



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1803
FACULTAD DE INGENIERÍA

**ACTIVIDAD PEROXIDASA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATINO
DISPERSABLES EN AGUA CON USO POTENCIAL EN BIOSENSORES**

Yeison Esteban Monsalve García

Trabajo de grado para optar por el título de ingeniero de materiales

Asesor

Jahir Orozco Holguín, PhD

Co-asesor

Andrés Felipe Cruz Pacheco, MSc

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Ingeniería de Materiales
Medellin, Antioquia, Colombia
2022

Cita	Monsalve García [1]
Referencia Estilo IEEE (2020)	[1] Y. Monsalve García, “ACTIVIDAD PEROXIDASA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATINO DISPERSABLES EN AGUA CON USO POTENCIAL EN BIOSENSORES”, Trabajo de grado profesional, Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia, 2022.

Grupo Tándem Max Planck en Nanobioingeniería



Centro de documentación de ingeniería

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.edua.edu.co>

Universidad de Antioquia – www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano/Director: Jesús Francisco Vargas Bonilla

Jefe departamento: Francisco Javier Herrera Builes

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo incondicional en mis años de formación personal y profesional. Al doctor Jahir Orozco Holguín y al MSc Andrés Felipe Cruz Pacheco, por su acompañamiento y guía en el desarrollo de este trabajo de investigación. Al Grupo Tándem Max Planck en Nanobioingeniería por el soporte económico a este trabajo, en el marco del convenio 566-1 2014 entre Minciencias, la Universidad de Antioquia y la Sociedad Max Planck. A EPM y a Ruta N por alojar los grupos Tándem.

Contenido

RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo General	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4. MARCO TEÓRICO.....	13
4.1 Biosensores catalíticos	13
4.2 Nanozimas o enzimas artificiales	14
4.3 Nanopartículas de platino como nanozima peroxidasa	16
4.4 Métodos de síntesis de nanopartículas de platino	16
4.5 Detección de glucosa en aplicaciones clínicas	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1 Revisión bibliográfica	19
5.2 Materiales	19
5.3 Síntesis de nanopartículas de platino	19
5.4 Caracterización estructural, química y morfológica de las nanopartículas	19
5.4.1 Difracción de rayos X (DRX)	19
5.4.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	20
5.4.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)	20
5.4.4. Dispersión electroforética de luz (ELS)	20
5.4.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	20
5.5 Determinación de actividad enzimática	20
5.6 Detección de glucosa.....	21
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	22
6.1 Caracterización de las nanopartículas de platino	22
6.2 Análisis cinéticos de mimetización de actividad enzimática	28
6.3 Detección de glucosa.....	33
7. CONCLUSIONES	37
8. ANEXOS.....	38
REFERENCIAS	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos derivados del análisis de difracción de rayos X.....	24
Tabla 2. Comparación de tamaños según los datos derivados de DRX, DLS y TEM.....	26
Tabla 3. Datos derivados del análisis de distribución de tamaño de la microscopía electrónica de transmisión	28
Tabla 4. Datos derivados del análisis de cinética enzimática.....	32
Tabla 5. Parámetros analíticos de la detección de glucosa.....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espectro de absorción UV-vis de las Nps de Pt@CS y Pt@PVP.....22
- Figura 2.** a) Patrones de DRX de las Nps de Pt. b) celda unitaria de Pt simulada con el programa VESTA.....23
- Figura 3.** Análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de las Nps de Pt estabilizadas con PVP (a) y con CS(b).....24
- Figura 4.** Análisis mediante dispersión dinámica de luz (a) y dispersión electroforética de luz (b) de las Nps de Pt@PVP y Pt@CS.....25
- Figura 5.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (A1 y B1), distribución de tamaño de de Nps realizado con el software ImageJ (A2 y B2) y espectros de energía dispersiva de rayos X (A3 y B3) de las Nps de Pt estabilizadas con PVP (A) y CS (B).....27
- Figura 6.** Ilustración esquemática de la actividad peroxidasa mimética de las Nps de Pt para la oxidación de TMB en presencia de H₂O₂ (a), valores medios de absorbancia (UV-Vis) para las Nps de Pt estabilizadas con PVP y CS con respecto a un control negativo sin Nps (b).....28
- Figura 7.** Dependencia de la absorbancia UV-vis (a 652 nm) de la reacción TMB/H₂O₂ catalizada por Nps de Pt@PVP en la concentración de (a) H₂O₂ (1 mM TMB) y (b) TMB (10 mM H₂O₂).....29
- Figura 8.** Velocidad de descomposición de distintas concentraciones de TMB (10 mM de H₂O₂) (a) y H₂O₂ (1 mM TMB) (c) catalizadas por Nps de Pt@PVP, con sus respectivas linealizaciones, TMB (b) y H₂O₂ (d).....30
- Figura 9.** Velocidad de descomposición de distintas concentraciones de TMB (10 mM de H₂O₂) (a) y H₂O₂ (1 mM TMB) (c) catalizadas por Nps de Pt@CS, con sus respectivas linealizaciones, TMB (b) y H₂O₂ (d).....31
- Figura 10.** Absorbancia UV-vis (a 652 nm) dependiente del tiempo de la reacción TMB/H₂O₂ catalizada por Nps de Pt@PVP.....33
- Figura 11.** Ilustración esquemática de la detección de glucosa gracias a la actividad peroxidasa mimética de las Nps de Pt para la oxidación de TMB en presencia de H₂O₂.....33
- Figura 12.** Curva de calibración para la detección de glucosa utilizando GOx y Nps de Pt@PVP como nanoperoxidasa. Condiciones del experimento: 103.2 nM de Nps de Pt; buffer de citrato de potasio 200 mM pH 4.0; tiempo de reacción 5 min 34
- Figura 13.** Determinación de la especificidad y selectividad de detección de glucosa (glucosa 8 mM, Manosa 32 mM, fucosa 32 mM y Galactosa 32 mM). Condiciones del experimento: 103.2 nM de Nps de Pt; buffer de citrato de potasio 200 mM pH 4.....35

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Pt	Platino
Nps	Nanopartículas
CS	Citrato de sodio
PVP	Polivinilpirrolidona
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
HRP	Peroxidasa de rábano
GOx	Glucosa oxidasa
LDD	Límite de detección
LDQ	Límite de cuantificación

RESUMEN

Las nanozimas basadas en nanomateriales inorgánicos con alta estabilidad y bajos costos de producción han surgido como una alternativa a las enzimas naturales en aplicaciones de detección de analitos de interés biomédico. En particular, las nanopartículas de platino se han propuesto en los últimos años como una nanozima innovadora que podría competir con las enzimas de tipo peroxidasa debido a su elevada reactividad química en la descomposición de peróxido de hidrógeno. En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de platino estabilizadas con citrato de sodio y polivinilpirrolidona mediante una ruta de química suave usando borohidruro de sodio como agente reductor. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por difracción de rayos X, dispersión dinámica y electroforética de la luz, microscopía electrónica de transmisión, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y de energía dispersiva de rayos X. La actividad peroxidasa de las nanopartículas de platino obtenidas con un tamaño de partícula de 3.2 nm se evaluó mediante ensayos de actividad enzimática siguiendo la reacción bisustrato de descomposición de peróxido de hidrógeno y oxidación de la tetrametilbencidina, determinando las constantes de afinidad y velocidades máximas de reacción. Con los parámetros catalíticos optimizados, las nanopartículas de platino recubiertas con polivinilpirrolidona se usaron para la detección colorimétrica de glucosa de forma indirecta usando el peróxido de hidrógeno generado en la reacción de oxidación de la enzima glucosa oxidasa. El método desarrollado mostró elevada selectividad en un rango lineal de concentración entre 2.3 y 25.0 mM, con un límite de detección de 1.1 mM. En general, la actividad catalítica superior de las nanopartículas de platino sintetizadas por una ruta de química suave tiene gran potencial para acoplarse en sistemas de detección de glucosa y otras moléculas de interés biomédico.

Palabras clave – biosensor catalítico, nanozima, nanopartícula, platino, cinética.

ABSTRACT

Nanozymes based on inorganic nanomaterials with high stability and low production costs have been proposed as an alternative to natural enzymes detection of analytes of biomedical interest. In particular, platinum nanoparticles have emerged in recent years as an innovative nanozyme that could compete with peroxidase-type enzymes due to their high chemical reactivity in the decomposition of hydrogen peroxide. In this work, platinum nanoparticles stabilized with sodium citrate and polyvinylpyrrolidone were synthesized by a soft chemistry route using sodium borohydride as a reducing agent. The obtained nanoparticles were characterized by X-ray diffraction, dynamic and electrophoretic light scattering, transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray dispersive energy. In addition, the peroxidase activity of the platinum nanoparticles obtained with a size of 3.2 nm particle was evaluated by enzymatic activity assays following the bisubstrate reaction of hydrogen peroxide decomposition and tetramethylbenzidine oxidation, determining the affinity constants and maximum reaction rates. Finally, with the catalytic parameters optimized, the polyvinylpyrrolidone-coated platinum nanoparticles were used to detect glucose colorimetrically and indirectly using the hydrogen peroxide generated in the oxidation reaction of the glucose oxidase enzyme. The developed method showed high selectivity in a linear concentration range between 2.3 and 25.0 mM, with a detection limit of 1.1 mM. The superior catalytic activity of platinum nanoparticles synthesized by a soft chemical route has great potential to be coupled in detection systems for glucose and other molecules of biomedical interest.

Keywords – catalytic biosensor, nanozyme, nanoparticle, platinum, kinetics.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de biosensores basados en enzimas de bajo costo, estables y portables es un desafío actual en diferentes aplicaciones ambientales, médicas o alimentarias. Normalmente, estos biosensores que utilizan enzimas para los procesos de reconocimiento molecular tienen varias desventajas, como el alto costo de producción, las condiciones de trabajo específicas y la dificultad de acoplarse a otras biomoléculas. En este sentido, las nanozimas o enzimas artificiales basadas en nanomateriales han atraído una atención particular debido a la capacidad de imitar las propiedades catalíticas y superar los inconvenientes inherentes de las enzimas naturales.

Dentro de la gran variedad de nanozimas estudiadas, las nanopartículas (Nps) de platino (Pt) se han propuesto como una alternativa eficiente a las enzimas naturales debido a su relevante actividad catalítica en procesos de descomposición de peróxido de hidrógeno y oxidación de diferentes sustratos. Sin embargo, la reactividad química de las Nps de Pt se ve influenciada por aspectos fisicoquímicos como su tamaño, morfología y condiciones propias de los procesos de síntesis como la temperatura, el medio de dispersión y los agentes estabilizantes. En este contexto, se estudiaron dos metodologías por rutas de química suave que permiten controlar factores estructurales, morfológicos y de superficie química de las Nps de Pt para maximizar la actividad catalítica en aplicaciones de detección de analíticos de interés clínico como la glucosa, por su importancia en el diagnóstico y monitorización de enfermedades como la diabetes en pacientes que presentan altas concentraciones de esta molécula en fluidos biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo General*

Evaluar la actividad peroxidasa de nanopartículas de platino recubiertas con agentes estabilizantes solubles en agua, mediante métodos colorimétricos.

2.2. *Objetivos específicos*

- Desarrollar una metodología en fase acuosa para la síntesis de nanopartículas de platino recubiertas con citrato de sodio y polivinilpirrolidona como agentes estabilizantes.
- Estudiar las propiedades estructurales, morfológicas y químicas de las nanopartículas obtenidas mediante las técnicas de difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.
- Analizar la influencia del agente estabilizante en la actividad peroxidasa de las nanopartículas sintetizadas mediante ensayos colorimétricos por espectrofotometría ultravioleta-visible.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de biosensores de bajo costo que se puedan usar en el punto de atención, se ha convertido en un desafío actual para la detección y monitorización de enfermedades [1], en el procesamiento y control de calidad de alimentos [2], en biodefensa de ataques biológicos [3], ingeniería metabólica [4] y en biología vegetal [5]. Los biosensores que normalmente utilizan estrategias basadas en enzimas para detectar moléculas de interés en el campo biomédico por métodos ópticos tienen varias desventajas, como el alto costo de producción, las condiciones de trabajo específicas y la dificultad de generar respuestas confiables sin el uso de instrumentación robusta [6]. En este sentido, las nanozimas o enzimas artificiales basadas en nanomateriales han atraído atención particular debido a la capacidad de imitar las propiedades catalíticas y superar los inconvenientes inherentes de las enzimas naturales [7].

De la gran cantidad de nanozimas que se han investigado para imitar la actividad peroxidasa, las Nps de Pt han merecido especial atención [8], [9], debido a su comportamiento químico en la descomposición eficiente de peróxido de hidrogeno y la subsecuente oxidación de sustratos electroactivos y cromogénicos como la tetrametilbenzidina (TMB) en reacciones de transferencia de electrones en un solo paso, similar al mecanismo usado por enzimas peroxidasa [10], [11]. Esta actividad peroxidasa de las Nps de Pt se ve influenciada por el tamaño, la forma, la química de la superficie y parámetros externos como el pH y la temperatura, lo cual, juega un papel crucial en su aplicación en dispositivos biosensores [12]. Por lo tanto, modular estas variables mediante el uso de agentes estabilizantes solubles en agua y métodos de síntesis de reducción suave, fáciles y rápidos; que superen los problemas de las síntesis convencionales como el requerimiento de reactores, la utilización de agentes estabilizantes hidrofóbicos y la obtención de producto tóxicos [13], permitirá integrar estas nanozimas de Pt a sistemas biosensores altamente eficientes en solución acuosa.

4. MARCO TEÓRICO.

4.1 Biosensores catalíticos

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un biosensor se define como un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células para detectar compuestos químicos o biológicos, generalmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas, etc [14]. Estos dispositivos analíticos convierten interacciones biológicas en señales cuantificables que son altamente específicas, en condiciones de pH y temperatura en los cuales la detección sea favorable [15].

Los biosensores convencionales están compuestos por una molécula de reconocimiento biológico que interacciona selectivamente con un analito [16]. Los elementos principales de un biosensor incluyen; a) un elemento biológico sensible como bioreceptor que puede ser tejido, microorganismos, receptores celulares, enzimas, proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, entre otros; b) un transductor de tipo óptico, piezoeléctrico, electroquímico o térmico que transforma la señal resultante de la interacción del analito con el elemento biológico en una señal cuantificable y c) un componente electrónico o un procesador de las señales asociadas, los cuales ilustran los resultados de la medición [17]. Una forma convencional de detectar analitos en muestras líquidas se basa en el uso de elementos biocatalíticos, generalmente enzimas, que interaccionan específica y selectivamente con su sustrato [18]. Parámetros como el límite de detección (LDD), que se refiere a la cantidad mínima de analito que puede reconocer el sensor, el límite de cuantificación (LDQ), que expresa la cantidad de analito que detecta el sistema; la sensibilidad, que ilustra la señal de respuesta a un analito en función de su concentración; y la selectividad, que es la capacidad del biosensor para discriminar el objetivo de otras especies presentes en la muestra de análisis; son fundamentales en el momento de evaluar la eficacia de un sistema biosensor [19].

En los sensores biocatalíticos el proceso de detección se realiza mediante el uso de enzimas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores en reacciones químicas aumentando las velocidades de reacción [20]. Su alta especificidad por diferentes tipos de sustratos y su eficacia catalítica en dichas reacciones, hacen que las enzimas tengan aplicaciones en campos tan variados como el procesamiento de alimentos, la agricultura, la industria química y la medicina [21]. A pesar de lo mencionado anteriormente, estas macromoléculas poseen limitaciones intrínsecas asociadas al alto costo de producción y condiciones de trabajo restringidas, que han promovido el desarrollo de sistemas basados en enzimas artificiales [22]. De los avances llevados a cabo para la obtención de sistemas que imiten las propiedades de las enzimas y superen las limitaciones mencionadas, han surgido las enzimas miméticas basadas en nanomateriales o nanozimas [23]. Una de las estrategias fisicoquímicas para seguir los procesos de detección más comunes en este tipo de biosensores basados en nanozimas es por medio de técnicas colorimétricas, las cuales se basan en cambios de las propiedades ópticas de la solución o de la nanozima en respuesta a los cambios físicos o químicos producidos en el reconocimiento molecular [24]. De este modo, el desarrollo de biosensores basados en nanozimas, es una

tendencia en la fabricación de dispositivos sensores de bajo costo, con alta estabilidad y rendimiento analítico superior [25].

