

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Física II



**BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS DE TIROSINASA
PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS
FENÓLICOS EN MEDIOS ACUOSOS Y NO ACUOSOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Marta Sánchez-Paniagua López

Bajo la dirección de los doctores
Beatriz López Ruíz y Enrique López Cabarcos

Madrid, 2008

- **ISBN:978-84-692-0118-3**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Sección Departamental de Química Analítica
Departamento de Química-Física II (Fisicoquímica Farmacéutica)



**BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS DE
TIROSINASA PARA LA DETERMINACIÓN
DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN MEDIOS
ACUOSOS Y NO ACUOSOS**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

POR Marta Sánchez-Paniagua López

Bajo la dirección de los Doctores:

Beatriz López Ruiz

Enrique López Cabarcos

ÍNDICE

I. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	1
I. OBJECTIVES ET PLAN DU TRAVAIL	3
II. INTRODUCCIÓN	5
II.1. Compuestos fenólicos	5
II.1.1. Clasificación y descripción	5
II.1.2. Métodos de determinación	12
II.2. Biosensores	15
II.2.1. Clasificación	16
II.2.1.1. Naturaleza del material biológico	16
II.2.1.2. Sistema de transducción	16
II.2.2. Sistemas de inmovilización	18
II.2.3. Estado actual de los biosensores	21
II.3. Biosensor amperométrico de tirosinasa	25
II.3.1. Elemento biocatalítico	25
II.3.2. Transductor electroquímico	27
II.3.3. Biosensores de tirosinasa en medio acuoso	28
II.3.4. Biosensores de tirosinasa de fase orgánica	28
II. 4. Bibliografía	33
III. EXPERIMENTAL	39
III.1. Instrumentación	39
III.1.1. Instrumentos	39
III.1.2. Aparatos	41
III.1.3. Electrodo y células de trabajo	42
III.2. Reactivos	43
III.3. Procedimiento experimental	45
III.3.1. Preparación de disoluciones	45
III.3.2. Preparación de los sistemas de inmovilización enzimática	45
III.3.2.1. Atrapamiento en micropartículas poliméricas	45
III.3.2.2. Adsorción en matrices	49

III.3.3. Preparación del biosensor	51
III.3.3.1. Tratamiento de los electrodos y células electroquímicas	51
III.3.3.2. Biosensores fabricados con micropartículas poliméricas	51
III.3.3.3. Biosensores fabricados con matrices inorgánicas	52
III.3.4. Obtención de los amperogramas	53
III.3.5. Obtención de los voltamperogramas cíclicos	55
III.3.6. Estudio de los parámetros analíticos del biosensor	55
III.3.7. Otras medidas	58
III.4. Bibliografía	59
IV. RESULTADOS	61
IV.1. Biosensor amperométrico de tirosinasa unida al electrodo mediante una membrana de diálisis	61
IV.2. Biosensor amperométrico enzimático fabricado con microgeles de poliacrilamida	65
IV.2.1. Polímero de acrilamida	65
IV.2.2. Síntesis de microgeles de poliacrilamida	66
IV.2.3. Caracterización de microgeles de poliacrilamida	66
IV.2.3.1. Microscopía electrónica de barrido y analizador de partículas	66
IV.2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido	68
IV.2.3.3. Difracción de rayos X	70
IV.2.4. Desarrollo de un biosensor amperométrico con microgeles de PAA para	73
la determinación de compuestos fenólicos	
IV.2.4.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático	73
IV.2.4.1.1. Concentración de agente iniciador	73
IV.2.4.1.2. Concentración de monómero	75
IV.2.4.1.3. Grado de reticulación	78
IV.2.4.2. Optimización de la respuesta del biosensor	80
IV.2.4.2.1. Potencial aplicado	80
IV.2.4.2.2. pH	81
IV.2.4.2.3. Temperatura	82
IV.2.4.2.4. Diseño de experimentos	88
IV.2.4.2.5. Carga enzimática	92
IV.2.4.3. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas	96
IV.2.4.4. Estudio de precisión	97
IV.2.4.5. Estabilidad	98
IV.2.4.6. Determinación de distintos fenoles simples en medio acuoso	99

IV.2.4.7. Utilización en medios no acuosos	104
IV.2.4.8. Determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales	104
IV.3. Biosensor amperométrico enzimático fabricado con microgeles de polímeros de líquidos iónicos	107
IV.3.1. Polímero de líquidos iónicos	107
IV.3.2. Síntesis de microgeles de líquidos iónicos poliméricos	109
IV.3.2.1. Síntesis de micropartículas de poli bromuro 1-vinil-3-etil-imidazol	109
IV.3.2.2. Método de intercambio aniónico	110
IV.3.3. Caracterización de microgeles de líquidos iónicos poliméricos	112
IV.3.3.1. Hinchamiento de los microgeles en distintos disolventes	112
IV.3.3.2. Microscopia electrónica de barrido	112
IV.3.3.3. Analizador de partículas	114
IV.3.3.4. Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo	115
IV.3.3.5. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X	116
IV.3.3.6. Estabilidad térmica	117
IV.3.4. Desarrollo de un biosensor amperométrico con microgeles de LIPs para la determinación de glucosa	119
IV.3.4.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático	119
IV.3.4.1.1. Concentración de agente iniciador	120
IV.3.4.1.2. pH de síntesis	120
IV.3.4.1.3. Concentración de monómero	122
IV.3.4.1.4. Grado de reticulación	124
IV.3.4.2. Optimización de la respuesta del biosensor	125
IV.3.4.2.1. Potencial aplicado	126
IV.3.4.2.2. pH	126
IV.3.4.2.3. Temperatura	127
IV.3.4.2.4. Carga enzimática	130
IV.3.4.3. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas	133
IV.3.4.4. Estudio de precisión	134
IV.3.4.5. Estabilidad	135
IV.3.4.6. Comparación de los biosensores formados por micropartículas de poli[ViEtIm ⁺][Y ⁻] en medios de diferente polaridad	136
IV.3.4.7. Estudio de interferencias	142
IV.3.4.8. Determinación de glucosa en sueros sanguíneos	144
IV.3.5. Desarrollo de un biosensor amperométrico con microgeles de LIPs para la determinación de compuestos fenólicos	147
IV.3.5.1. pH de síntesis	147
IV.3.5.2. Grado de reticulación	149

IV.3.5.3. pH y temperatura	150
IV.3.5.4. Carga enzimática	151
IV.3.5.5. Comparación de los biosensores formados por micropartículas . de poli[ViEtIm ⁺][Y] en medios de diferente polaridad	153
IV.3.5.6. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas.	154
IV.4. Biosensor amperométrico enzimático fabricado con microgeles . de poli (vinilimidazol)	157
IV.4.1. Polímero de vinilimidazol	157
IV.4.2. Síntesis de microgeles de poli (vinilimidazol)	157
IV.4.3. Caracterización de microgeles de poli (vinilimidazol)	158
IV.4.4. Desarrollo de un biosensor amperométrico con microgeles de poli (vinilimidazol) para la determinación de glucosa	159
IV.4.4.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático	159
IV.4.4.1.1. pH de síntesis	159
IV.4.4.1.2. Concentración de monómero	161
IV.4.4.1.3. Grado de reticulación	162
IV.4.4.2. Optimización de la respuesta del biosensor	164
IV.4.4.2.1. Potencial aplicado	164
IV.4.4.2.2. pH	165
IV.4.4.2.3. Temperatura	166
IV.4.4.2.4. Carga enzimática	167
IV.4.4.3. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas	169
IV.4.4.4. Estudio de precisión	171
IV.4.4.5. Estabilidad	171
IV.4.4.6. Comparación de los biosensores formados por micropartículas . de poli (vinilimidazol) en medios de diferente polaridad	172
IV.4.4.7. Estudio de interferencias	175
IV.4.4.8. Determinación de glucosa en sueros sanguíneos	176
IV.4.5. Desarrollo de un biosensor amperométrico con microgeles de poli (vinilimidazol) para la determinación de compuestos fenólicos	179
IV.4.5.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático	179
IV.4.5.2. Optimización de la respuesta del biosensor	182
IV.4.5.2.1. Potencial, pH y temperatura	182
IV.4.5.2.2. Carga enzimática	185
IV.4.5.3. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas	188
IV.4.5.4. Estudio de precisión	188
IV.4.5.5. Determinación de distintos fenoles simples en medio acuoso	189
IV.4.5.6. Comparación de los biosensores formados por micropartículas	191

de poli (vinilimidazol) en medios de diferente polaridad	
IV.4.5.7. Estabilidad	192
IV.4.5.8. Determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales . .	193
IV.5. Biosensor amperométrico enzimático fabricado a partir de laponita	195
IV.5.1. Introducción	195
IV.5.2. Preparación del biosensor	197
IV.5.3. Respuesta del biosensor de laponita/PPO a catecol, quercetina y rutina. .	198
IV.5.4. Optimización del biosensor laponita/PPO	200
IV.5.4.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático	200
IV.5.4.1.1. Secado de la película	200
IV.5.4.1.2. Cantidad de mezcla laponita/PPO depositada en el . .	202
electrodo	
IV.5.4.2. Optimización de la respuesta del biosensor	203
IV.5.4.2.1. Potencial aplicado	204
IV.5.4.2.2. pH	204
IV.5.4.2.3 Temperatura	205
IV.5.5. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas	208
IV.5.6. Estudio de precisión	208
IV.5.7. Estabilidad	209
IV.5.8. Biosensor laponita/azure B/PPO	210
IV.5.8.1. Preparación del biosensor laponita/azure B/PPO	211
IV.5.8.2. Resultados	211
IV.6. Biosensor amperométrico enzimático fabricado a partir de brushita	215
IV.6.1. Introducción	215
IV.6.2. Preparación del biosensor	215
IV.6.3. Caracterización del biosensor	216
IV.6.4. Respuesta del biosensor de brushita pura y cemento de brushita a catecol	217
IV.6.5. Optimización del biosensor de PPO/brushita	220
IV.6.5.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático	221
IV.6.5.1.1. Relación enzima/brushita	221
IV.6.5.1.2. Cantidad de mezcla PPO/brushita depositada en . .	222
el electrodo	
IV.6.5.1.3. Entrecruzamiento con glutaraldehído	224
IV.6.5.2. Optimización de la respuesta del biosensor	225
IV.6.5.2.1. Potencial aplicado	225
IV.6.5.2.2. pH	226
IV.6.5.2.3. Temperatura	227

IV.6.6. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas	229
IV.6.7. Estudio de precisión	229
IV.6.8. Determinación de distintos compuestos fenólicos en medio acuoso	230
IV.6.9. Comparación de los biosensores de PPO/brushita en medios de diferente polaridad	233
IV.6.10. Estabilidad	235
IV.6.11. Determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales	236
 IV.7. Estudio comparativo de los biosensores propuestos para la determinación de compuestos fenólicos	 239
IV.7.1. Condiciones óptimas en la respuesta del biosensor	239
IV.7.2. Determinación de catecol en medio acuoso	240
IV.7.3. Determinación de distintos compuestos fenólicos en medio acuoso	241
IV.7.4. Determinación de catecol en medios predominantemente orgánicos	243
IV.7.5. Tiempo de respuesta	245
IV.7.6. Precisión	246
IV.7.7. Estabilidad	246
IV.7.8. Aplicación de los biosensores desarrollados al análisis de aguas residuales	247
IV.7.9. Aportaciones de los biosensores propuestos en este trabajo con otros encontrados en la literatura	247
 IV.8. Bibliografía	 251
 V. CONCLUSIONES	 257
V. CONCLUSIONS	259
 Anexo: Lista de abreviaturas	 261

I. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El trabajo realizado se engloba dentro de la línea de investigación de nuestro grupo, desarrollo de nuevos sistemas de inmovilización de enzimas para el diseño de biosensores amperométricos para la determinación de compuestos de interés sanitario. Nuestro objetivo principal es el diseño, desarrollo y optimización de biosensores amperométricos enzimáticos para la determinación cuantitativa de distintos compuestos fenólicos en medios acuosos y orgánicos. Los compuestos fenólicos están muy presentes en la naturaleza y tienen diferentes aplicaciones, con una gran importancia nutricional en algunos casos o tóxica en otros. Es muy importante su cuantificación en muy diversas muestras, tanto hidrofílicas como vino, frutas, agua, etc., como hidrofóbicas como aceites y grasas. Como biomaterial para la detección de los compuestos fenólicos se ha utilizado la tirosinasa dada su gran especificidad a los mismos.