4.2 Nanozimas o enzimas artificiales

Las nanozimas son nanomateriales que demuestran características intrínsecas similares a las de las enzimas, logrando combinar las ventajas de estas últimas y los catalizadores químicos; la base de la actividad catalítica de estos sistemas se encuentra en su naturaleza química, ya que tienen la capacidad de promover reacciones de oxidación y reducción en diferentes ambientes [26]. Las nanozimas se pueden sintetizar y modificar químicamente para las aplicaciones requeridas utilizando metodologías simples que permiten la producción en masa y de bajo costo con la posibilidad de reemplazar o competir con las enzimas naturales [27], además las nanozimas soportan condiciones de temperatura, pH y medio de dispersión en donde las enzimas no podrían aplicarse [28].

El tamaño, forma, morfología y recubrimiento de la superficie, además del pH, la temperatura de trabajo y la composición atómica han sido el conjunto de factores determinantes en el rendimiento catalítico de las nanozimas [29]. La ventaja más importante de las nanozimas es su actividad dependiente del tamaño y la composición, lo cual permite el diseño de materiales con una amplia gama de actividad catalítica simplemente variando la forma, la estructura y la composición. Las nanozimas también tienen propiedades únicas en comparación con otras enzimas artificiales, incluidas grandes áreas de superficie que facilitan significativamente su posterior modificación y bioconjugación [30]. A diferencia de las enzimas naturales, que suelen exhibir alta actividad catalítica y selectividad por el sustrato involucrado en la reacción química, las nanozimas normalmente tienen la desventaja de presentar actividades relativamente bajas, con poca especificidad además de imitar tipos de enzimas muy limitados; es por esto que se adelantan esfuerzos para mejorar el rendimiento de estos nanomateriales, haciendo énfasis en la selectividad de sustratos particulares [31].

Las nanozimas se pueden clasificar en función de su composición química, según estén basadas en nanoestructuras metálicas [32], óxidos metálicos [33], varias formas alotrópicas de carbono [34], dendrímeros [35], puntos cuánticos semi-conductores [36] y materiales conjugados, entre estos sistemas [37], [38]. Otra forma de clasificar estos nanomateriales es según su función enzimática hacia un sustrato característico, como se detalla a continuación:

- **Nanozimas de tipo peroxidasa**

Las peroxidas consisten en una amplia familia de enzimas que catalizan la oxidación de su sustrato con peróxido, en la mayoría de las ocasiones peróxido hidrógeno (H_2O_2). A través de su catálisis, las peroxidas desempeñan funciones importantes en los sistemas biológicos, como la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (con glutatión peroxidasa) y la defensa contra patógenos (con mieloperoxidasa). La peroxidasa de rábano (HRP) se ha utilizado ampliamente en química bioanalítica y clínica, donde generalmente se emplea como marca unida a un elemento biológico de captura, como anticuerpos de detección en ensayos por

inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Las HRP cataliza la degradación de H_2O_2 y oxidación de TMB en una reacción bisustrato generando una solución coloreada que se puede seguir por espectrofotometría UV-Vis y por métodos electroquímicos, de esta manera la detección de los analitos se realiza de forma indirecta [39]. En general, las nanozimas peroxidasas han sido las más estudiadas y se han empleado en múltiples estrategias de detección por las facilidades que ofrecen en términos de afinidad con sistemas electroquímicos y ópticos [6].

- Nanozimas de tipo oxidasa

Las oxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de los enlaces C-N y C-O en presencia de oxígeno molecular, que se reduce a peróxido de hidrogeno [40]. Las tres clases principales de sustratos para este tipo de enzimas son los aminoácidos, las aminas y los alcoholes [41]. Las nanozimas oxidasas como el oro (Au), el platino (Pt), el paladio (Pd), el cobre (Cu), óxido de titanio (TiO_2), el óxido de cobre (CuO), el óxido de cerio (CeO_2) y el óxido de manganeso (MnO_2), han sido utilizados en aplicaciones catalíticas de tipo oxidasa debido a sus propiedades de superficie química catalizando la oxidación de diferentes tipos de sustratos (como donantes de electrones) al producto oxidado correspondiente en presencia de O_2 (como aceptor de electrones) en diferentes ambientes [42].

- Nanozimas de tipo superóxido dimutasa (SOD)

Las superóxido dimutasas son enzimas que se distribuyen principalmente en microorganismos, plantas y animales. La nanozima superóxido dimutasa provee productos de reducción del oxígeno en el ambiente, incluidos los radicales de oxígeno y ciertos agentes oxidantes [43]. Aunque se ha demostrado que nanomateriales como formas alotrópicas del carbono, nanopartículas de Au y Pt e híbridos entre estas [44], poseen esta actividad, los principios subyacentes no están totalmente claros, lo que ha dificultado el descubrimiento de nanomateriales diferentes a los mencionados [45].

- Nanozimas de tipo catalasa

La catalasa cataliza la descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2 [46]. Las nanozimas catalasas actúan como receptores de electrones en la reacción de descomposición de H_2O_2 ; en ese sentido, los nanomateriales utilizados para mimetizar esta actividad son nanopartículas de Au y de Pt, además se han utilizado algunos óxidos metálicos como el CeO_2 , el óxido de hierro (Fe_3O_4), el óxido de cobalto (Co_3O_4) y el MnO_2 [47].

- Nanozimas de tipo lacasa

Las lacasas catalizan la oxidación de varios compuestos aromáticos, predominantemente fenoles, y la reducción de O_2 para formar H_2O . Entre los nanomateriales más utilizados para este propósito están las estructuras metal-orgánicas en cobre coordinado con diferentes grupos fosfato [6].

La clasificación según el tipo de actividad, no es discriminativa entre sí, de esta forma se pueden encontrar nanomateriales que exhiben diferentes actividades de acuerdo con el ambiente químico en el que se encuentren [48].

4.3 Nanopartículas de platino como nanozima peroxidasa

Las Nps de Pt han sido ampliamente utilizadas como nanozimas peroxidasa ya que catalizan diferentes tipos de reacciones, siendo la descomposición de H_2O_2 la más significativa [49], [50]. Las Nps de Pt actúan como catalizadores en reacciones de oxidación y reducción de sustratos electroactivos y cromogénicos como el TMB en presencia de H_2O_2 [51], [52]. Las reacciones de oxidación de TMB se pueden aprovechar de forma directa o indirecta en procesos de detección de diferentes tipos de analitos de interés biomédico mediante el seguimiento de los cambios de absorbancia en la región del espectro visible característica del TMB oxidado cuando el H_2O_2 está presente en el medio de reacción de la nanozima [53]. La actividad peroxidasa de las nanozimas de Pt se puede afectar por diferentes factores como lo son la temperatura, la concentración, el pH y aspectos relacionados a la química de superficie [54]. Además, la actividad peroxidasa se aprovecha ampliamente en diferentes industrias como catalizador [55], gracias al control de parámetros como el tamaño, la forma y diferentes agentes estabilizantes que les permiten ser estables en dispersiones coloidales y acuosas [10], [56]–[58].

4.4 Métodos de síntesis de nanopartículas de platino

Hay una gran variedad de métodos químicos de síntesis empleados para la obtención de Nps de Pt, donde el medio de dispersión y los agentes estabilizantes juegan un papel importante en las propiedades fisicoquímicas y catalíticas de las mismas [59]. Las actividades de las nanozimas dependen en gran medida de la estructura química, el tamaño de las partículas, la forma y la morfología de la superficie, que podrían afectarse por cargas, recubrimientos, dopajes, y campos externos. La morfología de las nanozimas sintetizadas se puede controlar gracias al rápido desarrollo de las técnicas experimentales. Algunos métodos usados para la síntesis se mencionan a continuación:

- **Método de co-precipitación**

El método de co-precipitación consiste en la formación de nanoestructuras mediante la adición de una base lo suficientemente fuerte como para causar la reducción y posterior precipitación de los sistemas. La co-precipitación es un método rápido para la síntesis de diferentes tipos de nanopartículas de platino, además es una excelente opción cuando se requiere una mayor pureza y un mejor control estequiométrico, con una distribución de tamaño controlada para morfologías de superficie específicas. La mayor fortaleza del método se basa en la obtención de nanoestructuras híbridas, como por ejemplo la obtención de nanosatélites de Pt-CeO₂ sobre nanotubos de carbono; en este caso las sales precursoras de los dos metales en presencia de las estructuras de carbono como sitios de nucleación se reducen mediante la adición del agente reductor, generando nanoestructuras con morfologías y tamaños controlables [60].

- **Método Hidrotermal**

En este método, la formación de nanopartículas puede darse en un amplio rango de temperaturas, desde temperatura ambiente hasta la temperatura de fusión de los constituyentes, además se pueden utilizar condiciones de alta o baja presión, dependiendo de la presión de vapor de la composición principal en la reacción [61]. En la síntesis hidrotermal las propiedades características de las nanozimas de platino obtenidas se pueden modificar fácilmente mediante

el control de la temperatura, de esta forma se pueden obtener tamaños de partícula pequeños lo que propicia un aumento del área de superficie y de sitios disponibles para la catálisis. Por ejemplo la reducción eficaz asistida por temperatura y control de medio de dispersión permite obtener Nps de Pt con control de tamaño, monodispersidad, estabilidad y funcionalidad [62].

- Síntesis “verde”

En las que se utilizan diferentes extractos naturales como método amigable con el medio ambiente al eliminar los agentes químicos tóxicos y los grandes consumos energéticos, mediante la utilización de agentes reductores naturales y solventes ecológicos, como el agua y el etanol. Un ejemplo destacable de nanopartículas de platino obtenidas mediante estas metodologías, es el logrado mediante la reducción con un surfactante biodegradable que se produce de forma natural en un grupo de plantas como las ‘Saudi’s Dates’, de las cuales se utilizaron Ajwa y Barni como agentes reductores naturales a temperatura ambiente. El producto fue Nps monodispersas y sin usar temperatura en el proceso [63].

- Método Sol-gel

En este método se da la mezcla de los precursores en una solución que se somete a ciclos de temperatura hasta la producción de un gel, asegurando la distribución homogénea de los cationes en la red [64]. El gel resultante se trata térmicamente hasta la consolidación de la estructura deseada. La cristalinidad, la morfología y las propiedades catalíticas de las nanozimas se pueden controlar de acuerdo con el agente complejante, la concentración y el tipo de aditivos químicos y las condiciones de temperatura apropiados. Un ejemplo destacable es la obtención de Nps de Pt de alta densidad que se cargaron homogéneamente en la matriz nanoestructurada tridimensional (3D) del hidrogel de polianilina. La estructura porosa del hidrogel de polianilina favoreció la inmovilización de alta densidad de la enzima y la penetración de moléculas hidrosolubles, lo que ayudó a catalizar eficientemente la reacción enzimática [65].

- Métodos de síntesis suaves.

La principal característica de las síntesis suaves radica en la obtención de Nps sin la utilización de altas temperaturas y presiones, en este método una sal iónica del metal se reduce en un medio apropiado en presencia de una molécula estabilizante. La reducción química es el método más utilizado debido a su rapidez y sencillez. Esta técnica permite producir Nps en las que la morfología y la distribución del tamaño de las partículas se controlan cambiando la concentración molar de los reactivos y el tipo de reductor. El factor crítico para lograr una alta reducción química es elegir los reductores apropiados [66]. Las Nps de Pt obtenidas por este método, tiene la ventaja de ser monodispersas, con tamaños y formas específicas, bajo condiciones de temperaturas y presiones de laboratorio, además de evitar el uso de reactivos tóxicos y productos con baja biocompatibilidad [67]. Como se ha reportado, la sal precursora del metal se somete a procesos de reducción en presencia de agentes reductores fuertes como el borohidruro de sodio (NaBH_4) y diferentes agentes estabilizantes, que en conjunto propician la nucleación y crecimiento controlado de las Nps, generando productos con alta dispersabilidad en agua [68] y comportamientos efectivos para la mimetización de enzimas peroxidadas [69].

4.5 Detección de glucosa en aplicaciones clínicas

Las concentraciones de glucosa en tejidos y fluidos biológicos están reguladas por el equilibrio homeostático dentro de un cierto rango que puede verse alterado por una patología, como la diabetes [70]. Por lo tanto, muchas investigaciones han intentado construir herramientas analíticas beneficiosas para monitorizar los niveles de glucosa en pacientes con diabetes; tales como los glucómetros, los cuales se utilizan para medir la cantidad de glucosa en sangre [71]. Las metodologías estándar para realizar los procesos de detección de glucosa involucran el seguimiento de H_2O_2 luego de la producción del mismo y ácido glucónico debido a la oxidación catalítica de glucosa por la enzima glucosa oxidasa (GOx) [72].

Por lo tanto, la concentración de glucosa se puede medir indirectamente al analizar el nivel de H_2O_2 . Para este fin se han utilizado varias enzimas y nanozimas peroxidadas en ensayos de detección colorimétricos usando sustratos cromogénicos como TMB [73], [74], [75]. Cuando las nanozimas se usan en este tipo de metodologías, el desempeño de los nanosistemas se ve significativamente influenciado por la dispersión de las nanopartículas en la solución, lo cual es un limitante para nanoestructuras pequeñas como las Nps de Pt, ya que suelen formar aglomerados. En ese sentido, en la actualidad se requieren nanozimas peroxidadas de Pt altamente dispersables en agua y con una alta reactividad química que pueda favorecer los procesos de detección de glucosa por métodos ópticos de manera más eficiente, para generar métodos de detección alternativos, sencillos y confiables en el campo clínico.

5. METODOLOGÍA

5.1 Revisión bibliográfica

Se buscó información actualizada sobre el tema de investigación a través de Google Académico, Science Direct, Scopus, Springer y Royal Society of Chemistry. La búsqueda se centró en la obtención de nanopartículas de platino con las características requeridas, la medición de su actividad catalítica y la detección de glucosa utilizando las mismas nanopartículas. Esto se hizo utilizando palabras clave como, “Platinum nanoparticles”, “peroxidase nanozyme”, “catalytic activity”, “enzymatic activity”, “glucose detection”, entre otras.

5.2 Materiales

El citrato de sodio tribásico monohidratado (CS) se adquirió en PanReac AppliChem y la 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) en la compañía Merck. El peróxido de hidrógeno 30% en peso (H_2O_2) se obtuvo en Bioquigen. El ácido cloroplatínico hidratado 36.7 % ($H_2PtCl_6 \cdot xH_2O$), la polivinilpirrolidona (PVP) de peso molecular promedio 40000 Dalton, el borohidruro de sodio ($NaBH_4$) >98%, la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (GOx), la D-glucosa >99.5 %, la D-manosa, la D-galactosa > 99%, la L-fucosa, el citrato de potasio tribásico monohidratado (CP) y los reactivos para la preparación del buffer fosfato 10 mM pH 7.4 (fosfato de sodio dibásico >99% y fosfato de sodio monobásico 99%) se adquirieron en la compañía Sigma Aldrich.

5.3 Síntesis de nanopartículas de platino

Las NPs de Pt en dispersión coloidal se sintetizaron de acuerdo con reportes previos [69], [76], [77]. En un Erlenmeyer de 50 mL se solubilizaron 2.4 mM de $H_2PtCl_6 \cdot xH_2O$ y 6 mM de CS o 44 μ M de PVP de 40000 Dalton en 20 mL de agua desionizada. La mezcla se agitó magnéticamente a 500 rpm y a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se agregó 2.4 mM de $NaBH_4$ y se mantuvo en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 120 min. La dispersión de Nps de Pt de color café se almacenó a 4°C. Las Nps de Pt recubiertas con CS y PVP se denominan a partir de ahora como Pt@CS y Pt@PVP.