El plan de trabajo propuesto es el siguiente:

1. Desarrollo de nuevos sistemas de inmovilización enzimáticos, abordando un tema fundamental en la fabricación de un biosensor: la actividad de la biomolécula y su estabilidad a lo largo del tiempo. Como estrategias de inmovilización del biomaterial se utilizan el atrapamiento en micropartículas poliméricas y la adsorción en matrices inorgánicas. Más concretamente, se proponen 5 sistemas de inmovilización de la enzima tirosinasa:

- Atrapamiento en micropartículas de poliacrilamida
- Atrapamiento en micropartículas de poli (bromuro 1-vinil-3-etil imidazol)
- Atrapamiento en micropartículas de poli (vinilimidazol)
- Adsorción en laponita
- Adsorción en brushita

2. Caracterización y optimización del sistema de inmovilización. En la caracterización se estudia su morfología, propiedades físico-químicas, eficacia de la inmovilización y efecto de la inmovilización sobre la estructura de la enzima. En la optimización se estudian parámetros relacionados con la matriz y su efecto en la actividad de la enzima inmovilizada.

3. Desarrollo de biosensores amperométricos para la determinación de compuestos fenólicos, utilizando como componente biológico la enzima tirosinasa inmovilizada en

diferentes matrices. Se estudian los parámetros que afectan a la respuesta del biosensor (pH, temperatura, potencial, carga enzimática) con el fin de optimizar el dispositivo analítico y obtener las mejores propiedades analíticas.

4. Para ampliar el campo de aplicación de los biosensores y poder determinar compuestos fenólicos tanto en muestras hidrofílicas como hidrofóbicas, se estudia el comportamiento de los mismos en medios acuosos y no acuosos.

5. Con el fin de evaluar la aplicabilidad de los biosensores desarrollados, se utilizan para el análisis de compuestos fenólicos en aguas residuales.

I. OBJECTIVES ET PLAN DU TRAVAIL

Le travail effectué s'inscrit dans la ligne de recherche de notre groupe, consacré au développement de nouveaux systèmes d'immobilisation d'enzymes pour la conception de biocapteurs ampérométriques appliqués à la détermination de composés d'intérêt sanitaire. Notre objectif principal est la conception, le développement et l'optimisation de biocapteurs ampérométriques enzymatiques pour la détermination quantitative de différents composés phénoliques en milieux aqueux et organique. Les composés phénoliques sont très présents dans la nature et ont différentes applications, du à leur grande importance nutritionnelle dans des certains cas ou leur toxicité pour d'autres. Il est donc important de pouvoir effectuer des dosages dans des milieux différents, aussi bien hydrophiles comme du vin, fruits, eau, etc. ou bien hydrophobes comme des huiles et matières grasses. Comme biomolécule pour la détection des composés phénoliques nous avons utilisé la tyrosinase compte tenu de sa grande spécificité vis-à-vis de ces derniers.

Le plan de travail proposé est le suivant :

1. Développement de nouveaux systèmes d'immobilisation enzymatiques, en abordant un aspect fondamental dans la fabrication d'un biocapteur : l'activité de la biomolécule et sa stabilité dans temps. Comme stratégies d'immobilisation de la biomolécule nous avons utilisé l'encapsulation dans des microparticules polymériques et l'adsorption dans des matrices inorganiques. Plus concrètement, on propose 5 systèmes d'immobilisation de l'enzyme tyrosinase:

- Encapsulation dans des microparticules de poly acrylamide
- Encapsulation dans des microparticules de poli (bromide 1-vinyl-3-ethyl imidazole)
- Encapsulation dans des microparticules de poli (vinylimidazole)
- Adsorption dans laponite
- Adsorption dans brushite

2. Caractérisation et optimisation du système d'immobilisation. Pour la caractérisation on étudie la morphologie, les propriétés physico-chimiques, l'efficacité de l'immobilisation et l'effet de l'immobilisation sur la structure de l'enzyme. Dans l'optimisation on étudie des paramètres en rapport avec la matrice d'immobilisation et leur effet dans l'activité l'enzyme immobilisé.

3. Développement de biocapteurs ampérométriques pour la détermination de composés phénoliques en utilisant comme biomolécule la tyrosinase immobilisée dans différentes matrices. Nous avons étudié les paramètres qui affectent la réponse du biocapteur (pH, température, potentiel, charge enzymatique) afin d'optimiser le dispositif analytique et obtenir les meilleures propriétés analytiques.

4. Pour étendre le domaine d'application des biocapteurs et pouvoir déterminer des composés phénoliques dans des échantillons hydrophobes ou bien hydrophiles, on étudie le comportement de ces derniers en milieux aqueux et non aqueux.

5. Afin d'évaluer l'applicabilité des biocapteurs développés, ils sont utilisés pour l'analyse de composés phénoliques dans des eaux résiduelles.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. Compuestos fenólicos

II.1.1. CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN

Los compuestos fenólicos son sustancias químicas con estructura que consiste en un núcleo aromático con al menos un sustituyente hidroxílico libre o sustituido. Se diferencian de otros compuestos, que también poseen esta estructura fenólica (monoterpenos), en su origen biosintético. Al clasificar los compuestos fenólicos según su complejidad química, encontramos los siguientes grupos:

- Fenoles simples
- Ácidos fenólicos
- Acetofenonas y ácidos fenil acéticos
- Cumarinas
- Benzofenonas y estilbenos
- Xantonas
- Flavonoides

Como consecuencia de la gran variedad de compuestos fenólicos presentes en la naturaleza, las propiedades y aplicaciones de los fenoles varían, existiendo algunos con efectos tóxicos sobre los organismos vivos y otros con efectos beneficiosos para la salud. A continuación se realizará un estudio más detallado de cada grupo.

Fenoles simples

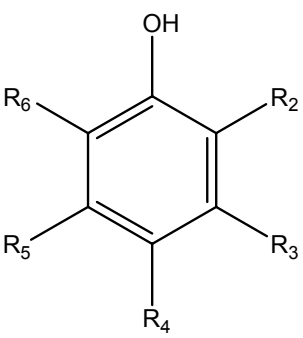
Este grupo de compuestos se caracteriza por poseer en su estructura química un anillo aromático y grupos hidroxílicos (C_6) (Tabla 2.1). La presencia de fenoles en el medio ambiente es consecuencia tanto de acciones naturales (son productos intermedios de degradación de sustancias proteicas) como del aporte antropogénico de carácter industrial. La mayoría de los compuestos fenólicos que se pueden encontrar en las aguas residuales son el resultado de diversas actividades industriales y agrícolas entre las que destacan (Primo Yufera y Carrascón Dorrien, 1980, Enciclopedia OIT) su utilización como desinfectantes y herbicidas (derivados clorados del fenol y cresoles respectivamente), reveladores fotográficos (hidroquinona), antioxidantes en las industrias del caucho (metilfenoles), conservantes de la madera (pentaclorofenol, por su acción fungicida), explosivos (ácido pícrico, por sus propiedades detonantes), etc.

Los vapores y líquidos del fenol son tóxicos y pueden entrar fácilmente en el organismo, por vía cutánea. En humanos, la intoxicación aguda de fenol produce depresión cardíaca, vasodilatación, parada respiratoria, etc. En plantas inhiben el

crecimiento. La cloración de las aguas puede producir clorofenoles que producen mal sabor y la exposición a altos niveles puede causar daño al hígado y al sistema inmunitario. Los nitrofenoles pueden producir alteraciones del metabolismo. La toxicidad de este grupo de fenoles, de gran incidencia en la salud humana, hace imprescindible su control.

Dado que estos compuestos poseen efectos tóxicos sobre los organismos vivos, las legislaciones nacional e internacional recogen los niveles máximos permitidos de fenoles en aguas. La agencia de protección medioambiental norteamericana (EPA 8041, 1995) ha seleccionado 21 fenoles contaminantes prioritarios en función de su frecuencia de aparición, toxicidad y persistencia: fenol, 2-metilfenol, 3-metilfenol, 4-metilfenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,5-tetraclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol, 2,3,5,6-tetraclorofenol, pentaclorofenol, 2,4-dimetilfenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2-amino-4-clorofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2-(1-Metilpropil)-4,6-dinitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2-ciclohexil-4,6-dinitrofenol. En la legislación de la Unión Europea (directiva 80/778/EEC) se establece la concentración máxima admisible de fenoles en agua de bebida, que debe ser 0,5 µg/l para el contenido total y 0,1 µg/l para contenido individual. Por tanto, se requieren métodos de determinación con límites de detección menores de 10⁻⁹M.

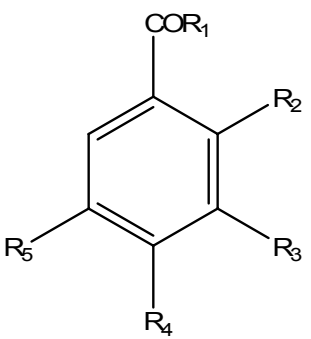
Tabla 2.1.- Estructura química de fenoles simples

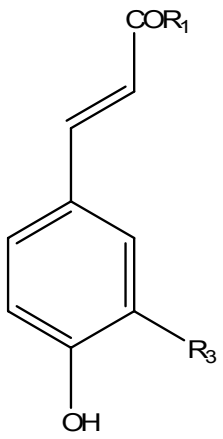
Fenoles simples; C ₆	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	
	H	H	H	H	H	Fenol
	H	Cl	H	H	H	3-clorofenol
	H	H	Cl	H	H	4-clorofenol
	H	CH ₃	H	H	H	m-cresol
	H	H	CH ₃	H	H	p-cresol
	Cl	H	Cl	H	H	2,4-diclorofenol
	NH ₂	H	H	H	H	2-nitrofenol
	H	H	NH ₂	H	H	4-nitrofenol

Ácidos fenólicos

La estructura química de este grupo de compuestos fenólicos consta de un anillo aromático y un grupo hidroxílico comunes a todos los compuestos fenólicos y de un grupo carboxílico (Tabla 2.2). A diferencia del grupo anterior, dentro de éste se encuentran muchos compuestos con interés terapéutico, son los derivados del ácido benzoico (C_6-C_1) y del ácido cinámico (C_6-C_3). Los derivados del ácido cinámico son abundantes en la naturaleza en forma libre (ácido cumárico, ácido caféico) o esterificados con azúcares (ácido cafeil-tartárico), ácido quínico (ácido clorogénico), etc. Los derivados del ácido benzoico son abundantes en la naturaleza fundamentalmente en forma libre, como ácidos (ácido vanílico, ácido gálico) o aldehídos (vanillina, anisaldehído). Entre las plantas medicinales que poseen ácidos fenólicos se encuentran la equinácea con propiedades inmunoestimulantes y la alcachofa con actividad colerética. El sauce posee derivados del ácido salicílico con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. El café, té y vino contienen importantes antioxidantes fenólicos, tales como los ácidos clorogénico, caféico, gálico y ferúlico, que pueden contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Por repetición de estas estructuras C_6-C_1 o C_6-C_3 se forman estructuras poliméricas, taninos hidrolizables, melanina y ligninas. Hay taninos que pueden ser saludables para el hombre (ej. taninos del vino con efectos antioxidantes) pero en general son tóxicos. Las ligninas realizan funciones esenciales para la vida de las plantas como proporcionar rigidez a la pared celular y dar resistencia al ataque de los microorganismos.

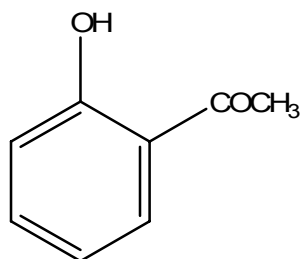
Tabla 2.2.- Estructura química de ácidos fenólicos

Ácidos Benzoicos; C_6-C_1	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	
	OH	H	OH	OH	OH	Ácido gálico
	OH	OH	H	H	H	Ácido salicílico
	OH	H	OH	OH	H	Ácido protocatéquico
	OH	H	OCH ₃	OH	H	Ácido vanílico
	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ácido siríngico
	H	H	OCH ₃	OH	H	Vanillina
	H	H	H	OCH ₃	H	Anisaldehído

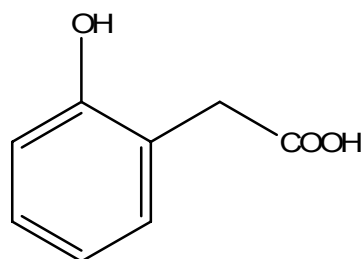
Ácidos Cinámicos; C ₆ -C ₃	R ₁	R ₃	
	OH	OH	Ácido caféico
	OH	H	Ácido p-cumárico
	OH	OCH ₃	Ácido ferúlico
	Ácido tartárico	OH	Ácido cafeil-tartárico
	Ácido quínico	OH	Ácido clorogénico

Acetofenonas y ácidos fenil acéticos

Estos compuestos poseen un anillo fenólico con un sustituyente de 2 átomos de carbono (C₆-C₂). La para y orto-hidroxiacetofenona son intermediarios en la síntesis del paracetamol y aspirina respectivamente. Las hidroxiacetofenonas y derivados se encuentran en plantas de las familias Asteráceas y Verbenáceas con efectos hipotensores. El ácido 2-hidroxifenilacético parece inhibir la agregación plaquetaria (Kim y col, 1998).



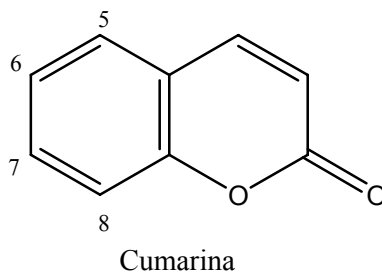
o-hidroxiacetofenona



ácido-2-hidroxifenilacético

Cumarinas

Se conoce a un grupo muy amplio de compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo vegetal, como constituyentes de muchas plantas y aceites esenciales, en las familias Apiáceas, Retáceas, etc. y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopirán-2-ona, (C₆-C₃), denominada cumarina.

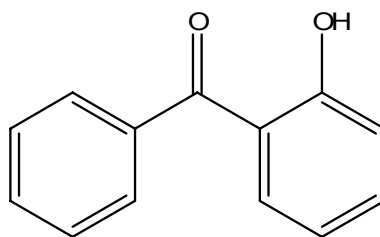


Prácticamente todas las cumarinas, a excepción de la cumarina propiamente dicha, poseen un sustituyente hidroxílico en posición 7 libre como sucede en la umbeliferona, esculetina y escopoletina. Es frecuente que sobre los carbonos 6 u 8 se sitúen radicales isoprenílicos de 5, 10 o con menor frecuencia, 15 átomos de carbono, que por su alta reactividad pueden originar anillos adicionales de tipo furánico o piránico. A este grupo de cumarinas isopreniladas se les conoce en conjunto como cumarinas complejas debido a la gran variabilidad química de sus estructuras (furano y piranocumarinas). Aunque algunas son tóxicas para los mamíferos, como las aflatoxinas, y para otras, como algunas furanocumarinas, se ha descrito fototoxicidad, sin embargo, las cumarinas presentan una variada acción farmacológica. Tienen propiedades vitamínicas, disminuyen la permeabilidad capilar y aumentan la resistencia de las paredes de los capilares. Las piranocumarinas tienen acción antiespasmódica y vasodilatadora de coronarias. Este tipo de compuestos se encuentran en plantas como la angélica que contiene cumarinas sencillas y numerosas furanocumarinas como arcangelicina y bergapteno, y la planta posee propiedades antiespasmódicas, digestivas, diuréticas, antibacterianas y antifúngicas. Asimismo, el castaño de indias, en la corteza contiene cumarinas con propiedades venotónicas.

Benzofenonas y estilbenos

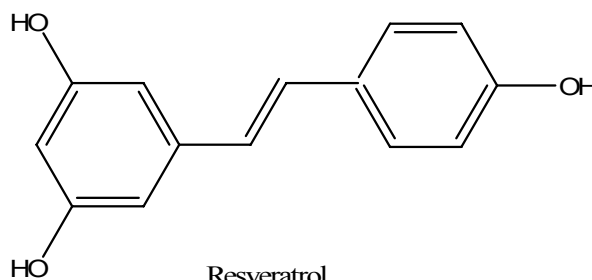
Este grupo de compuestos fenólicos poseen una estructura de 2 anillos fenólicos unidos mediante un átomo de carbono ($C_6-C_1-C_6$) en el caso de las benzofenonas y a dos átomos de carbono ($C_6-C_2-C_6$) en el caso de los estilbenos.

Los derivados de las hidroxibenzofenas se utilizan como fotoprotectores en cremas solares. En la industria textil se utilizan o-hidroxibenzofenonas para proteger las fibras de la fotodegradación. La maclurina (2,3,4,4,6-pentahidroxibenzofenona) es un colorante natural extraído de la madera, empleado en la industria textil y del cuero.



o-hidroxibenzofenona

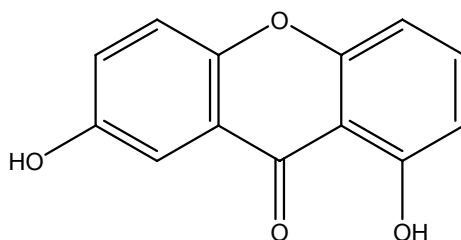
El resveratrol es un compuesto fenólico del grupo de los estilbenos presente principalmente en las uvas y derivados (vino). En estos alimentos, se encuentra libre o como piceido (resveratrol-3-O-glucósido). Este compuesto ayuda a frenar el envejecimiento y prevenir las enfermedades cardiovasculares, y además posee propiedades antiinflamatorias y antitumorales.



Resveratrol

Xantonas

Estos compuestos poseen 2 anillos fenólicos unidos por un átomo de carbono ($C_6-C_1-C_6$). Las xantonas y sus derivados han demostrado tener efectos beneficiosos sobre las enfermedades cardiovasculares. Este efecto protector se debería a sus potentes propiedades antioxidantes y a su actividad antiagregante plaquetaria y vaso relajante.

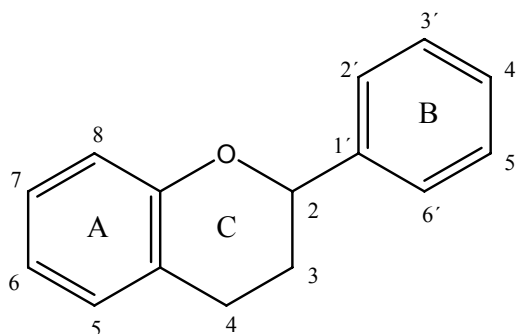


Euxantona

Flavonoides

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, un anillo B y 3 átomos que unen los 2 anillos ($C_6-C_3-C_6$). La estructura puede conformar un

heterociclo (pirona) que son los más abundantes (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas) o una cadena abierta (chalconas). Poseen varios grupos hidroxilo unidos a su estructura de anillo y se encuentran normalmente como glicósidos, siendo la glucosa el residuo de glicosilación mas frecuente. Los taninos condensados o proantocianidinas se forman por condensación de flavanoles.



Los flavonoides están presentes en frutas, verduras, así como en cerveza, té, vino, miel, etc.... y representan un constituyente común en la dieta humana. Entre sus funciones en los vegetales se destaca su papel antifúngico y bactericida. Debido a sus propiedades organolépticas, los flavonoides son los responsables del color natural de los alimentos. Su contribución a la pigmentación de los alimentos vegetales está claramente reconocida, a través de las antocianinas, responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y de sus productos. Los taninos condensados constituyen la principal fracción fenólica responsable de las características de astringencia de los alimentos vegetales. Los flavonoides tienen un enorme interés científico debido a la protección que ejercen en enfermedades crónicas como cáncer (Ramanathan y col, 1996) y enfermedades cardiovasculares (Padilla y col, 2005). Además, poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Tim y col, 2005). Su actividad antioxidante, que parece estar relacionada con su capacidad para quelar metales y captar radicales libres, tiene interés desde un punto de vista nutricional, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales (alimentos que pueden proporcionar un beneficio para la salud además de nutrición básica). Esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer así como en procesos de envejecimiento, por lo que está siendo intensamente estudiado.

II.1.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

Debido a las distintas aplicaciones de los compuestos fenólicos y por su gran importancia nutricional en unos casos y tóxica en otros, es importante disponer de métodos analíticos que permitan la identificación y cuantificación de estos compuestos en muestras clínicas, medioambientales y alimentarias.

Se han desarrollado un gran número de técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. Tradicionalmente se han determinado mediante métodos colorimétricos ya que estos compuestos son capaces de sufrir una gran variedad de reacciones que se pueden utilizar para su detección espectrofotométrica. Las reacciones más comunes son las de copulación o condensación que generan especies intensamente coloreadas que son fácilmente analizables por espectrofotometría. Los fenoles con sustituyentes en la posición para-, no se pueden determinar por estos métodos, por tener desactivada la posición más activa tanto para las reacciones de condensación como de copulación. Por otra parte, se trata de una técnica con baja especificidad, ya que la reacción de color tiene lugar con cualquier grupo hidroxilo oxidable y además se determina la cantidad total de fenoles sin distinguir entre ellos. El método de referencia en la Comunidad Europea para el análisis de fenoles en aguas es el método espectrofotométrico basado en la 4-aminoantipirina (4-AAP) para formar un complejo coloreado con los compuestos fenólicos (Directiva 79/869/CEE) con una exactitud del 50%, precisión del 30% y límite de detección de 0,5 µg/L.

La necesidad de identificación individual de los compuestos fenólicos en distintas muestras requiere el uso de las técnicas tradicionales de separación, como cromatografía de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG) y electroforesis capilar (EC). HPLC es la técnica analítica más utilizada para la caracterización de compuestos fenólicos, como lo refleja el gran número de artículos publicados. Los sistemas de detección más empleados en HPLC son espectrofotometría UV-visible con fotodiodos en serie, espectrometría de masas y detección electroquímica. La electroforesis capilar ha sido incorporada como alternativa o complemento de las separaciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos en distintas matrices, ya que es una técnica de alta resolución, sin paso de derivatización previo y corto tiempo de análisis (Carrasco-Pancorbo y col., 2005., Gómez-Caravaca y col., 2006). Recientemente se ha utilizado como técnica analítica la electrocromatografía capilar (ECC), técnica híbrida de electroforesis capilar y HPLC, uniéndose las ventajas

de ambas y combinando la retención cromatográfica con la movilidad electroforética (Stoggl y col., 2006; Fonseca y col., 2007). El mayor inconveniente radica en la baja vida de la columna, así como el elevado tiempo de acondicionamiento de la columna, lo que perjudica a la robustez del método y al precio del análisis. En la tabla siguiente se describen algunas de las publicaciones de los últimos 3 años en el campo de la determinación de compuestos fenólicos en distintas matrices, indicándose en cada caso el pretratamiento utilizado, los compuestos determinados y las muestras analizadas.

Tabla 2.3.- Métodos cromatográficos y electroforéticos para la determinación de compuestos fenólicos

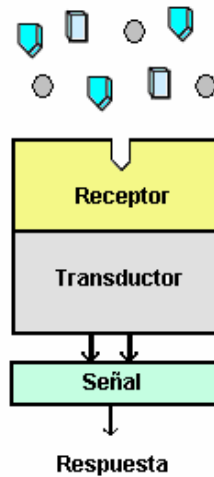
Método	Detector	Pretratamiento	Compuestos/ Muestras	Límite de detección	Ref.
HPLC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción con ultrasonidos	Ácidos fenólicos en fresas	2 µg/mL	Herrera y Luque, 2005
HPLC	Espectrofotometría UV/VIS, fotodiodos en serie	Extracción en membrana líquida sobre fibra hueca	Nitrofenoles en agua	6-8 ng/L	Berhanu y col., 2006
HPLC	Espectrofotometría UV/VIS, fotodiodos en serie	—	Ácidos fenólicos en aceite de oliva	52-160 ng/g	Jiménez y col., 2007
HPLC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción de disolvente	Ácidos fenólicos y flavonoides en zumo de fruta	5-30 ng/mL	Abad-García y col., 2007
HPLC	Espectrometría de masas	Extracción en fase sólida	Ácidos fenólicos en lipoproteínas de baja densidad	0,32-0,89 ng/mL	Torre-Carbot y col., 2007
HPLC	Espectrometría de masas	Extracción en fase sólida	Fenoles simples y benzofenonas en leche materna	1 ng/mL	Ye y col., 2006
HPLC	Quimioluminiscencia	—	Ácidos fenólicos y flavonoides en vino	1,5-82,1 ng/mL	Zhang y col., 2005
HPLC	Fluorescencia	Derivatización	Fenoles simples en agua	0,1-0,9 ng/mL	Suliman y col., 2006
HPLC	Electroquímico	—	Fenoles simples en cerveza	10-200 ng/mL	Vanbeneden y col., 2006
HPLC	Electroquímico	Extracción en fase sólida	Fenoles simples en agua	0,098-0,34 µM	Vega y col., 2007
CG	Espectrometría de	Extracción en fase sólida, con	Fenoles simples en	50-500 ng/L	Zhang y col.,

	masas	derivatización previa	agua		2006
CG	Espectrometría de masas	Extracción en fase sólida, con derivatización previa	Fenoles simples en agua	0,03-0,96 ng/g	Gatidou y col., 2007
CG	Espectrometría de masas	Microextracción en una gota, con derivatización previa	Fenoles simples en agua	4-61 ng/L	Saraji y Bakhshi, 2005
CG	Espectrometría de masas o Ionización en llama	Extracción en fase sólida	Fenoles simples en agua	10-100 ng/L	Faraji, 2005
EC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción en fase sólida	Bisfenoles	0,4 ng/mL	Blanco y col., 2005
EC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	–	Ácidos fenólicos	0,46-3,47 µg/mL	Carrasco-Pancorbo y col., 2007
EC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción en fase sólida	Ácidos fenólicos	0,09-0,11 mM	Lima y col., 2007
EC	Espectrometría de masas	Extracción en fase sólida	Flavonoides en miel	1-25 µg/mL	Arraez-Roman y col., 2006
ECC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción en fase sólida	Flavonoides, cumarinas y ácidos fenólicos en plantas	35 µg/mL	Fonseca y col., 2007

Los métodos electroquímicos constituyen una alternativa interesante para el análisis de compuestos fenólicos, sustancias electroactivas fácilmente oxidables. Estos métodos analíticos son poco costosos, sencillos, con cortos tiempos de análisis y buena reproducibilidad. Por estas razones son muchos los grupos dedicados a desarrollar métodos electroquímicos de detección de compuestos fenólicos, y dentro de estos métodos los biosensores amperométricos, que se describirán más adelante, han adquirido un papel relevante.