5.4 Caracterización estructural, química y morfológica de las nanopartículas

5.4.1 Difracción de rayos X (DRX)

Los parámetros cristalográficos de las Nps sintetizadas se analizaron mediante DRX en un difractómetro de rayos X Rigaku MiniFlex 600, entre 35 y 75°, con pasos de 0.01°, usando una radiación de Cu ($\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$), con un voltaje de 40 kV y una corriente de 15 mA. Se utilizó el software Xpert Highscore 2.0 para identificar la estructura cristalina de las NPs obtenidas por comparación con bases de datos cristalográficas.

5.4.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La identificación de los grupos funcionales característicos de los agentes estabilizantes que recubren las Nps de Pt se analizaron en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier FTIR Nicolet™ iS50™ de ThermoScientific empleando el método de ATR (reflectancia total atenuada). Las dispersiones de Nps se secaron a 50 °C por 12 h y el sólido obtenido se homogenizo para realizar la medición.

5.4.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se determinó utilizando un ZetaSizer Pro Malvern con cubetas cuadradas de poliestireno de 12 mm de diámetro exterior. La preparación de la muestra consistió en diluir las Nps (1:10) en agua desionizada, y depositarlas en la cubeta. Las mediciones se realizaron por triplicado.

5.4.4. Dispersión electroforética de luz (ELS)

La carga superficial de las Nps se midió utilizando un ZetaSizer Pro Malvern con celdas capilares de poliestireno equipadas con resistencias. La preparación de la muestra consistió en una dilución de 1:10 de las Nps obtenidas en agua desionizada. La dilución se depositó en la cubeta limpia y la medida se realizó por triplicado.

5.4.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión se tomaron con un microscopio de transmisión Tecnai F20 Super Twin TMP de FEI. La preparación de la muestra consistió en una dilución de 1:10 de las Nps obtenidas en agua y desionizada (tipo II), esta dilución fue sonicada y depositada en una rejilla de cobre.

5.5 Determinación de actividad enzimática

La medición actividad peroxidasa de las Nps de Pt se llevó a cabo a temperatura ambiente usando 10 µL de Nps de Pt@CS y Pt@PVP (103.2 nM) y 90 µL de un buffer de reacción (0.2 M citrato de potasio, pH 4) en presencia de 1 mM de TMB disuelto en DMSO y 10 mM de H₂O₂. La reacción de oxidación de TMB se monitoreó en modo de barrido a una longitud de onda de 652 nm en función del tiempo usando un lector de microplacas multimodo Varioskan™ LUX de ThermoScientific. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los ensayos cinéticos de estado estacionario se llevaron a cabo utilizando las condiciones estandarizadas descritas en el párrafo anterior, pero variando las concentraciones de H₂O₂ (2-12 mM) a una concentración fija de TMB (1 mM), y viceversa para la variación de concentración de TMB (0.2-1.2 mM) a una concentración fija de H₂O₂ (10 mM). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los parámetros cinéticos aparentes se calcularon considerando una reacción catalítica enzimática típica adaptada al caso de las nanozimas de Nps de Pt [78]:



Donde E representa la enzima (Nps de Pt), S representa el sustrato (TMB y H₂O₂), ES representa el aducto entre enzima (Nps de Pt) y sustrato (TMB y H₂O₂) y P representa el producto. La ecuación de Michaelis-Menten para la descripción del sistema catalítico es:

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

En esta ecuación, V₀ es la velocidad de conversión de sustrato a producto, V_{max} es la velocidad máxima de conversión, [S] es la concentración de sustrato y K_m es la constante de Michaelis-Menten. Con la finalidad de calcular más fácilmente los parámetros mencionados se hace uso de diferentes métodos de linealización, como el de Lineweaver-Burk, el de Hanes-Woolf y el de Eadie-Hofstee para calcular los parámetros K_m y V_{max}, utilizando las siguientes ecuaciones, respectivamente:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

$$\frac{[S]}{V_o} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (4)$$

$$V_o = -K \frac{V_o}{[S]} + V_{max} \quad (5)$$

5.6 Detección de glucosa

La detección de glucosa se realizó de la siguiente manera: (a) 2 μL de 20 mg/mL de glucosa oxidasa (GOx) y 20 μL de glucosa de diferentes concentraciones (2-14 mM) en buffer fosfato 10 mM se incubaron a 37 °C por 1 hora; (b) 10 μL de Nps de Pt@PVP (103.2 nM), 168 μL de un buffer de reacción (0.2 M citrato de potasio, pH 4) en presencia de 1 mM TMB se añadieron en la solución de reacción de 22 μL de GOx-glucosa; finalmente se midió la absorbancia de la mezcla en modo de barrido a una longitud de onda de 652 nm en función del tiempo usando un lector de microplacas multimodo Varioskan™ LUX de Thermoscientific. El control de la detección de glucosa se realizó haciendo un blanco de reacción con las mismas concentraciones utilizadas, pero sin glucosa. Los análisis de especificidad y selectividad se realizaron con 32 mM de manosa, fucosa y galactosa como interferentes de forma individual y mezclados todos con y sin 8 mM de glucosa. Los ensayos se realizaron por duplicado.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Caracterización de las nanopartículas de platino

Los espectros UV-Vis observados en la Figura 1, corresponden a H_2PtCl_6 y a las Nps estabilizadas con PVP y CS. Luego de los 120 min de reacción en presencia de NaBH_4 , no se observó el máximo de absorbancia inicial de las correspondientes transiciones electrónicas de la sal precursora de Pt, lo cual es un indicativo de la total reducción de Pt^{4+} a Pt^0 . Por ende se afirma que 120 min fue suficiente para la reducción completa de iones de Pt y la formación de Nps, afirmación que se hace con base en los espectros UV-Vis típico de las Nps de Pt (Figura 1 en rojo y azul), los cuales no presentan bandas de absorción el rango UV-Vis [79].

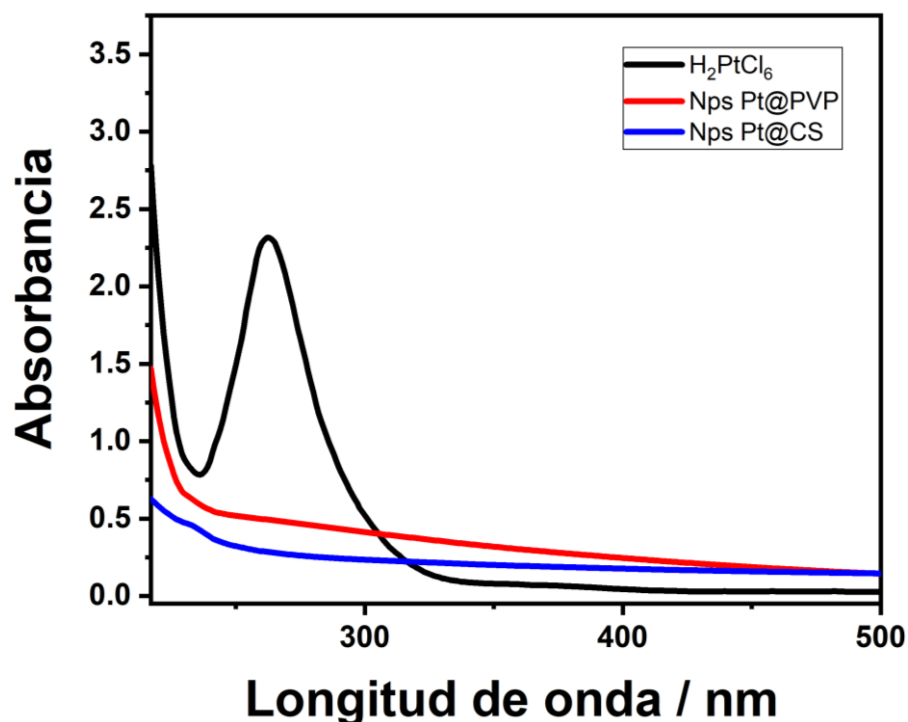
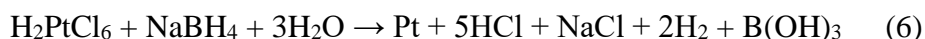


Figura 1. Espectro de absorción UV-vis de las Nps de Pt@CS y Pt@PVP

La concentración de Pt^0 se estimó a partir de la concentración de Pt^{4+} presente en H_2PtCl_6 de la solución inicial de reacción, afirmación apoyada por la Figura 1 donde se nota que el Pt^{4+} se redujo a átomos de Pt^0 en un 100%. En este sentido, se pudo realizar un cálculo estequiométrico basado en la ecuación 6, en el que se adujo que por 1 mol que reaccionaba de H_2PtCl_6 , se producía 1 mol de Pt^0 ; estimando una concentración de este último de $468.9 \mu\text{g/mL}$ de Pt en dispersión.



La Figura 2a muestra los difractogramas correspondientes a las Nps de Pt estabilizadas con CS (azul), PVP (roja), y el patrón de difracción de Pt teórico (JCPDS No: 76153). Los picos de difracción característicos de Pt se muestran en 39° , 46° y 67° correspondientes a los planos cristalinos (111), (200) y (220), respectivamente. Las Nps presentan un sistema cristalino

cubico, con un volumen de celda igual a 0.06 nm^3 y un parámetro de red $a=b=c$ de 0.392 nm . La estructura cristalina mostrada en la Figura 2b se simuló con el programa de visualización 3D para modelos estructurales VESTA.

El ancho de los picos de difracción en los DRX obtenidos se asoció al pequeño tamaño de las Nps, debido a que según lo reportado, la obtención de Nps de tamaños inferiores a 10 nm da como resultado estructuras nanocristalinas con una red altamente ordenada [80]. Por lo tanto, al incidir radiación con una longitud de onda que es inferior solo por aproximadamente un orden de magnitud, el pico no se alcanza a resolver a un ángulo específico [81].

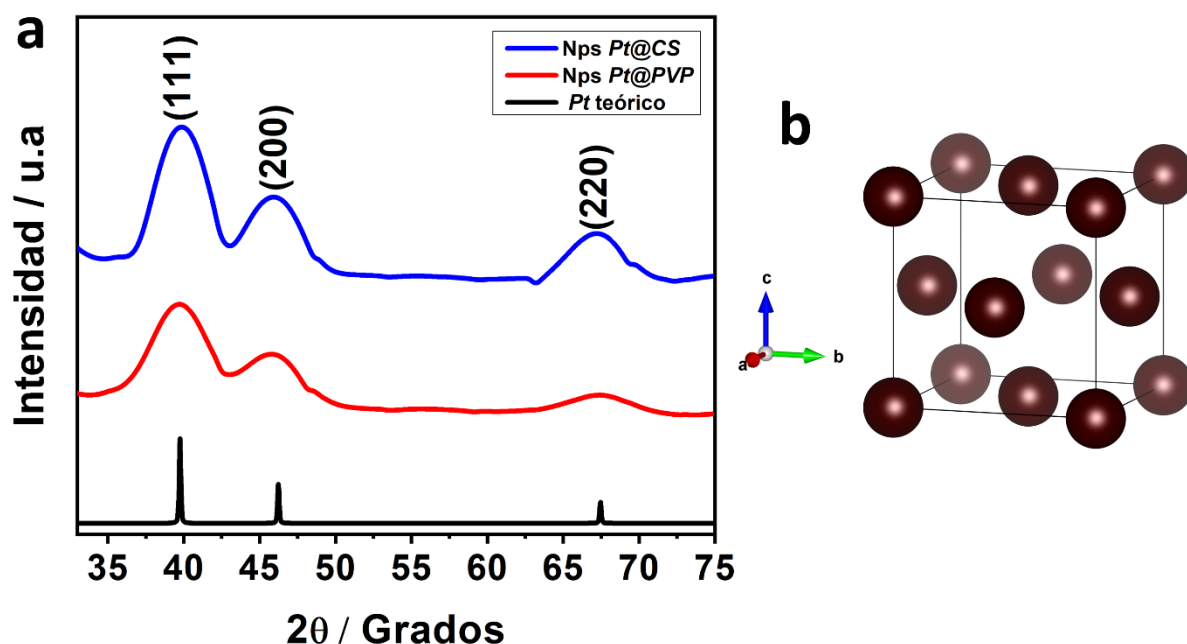


Figura 2. a) Patrones de DRX de las Nps de Pt. b) celda unitaria de Pt simulada con el programa VESTA.

El tamaño de los dominios cristalinos se calculó con la ecuación de Debye-Scherrer teniendo en cuenta el pico de mayor intensidad como se muestra a continuación [82]:

$$L_{(111)} = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (7)$$

Donde k es igual a 0.9 y corresponde a un factor geométrico asociado a la forma de la nanopartícula, λ es igual a 1.541 \AA y se refiere a la longitud de onda de la fuente, β es el ancho total a la mitad del pico máximo en radianes y θ es el ángulo de Bragg del pico máximo en radianes. Los resultados derivados del análisis de DRX se resumen en la tabla 1. Los tamaños de los dominios cristalinos de las Nps de Pt@CS y Pt@PVP son de 7.0 y 6.7 nm , respectivamente.

Tabla 1. Tamaño de los dominios cristalinos de las NPs de Pt derivados del análisis de difracción de rayos X

Muestra	θ (°)	β	$L_{(111)}$ / nm
Pt@CS	19.95	0.0208	7.0
Pt@PVP	19.79	0.0219	6.7

El análisis de los grupos funcionales característicos de las nanopartículas sintetizadas y recubiertas con CS y PVP se realizó por FTIR. La Figura 3a muestra el espectro FTIR de las Nps de Pt@PVP, en el cual se observa una señal a 1274 cm^{-1} que se asocia a la vibración de estiramiento del enlace C-N [83]. Del mismo modo se muestra un pico a 1425 cm^{-1} perteneciente a enlaces de estiramiento del grupo C-H [84], a 1672 cm^{-1} se presenta el modo vibracional de estiramiento correspondiente al enlace de C=O [84], característico del PVP. La señal a 2923 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del grupo CH_2 presente en la cadena polimérica del PVP [83]. Por último, el pico a 3253 cm^{-1} se asocia al grupo OH de agua remanente en la muestra preparada para la medición. De igual modo, la Figura 3b muestra los picos característicos de diferentes modos vibracionales asociados a la molécula de CS, a 1214 cm^{-1} se observa el pico perteneciente al enlace C-H presente en la cadena de esta molécula [85], las señales a 1384 cm^{-1} y 1737 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de estiramiento y flexión del grupo C-O del grupo ácido carboxílico [86], para este mismo grupo en el espectro de la misma figura aparece el estiramiento C=O a 1586 cm^{-1} . Por último, se observa el pico de estiramiento asociado al grupo OH a 3413 cm^{-1} [87] de una forma más pronunciada.

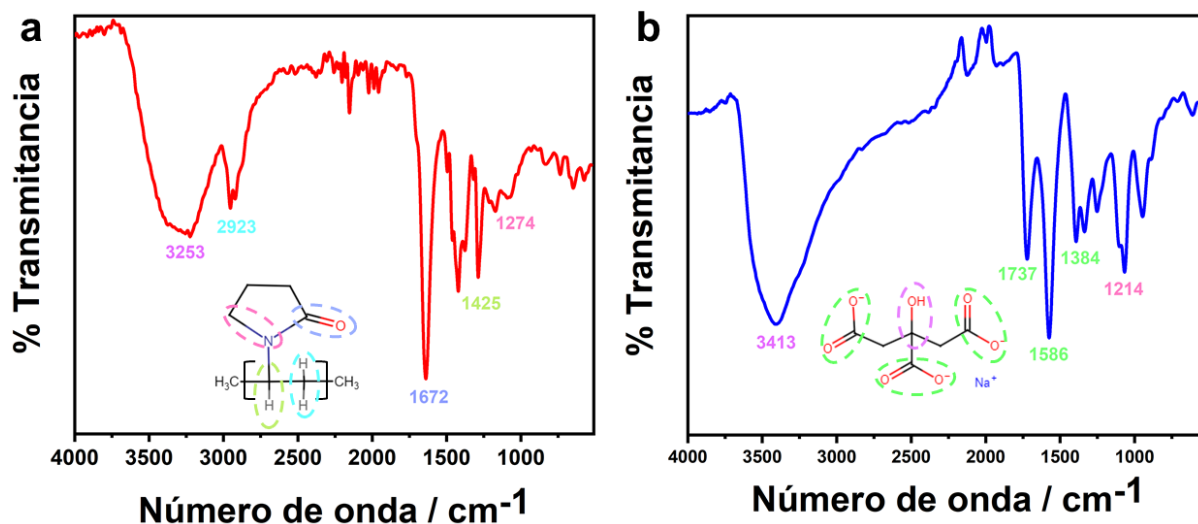


Figura 3. Análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de las Nps de Pt estabilizadas con PVP (a) y con CS (b)

El tamaño de las Nps en dispersión se estudió por dispersión dinámica de luz (DLS). DLS permite medir el radio hidrodinámico de las Nps en dispersión cuantificando su movimiento

por difusión mediante las fluctuaciones de intensidad de la señal de luz dispersada por las Nps en intervalos de tiempo muy cortos utilizando una sistema de autocorrelación [86].