II.2. Biosensores

Los biosensores se definen como dispositivos analíticos formados por un elemento de reconocimiento biológico en íntimo contacto con un sistema transductor adecuado que permite procesar la señal producida por la interacción entre el biomaterial y el analito (Esquema 2.1). La señal obtenida se relaciona con la concentración de analito y debido a la especificidad de la biomolécula, la detección se puede hacer directamente en muestras complejas, sin previo tratamiento.



Esquema 2.1.- Esquema del funcionamiento de un biosensor

Estos dispositivos han experimentado un notable avance en los últimos años desarrollándose fundamentalmente biosensores para su utilización en el campo de la biomedicina debido a la necesidad de un diagnóstico rápido. El primer biosensor fue desarrollado por Clark y Lyons en 1962 para la determinación de glucosa y fue comercializado a partir de 1975. Este biosensor consistía en la enzima glucosa oxidasa acoplada a un electrodo de oxígeno. Actualmente, la tecnología de los biosensores ha avanzado a otros campos como el control medioambiental y las industrias agroalimentarias (análisis de control de alimentos, seguridad alimentaria, etc). El número de publicaciones científicas, revisiones y patentes relacionadas con biosensores es muy elevado, lo que refleja el gran interés que despierta este tema en el área científica (Keusgen, 2002).

Los biosensores poseen una serie de características entre las que destacan su alta sensibilidad y especificidad, bajo coste y manejo sencillo, tiempo de análisis corto, además permiten realizar análisis en tiempo real, pudiendo ser automatizados y miniaturizados.

II.2.1. CLASIFICACIÓN

Los biosensores, generalmente, se suelen clasificar dependiendo de la naturaleza del material biológico y en función del sistema de transducción utilizado.

II.2.1.1. Naturaleza del material biológico

a) Biosensores catalíticos, cuyos receptores pueden ser enzimas, tejidos o células. Son los biosensores mejor conocidos y los más aplicados. Se basan en la utilización de biocatalizadores, que son elementos capaces de producir una reacción química sin consumo del biocatalizador, que se regenera y puede ser utilizado de nuevo. Pueden utilizarse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, detectando la desaparición de algún cosustrato o la aparición de algún producto. Para aumentar la estabilidad del material biológico se utilizan distintos sistemas de inmovilización que se describen posteriormente.

b) Biosensores de afinidad, donde los receptores son anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores, etc. Se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que exista transformación catalítica, sino que se produce una reacción en la que se forma un complejo analito-receptor. Para medir la interacción, ya que no existe consumo de sustratos ni generación de productos, se suele utilizar un marcador del receptor o de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor, es habitual el uso de enzimas como marcadores ya que permiten detectar mediante el sistema de transducción alguno de los componentes de la reacción biocatalítica complementaria. El inconveniente que plantea este sistema es la necesidad de incluir pasos posteriores de lavado y separación del exceso de moléculas marcadas y la adición de sustratos para que ocurra la reacción que cataliza la enzima que se usa como marcador.

II.2.1.2. Sistema de transducción

El transductor, en cuyas proximidades se encuentra inmovilizado o retenido el material biológico, debe permitir la conversión de la interacción del analito con el receptor en una respuesta, que luego es amplificada y procesada y que estará relacionada con la concentración de ese analito. Existen distintos tipos de transductores (Eggins, 1996).

a) Electroquímicos

Los transductores electroquímicos transforman la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito en una señal eléctrica. El elemento de reconocimiento biológico y el elemento de transducción deben estar en contacto. Se diferencian cuatro tipos de biosensores electroquímicos que son conductimétricos, potenciométricos, amperométricos e impedimétricos que detectan cambios en la conductividad, en el potencial, en la corriente generada o en la impedancia, respectivamente.

Los biosensores que realizan medidas amperométricas son los más utilizados. En estos casos se trabaja a un potencial fijo respecto al electrodo de referencia. Se mide el flujo de corriente que se genera en la superficie del electrodo de trabajo cuando tiene lugar la oxidación o reducción de alguna de las especies implicadas en la reacción enzimática, y la señal dada se puede correlacionar con la concentración de sustrato. En estos electrodos, bien el sustrato o el producto deben ser especies electroactivas y la velocidad de la reacción enzimática se controla por el registro directo de la corriente (transferencia de electrones) producida.

b) Ópticos

Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la radiación electromagnética (REM) como consecuencia de la interacción física o química entre el analito y el elemento biológico. Las bases físicas de este tipo de sensores son los cambios que ocurren en la absorción de REM, luminiscencia, dispersión de REM o índice de refracción, cuando la radiación incide sobre las superficies de reconocimiento. El sistema básico de medida consiste en una fuente de REM, el elemento biológico (donde se encontrarían las moléculas receptoras) y el detector.

c) Piezoeléctricos

Los sistemas de transducción piezoeléctricos, másicos, gravimétricos o acústicos miden cambios directos de masa inducidos por la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Los materiales que se utilizan para el diseño de este tipo de biosensores son materiales piezoeléctricos. Estos cristales se recubren con el elemento de reconocimiento que suele ser de bioafinidad y se ponen en contacto con la muestra que contiene el analito. La señal medida es la variación observada en la

frecuencia de oscilación antes y después de que se produzca la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito

d) Termométricos

Se basan en la detección del calor generado en las reacciones enzimáticas exotérmicas, que se puede relacionar con la concentración de analito. Estos cambios de temperatura normalmente se determinan por medio de termistores a la entrada y a la salida del dispositivo en el que se encuentran inmovilizadas las enzimas.

e) Nanomecánicos

En este caso, el elemento de reconocimiento biológico se inmoviliza sobre la superficie de una micropalanca de silicio, que se sumerge en una muestra líquida. Generalmente se utilizan anticuerpos como elementos de reconocimiento. La interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito produce un cambio diferencial en la tensión superficial del líquido y la micropalanca sufre una respuesta de tipo nanomecánico que consiste en un cambio de la deflexión y/o de la frecuencia de resonancia, la magnitud de este cambio está relacionada con la concentración de analito.

II.2.2. SISTEMAS DE INMOVILIZACIÓN

Como ya se ha dicho anteriormente, de todos los biosensores descritos, los más utilizados son los enzimáticos. La unión de una capa enzimática inmovilizada en las cercanías de un transductor permite obtener dispositivos que combinan la alta sensibilidad de los métodos analíticos con la inherente selectividad que aportan las enzimas. Se han fabricado un gran número de electrodos enzimáticos y algunos se han utilizado en aplicaciones comerciales, resultando su uso fácil y selectivo para la determinación de distintas sustancias. Un factor limitante para el tiempo de vida de estos biosensores es la estabilidad de las enzimas. Para incrementar, a lo largo del tiempo, la estabilidad estructural y funcional del biomaterial, se han empleado distintos métodos de inmovilización que proporcionan un ambiente en el que el material biológico se encuentra protegido del medio que le rodea. Este material puede actuar únicamente como soporte del componente biológico o participar además en la transmisión de la señal al sistema de transducción (por ejemplo, mediante la inclusión de mediadores para las reacciones redox). Las técnicas empleadas para la inmovilización del biomaterial se pueden dividir en métodos físicos como adsorción,

encapsulación y atrapamiento y métodos químicos como entrecruzamiento y uniones covalentes.

a) Adsorción

La adsorción de las biomoléculas sobre materiales es un método de inmovilización simple, poco costoso, con alta sensibilidad y que no desnaturaliza a la enzima, lo que hace que sea una técnica versátil para la modificación de la superficie electródica. Este tipo de inmovilización se basa en la unión de la biomolécula a la matriz mediante interacciones de tipo no covalente: fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals. El procedimiento de adsorción consiste en poner en contacto las moléculas de enzima con el material adsorbente durante el tiempo suficiente para que se produzcan las interacciones. Los adsorbentes utilizados son: resinas de intercambio iónico, geles de sílice, arcillas, alúmina, colágeno y vidrio poroso. Este sistema presenta un inconveniente, se trata de un proceso reversible ya que la unión entre la matriz y la enzima es débil, pudiéndose producir pérdida de enzima.

b) Encapsulación

En este método, el biomaterial se separa del seno de la disolución mediante una membrana. Los tipos principales de membranas usadas son acetato celulosa (membrana de diálisis), policarbonato, Nafion, etc. Entre las ventajas de este sistema destacan la unión íntima entre el biomaterial y transductor, además de preparación sencilla.

c) Atrapamiento

El atrapamiento es otro método físico de inmovilización que puede llevarse a cabo de dos formas diferentes: a) por inclusión dentro de una matriz polimérica y b) por inclusión en la matriz del transductor. Estas técnicas de atrapamiento poseen algunas ventajas tales como su preparación químicamente sencilla, fácil manipulación y además la enzima está protegida de la biodegradación y la contaminación por la matriz, lo cual aumenta el tiempo de vida del biosensor. Como desventaja se puede encontrar la dificultad de acceso del sustrato a la enzima por la barrera difusional impuesta.

d) Entrecruzamiento

En los métodos químicos de inmovilización basados en el entrecruzamiento, se producen uniones de las enzimas entre sí mediante reactivos bifuncionales, entre los que destacan el glutaraldehído y 2,4-dinitro-benceno. Con este método se produce una mínima pérdida de enzima, pero las uniones entre las enzimas son irreversibles y se utilizan sustancias químicas tóxicas.

e) Enlaces covalentes

Se producen uniones covalentes entre grupos funcionales de la enzima que no son esenciales para su actividad catalítica con grupos químicos de la matriz o directamente del transductor. Como ventajas se destaca la manipulación sencilla y la estabilidad en condiciones ambientales extremas teniendo como inconvenientes la posible alteración del centro activo de la enzima y el tratamiento con sustancias químicas tóxicas.

Además de los 5 tipos de inmovilización explicados, se han investigado mecanismos alternativos de inmovilización con el objetivo de minimizar los inconvenientes de los anteriores. Así, las técnicas de sol-gel, monocapas autoensambladas y membranas lipídicas se están empleando con éxito en el campo de los biosensores.

Técnica sol-gel: Se parte de un precursor (sales inorgánicas de metales o compuestos organometálicos) que se somete a reacciones de hidrólisis y polimerización dando una suspensión coloidal o sol. Esta suspensión se deposita sobre la superficie a recubrir y las partículas se condensan en una nueva fase, gel, formando una capa muy fina. posteriormente, esta película se somete a un tratamiento térmico, dando lugar a una matriz sólida porosa. El material de reconocimiento se añade durante la transición de sol a gel, quedando retenido el material biológico en las cavidades de la matriz.

Monocapas autoensambladas (*self-assemble monolayers* o SAMs): Se forman por la organización espontánea de las moléculas de enzima con ciertos grupos funcionales (ej, tiol), sobre la superficie de un metal. Para inmovilizar el elemento de reconocimiento, se pone en contacto las monocapas con una disolución que contenga el material biológico produciéndose una interacción entre ambos a través de grupos funcionales que se han activado previamente con diversos compuestos químicos.

Membranas de bicapas lipídicas (*bilayer lipid membranes* o BLMs): Aunque su uso para la fabricación de biosensores no es algo reciente, su utilización en este campo se ha limitado debido entre otras cosas a problemas de estabilidad mecánica. Para mejorar la estabilidad se han diseñado membranas unidas a un soporte sólido (solid supported bilayer lipid membranes) y para ello, se requiere de una SAM adsorbida sobre la superficie del transductor más una monocapa lipídica que interacciona con ella.

II.2.3. ESTADO ACTUAL DE LOS BIOSENSORES

La tecnología de los biosensores se encuentra en una etapa de gran actividad, como lo refleja el gran número de artículos científicos, libros, congresos y patentes que generan. El biosensor es una herramienta analítica ideal para su utilización en distintas áreas donde existe la necesidad de disponer de sistemas que proporcionen información selectiva, rápida, automatizada y en tiempo real acerca de la composición química de las muestras, como son el control de procesos biotecnológicos, fermentaciones, control medioambiental y control de calidad de alimentos. Además de la necesidad de detectar niveles bajos de concentración de diversos analitos en aguas, alimentos, etc y en matrices de distinta naturaleza, tanto acuosas como no acuosas.

En el presente trabajo queremos hacer especial mención a los biosensores diseñados para la determinación de analitos en disoluciones no acuosas (biosensores de fase orgánica) dada la especial atención que han generado en los últimos años. La catálisis enzimática ha sido realizada tradicionalmente en medios acuosos. Sin embargo, se ha comprobado que la biocatálisis puede funcionar tanto en medios acuosos como en medios orgánicos (Zaks y Klibanov, 1988; Hall y col., 1988). Según estos autores parece que las enzimas retienen su actividad enzimática en ciertos medios no acuosos siempre que el microentorno de la enzima contenga un nivel de hidratación adecuado. Como consecuencia, la posibilidad de emplear disolventes no acuosos en biocatálisis enzimática representa una nueva oportunidad en la tecnología de los biosensores (Campanella y col., 1998a; Wilkins, y col., 2000; Morales y col., 2002). Un aspecto fundamental para dicha actividad catalítica es la selección de una fase orgánica compatible, que no reaccione fuertemente con la capa de hidratación, indispensable para el funcionamiento de la enzima.

El desarrollo de electrodos enzimáticos de fase orgánica tiene un considerable interés (Sánchez-Paniagua y col., 2006), debido a las siguientes ventajas:

- Permite la determinación de compuestos poco solubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos (Campanella y col., 1998b), extendiendo el campo analítico de los biosensores a muestras y sustratos hidrofóbicos
- Desaparecen las interferencias causadas por especies iónicas e hidrofílicas
- Incrementa el tiempo de vida del biosensor debido a la desaparición de la contaminación microbiana (Saini y col., 1991)
- Simplifica las técnicas de inmovilización ya que al trabajar con disolventes no acuosos, la simple adsorción de la enzima en un soporte sólido es un buen método de inmovilización debido a la insolubilidad de las enzimas en los disolventes orgánicos.

Se han desarrollado gran variedad de estrategias de inmovilización incluyendo adsorción (Kröger y col., 1998; Morales y col., 2005a), atrapamiento en matrices poliméricas (Andreescu y col., 2002; Stanca y Popescu, 2004) y técnicas sol-gel (Wang y Dong, 2001a; Yu y Ju, 2004). Las enzimas más utilizadas para el diseño de biosensores de fase orgánica han sido tirosinasa (Cosnier y col., 2004; Campanella y col., 2005), catalasa (Campanella y col., 2001; Horozova y col., 2002), peroxidasa (García-Moreno y col., 2001) y glucosa oxidasa (Adanyi y col., 2004) para determinar distintos compuestos (fenoles, peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos) en matrices hidrofóbicas. También se han desarrollado biosensores bienzimáticos, como por ejemplo, el propuesto por Campanella y col. para la determinación de lecitina que consta de fosfolipasa D+colinoxidasa (Campanella y col., 1998c). Los electrodos más utilizados para estos fines han sido de grafito, platino, carbono y electrodo de oxígeno de Clark.

En la mayoría de los casos, la actividad enzimática está relacionada directamente con la hidrofobicidad del disolvente. Un indicador de la hidrofobicidad es el parámetro P (coeficiente de distribución del disolvente utilizando un sistema bifásico octanol/agua) (Laane y col., 1987). Los disolventes con $\lg P > 4$ tienen carácter muy hidrofóbico, lo que hace que la interacción con las capas de agua circundantes de la enzima sea prácticamente despreciable. Aquellos disolventes con $\lg P$ comprendidos entre 2 y 4, atrapan parte del agua necesaria por la enzima, mientras que los

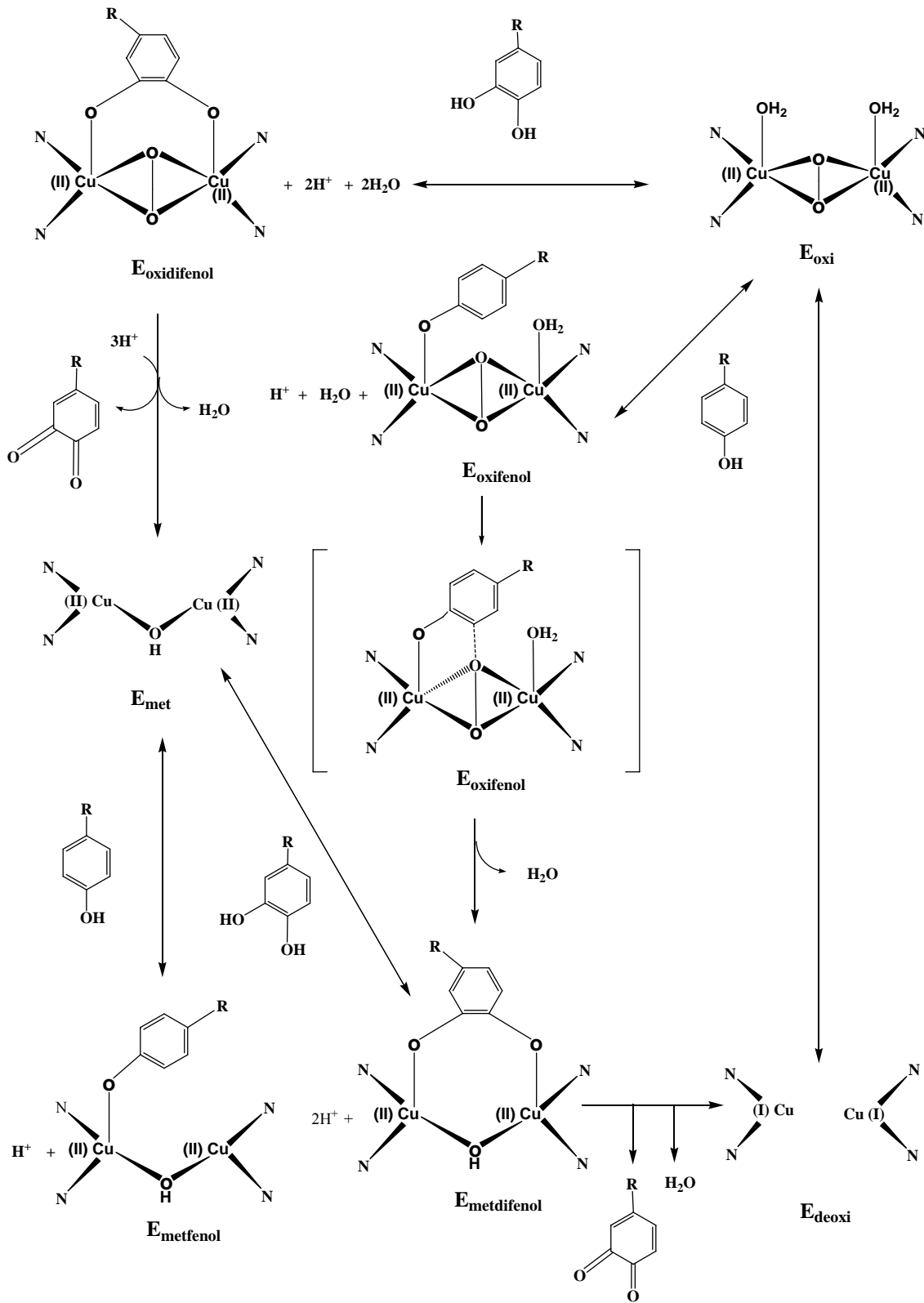
disolventes con un $\lg P < 2$, son muy hidrofílicos, lo que significa que atrapan el agua necesaria para la actividad de la enzima, la deshidratan y tienen tendencia a aumentar su rigidez estructural con la consecuente pérdida de actividad catalítica (Campanella y col., 2001). Esta tendencia, sin embargo, en algunos casos no se cumple. Así, ciertas enzimas muestran una actividad sorprendentemente alta en algunos disolventes orgánicos hidrofílicos, lo cual puede ser debido a que dichas enzimas retienen su capa de hidratación tan fuertemente que incluso los disolventes hidrofílicos no pueden arrancarla. Se ha visto que disolventes como acetonitrilo y acetona que presentan $\lg P < 2$ se pueden utilizar en el diseño de biosensores controlando el grado de hidratación del entorno del biosensor (Iwuoha y Smyth., 1997). Por otra parte, este tipo de disolventes presentan un gran interés analítico como posibles fases móviles en cromatografía de líquidos. No olvidemos que uno de los objetivos analíticos de los biosensores enzimáticos es su utilización en sistemas de flujo y especialmente como sistemas de detección en técnicas cromatográficas.

II.3. Biosensor amperométrico de tirosinasa

Se han desarrollado gran cantidad de biosensores para la determinación de compuestos fenólicos, siendo los biosensores amperométricos de tirosinasa los más utilizados. Estos biosensores se han utilizado para la determinación de fenoles en medios acuosos y no acuosos.

III.3.1. ELEMENTO BIOCATALÍTICO

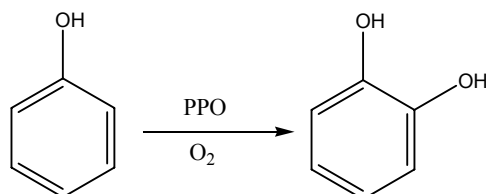
La tirosinasa, también conocida como polifenoloxidasa (PPO), está ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en bacterias, plantas y animales. La tirosinasa ha sido purificada a partir de una gran variedad de fuentes que incluyen desde el champiñón hasta el melanoma de ratón. En general, la especificidad de las tirosinasas se reduce a los monofenoles con una posición orto libre y los ortodifenoles. La estructura de la tirosinasa producida por champiñones es la de un tetrámero, con un peso molecular de 128.000 Dalton, cuyo centro activo consiste en 2 átomos de cobre que según los sustituyentes da lugar a 3 formas de enzima distintas: oxi (E_{oxi}), met (E_{met}) y deoxi (E_{deoxi}). En el estado basal, la enzima tiene un 2-30% de la forma oxi y el resto de la forma met. Existe un ciclo catalítico para monofenoles y otro para difenoles. En el caso de los monofenoles, éstos se unen a la forma E_{oxi} de la enzima dando el complejo E_{oxifenol} que deriva en $E_{\text{metdifenol}}$. Después se libera la ortoquinona quedando la enzima en su forma E_{deoxi} , la cual se une con el oxígeno para dar la forma E_{oxi} . Por otro lado, los monofenoles se pueden unir a la forma E_{met} dando un complejo final que no evoluciona. La oxidación difenólica se inicia por unión del difenol a la forma E_{oxi} que posteriormente se transforma en quinona y en la forma E_{met} de la enzima. Esta forma E_{met} se une a otra molécula de difenol dando el complejo $E_{\text{metdifenol}}$ que sufre las mismas transformaciones que en el caso de los monofenoles (Sánchez-Ferrer y col., 1995) (Esquema 2.2).