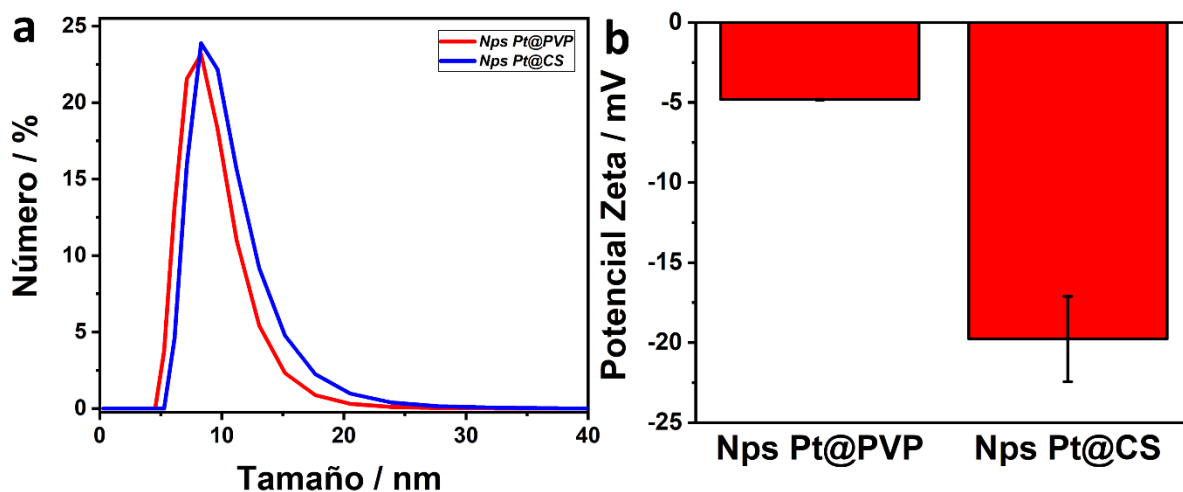


Figura 4. Análisis mediante dispersión dinámica de luz (a) y dispersión electroforética de luz (b) de las Nps de Pt@PVP y Pt@CS

La Figura 4a muestra la distribución de tamaños hidrodinámicos de las Nps estabilizadas con PVP (rojo) y CS (azul), mediante un conteo de porcentaje en número como indicativo de la proporción relativa del número de partículas de diferentes tamaños. Las Nps Pt@PVP y las Pt@CS poseen una distribución monomodal de tamaños hidrodinámicos en promedio de 8.3 ± 0.0 y 7.9 ± 1.4 para Pt@CS y Pt@PVP, respectivamente. Las mediciones se realizaron por triplicado. La distribución de tamaños de partícula obtenida por DLS son mayores a los obtenidos por DRX debido a la doble capa que rodea las Nps en dispersión coloidal. Éste es un segundo indicativo del tamaño de partícula obtenido, donde se observa que las Nps de Pt@CS tienen un tamaño mayor que las Nps de Pt@PVP, consistente con los resultados de análisis de difracción de rayos X.

La Figura 4b muestra una medida de la carga eléctrica efectiva en la superficie de las Nps. Las Nps Pt@PVP presentan una carga de -4.81 ± 0.02 mV, relacionada con una pequeña interacción electrostática con moléculas de agua en la dispersión. Es relevante mencionar que la PVP que recubre a las NPs de Pt no presenta cargas electrostáticas, por tal motivo muestra un valor de potencial zeta cercano a 0 [84]. Por lo contrario las NPs de Pt@CS presentan una carga de -19.8 ± 2.7 mV que coincide con las cargas aniónicas presentes en la molécula de CS que se encuentran estabilizando la NP [88].

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión que se muestran en la Figura 5A1 y B1 denotan formas esféricas y monodispersas para las Nps estabilizadas con PVP (A) y CS (B). El conteo realizado con el software ImageJ utilizó tres imágenes para cada tipo de Np con una población de 200 Nps en cada imagen. Las Nps de Pt@CS y Pt@PVP tienen un tamaño promedio de 3.24 ± 0.71 y de 3.21 ± 0.65 nm, respectivamente, con formas altamente homogéneas. La Figura 5C1 y C2 muestra el análisis de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, donde se aprecia que en las muestras (A) y (B) están en una alta relación con

respecto a los átomos de Pt. Los tamaños obtenidos por TEM confirman los análisis de DRX con el tamaño promedio del cristal con base en el ancho a la mitad del pico de mayor intensidad correspondiente al plano (111), y los ensayos de DLS correspondiente al tamaño hidrodinámico de las Nps. Esta información se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de tamaños según los datos derivados de DRX, DLS y TEM

Muestra	Pt@CS	Pt@PVP
<i>Tamaño promedio del cristal (DRX/nm)</i>	7.0	6.7
<i>Tamaño hidrodinámico (nm)</i>	8.3 ± 0.0	7.9 ± 1.4
<i>Tamaño (TEM/nm)</i>	3.2 ± 0.7	3.2 ± 0.6

La aproximación del tamaño real con base en a las imágenes de TEM permite realizar el cálculo de la concentración de Nps en dispersión, teniendo en cuenta el diámetro de las Nps, la densidad del platino y la masa de cada Np, de acuerdo con la relación mostrada en la ecuación 8:

$$M_i = \frac{M_{Pt}}{m} \quad (8)$$

Donde M_i es la concentración en peso de Nps en dispersión, M_{Pt} es la concentración de platino metálico calculada de la estequiometría de la reacción (468.9 $\mu\text{g Pt/mL}$) y m es la masa de cada Np que se calculó teniendo en cuenta la densidad del platino (21.45 g/cm^3) y el volumen obtenido con base en el tamaño promedio que mostraba cada Np en la microscopía electrónica de transmisión (3.2 nm). Teniendo este dato para las Nps de Pt@PVP y Pt@CS se calculó la concentración molar de las Nps utilizando la ecuación 9

$$M = \frac{M_i}{6.020 \cdot 10^{23} \text{partículas/mol}} \quad (9)$$

Donde M es la concentración molar de Nps de Pt. Los resultados de los cálculos mencionados se encuentran resumidos en la tabla 3. El cálculo de la concentración de las Nps es relevante para realizar los ensayos de actividad enzimática que se muestran en la siguiente sección.

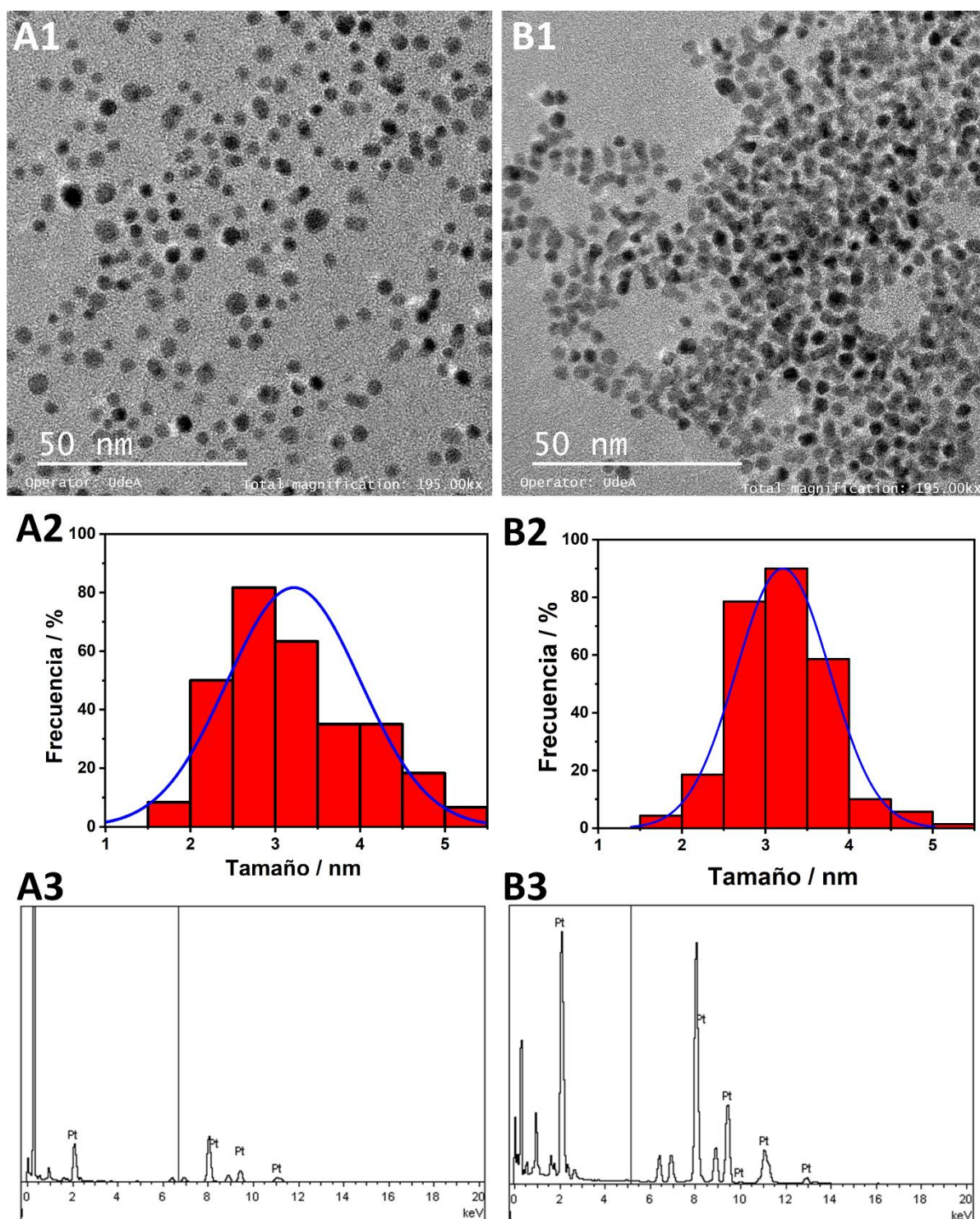


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (A1 y B1), distribución de tamaño de de Nps realizado con el software ImageJ (A2 y B2) y espectros de energía dispersiva de rayos X (A3 y B3) de las Nps de Pt estabilizadas con PVP (A) y CS (B)

Tabla 3. Datos derivados del análisis de distribución de tamaño de la microscopía electrónica de transmisión

Muestra	Pt@CS	Pt@PVP
Tamaño (nm)	3.21 ± 0.65	3.24 ± 0.71
Concentración Platino (g/mL)	$4.70 \cdot 10^{-4}$	$4.69 \cdot 10^{-4}$
Concentración de Nps en dispersión (partículas/mL)(M_i)	$1.26 \cdot 10^{15}$	$1.22 \cdot 10^{15}$
Concentración molar de Nps (μM) (M)	2.10	2.03

6.2 Análisis cinéticos de mimetización de actividad enzimática

La reacción catalítica entre Nps de Pt, H_2O_2 y TMB produce un complejo de transferencia de carga, de color azul que podría usarse para una evaluación cualitativa a simple vista y cuantitativa mediante el uso de un espectrofotómetro. Las Nps de Pt exhiben esta actividad similar o mimética a la peroxidasa para la oxidación de TMB en presencia de H_2O_2 . la Figura 6a muestra de manera esquemática el mecanismo que este nanomaterial utiliza para la catálisis de oxidación y la Figura 6b muestra la oxidación de TMB (1 mM) en presencia de 10 mM H_2O_2 con el respectivo blanco de TMB- H_2O_2 sin Nps. Las muestras con Nps presentes evidencian una absorbancia de 0.986 (Pt@PVP) y 0.976 (Pt@CS) a 652 nm, la cual es aproximadamente 18 veces mayor que la absorbancia presentada por el control negativo, sin Nps.

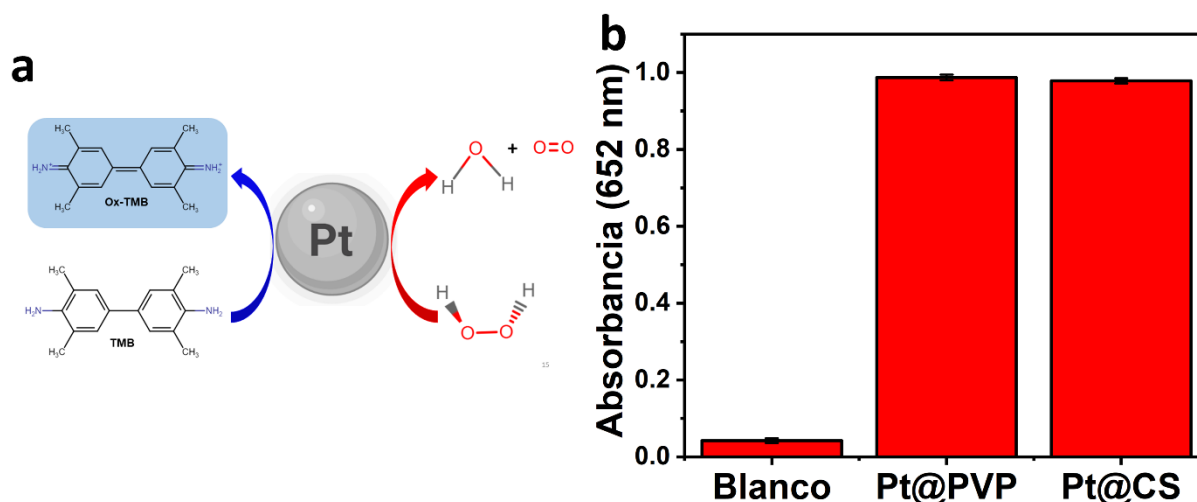
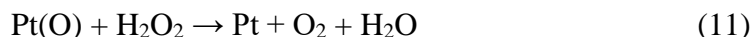


Figura 6. Ilustración esquemática de la actividad peroxidasa mimética de las Nps de Pt para la oxidación de TMB en presencia de H_2O_2 (a), valores medios de absorbancia (UV-Vis) para las Nps de Pt estabilizadas con PVP y CS con respecto a un control negativo sin Nps (b)

Estos resultados confirman que los dos sistemas de Nps sintetizados muestran una notable actividad peroxidasa; debida a factores asociados a la alta afinidad que tienen las Nps de Pt para descomponer H_2O_2 y a la gran área de superficie disponible para la catálisis de TMB. El tamaño de las Nps proporcionan un efecto de confinamiento cuántico, que ayuda a la oxidación más efectiva del sustrato [89], debido a la mayor unión de TMB con carga positiva e interacción con

los productos de descomposición de H_2O_2 por el contacto con las Nps de Pt [90]. El mecanismo de la acción peroxidasa de las Nps de Pt se ilustra de la siguiente forma, el O_2 generado oxida el TMB como se muestra a continuación:



Las Nps de Pt en presencia de H_2O_2 generan en primera instancia H_2O y una especie intermedia de Pt oxidado (ecuación 10), el cual en una reacción sucesiva en presencia de otro equivalente de H_2O_2 genera nuevamente H_2O y O_2 (ecuación 11). La semireacción equivalente se muestra en la ecuación 12. Este oxígeno molecular producido lleva la molécula de TMB (incolora) a un estado oxidado (color azul) con la presencia de diaminas en su estructura (Figura 1a), de la forma que se muestra en la ecuación 12 [91]. Este proceso es tan veloz que, para poder cuantificarse mediante un espectrofotómetro, las Nps de Pt se diluyeron a una concentración de 103.2 nM, en la solución de reacción Pt- H_2O_2 -TMB. Los experimentos se realizaron en buffer citrato de potasio 0.2 M, como se reportó en estudios previos [92].