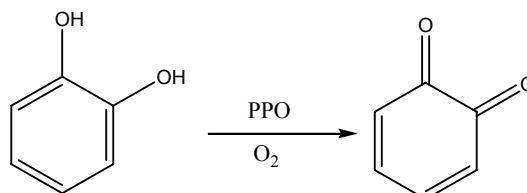
Esquema 2.2.- Mecanismo de acción de la enzima tirosinasa

Por tanto, la tirosinasa en presencia de oxígeno cataliza 2 reacciones distintas y consecutivas, en el caso de los monofenoles:

- Hidroxilación de monofenoles (cresoles, clorofenoles, fenol, etc) a o-difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa):

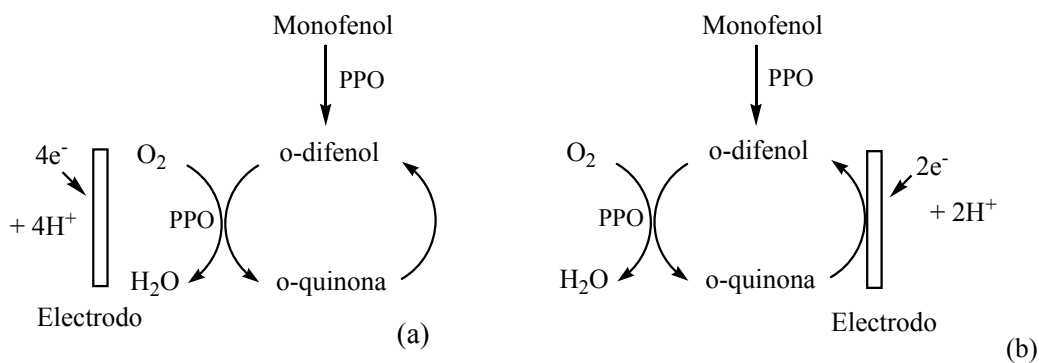


- Oxidación de o-difenoles (catecol, dopamina, L-DOPA, epinefrina) a o-quinonas (actividad difenolasa o catecolasa):



III.3.2. TRANSDUCTOR ELECTROQUÍMICO

La determinación del sustrato se puede llevar a cabo midiendo el consumo de oxígeno en la reacción enzimática (a) o midiendo la reducción electroquímica de las quinonas producidas enzimáticamente (b). En la primera modalidad se utiliza un electrodo de oxígeno de Clark y en el segundo caso electrodos de carbono. La intensidad de corriente obtenida en ambos casos se relaciona con la concentración de sustrato (Esquema 2.3).



Esquema 2.3.- Reacción global del biosensor midiendo (a) el oxígeno consumido en la reacción enzimática o (b) la reducción de la o-quinona producida enzimáticamente

Son muchos los compuestos que pueden actuar como sustratos de la tirosinasa, es por ello que los biosensores amperométricos de tirosinasa se han desarrollado para su utilización en medios acuosos y no acuosos. A continuación mostraremos una pequeña revisión de los distintos tipos de electrodos de tirosinasa utilizados para la detección de compuestos fenólicos, así como de los sistemas de inmovilización, deteniéndonos más en los biosensores de fase orgánica.

III.3.3. BIOSENSORES DE TIROSINASA EN MEDIO ACUOSO

Los biosensores de tirosinasa han sido muy utilizados para la determinación de distintos fenoles en medio acuoso. Dentro de los electrodos de tirosinasa encontrados en la literatura, destacamos como transductores más habituales los electrodos de pasta de carbono (Mailley y col., 2003, Liu y col., 2003, Kim y col., 2007), electrodos de grafito (Peña y col., 2001; Serra y col., 2002, Carralero y col., 2006) y electrodos de carbono vitrificado (Carralero y col., 2005). Respecto a los métodos de inmovilización de tirosinasa más utilizados se encuentran la adsorción (Shan y col., 2002., Shan y col., 2003), el atrapamiento (Mailley y col., 2003, Carralero y col., 2006, Hervás y col., 2006), la unión covalente (Rajesh y Kaneto, 2005, Montereali y col., 2005) y técnicas sol-gel (Liu y col., 2000, Wang y col., 2000b).

Con estos dispositivos se ha conseguido determinar fenoles en muestras de distinta naturaleza, fundamentalmente en vinos, té y aguas (Campanella y col., 2004, Carralero y col., 2005, Dall'Orto y col., 2005).

III.3.4. BIOSENSORES DE TIROSINASA DE FASE ORGÁNICA

En la actualidad, y especialmente en países donde predomina la dieta mediterránea se ha tomado conciencia de la importancia que el aceite tiene en la alimentación, atribuyéndole propiedades beneficiosas para la salud. Por otro lado, parte del carácter nocivo para la salud que presentan las grasas en general, se debe a su tendencia a la autooxidación. Como consecuencia de las investigaciones realizadas con estos fines se ha visto que los aceites de origen vegetal contienen sustancias naturales, como compuestos fenólicos, con propiedades antioxidantes que pueden prevenir el proceso de rancidificación. Para conseguir más información sobre este aspecto de los aceites es importante disponer de métodos analíticos que puedan operar en medios no acuosos, de esta forma se simplificaría mucho el pretratamiento de la muestra con la consiguiente mejora en los resultados analíticos además del

ahorro de tiempo y dinero que esto supone. Con esta idea vemos en la literatura propuestas de biosensores de tirosinasa que han aportado resultados satisfactorios en la determinación de compuestos fenólicos en matrices no acuosas.

En el caso de estos biosensores diseñados para trabajar en medios orgánicos, se han utilizado diferentes estrategias de inmovilización enzimática. Cosnier y col. proponen el uso de pirrol y derivados de este monómero en la fabricación de un biosensor para la determinación de catecol en cloroformo, la inmovilización de la enzima se consigue mediante la polimerización electroquímica de una mezcla enzima/pirrol previamente adsorbido en un electrodo de carbono vitrificado. La inmovilización de PPO en las películas de pirrol con lactobionamida como aditivo polimérico produce un aumento en la sensibilidad del biosensor (+350%) en cloroformo debido al carácter hidrofílico del lactitol (Cosnier y col., 1998).

También se han empleado las interacciones avidina-biotina para el desarrollo de biosensores. Se han desarrollado sensores para determinar catecol en distintos disolventes orgánicos (cloroformo, acetonitrilo, acetato de etilo, etc) utilizando películas de polipirrol electrogenerado en combinación con tirosinasa ambos biotinilados (Mousty y col., 2001) y películas de polipirrol electrogenerado y alginato biotinilados (Cosnier y col., 2004), colocando una capa de avidina entre ambas películas.

Stanca y Popescu construyeron dos biosensores amperométricos para la detección de fenoles simples en cloroformo y disolución tampón, uno de ellos basado en la inmovilización de PPO en una matriz de pirrol electropolimerizado y el otro basado en el entrecruzamiento de la enzima con glutaraldehído (GA). La matriz de polipirrol mostró una mayor eficiencia en la retención de la enzima dando como resultado una mayor sensibilidad, en ambos disolventes. El biosensor fue utilizado, con éxito, en la determinación de ácido benzoico en medio orgánico usando un método analítico basado en la inhibición de PPO por este ácido (Stanca and Popescu, 2004).

Cristea y col. describen la construcción de un electrodo para su uso en fase orgánica (determinación de catecol en cloroformo) utilizando como polímero un derivado bispirrólico que contiene un espaciador hidrofílico largo, lo que facilita el atrapamiento enzimático (Cristea y col., 2005).

Además de polipirrol, se han propuesto otras matrices para la inmovilización enzimática y su posterior uso en medios no acuosos. La inmovilización de PPO por enlaces covalentes con glutaraldehído en una membrana preactivada lo llevó a cabo Capannesi y col. El biosensor se utilizó para evaluar el contenido fenólico en aceite de oliva virgen extra (Capannesi y col., 2000). El método presenta ventajas importantes ya que es relativamente barato, fácil de operar, y no necesita previa extracción por la solubilidad del aceite en n-hexano.

Las técnicas sol-gel también se han utilizado para el desarrollo de biosensor de PPO de fase orgánica. Wang y Dong propusieron un biosensor sol-gel de tirosinasa para la detección de fenoles simples en cloroformo (Wang y Dong, 2000a). Yu y Ju determinaron fenoles en cloroformo puro inmovilizando PPO en una membrana sol-gel de titanio (Yu y Ju, 2004). No se necesitó ninguna cantidad de agua en el disolvente orgánico ya que la membrana retiene la capa de agua esencial necesaria para mantener la actividad enzimática en la fase orgánica lo que abre el camino para la construcción de biosensores de fase orgánica pura.

Campanella y col han desarrollado una gran cantidad de biosensores (mono y bienzimáticos) operando en distintos disolventes orgánicos o mezclas de disolventes. Utilizan, como sistema de inmovilización, el atrapamiento de la enzima en gel kappa-Carrageenan sobre un electrodo de oxígeno de Clark, para la detección amperométrica de distintos analitos. Se ha mostrado la utilidad de estos biosensores en el análisis de alimentos y cosméticos, en su estudio se demuestra que existe relación entre indicadores clásicos de la polaridad de los disolventes, como el Ig P, con nuevos indicadores, como la variación de la corriente máxima y de la sensibilidad del biosensor (Campanella y col., 1999a,b). Centrándonos en los biosensores de tirosinasa, desarrollaron un sensor para el análisis de compuestos fenólicos en aceite de oliva, operando en hexano. Para evaluar el proceso de rancidificación compararon su método, que consistía en medir la disminución progresiva de fenoles, con el método clásico de determinación del índice de peróxidos (ya que los peróxidos son productos típicos de oxidación) y obtuvieron una correlación inversa entre ambos parámetros (Campanella y col., 1999c).

Morales y col. diseñaron un biosensor de grafito-Teflon-PPO para la determinación de galato de propilo en tabletas de caldo utilizando una mezcla acetonitrilo/disolución tampón 80:20. No observaron respuesta amperométrica en

acetonitrilo puro ni en mezclas con poco contenido en agua, lo que confirma la importancia de este elemento en la actividad catalítica de la enzima (Morales y col., 2005a). En un segundo intento, utilizaron micelas inversas (formadas por dioctilsulfosucinato como emulsificante en un disolvente orgánico como fase continua, y en una disolución tampón de fosfato como fase dispersa), para la determinación de galato de propilo en manteca de cerdo (Morales y col., 2005b). El uso de micelas inversas presentó la ventaja de que se produce un fácil control de la cantidad óptima de agua necesaria para la hidratación de la enzima.

La Tabla 2.4 presenta un resumen de los biosensores de tirosinasa de fase orgánica comentados en este apartado, especificándose, en cada caso, el sistema de inmovilización y los disolventes utilizados, así como el sustrato a determinar.

Tabla 2.4.- Biosensores de fase orgánica basados en la enzima tirosinasa

Electrodo	Sistema de inmovilización	Disolventes	Compuestos determinados	Ref.
Carbono vitrificado	Atrapamiento en polímeros derivados del pirrol	Cloroformo	Catecol	Cosnier y col., 1998
Carbono vitrificado	Silica sol-gel	Cloroformo	Fenoles simples	Wang y Dong, 2000a
Carbono vitrificado	Interacción avidin-biotina con polipirrol y alginato	Cloroformo	Catecol	Mousty y col., 2001
Carbono vitrificado	Interacción avidin-biotina con polipirrol y alginato	Cloroformo, acetato de etilo y acetonitrilo	Catecol	Cosnier y col., 2004
Carbono vitrificado	Titanio sol-gel	Cloroformo	Fenoles simples	Yu y Ju, 2004
Carbono vitrificado	Atrapamiento en polipirrol	Cloroformo	Catecol	Cristea y col., 2005
Electrodo de oxígeno de Clark	Atrapamiento en gel Kappa-Carrageenan	n-hexano	Compuestos fenólicos en aceite de oliva, expresado en fenol y ácido caféico	Campanella y col., 1999c
Electrodo de oxígeno de Clark	Unión covalente a una membrana preactivada con GA	n-hexano	Fenol	Capannesi y col., 2000
Grafito	Adsorción en grafito-teflon	Mezclas acetonitrilo-disolución tampón	Propil galato en tabletas de caldo y aceite de oliva	Morales y col., 2005a
Grafito	Adsorción en grafito-teflon	Micelas reversas	Propil galato en manteca de cerdo	Morales y col., 2005b
Platino	Atrapamiento en polipirrol o entrecruzamiento con GA	Cloroformo	Fenoles simples y ácidos fenólicos	Stanca y Popescu, 2004

II.4. Bibliografía

Abad-Garcia, B., Berrueta, LA., Lopez-Marquez, DM., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B., Vicente, F **2007**. J. Chrom. A, 1154, 87-96

Adanyi, N., Toth-Markus, M., Szabo, E.E., Varadi, M., Sammartino, M.P., Tommasetti, M., Campanella, L., **2004**. Anal. Chim. Acta. 501, 219-225

Andreescu, S., Noguer, T., Magearu, V., Marty, J.L., **2002**. Talanta. 57, 169-176

Arraez-Roman, D., Gomez-Caravaca, AM., Gomez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., **2006**. J. Pharm.Biom. Anal. 41, 1648-1656

Berhanu, T., Liu, JF., Romero, R., Megersa, N., Jonsson, JA., **2006**. J. Chrom. A. 1103, 1-8

Blanco, E., Casais, MC., Mejuto, MC., Cela, R., **2005**. J. Chrom. A. 1071, 205-211

Campanella, L., Favero, G., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., **1998a**. Talanta. 46, 595-606

Campanella, L., Pacifici, F., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., **1998b**. Bioelectrochem. Bioenerg. 47, 25-38.

Campanella, L., Pacifici, F., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., **1998c**. Bioelectrochem. Bioenerg. 47, 25-38

Campanella, L., Favero, G., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., **1999a**. Anal. Chim. Acta. 393, 109-120

Campanella, L., Favero, G., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., **1999b**. J. Mol. Catal. B-Enzym. 7, 101-113

Campanella, L., Favero, G., Pastorino, M., Tomassetti, M., **1999c**. Biosens. Bioelectron. 14, 179-186

Campanella, L., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., Zanella, S., **2001**. Sens. Actuat. B. 76, 158-165

Campanella, L., Bonanni, L.A., Finotti, E., Tomassetti M., **2004**. Biosens. Bioelectron. 19, 641-651

Campanella, L., Bonanni, A., Martini, E., Todini, N., Tomassetti, M., **2005**. Sens. Actuat. B. 111-112, 505-514

- Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A., **2000**. Food. Chem. 71, 553-562
- Carralero, V., Mena, M.L., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., **2005**. Anal. Chim. Acta, 528, 1-8
- Carralero, V., Mena, M.L., Gonzalez-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., **2006**. Biosens. Bioelectron., 22, 730-736
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, t., Fernandez-Gutierrez, A., **2005**. J. Sep. Sci. 28, 837-858
- Carrasco-Pancorbo, A., Cifuentes, A., Cortacero-Ramirez, S., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., **2007**. Talanta. 71, 397-405
- Clark, L.C., Lyons, C., Ann. N. Y., **1962**. Acad. Sci., 102, 29-45
- Cosnier, S., Lepellec, A., Guidetti, B., Rico-Lattes, I., **1998**. J. Electroanal. Chem. 449, 165-171
- Cosnier, S., Mousty, C., De Melo, J., Lepellec, A., Novoa, A., Polyak, B., Marks, R.S., **2004**. Electroanal. 16, 2022-2029
- Cristea, C., Mousty, C., Cosnier, S., Popescu, I.C., **2005**. Electrochim. Acta. 50, 3713-3718
- Dall'Orto, V.C., Vago, J.M., Carballo, R.R., Rezzano, J.N., **2005**. Anal. Lett. 38, 19-33
- Drinking Water Directive 80/778/EEC, Commission of the European Communities, Brussels, 198
- Eggins, B., Biosensors: an introduction, **1996**. Editorial: Wiley Teubner, Pg. 51.
- Enciclopedia OIT, enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, Ministerio de trabajo y asuntos sociales, **2001**, Madrid
- Faraji, H., **2005**. J. Chrom. A. 1087, 283-288
- Fonseca, FN., Tavares, MFM., Horvath, C., **2007**. J. Chrom. A. 1154, 390-399
- Garcia-Moreno, E., Ruiz, M.A., Barbas, C., Pingarrón, J.M., **2001**. Anal. Chim. Acta. 448, 9-17
- Gatidou, G., Thomaidis, NS., Stasinakis, AS., Lekkas, TD., **2007**. J. Chrom. A. 1138, 32-41

Gomez-Caravaca, AM., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., **2006**. J. Pharm. Biom. Anal., 41, 1220-1234

Hall, G., Best, D., Turner, A.F. **1988**. Anal. Chim. Acta. 213, 113-119

Herrera, MC., Luque de Castro, MD., **2005**. J. Chrom. A. 1100, 1-7

Hervás Pérez, J.P., Sánchez-Paniagua López, M., López-Cabarcos E., López-Ruiz B., **2006**. Biosens. Bioelectron. 22, 429-439

Horozova, E., Dimcheva, N., Jordanova, Z., **2002**. Bioelectrochem. 58, 181-187

Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., Lyons, M.E.G., **1997**. Biosens. Bioelectron. 12, 53-75

Jimenez, MS, Velarte., R., Castillo, JR. **2007**. Food. Chem. 100, 8-14

Keusgen, M. **2002**. Naturwissenschaften. 89, 433-444

Kim, DH., Jung, EA., Shong, IS., Han, JA., Kim, TH., Han, MJ., **1998**. Arch. Pharm. Res. 21, 17-23

Kim, G-Y., Cuong, NM., Cho, S-H., Shim, J., Woo, J-J., Moon, S-H, **2007**. Talanta. 71, 129-135

Kröger, S., Seford, S.J., Turner, A.P.F., **1998**. Anal. Chim. Acta. 368, 219-231

Laane, C., Boeren, S., Vos, K., **1987**. Biotechnol. Bioeng. 30, 81-87

Lima, DLD., Duarte, AC., Esteves, VI., **2007**. Talanta. 72, 1404-1409

Liu, Z., Deng, J., Li, D., **2000**. Anal. Chim. Acta. 407, 87-96

Liu, S., Yu, J., Ju, H., **2003**. J. Electroanal. Chem. 540, 61-67

Mailley, P., Cummings, EA., Mailley, SC., Eggins, BR., McAdams, E., Cosnier, S., **2003**. Anal. Chem. 75, 5422-5428

Montereali, M., Vastarella, W., Della Seta, L., Pilloton, R., **2005**. Int. J. Environ. Anal. Chem. 85, 795 - 806

Morales, M.D., Morante, S., Escarpa, A., Gonzalez, M.C., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., **2002**. *Talanta*. 57, 1189-1198

Morales, M.D., Gonzalez, M.C., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., **2005a**. *Microchem. J.* 80, 71-78

Morales, M.D., González, M.C., Serra, B., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., **2005b**. *Sens. Actuat. B.* 106, 572-579

Mousty, C., Lepellec, A., Cosnier, S., Novoa, A., Marks, R.S., **2001**. *Electrochem. Commun.* 3, 727-732

Padilla, E., Ruiz, E., Redondo, S., Gordillo-Moscoso, A., Slowing, K., Tejerina, T., **2005**. *Eur. J. Pharmacol.* 517, 84-91

Peña, N., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., **2001**. *Talanta*. 55, 179-187

Primo Yufera, E., Carrascón Dorrien, J.M., **1980**. *Química Agrícola II*, Editorial Alambra. Madrid.

Rajesh., Kaneto, K., **2005**. *Current Applied Physics*. 5, 178-183

Ramanathan, R., Das, W.P., Tan, C.H., **1996**. *Int. J. Oncol.* 3, 115-119

Saini, S., Hall, G.F., Downs, M.E.A., Turner, A.P.F., **1991**. *Anal. Chim. Acta.* 249, 1-15

Sánchez Ferrer, A., Rodríguez López, J.N., García Cánovas, F., García Carmona, F., **1995**. *Biochim. Biophys. Acta.* 1047, 1-11

Sánchez-Paniagua López, M., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B., **2006**. *Biomol. Eng.* 23, 135-147

Saraji, M., Bakhshi, M., **2005**. *J. Chrom. A.* 1098, 30-36

Serra, B., Jiménez, S., Mena, M.L., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., **2002**. *Biosens. Bioelectron.* 17, 217-226

Shan, D., Mousty, C., Cosnier S., Mu. S., **2002**. *J. Electroanal. Chem.*, 537, 103-109

Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S., Mu, S., **2003**. *Electroanal.* 15, 1506-1512

Stanca, S.E., Popescu, I.C., **2004**. *Bioelectrochem.* 64, 47-52

- Stoggl., WM., Huck, CW., Stecher, G., Bonn, GK., **2006**. *Electrophoresis*. 27, 787-792
- Suliman, FEO., Al-kind, SS., Al-Kindy, SMZ., Al-Lawati, HAJ., **2006**. *J. Chrom. A*. 1101, 179-184
- Tim Cushnie, T.P., Lamb, A.J., **2005**. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 26, 343-356
- Torre-Carbot, K., Chavez-Servin, JL., Jauregui, O., Castellote, Al., Lamuela-Raventos, RM., Fito, M., Covas, MI., Muñoz-Aguayo, D., Lopez-Sabater, MC., **2007**. *Anal. Chim. Acta*. 583, 402-410
- Vanbeneden, N., Delvaux, F., Delvaux, FR., **2006**. *J. Chrom. A*. 1136, 237-242
- Vega, D., Agui, L., Gonzalez-Cortes, A., Yañez-Sedeño, P., Pingarrón, JM., **2007**. *Talanta*. 71, 1031-1038
- Wang, B., Dong, S., **2000a**. *J. Electroanal. Chem.* 487, 45-50
- Wang, B., Zhang, J., Dong, S., **2000b**. *Biosens. Bioelectron.* 15, 397-402
- Wilkins, E., Carter, M., Voss, J., Ivnitski, D., **2000**. *Electrochem. Commun.* 2, 786-790
- Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, LL., Calafat, AM., **2006**. *J. Chrom. B*. 831, 110-115
- Yu, J., Ju, H., **2004**. *Electroanal.* 16, 1305-1310
- Zaks, A., Klivanov, A.M., **1988**. *J. Biolog. Chem.* 263, 3194-3201
- Zhang, Q., Cui, H., Myint, A., Lian, M., Liu, L., **2005**. *J. Chrom. A*. 1095, 94-101
- Zhang, ZL., Hibberd, A., Zhou, JL, **2006**. *Anal. Chim. Acta*. 577, 52-61

III. EXPERIMENTAL

III.1. Instrumentación

III.1.1. INSTRUMENTOS

a) Para la caracterización del sistema de inmovilización enzimático, se han utilizado distintos equipos que se describen a continuación

▪ **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Esta técnica se ha utilizado para la caracterización de las micropartículas poliméricas, y estudio de la temperatura de transición vítrea. Para la realización de las medidas se ha utilizado un calorímetro diferencial de barrido Mettler modelo 820 conectado a un sistema de enfriamiento de nitrógeno líquido, que permite un intervalo de temperatura de trabajo comprendido entre -150°C y $700^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Para su análisis, las muestras se introducen en cápsulas de aluminio, el peso aproximado de cada muestra es de 5,0 mg y la velocidad de calentamiento $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

• **Análisis termogravimétrico**

Para comparar el comportamiento térmico de las micropartículas de líquidos iónicos poliméricos se utiliza la termogravimetría. Los ensayos se realizan en un analizador termogravimétrico TGA Q500 bajo nitrógeno y velocidad de calentamiento $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, entre 40 y 700°C .

• **Difracción de rayos X**

Las medidas de difracción de las micropartículas poliméricas se realizan en un difractómetro Philips X'Pert modelo PW3050. Los difractogramas se registran cubriendo un intervalo angular comprendido entre $7^{\circ} < 2\phi < 35^{\circ}$, registrando cada segundo $0,01^{\circ}$, a una temperatura de 25°C , con una precisión en la medida de la temperatura de $\pm 3^{\circ}$. El método utilizado para la adquisición de los difractogramas se realiza por reflexión del haz incidente sobre la muestra, produciéndose un error estimado en la posición de las reflexiones de $\pm 0,02^{\circ}$.

• **Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

El estudio de la forma y el tamaño de las micropartículas poliméricas así como la caracterización del biosensor de brushita, se realiza mediante microscopia electrónica de barrido. Para ello, se deposita una pequeña cantidad de micropartículas previamente liofilizadas o película de brushita, sobre un porta y se cubren de una película de oro. Las medidas se realizan con un microscopio

marca JOEL, modelo JSM-6400, operando a 20 kV. El recubrimiento con oro se realiza con un Sputter Coater marca Blazer (SCD-004) en una atmósfera de argón de 0,05 torr y una corriente de 20 mA.

El microscopio posee un analizador de elementos. Dicho analizador mide la energía de los fotones emitidos por los electrones de las capas más internas del átomo. Los átomos son excitados por los electrones incidentes del haz del microscopio liberando un fotón al volver el electrón excitado a su nivel basal. La energía del fotón liberado es por tanto específica del átomo excitado, lo que permite realizar un análisis semicuantitativo de la muestra. Este analizador se ha utilizado para el estudio de elementos de las micropartículas de poliméricas.

- **Analizador de partículas Galai-Cis**

El analizador de partículas Galai-Cis se utiliza para la medida del tamaño de las micropartículas poliméricas. Este analizador permite medir partículas con tamaños comprendidos entre 2 y 300 μm . Para el cálculo de la superficie específica se ha utilizado el parámetro área/densidad del glóbulo de fase interna.

- **Espectrofotometría de absorción**

La espectrofotometría de absorción UV-VIS se utiliza con el fin de conocer la eficacia catalítica de la enzima inmovilizada. Las medidas se realizan con un espectrofotómetro UV-visible CARY 300 Bio a una longitud de onda de 380 nm.

La espectrofotometría infrarroja se utiliza para saber si la reacción de intercambio aniónico realizada para la síntesis de micropartículas de líquidos iónicos se produce con éxito y para la caracterización del biosensor de brushita. Se utiliza un espectrofotómetro Avatar 360 FT-IR Thermo Nicolet en el intervalo de 4000-500 cm^{-1} en el caso de las micropartículas y 1500-500 cm^{-1} para la brushita.