Para investigar la actividad de las Nps similar a la peroxidasa, se determinaron los parámetros cinéticos aparentes de estado estacionario para la oxidación de TMB. Esto se hizo variando la concentración de H_2O_2 y TMB como se muestra en la Figura 7, los experimentos se llevaron a cabo utilizando 10 μL de Nps de Pt@PVP en un volumen de reacción de 100 μL de buffer citrato de potasio 0.2 M, haciendo un barrido de concentración de 2 a 12 mM H_2O_2 con TMB (1 mM), y de 0.2 a 1.2 mM TMB con H_2O_2 (10 mM). Como se muestra en la Figura 7, las concentraciones óptimas para realizar el estudio catalítico se alcanzaron a 1 mM de TMB y 10 mM de H_2O_2 .

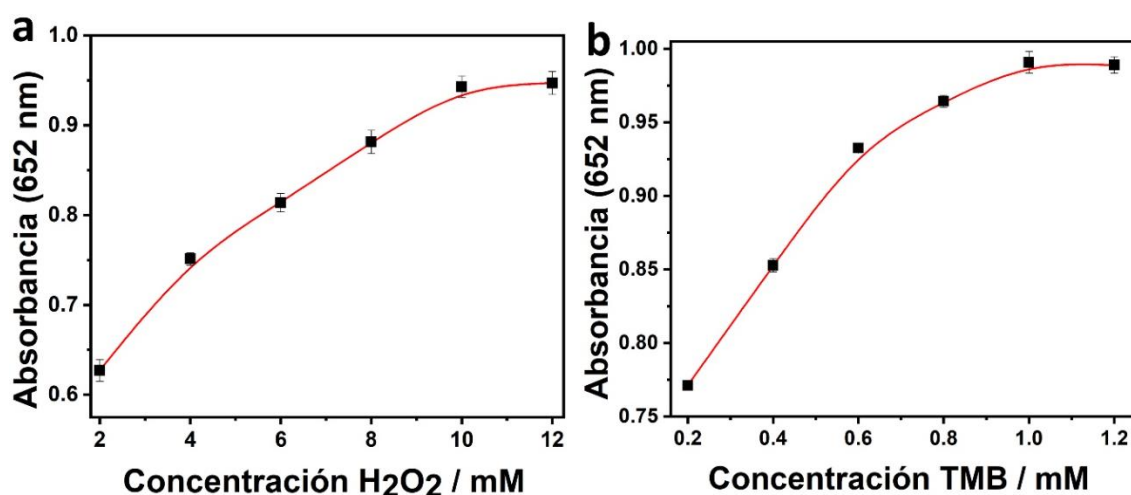


Figura 7. Dependencia de la absorbancia UV-vis (a 652 nm) de la reacción TMB/ H_2O_2 catalizada por Nps de Pt@PVP en la concentración de (a) H_2O_2 (1 mM TMB) y (b) TMB (10 mM H_2O_2)

Los parámetros cinéticos se determinaron teniendo en cuenta la velocidad inicial de reacción. En el lector de microplacas Uv-Vis se hizo una conversión de los datos de absorbancia a la concentración correspondiente haciendo uso de la relación de Beer-Lambert con un valor de absorptividad molar $\epsilon=39000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (a 652 nm) para el producto oxidado de TMB [78]. El producto fue una curva típica de Michaelis-Menten descrita por la ecuación 2, donde V_0 representa la velocidad de conversión de sustrato a producto, V_{\max} es la velocidad máxima de conversión que se logra cuando los sitios activos o catalíticos de la nanozima están saturados con sustrato y K_m es la constante de Michaelis-Menten que indica la afinidad que la nanozima tienen por el sustrato.

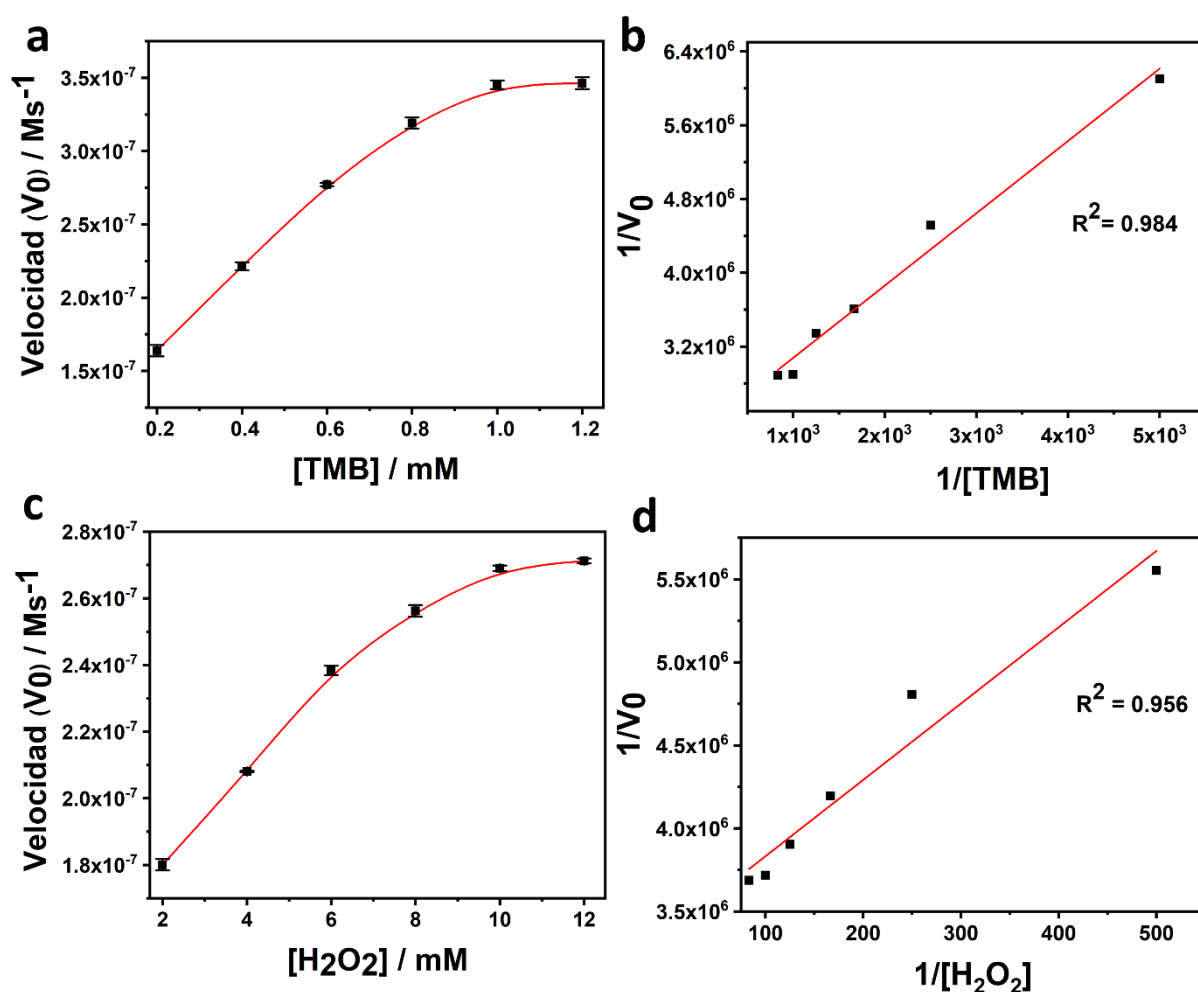


Figura 8. Velocidad de descomposición de distintas concentraciones de TMB (10 mM de H₂O₂) (a) y H₂O₂ (1 mM TMB) (c) catalizadas por Nps de Pt@PVP, con sus respectivas linealizaciones, TMB (b) y H₂O₂ (d)

Con el fin de calcular los parámetros cinéticos con un ajuste más confiable, se realizaron linealizaciones de los gráficos de Michaelis-Menten mediante las relaciones de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf y Eadie-Hofstee, utilizando los recíprocos de la concentración de sustrato y de la velocidad inicial; la reorganización de la relación de Michaelis-Menten se muestra en

las ecuaciones 3, 4 y 5. Gracias a las diferentes linealizaciones realizadas y la obtención de los coeficientes de correlación de las mismas, se eligió el modelo de Lineweaver-Burk para la obtención de los parámetros cinéticos aparentes y el análisis de los mismos. Las linealizaciones por el modelo de Hanes-Woolf y Eadie-Hofstee se encuentran en el anexo de este documento, junto a los parámetros cinéticos derivados de su análisis. Las Figuras 8 y 9 muestran las gráficas de Michaelis-Menten con sus respectivas linealizaciones para el barrido de concentraciones de TMB y H_2O_2 , catalizadas por Nps de Pt@ PVP y Pt@CS, respectivamente.

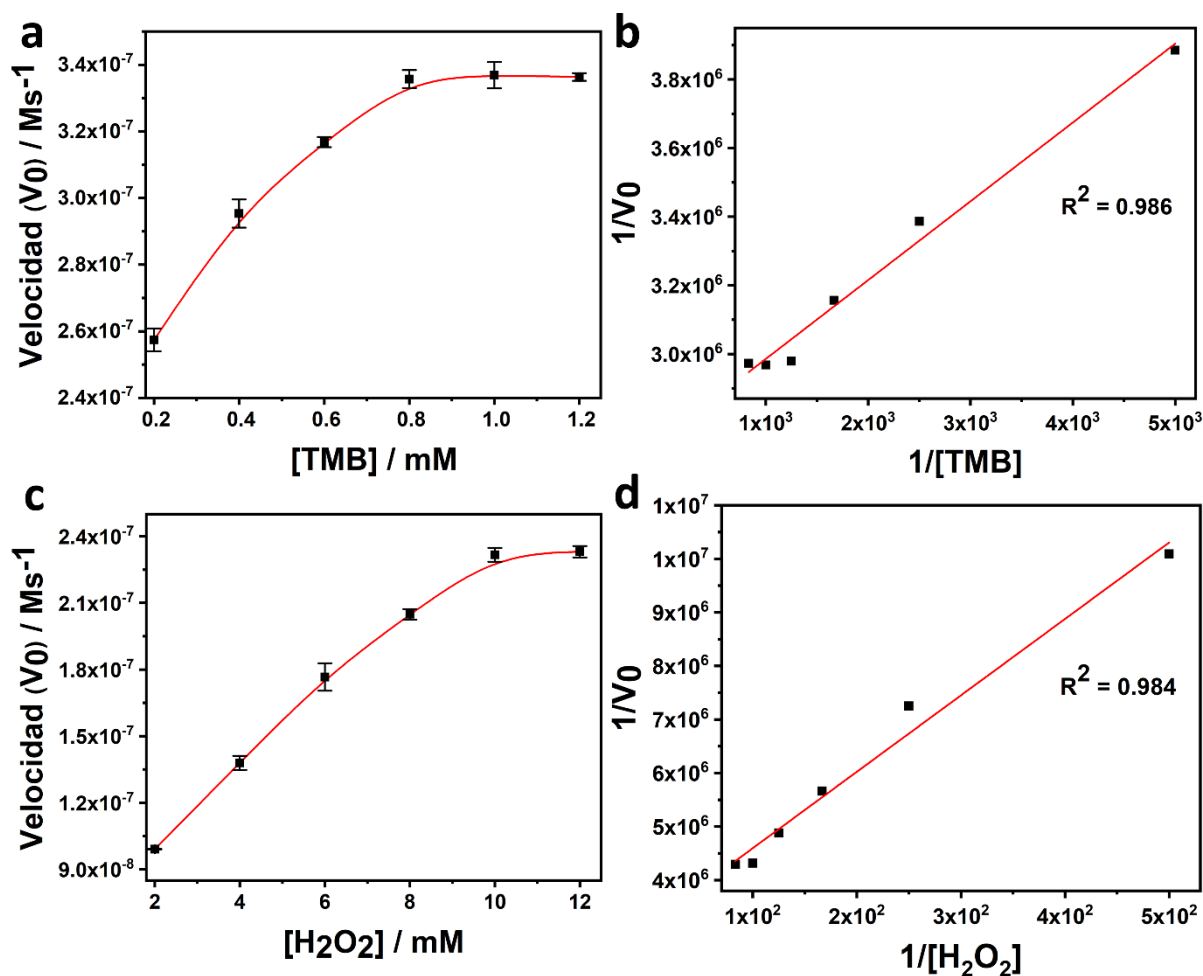


Figura 9. Velocidad de descomposición de distintas concentraciones de TMB (10 mM de H_2O_2) (a) y H_2O_2 (1 mM TMB) (c) catalizadas por Nps de Pt@CS, con sus respectivas linealizaciones, TMB (b) y H_2O_2 (d)

Como ya se mencionó antes, el valor de K_m denota la afinidad del sustrato por la nanozima, indicando una mejor afinidad en cuanto más cercano a cero. La tabla 4 muestra una comparación de los parámetros cinéticos entre los dos sistemas de Nps obtenidos y diferentes sistemas que también exhiben actividad peroxidasa. El valor de K_m aparente de las Nps de Pt@PVP fue más bajo que para la enzima natural peroxidasa de rábado (HRP), lo que sugiere

que estas Nps tienen una mayor afinidad por TMB y H₂O₂ que la HRP. Por otro lado, las Nps de Pt@CS muestran una mayor afinidad por el TMB que la HRP, pero no por el H₂O₂. Los valores de velocidad máxima sugieren que los sitios activos de las dos nanozimas obtenidas tienden a saturarse más rápido que en el HRP, lo cual concuerda con los valores obtenidos para la constante de afinidad, que incrementó directamente proporcional respecto a K_m y V_{max}, pero se dio de una manera más eficiente en las Nps de Pt@PVP comparado con sus homólogas de Pt@CS. Esta actividad mejorada de las Nps de Pt@PVP se explica mediante la mayor estabilidad estérica que provee el PVP, ya que su tamaño y peso molecular de 40000 Da brinda un efecto estabilizante mejorado que funciona como una barrera para que no se agreguen las Nps y forma una capa delgada en la superficie que impide su crecimiento [93]. Además, la carga neutral del ligando y de las Nps de Pt@PVP (Figura 4b), permite la difusión de moléculas como H₂O₂ y TMB, beneficioso para el proceso catalítico.

De igual forma, el valor de los parámetros cinéticos de las Nps de Pt obtenidas es mejor respecto los datos encontrados en la literatura para otros tipos de sistemas de Nps con actividad peroxidasa, como se observa en la tabla 4. Este comportamiento mejorado puede deberse a los mismos dos factores mencionados, la capacidad del Pt para descomponer el H₂O₂ y la gran área superficial que se tiene las Nps.

Tabla 4. Datos derivados del análisis de cinética enzimática

Catalizador	Substrato	K _m / mM	V _{max} / 10 ⁻⁷ Ms ⁻¹	Referencia
Pt@PVP	TMB	0.34	4.36	Este trabajo
	H₂O₂	1.36	2.97	
Pt@CS	TMB	0.08	3.63	Este trabajo
	H₂O₂	4.50	3.16	
HRP	TMB	0.43	1	[94]
	H₂O₂	3.70	0.87	
Fe₃O₄	TMB	0.09	0.34	[94]
	H₂O₂	154	0.98	
Fe₃O₄@Pt	TMB	0.15	0.41	[95]
	H₂O₂	702.61	7.14	
Pt@PEI	TMB	2.02	11.52	[96]
	H₂O₂	43.64	0.85	
Co₃O₄	TMB	0.04	0.63	[97]
	H₂O₂	140.07	1.21	
Eu₂O₂S	TMB	0.14	0.68	[98]
	H₂O₂	142.34	4.49	

La Figura 10 muestra la cinética de reacción de las Nps de Pt@PVP en presencia de TMB-H₂O₂ (1-10 mM), que tomó aproximadamente 2.5 minutos para llegar a su punto máximo. El protocolo general de ELISA para HRP de Thermo Fisher Scientific que utiliza también TMB-H₂O₂ da un tiempo aproximado de reacción de 30 min, para que la reacción llegue a su punto

máximo. Es necesario anotar que la concentración de enzima HRP es menor que la concentración de Nps de Pt en el ensayo de la Figura 10, sin embargo, el tiempo de reacción y el valor de absorción mostrados evidencian que la nanozima sintetizada tiene potencial para ser una alternativa sintética a la HRP en términos de sus costos de producción, facilidad de obtención, estabilidad a temperatura ambiente y condiciones de temperatura y pH para su utilización como nanozima peroxidasa.

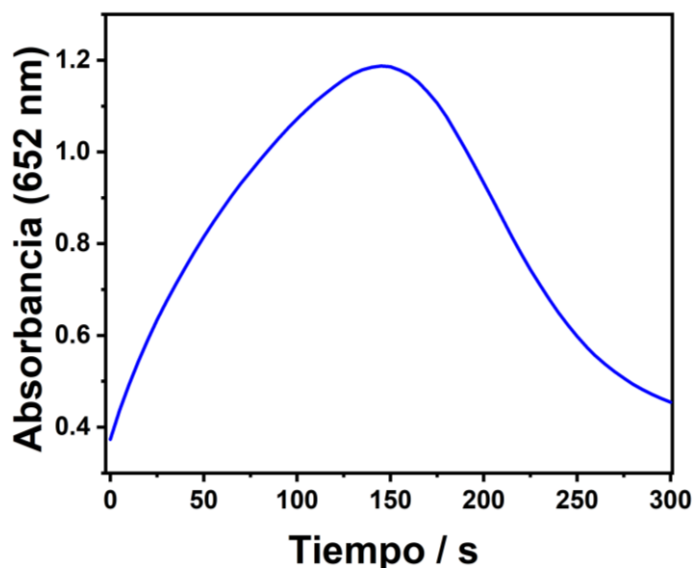


Figura 10. Absorbancia UV-vis (a 652 nm) dependiente del tiempo de la reacción TMB/H₂O₂ catalizada por Nps de Pt@PVP

6.3 Detección de glucosa

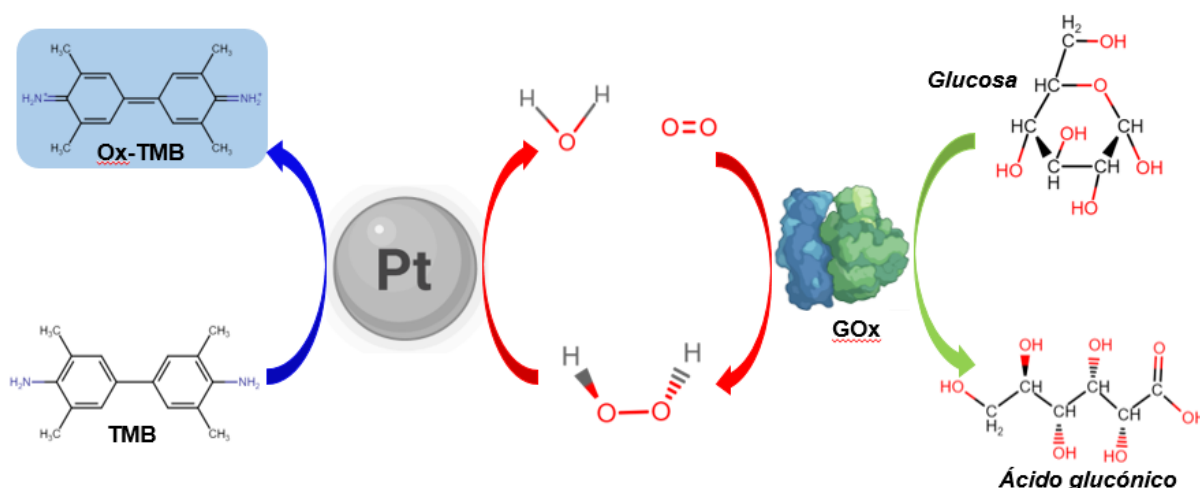


Figura 11. Ilustración esquemática de la detección de glucosa gracias a la actividad peroxidasa mimética de las Nps de Pt para la oxidación de TMB en presencia de H₂O₂

Como se demostró en la sección anterior, la variación de intensidad en la oxidación de TMB catalizada por las Nps de Pt muestra una dependencia de la concentración de H_2O_2 . Como prueba de concepto, se utilizó esta propiedad de las Nps de Pt@PVP similar a la peroxidasa para implementar un método colorimétrico simple para la detección de glucosa, la cual es un indicador importante para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades como la diabetes. El H_2O_2 necesario para la oxidación de TMB catalizado por NPs de Pt@PVP, se puede producir mediante la reacción entre glucosa y la enzima glucosa oxidasa (GOx) [99], como se muestra en la Figura 11 y en la ecuación 14



De esta forma con la obtención del producto oxidado de TMB y medición de la absorbancia a 652 nm, se logró detectar de forma indirecta glucosa, utilizando Nps de Pt@PVP en lugar de su homólogo natural HRP. Dado que la actividad de la GOx no es óptima a las condiciones de trabajo del buffer citrato de potasio en la cual está diluida el TMB, la detección de glucosa se realizó en dos pasos detallados en la sección de la metodología. La reacción entre glucosa-GOx en buffer fosfato pH 7 genera H_2O_2 que degradan las Nps de Pt con la posterior oxidación de TMB mediante la adición de la nanozima a la solución que contiene la GOx permitiendo la detección colorimétrica indirecta de glucosa. La Figura 11 muestra una curva de respuesta a la variación de concentraciones de glucosa en el rango de 2 a 14 mM, los procedimientos completos están consignados en la sección experimental. El límite de detección (LDD) del ensayo se determinó con la relación mostrada en la ecuación 15

$$LDD = \frac{3SD_{Blanco}}{Pendiente} \quad (15)$$

Donde SD_{Blanco} corresponde a la desviación estándar del blanco y el valor de la pendiente es el correspondiente a la linealización de la figura 11. El LDD en las condiciones ideales de trabajo es de 1.18 mM. El límite de cuantificación (LDQ) del ensayo de detección se determinó con la relación mostrada en la ecuación 16.

$$LDQ = \frac{10SD_{Blanco}}{Pendiente} \quad (16)$$

Donde SD_{Blanco} corresponde a la desviación estándar del blanco y el valor de la pendiente es el correspondiente a la linealización de la figura 11; el LDQ fue de 3.93 mM.

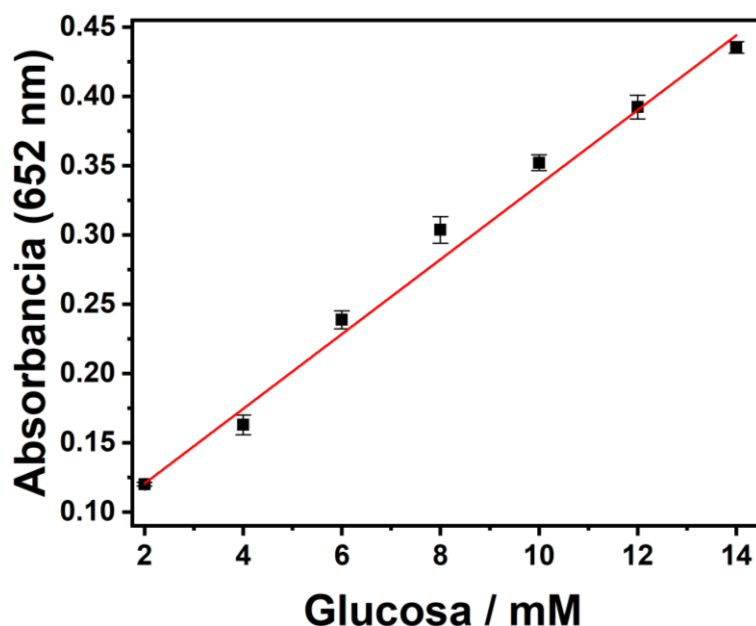


Figura 12. Curva de calibración para la detección de glucosa utilizando GOx y Nps de Pt@PVP como nanoperoxidasa. Condiciones del experimento: 103.2 nM de Nps de Pt; buffer de citrato de potasio 200 mM pH 4.0; tiempo de reacción 5 min.

La tabla 5 muestra los parámetros analíticos mencionados para la detección de glucosa a través de la actividad peroxidasa de las Nps de Pt@PVP, comparados con otros sistemas basados en nanozimas que detectaron glucosa. Es necesario señalar que los sensores que se muestran en la tabla utilizan métodos de detección diferentes, desde el elemento de bioreconocimiento utilizado, hasta el sistema de transducción y procesamiento de la señal. Sin embargo, sirven como ejemplos para demostrar que las Nps de Pt@PVP evidencian potencial en la detección de glucosa respecto a otros sistemas con base en nanomateriales inorgánicos y son comparables a los parámetros analíticos de un glucómetro comercial estándar.

Tabla 5. Parámetros analíticos de la detección de glucosa

Material	Rango lineal (mM)	LDD (mM)	Referencia
Nps Pt@PVP	2-14	1.18	Este trabajo
Au-Polímero (complejo B5)	1-50	0.93	[100]
Ag3-papel (complejo)	1-35	0.09	[101]
Glucómetro	2.39-25.03	7.67 (v.m)*	[102]

*v.m: valor medio.

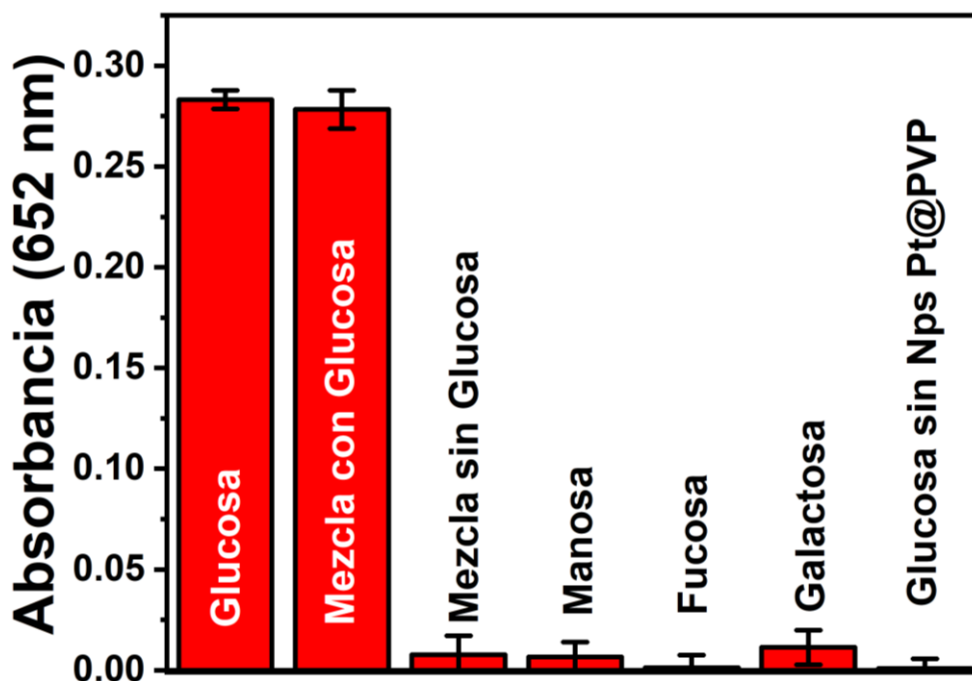


Figura 13. Determinación de la especificidad y selectividad de detección de glucosa (glucosa 8 mM, Manosa 32 mM, fucosa 32 mM y Galactosa 32 mM). Condiciones del experimento: 103.2 nM de Nps de Pt; buffer de citrato de potasio 200 mM pH 4

Con el fin de comprobar que el biosensor desarrollado es selectivo y específico para la detección de glucosa, se usaron manosa, fucosa, y galactosa como azúcares interferentes que podrían estar presentes en una muestra de sangre real y podrían afectar las mediciones. Es importante mencionar que GOx tiene una afinidad alta hacia glucosa y por ende no debe presentar ninguna reacción con los interferentes. El ensayo también se realizó con la mezcla de los tres azúcares mencionados en presencia y ausencia de la glucosa, con el fin de confirmar la selectividad del ensayo. La Figura 12 muestra los resultados de los ensayos mencionados, con concentraciones tres veces mayores para los demás azúcares respecto a la glucosa, denotando que no presentaron diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$. Esto indica que el mecanismo de detección con base en Nps de Pt@PVP tiene una alta selectividad y especificidad hacia la detección de glucosa, lo que se atribuye directamente a la alta especificidad de la GOx hacia la glucosa y de las Nps de Pt@PVP hacia el H_2O_2 .

7. CONCLUSIONES

En general los análisis estructurales, químicos y morfológicos de las Nps de Pt, en conjunto con los análisis cinéticos de actividad catalítica demostraron que las Nps sintetizadas tienen un gran potencial como nanozima peroxidasa en la degradación de H_2O_2 y la posterior oxidación de sustratos cromogénicos como el TMB, permitiendo el acople de estas Nps a plataformas de detección de analitos de interés clínico como la glucosa.

Específicamente,

- Se demostró la viabilidad de sintetizar Nps de Pt@PVP y Pt@CS en fase acuosa mediante una metodología de química suave que no implica el uso de reactivos químicos o productos de reacción tóxicos, con un mínimo gasto energético en condiciones de temperatura ambiente y presión atmosférica y con un tiempo de reacción total de 120 min.
- Se confirmó la obtención de Nps de Pt de forma esférica, estabilizadas con PVP y CS, y con tamaños en promedio de 3.2 nm para los dos sistemas por TEM, lo cual estuvo en concordancia con los análisis por DRX y DLS.
- Se evidenciaron los grupos funcionales característicos de PVP y CS por FTIR, corroborando el recubrimiento efectivo de las Nps de Pt luego del proceso de síntesis.
- Se estudió la actividad mimética peroxidasa de las Nps de Pt@PVP y Pt@CS mediante análisis cinéticos siguiendo las reacciones de oxidación-reducción de H_2O_2 y TMB mediante espectrofotometría UV-Vis. Los valores de K_m y V_{max} en las condiciones ideales permitieron deducir que las Pt@PVP presentaron mayor estabilidad y reactividad química asociada a la mayor estabilización y neutralidad las Nps recubiertas con PVP, que además permitieron mayor difusión e interacción con las moléculas en la medición de actividad catalítica.
- Se ensambló un biosensor colorimétrico para la detección de glucosa usando el H_2O_2 como producto de la oxidación de glucosa por la enzima GOx aprovechando la actividad peroxidasa eficiente de la nanozima de Pt@PVP, como prueba de concepto. El sistema fue altamente lineal entre 2.3 a 25.0 mM con un LDD y LDC de 1.1 mM y 3.9 mM, respectivamente.

8. ANEXOS

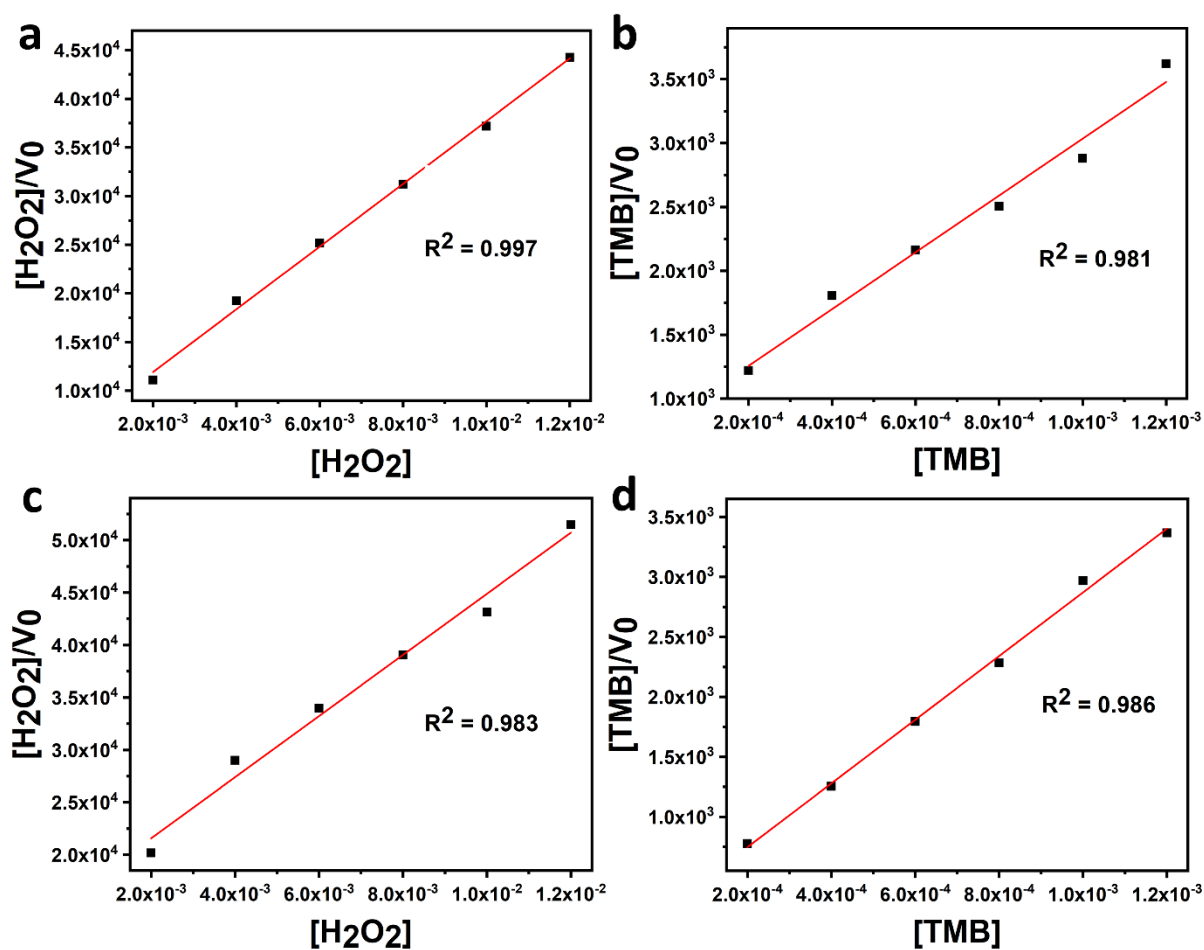


Figura A1. Linealizaciones método de Hanes-Woolf (a) y (b) Pt@PVP, (c) y (d) Pt@CS

Tabla A1. Datos derivados del análisis de cinética enzimática

	Catalizador	Substrato	K_m / mM	$V_{\max} / 10^{-7} \text{Ms}^{-1}$	R^2
Modelo de Hanes-Woolf	Pt@PVP	TMB	0.36	4.49	0.98
		H_2O_2	1.69	3.10	0.99
	Pt@CS	TMB	0.08	3.77	0.98
		H_2O_2	5.39	3.43	0.98
Modelo de Eadie-Hofstee	Pt@PVP	TMB	0.35	4.46	0.92
		H_2O_2	1.41	2.99	0.93
	Pt@CS	TMB	0.08	3.63	0.97
		H_2O_2	4.82	3.26	0.93

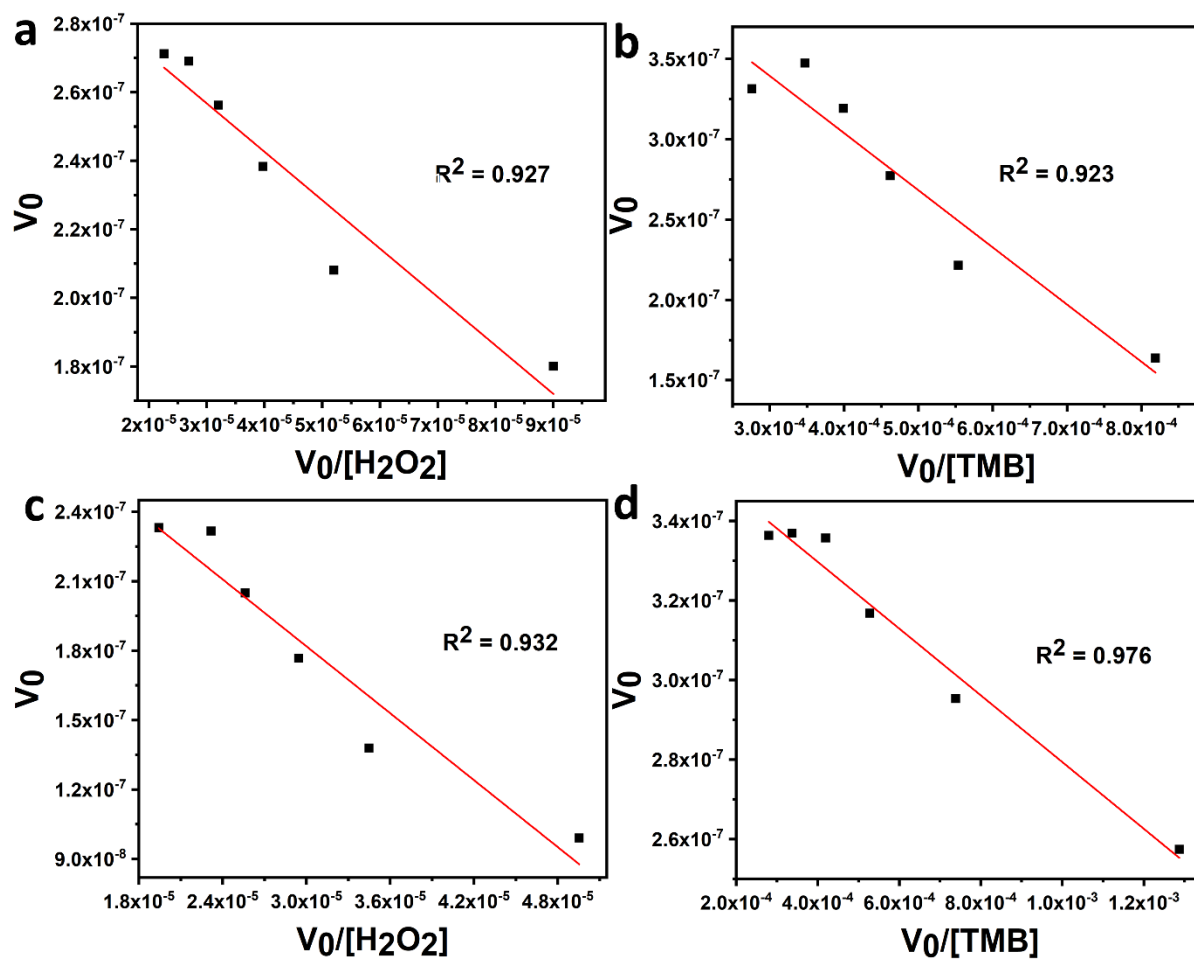


Figura A2. Linealizaciones método de Eadie-Hofstee (a) y (b) Pt@PVP, (c) y (d) Pt@CS

REFERENCIAS

- [1] A. Haleem, M. Javaid, R. P. Singh, R. Suman, and S. Rab, “Biosensors applications in medical field: A brief review,” *Sensors Int.*, vol. 2, no. April, p. 100100, 2021, doi: 10.1016/j.sintl.2021.100100.
- [2] M. Ghasemi-Varnamkhasti *et al.*, “Monitoring the aging of beers using a bioelectronic tongue,” *Food Control*, vol. 25, no. 1, pp. 216–224, 2012, doi: 10.1016/j.foodcont.2011.10.020.
- [3] P. Mehrotra, “Biosensors and their applications - A review,” *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 153–159, 2016, doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
- [4] E. A. Peroza, J. C. Ewald, G. Parakkal, J. M. Skotheim, and N. Zamboni, “A genetically encoded Förster resonance energy transfer sensor for monitoring in vivo trehalose-6-phosphate dynamics,” *Anal. Biochem.*, vol. 474, no. 2015, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1016/j.ab.2014.12.019.
- [5] C. Bermejo, J. C. Ewald, V. Lanquar, A. M. Jones, and W. B. Frommer, “In vivo biochemistry: Quantifying ion and metabolite levels in individual cells or cultures of yeast,” *Biochem. J.*, vol. 438, no. 1, pp. 1–10, 2011, doi: 10.1042/BJ20110428.
- [6] S. Campuzano, M. Pedrero, P. Yáñez-Sedeño, and J. M. Pingarrón, “Nanozymes in electrochemical affinity biosensing,” *Microchim. Acta*, vol. 187, no. 8, 2020, doi: 10.1007/s00604-020-04390-9.
- [7] Q. Liu, A. Zhang, R. Wang, Q. Zhang, and D. Cui, *A Review on Metal- and Metal Oxide-Based Nanozymes: Properties, Mechanisms, and Applications*, vol. 13, no. 1. Springer Singapore, 2021.
- [8] X. Wang, Y. Xu, N. Cheng, X. Wang, K. Huang, and Y. Luo, “Recent advances in nucleic acid modulation for functional nanozyme,” *Catalysts*, vol. 11, no. 5, 2021, doi: 10.3390/catal11050638.
- [9] J. Zhang and J. Liu, “Nanozyme-based luminescence detection,” *Luminescence*, vol. 35, no. 8, pp. 1185–1194, 2020, doi: 10.1002/bio.3893.
- [10] A. J. Kora and L. Rastogi, “Peroxidase activity of biogenic platinum nanoparticles: A colorimetric probe towards selective detection of mercuric ions in water samples,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 254, pp. 690–700, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.07.108.
- [11] F. Attar *et al.*, “Nanozymes with intrinsic peroxidase-like activities,” *J. Mol. Liq.*, vol. 278, pp. 130–144, 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2018.12.011.
- [12] V. G. Panferov, N. A. Byzova, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev, “Peroxidase-mimicking nanozyme with surface-dispersed Pt atoms for the colorimetric lateral flow immunoassay of C-reactive protein,” *Microchim. Acta*, vol. 188, no. 9, 2021, doi: 10.1007/s00604-021-04968-x.
- [13] O. V. Singh, “Bio-Nanoparticles: Biosynthesis and Sustainable Biotechnological Implications,” *Bio-Nanoparticles Biosynth. Sustain. Biotechnol. Implic.*, pp. 1–375, 2015, doi: 10.1002/9781118677629.
- [14] B. Nagel, H. Dellweg, and L. M. Gierasch, “Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 64, no. 1, pp. 143–168, 2007, doi: 10.1351/pac199264010143.
- [15] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, “Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 1–2, pp. 121–131, 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
- [16] P. Bhattarai and S. Hameed, “Basics of Biosensors and Nanobiosensors,” *Nanobiosensors*, pp. 1–22, 2020, doi: 10.1002/9783527345137.ch1.
- [17] P. Hassanzadeh, “New perspectives in biosensor technology,” *Gastroenterol. Hepatol.*

- From Bed to Bench*, vol. 3, no. 3, pp. 105–107, 2010.
- [18] P. T. Kissinger, “Biosensors - A perspective,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 12, pp. 2512–2516, 2005, doi: 10.1016/j.bios.2004.10.004.
- [19] K. Mahato, P. K. Maurya, and P. Chandra, “Fundamentals and commercial aspects of nanobiosensors in point-of-care clinical diagnostics,” *3 Biotech*, vol. 8, no. 3, 2018, doi: 10.1007/s13205-018-1148-8.
- [20] J. D. Newman and S. J. Setford, “Enzymatic biosensors,” *Mol. Biotechnol.*, vol. 32, no. 3, pp. 249–268, 2006, doi: 10.1385/MB:32:3:249.
- [21] J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial Enzymes: Structure , Function and Applications*. 2007.
- [22] Y. Murakami, J. I. Kikuchi, Y. Hisaeda, and O. Hayashida, “Artificial enzymes,” *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 2, pp. 721–758, 1996, doi: 10.1021/cr9403704.
- [23] J. Wu *et al.*, “Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II),” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 48, no. 4, pp. 1004–1076, 2019, doi: 10.1039/c8cs00457a.
- [24] W. Wang and S. Gunasekaran, “Nanozymes-based biosensors for food quality and safety,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 126, p. 115841, 2020, doi: 10.1016/j.trac.2020.115841.
- [25] J. A. C. Pérez, J. E. Sosa-Hernández, S. M. Hussain, M. Bilal, R. Parra-Saldivar, and H. M. N. Iqbal, “Bioinspired biomaterials and enzyme-based biosensors for point-of-care applications with reference to cancer and bio-imaging,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 17, pp. 168–176, 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.015.
- [26] L. Alaei *et al.*, “Nanozymes—An Overview,” *Nanozymes*, pp. 15–28, 2021.
- [27] H. Wei and E. Wang, “Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 14, pp. 6060–6093, 2013, doi: 10.1039/c3cs35486e.
- [28] Q. Wang, H. Wei, Z. Zhang, E. Wang, and S. Dong, “Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 105, pp. 218–224, 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.05.012.
- [29] H. Wei *et al.*, “Nanozymes: A clear definition with fuzzy edges,” *Nano Today*, vol. 40, no. August, p. 101269, 2021, doi: 10.1016/j.nantod.2021.101269.
- [30] N. Stasyuk *et al.*, “Synthesis, catalytic properties and application in biosensorics of nanozymes and electronanocatalysts: A review,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 16, pp. 1–42, 2020, doi: 10.3390/s20164509.
- [31] M. Liang and X. Yan, “Nanozymes: From New Concepts, Mechanisms, and Standards to Applications,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 8, pp. 2190–2200, 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00140.
- [32] B. Unnikrishnan, C. W. Lien, H. W. Chu, and C. C. Huang, “A review on metal nanozyme-based sensing of heavy metal ions: Challenges and future perspectives,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 401, p. 123397, 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123397.
- [33] Y. Liu *et al.*, “Metallic oxide nanomaterials act as antioxidant nanozymes in higher plants: Trends, meta-analysis, and prospect,” *Sci. Total Environ.*, vol. 780, p. 146578, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146578.
- [34] H. Ding *et al.*, “Carbon-based nanozymes for biomedical applications,” *Nano Res.*, vol. 14, no. 3, pp. 570–583, 2021, doi: 10.1007/s12274-020-3053-9.
- [35] L. Wu, M. Zhou, Y. Wang, and J. Liu, “Nanozyme and aptamer- based immunosorbent assay for aflatoxin B1,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 399, p. 123154, 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123154.
- [36] D. He, M. Yan, P. Sun, Y. Sun, L. Qu, and Z. Li, “Recent progress in carbon-dots-based nanozymes for chemosensing and biomedical applications,” *Chinese Chem. Lett.*, vol.

- 32, no. 10, pp. 2994–3006, 2021, doi: 10.1016/j.cclet.2021.03.078.
- [37] R. G. Mahmudunnabi, F. Z. Farhana, N. Kashaninejad, S. H. Firoz, Y. B. Shim, and M. J. A. Shiddiky, “Nanozyme-based electrochemical biosensors for disease biomarker detection,” *Analyst*, vol. 145, no. 13, pp. 4398–4420, 2020, doi: 10.1039/d0an00558d.
- [38] Q. Liu, A. Zhang, R. Wang, Q. Zhang, and D. Cui, *A Review on Metal- and Metal Oxide-Based Nanozymes: Properties, Mechanisms, and Applications*, vol. 13, no. 1. Springer Singapore, 2021.
- [39] F. Attar *et al.*, “Nanozymes with intrinsic peroxidase-like activities,” *J. Mol. Liq.*, vol. 278, pp. 130–144, 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2018.12.011.
- [40] H. . Mason, “Oxidases,” *Biochem*, no. 3, 1964.
- [41] N. J. Turner, *7.12 Oxidation: Oxidases*, vol. 7. Elsevier Ltd., 2012.
- [42] D. Jiang, D. Ni, Z. T. Rosenkrans, P. Huang, X. Yan, and W. Cai, “Nanozyme: New horizons for responsive biomedical applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 48, no. 14, pp. 3683–3704, 2019, doi: 10.1039/c8cs00718g.
- [43] Y. Zhang, Y. Jin, H. Cui, X. Yan, and K. Fan, “Nanozyme-based catalytic theranostics,” *RSC Adv.*, vol. 10, no. 1, pp. 10–20, 2019, doi: 10.1039/c9ra09021e.
- [44] H. Zhao, R. Zhang, X. Yan, and K. Fan, “Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 9, no. 35, pp. 6939–6957, 2021, doi: 10.1039/d1tb00720c.
- [45] Z. Wang *et al.*, “Accelerated discovery of superoxide-dismutase nanozymes via high-throughput computational screening,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-27194-8.
- [46] J. Golchin *et al.*, “Nanozyme applications in biology and medicine: an overview,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 45, no. 6, pp. 1069–1076, 2017, doi: 10.1080/21691401.2017.1313268.
- [47] S. Li *et al.*, “A Nanozyme with Photo-Enhanced Dual Enzyme-Like Activities for Deep Pancreatic Cancer Therapy,” *Angew. Chemie*, vol. 131, no. 36, pp. 12754–12761, 2019, doi: 10.1002/ange.201904751.
- [48] L. Gao and X. Yan, “Nanozymes: An emerging field bridging nanotechnology and biology,” *Sci. China Life Sci.*, vol. 59, no. 4, pp. 400–402, 2016, doi: 10.1007/s11427-016-5044-3.
- [49] A. L. Stepanov, A. N. Golubev, S. I. Nikitin, and Y. N. Osin, “A review on the fabrication and properties of platinum nanoparticles,” *Rev. Adv. Mater. Sci.*, vol. 38, no. 2, pp. 160–175, 2014.
- [50] E. Antonini, “Heme proteins: hemoglobin,” *FEBS Lett.*, vol. 40, no. Sup., pp. 98–104, 1974.
- [51] J. N. Rodri, D. J. Lowe, J. Herna, A. N. P. Hiner, and F. Garcı, “Mechanism of Reaction of Hydrogen Peroxide with Horseradish Peroxidase : Identification of Intermediates in the Catalytic Cycle,” no. 6, pp. 11838–11847, 2001.
- [52] S. Gu, S. Risse, Y. Lu, and M. Ballauff, “Mechanism of the Oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Catalyzed by Peroxidase-Like Pt Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes: A Kinetic Study,” *ChemPhysChem*, vol. 21, no. 5, pp. 450–458, 2020, doi: 10.1002/cphc.201901087.
- [53] N. Fakhri, F. Salehnia, S. Mohammad Beigi, S. Aghabalazadeh, M. Hosseini, and M. R. Ganjali, “Enhanced peroxidase-like activity of platinum nanoparticles decorated on nickel- and nitrogen-doped graphene nanotubes: colorimetric detection of glucose,” *Microchim. Acta*, vol. 186, no. 6, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1007/s00604-019-3489-3.
- [54] S. Kareska, “Factors Affecting Hydrogen Peroxidase Activity,” *Essai*, vol. 7, no. 1, pp. 81–85, 2010, [Online]. Available: <http://dc.cod.edu/essai/vol7/iss1/27>.
- [55] A. E. Hughes, N. Haque, S. A. Northey, and S. Giddey, “Platinum group metals: A

- review of resources, production and usage with a focus on catalysts,” *Resources*, vol. 10, no. 9, pp. 1–40, 2021, doi: 10.3390/resources10090093.
- [56] Y. Minami and Y. Amao, “Catalytic mechanism for selective hydrogen production based on formate decomposition with polyvinylpyrrolidone-dispersed platinum nanoparticles,” *Sustain. Energy Fuels*, vol. 4, no. 7, pp. 3458–3466, 2020, doi: 10.1039/d0se00363h.
- [57] S. Bin He *et al.*, “Synthesis and peroxidase-like activity of salt-resistant platinum nanoparticles by using bovine serum albumin as the scaffold,” *ChemCatChem*, vol. 6, no. 6, pp. 1543–1548, 2014, doi: 10.1002/cctc.201400011.
- [58] J. Fan *et al.*, “Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin-platinum nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 6, pp. 1611–1618, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.004.
- [59] M. Jeyaraj, S. Gurunathan, M. Qasim, M. H. Kang, and J. H. Kim, “A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 12, 2019, doi: 10.3390/nano9121719.
- [60] D. J. Guo and Z. H. Jing, “A novel co-precipitation method for preparation of Pt-CeO₂ composites on multi-walled carbon nanotubes for direct methanol fuel cells,” *J. Power Sources*, vol. 195, no. 12, pp. 3802–3805, 2010, doi: 10.1016/j.jpowsour.2009.12.115.
- [61] A. Tavakoli, M. Sohrabi, and A. Kargari, “A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds,” *Chem. Pap.*, vol. 61, no. 3, pp. 151–170, 2007, doi: 10.2478/s11696-007-0014-7.
- [62] M. H. So, C. M. Ho, R. Chen, and C. M. Che, “Hydrothermal synthesis of platinum-group-metal nanoparticles by using HEPES as a reductant and stabilizer,” *Chem. - An Asian J.*, vol. 5, no. 6, pp. 1322–1331, 2010, doi: 10.1002/asia.201000066.
- [63] N. S. Al-Radadi, “Green synthesis of platinum nanoparticles using Saudi’s Dates extract and their usage on the cancer cell treatment,” *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 3, pp. 330–349, 2019, doi: 10.1016/j.arabjc.2018.05.008.
- [64] B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko, and C. J. O’Connor, “Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles,” *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 9, pp. 3893–3946, 2004, doi: 10.1021/cr030027b.
- [65] D. Zhai *et al.*, “Highly Sensitive Glucose Sensor Based on Pt Nanoparticle Polyaniline Hydrogel Heterostructures,” no. Xx, 2013.
- [66] Y. Song *et al.*, “Synthesis of platinum nanowire networks using a soft template,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 12, pp. 3650–3655, 2007, doi: 10.1021/nl0719123.
- [67] H. J. Salavagione, C. Sanchis, and E. Morallón, “Friendly conditions synthesis of platinum nanoparticles supported on a conducting polymer: Methanol electrooxidation,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 33, pp. 12454–12460, 2007, doi: 10.1021/jp071037+.
- [68] J. M. Park, H. W. Jung, Y. W. Chang, H. S. Kim, M. J. Kang, and J. C. Pyun, “Chemiluminescence lateral flow immunoassay based on Pt nanoparticle with peroxidase activity,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 853, no. 1, pp. 360–367, 2015, doi: 10.1016/j.aca.2014.10.011.
- [69] H. H. Deng *et al.*, “Chitosan-stabilized platinum nanoparticles as effective oxidase mimics for colorimetric detection of acid phosphatase,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 29, pp. 10292–10300, 2017, doi: 10.1039/c7nr03399k.
- [70] B. E. Levin, A. A. Dunn-meynell, V. H. Routh, E. Barry, A. A. Dunn-meynell, and H. Vanessa, “Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes,” no. 81, 2018.
- [71] K. Tonyushkina and J. H. Nichols, “Glucose meters: A review of technical challenges to obtaining accurate results,” *J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 3, no. 4, pp. 971–980, 2009, doi: 10.1177/193229680900300446.
- [72] S. Bin He *et al.*, “Improved enzymatic assay for hydrogen peroxide and glucose by

- exploiting the enzyme-mimicking properties of BSA-coated platinum nanoparticles,” *Microchim. Acta*, vol. 186, no. 12, 2019, doi: 10.1007/s00604-019-3939-y.
- [73] Q. Yang, L. Li, L. Sun, Z. Ye, Y. Wang, and X. Guo, “Spherical polyelectrolyte brushes as bio-platforms to integrate platinum nanozyme and glucose oxidase for colorimetric detection of glucose,” *J. Polym. Sci.*, vol. 59, no. 19, pp. 2201–2211, 2021, doi: 10.1002/pol.20210501.
- [74] L. Jin *et al.*, “Ultrasmall Pt Nanoclusters as Robust Peroxidase Mimics for Colorimetric Detection of Glucose in Human Serum,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 11, pp. 10027–10033, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b01616.
- [75] F. X. Qin, S. Y. Jia, F. F. Wang, S. H. Wu, J. Song, and Y. Liu, “Hemin@metal-organic framework with peroxidase-like activity and its application to glucose detection,” *Catal. Sci. Technol.*, vol. 3, no. 10, pp. 2761–2768, 2013, doi: 10.1039/c3cy00268c.
- [76] X. Wang, D. Liu, S. Song, and H. Zhang, “Synthesis of highly active Pt-CeO₂ hybrids with tunable secondary nanostructures for the catalytic hydrolysis of ammonia borane,” *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 82, pp. 10207–10209, 2012, doi: 10.1039/c2cc33363e.
- [77] G. W. Wu *et al.*, “Citrate-capped platinum nanoparticle as a smart probe for ultrasensitive mercury sensing,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 21, pp. 10955–10960, 2014, doi: 10.1021/ac503544w.
- [78] M. K. Masud *et al.*, “Gold-Loaded Nanoporous Ferric Oxide Nanocubes with Peroxidase-Mimicking Activity for Electrocatalytic and Colorimetric Detection of Autoantibody,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 20, pp. 11005–11013, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02880.
- [79] A. Watanabe *et al.*, “In vitro free radical scavenging activity of platinum nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 20, no. 45, 2009, doi: 10.1088/0957-4484/20/45/455105.
- [80] X. Teng, X. Liang, S. Maksimuk, and H. Yang, “Synthesis of porous platinum nanoparticles,” *Small*, vol. 2, no. 2, pp. 249–253, 2006, doi: 10.1002/sml.200500244.
- [81] E. Gharibshahi and E. Saion, “Influence of dose on particle size and optical properties of colloidal platinum nanoparticles,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 11, pp. 14723–14741, 2012, doi: 10.3390/ijms131114723.
- [82] N. V. Long, M. Ohtaki, V. N. Ngo, M. T. Cao, and M. Nogami, “Structure and morphology of platinum nanoparticles with critical new issues of low- and high-index facets,” *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 3, no. 2, 2012, doi: 10.1088/2043-6262/3/2/025005.
- [83] Y. K. Du, P. Yang, Z. G. Mou, N. P. Hua, and L. Jiang, “Thermal decomposition behaviors of PVP coated on platinum nanoparticles,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 99, no. 1, pp. 23–26, 2006, doi: 10.1002/app.21886.
- [84] V. S. Ramkumar *et al.*, “Synthesis of platinum nanoparticles using seaweed *Padina gymnospora* and their catalytic activity as PVP/PtNPs nanocomposite towards biological applications,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 92, pp. 479–490, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.076.
- [85] Z. Bai *et al.*, “High-efficiency carbon-supported platinum catalysts stabilized with sodium citrate for methanol oxidation,” *J. Power Sources*, vol. 195, no. 9, pp. 2653–2658, 2010, doi: 10.1016/j.jpowsour.2009.11.008.
- [86] P. J. Shiny, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran, “Haemocompatibility assessment of synthesised platinum nanoparticles and its implication in biology,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 37, no. 6, pp. 991–997, 2014, doi: 10.1007/s00449-013-1069-1.
- [87] M. Cueto *et al.*, “Platinum nanoparticles as photoactive substrates for mass spectrometry and spectroscopy sensors,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 21, pp. 11432–11439, 2014, doi: 10.1021/jp500190m.
- [88] M. Fischer, J. Hormes, G. Marzun, P. Wagener, U. Hagemann, and S. Barcikowski, “In

- Situ Investigations of Laser-Generated Ligand-Free Platinum Nanoparticles by X-ray Absorption Spectroscopy: How Does the Immediate Environment Influence the Particle Surface?," *Langmuir*, vol. 32, no. 35, pp. 8793–8802, 2016, doi: 10.1021/acs.langmuir.6b00685.
- [89] Y. Wang and N. Herron, "Nanometer-sized semiconductor clusters: Materials synthesis, quantum size effects, and photophysical properties," *J. Phys. Chem.*, vol. 95, no. 2, pp. 525–532, 1991, doi: 10.1021/j100155a009.
- [90] R. K. Sharma, P. Sharma, and A. Maitra, "Size-dependent catalytic behavior of platinum nanoparticles on the hexacyanoferrate(III)/thiosulfate redox reaction," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 265, no. 1, pp. 134–140, 2003, doi: 10.1016/S0021-9797(03)00463-6.
- [91] L. Shayne *et al.*, "3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Oxidation on Paper Devices for Horseradish Peroxidase-based Assays," vol. 32, no. August, pp. 815–818, 2016.
- [92] A. Frey, B. Meckelein, D. Externest, and M. A. Schmidt, "A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 233, no. 1–2, pp. 47–56, 2000, doi: 10.1016/S0022-1759(99)00166-0.
- [93] K. M. Koczkur, S. Mourdikoudis, L. Polavarapu, and S. E. Skrabalak, "Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis," *Dalt. Trans.*, vol. 44, no. 41, pp. 17883–17905, 2015, doi: 10.1039/c5dt02964c.
- [94] L. Gao *et al.*, "Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 9, pp. 577–583, 2007, doi: 10.1038/nnano.2007.260.
- [95] M. Ma, J. Xie, Y. Zhang, Z. Chen, and N. Gu, "Fe₃O₄@Pt nanoparticles with enhanced peroxidase-like catalytic activity," *Mater. Lett.*, vol. 105, pp. 36–39, 2013, doi: 10.1016/j.matlet.2013.04.020.
- [96] Y. Cui, X. Lai, B. Liang, Y. Liang, H. Sun, and L. Wang, "Polyethyleneimine-Stabilized Platinum Nanoparticles as Peroxidase Mimic for Colorimetric Detection of Glucose," *ACS Omega*, vol. 5, no. 12, pp. 6800–6808, 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c00147.
- [97] J. Mu, Y. Wang, M. Zhao, and L. Zhang, "Intrinsic peroxidase-like activity and catalase-like activity of Co₃O₄ nanoparticles," *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 19, pp. 2540–2542, 2012, doi: 10.1039/c2cc17013b.
- [98] A. B. Ghosh *et al.*, "Morphological tuning of Eu₂O₂S nanoparticles, manifestation of peroxidase-like activity and glucose assay use," *New J. Chem.*, vol. 40, no. 2, pp. 1595–1604, 2016, doi: 10.1039/c5nj02705e.
- [99] R. Gill, L. Bahshi, R. Freeman, and I. Willner, "Optical Detection of Glucose and Acetylcholine Esterase Inhibitors by H₂O₂-Sensitive CdSe/ZnS Quantum Dots," *Angew. Chemie*, vol. 120, no. 9, pp. 1700–1703, 2008, doi: 10.1002/ange.200704794.
- [100] J. J. Luo *et al.*, "Detecting glucose levels in blood plasma and artificial tear by Au(I) Complex on the carbopol polymer: A microfluidic paper-based method," *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 9, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3390/polym10091001.
- [101] Z. B. Pan *et al.*, "A silver metal complex as a luminescent probe for enzymatic sensing of glucose in blood plasma and urine," *Dalt. Trans.*, vol. 47, no. 25, pp. 8346–8355, 2018, doi: 10.1039/c8dt00500a.
- [102] M. Ángel Castaño López, J. L. Fernández de Liger Serrano, J. L. Robles Rodríguez, and T. Márquez Márquez, "Validación de un glucómetro en una unidad de cuidados intensivos," *Endocrinol. y Nutr.*, vol. 59, no. 1, pp. 28–34, 2012, doi: 10.1016/j.endonu.2011.08.003.