- b) Las medidas electroquímicas se realizaron con los equipos que a continuación se describen:

- **Amperometría**

Las medidas amperométricas se realizaron con dos potenciostatos, Metrohm E-506 y Radiometer Analytical PRG-DL conectado con un registrador Kipp y Zonen BP 91 XY/t. En ambos casos el potenciostato está conectado a una célula electroquímica termostaticada con 3 electrodos: electrodo de referencia de calomelanos saturado (ECS), en todos los casos salvo en el estudio de laponita que se utiliza un electrodo de referencia Ag/AgCl; electrodo auxiliar de barra de platino y un electrodo de trabajo, en nuestro caso el biosensor, constituido por un electrodo de carbono vitrificado en contacto con la enzima inmovilizada (Figura 3.1).

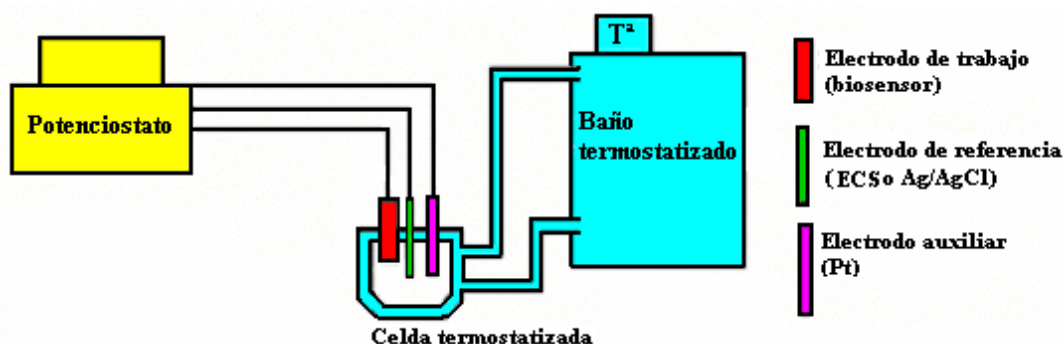


Figura 3.1.- Diseño del potenciostato

- **Voltamperometría cíclica**

Las voltamperometrías cíclicas se realizan con un potenciostato Autolab 100 conectado a un ordenador equipado con el programa Autolab.

- **Potenciometría**

Las medidas de pH se realizan en un pH-metro Mettler Toledo MP-230.

III.1.2. APARATOS

- Los experimentos que requieren control de temperatura, se realizan en células termostaticadas con la ayuda de un termostato de circulación Julabo (-50-200°C)
- Para eliminar el agua de las micropartículas se emplea un liofilizador Leybold-Heraeus

III.1.3. ELECTRODOS Y CÉLULAS DE TRABAJO

Electrodos de trabajo

- Electrodo de carbono vitrificado (superficie 3 mm) con tirosinasa inmovilizada en micropartículas o brushita, preparados según se describe en los apartados 3.3.2 y 3.3.3
- Electrodo rotatorio de carbono vitrificado de superficie electródica 5 mm con tirosinasa inmovilizado en laponita, preparados según se describe en el apartado 3.3.3
- Electrodo de platino (superficie 3 mm) con glucosa oxidasa inmovilizada en micropartículas, preparados según se describe en el apartado 3.3.2

Electrodos de referencia

- Electrodo de calomelanos saturado (ECS)
- Electrodo de Ag/AgCl/KCl (sat)

Electrodo auxiliar

- Electrodo de barra de platino

Células electroquímicas

- De 10 mL y 20 mL de capacidad y termostatizadas

III.2. Reactivos

Todas las disoluciones se preparan diariamente con agua purificada mediante un sistema Milli-Q (Milli-Q RG, Millipore).

Para desoxigenar las disoluciones se hizo pasar corriente de nitrógeno (N₂ comprimido air liquide, Alphagaz N2-1)) de pureza 99,999%.

En las Tablas 3.1 y 3.2 se muestran los reactivos utilizados en este trabajo

Tabla 3.1.- Reactivos generales

Reactivo	Casa comercial	Nº Catálogo
<i>di</i> -Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro	Panreac	131679
Sodio <i>di</i> -hidrógeno Fosfato anhidro	Panreac	122018
Acetato sódico	Merck	6268
Hidróxido sódico	Panreac	141687
Ácido clorhídrico	Panreac	141019
Ácido sulfúrico	Panreac	141058
Peróxido de hidrógeno	Panreac	141076
Ácido perclórico	Panreac	141054
Acetonitrilo	Panreac	131881
Dioxano	Panreac	141296
Etanol	Panreac	121085
Cloroformo	Panreac	141252
Hexano	Panreac	132063

Tabla 3.2.- Reactivos específicos

Reactivo	Casa comercial	Nº Catálogo
Glucosa oxidasa	Sigma-Aldrich	G6766
Tirosinasa	Sigma-Aldrich	T3824
Acrilamida	Sigma-Aldrich	A8887
NN'-metilen-bis-acrilamida	Sigma-Aldrich	146072
Persulfato de amonio	Fluka	09913
Span 80	Fluka	85548
Dodecano	Sigma-Aldrich	D221104
NNN'N'-tetra-metil-etilen-diamina	Fluka	87687
Tetrafluoroborato de sodio	Fluka	71525
Bistrifluorometanosulfonimida de litio	3M	HQ-115
Triflato de litio	3M	FC-122
Dodecilbencenosulfonato de sodio	Sigma-Aldrich	289957
1-vinilimidazol	Sigma-Aldrich	235466
D(+) glucosa	Sigma-Aldrich	G8270
Catecol	Sigma-Aldrich	C9510
Fenol	Sigma-Aldrich	P3653
3-clorofenol	Sigma-Aldrich	C62808
4-clorofenol	Sigma-Aldrich	C62816
m-cresol	Sigma-Aldrich	C85727
p-cresol	Sigma-Aldrich	C85751
Dopamina	Sigma-Aldrich	56610
Quercetina	Sigma-Aldrich	337951
Rutina	Sigma-Aldrich	R2303
Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich	A 5960
Ácido úrico	Sigma-Aldrich	U 0881
Nafion	Sigma-Aldrich	510211
Disolución de glutaraldehído, 25% en agua	Sigma-Aldrich	G6257

III.3. Procedimiento experimental

III.3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH 6,0: Se prepara disolviendo las cantidades adecuadas de las sales disódica y monosódica.
- Disolución tampón 0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/$ 0,05 M CH_3COONa para hacer batería de pH de 4,0 a 8,0 ajustando con HCl.
- Disoluciones patrón de los compuestos fenólicos:
Se obtienen disolviendo la cantidad necesaria del fenol correspondiente (fenol, catecol, *m*-cresol, *p*-cresol, 3-clorofenol, 4-clorofenol, dopamina, quercetina) en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M o en metanol para la rutina, facilitando en este caso el proceso mediante sonicación. Estas disoluciones se preparan diariamente.
- Disolución patrón de glucosa:
Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de glucosa anhidra en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M. Esta disolución se prepara diariamente.

III.3.2. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

En este trabajo se han utilizado dos matrices diferentes, orgánica e inorgánica, como sistemas de inmovilización enzimática. El primero de ellos consiste en el atrapamiento del material biológico en micropartículas poliméricas entrecruzadas con bisacrilamida mientras que el segundo consiste en la adsorción de la enzima a una matriz inorgánica, y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído.

III.3.2.1. Atrapamiento en micropartículas poliméricas

La inmovilización de enzimas en el interior de micropartículas se realiza por polimerización desde emulsión concentrada de fase interna acuosa (W/O) (Terreros, 1999). Las emulsiones concentradas son aquellas en las que la fracción de volumen (Φ) es mayor de 0,74.

$$\Phi = \frac{V_{F.interna}}{V_{F.interna} + V_{F.externa}} \quad (1)$$

donde $V_{F.interna}$ es el volumen de fase interna acuosa y $V_{F.externa}$ es el volumen de fase externa oleosa.

La preparación de micropartículas por polimerización desde emulsión concentrada es un método económico y poco contaminante al utilizar pequeñas cantidades de fase oleosa.

a) Proceso de polimerización radicalaria

La preparación de micropartículas se ha llevado a cabo polimerizando el monómero junto con un agente entrecruzante. La reacción de polimerización radicalaria se inicia con persulfato de amonio (PSA), que se disocia formando NH_4^+ y $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$. Esta última especie es capaz, en medio acuoso, de homolizarse generando 2 radicales libres, $\text{OH}\cdot$ y $\text{SO}_4\cdot$, proceso que se ve acelerado por el NNN'N'-tetra-metil-etilen-diamina (TEMED). Los radicales libres dan lugar a un ataque electrófilo sobre el carbono adyacente al grupo imidazol o adyacente al grupo carbonilo. Esto genera la formación del radical R-monómero que en la fase de crecimiento reacciona con otro monómero de la disolución dando lugar a otro radical formado por 2 moléculas de monómero. El proceso se repite n veces generando un polímero lineal. En nuestro caso se ha incorporado un agente entrecruzante, NN'-metilen-bis-acrilamida, generándose un polímero entrecruzado.

El tamaño de poro de la matriz polimérica reticulada está determinado por la cantidad de agente entrecruzante existente, disminuyendo el diámetro del poro al aumentar la cantidad de entrecruzante. El tamaño de poro de una matriz polimérica guarda relación directa con el grado de reticulación, η , que viene dado por:

$$\eta(\%) = \frac{Ar(g)}{Ar(g) + M(g)} \times 100 \quad (2)$$

donde Ar es la cantidad de agente entrecruzante y M la cantidad de monómero, expresadas ambas en gramos.

Al final, se obtiene una matriz polimérica que atrapa las sustancias que se encuentren dentro del medio donde se realiza la polimerización, como la enzima tirosinasa. Interesa que el tamaño de poro sea lo suficientemente pequeño como para que la enzima no salga al exterior pero a la vez debe ser lo suficientemente grande para que el sustrato pueda difundir hacia el interior de la micropartícula permitiendo la reacción enzimática y para que el producto de dicha reacción, pueda salir del polímero y alcanzar la superficie eléctrica.

b) Síntesis de micropartículas poliméricas

La síntesis de micropartículas tiene distintas fases (Esquema 3.1):

1. Preparación de la emulsión concentrada acuosa/oleosa

Se preparan por separado las 2 fases que formarán la emulsión. La fase externa u oleosa está constituida por dodecano donde se ha solubilizado un tensioactivo. Para preparar emulsiones W/O, se utiliza un tensioactivo con un coeficiente hidrofilia-lipofilia bajo, como el Span 80 (HLB 4,2). La fase interna o acuosa está formada por una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M de pH 6,0 (para evitar que la enzima se desnaturalice), el monómero, agente entrecruzante bisacrilamida (BA), iniciador (PSA) y la enzima que se quiere inmovilizar. Las cantidades de cada uno de estos compuestos se detallan en la Tabla 3.3.

Antes de que se forme la emulsión, se pasa una corriente de nitrógeno a través de la fase acuosa y de la oleosa con el fin de eliminar el O₂ disuelto, ya que el oxígeno molecular es un inhibidor de la polimerización. A continuación, en atmósfera inerte y con agitación magnética, se inyecta la fase acuosa gota a gota sobre la oleosa, consiguiendo una emulsión de aspecto lechoso.

2. Polimerización de la emulsión

Se añade NNN'-trimetil-etilen-diamina (30 µL) que actúa como acelerador de la polimerización. Se mantiene el sistema en agitación durante 60-90 minutos hasta completarse la polimerización, a una temperatura inferior a la de desnaturalización de la enzima.

3. Recuperación de las micropartículas

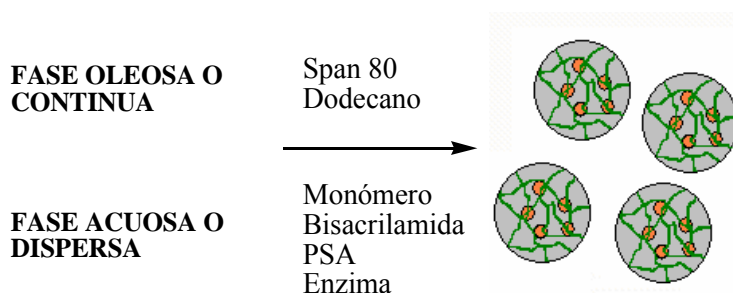
Se añaden 10 mL de acetona al producto obtenido, la emulsión se rompe y las micropartículas obtenidas precipitan. El precipitado obtenido se centrifuga a 4500 rpm durante 15 minutos con la disolución tampón de fosfato, guardando el líquido sobrenadante para comprobar si contiene enzima.

4. Conservación de las micropartículas

Las micropartículas se liofilizan durante 24 horas y se conservan en cámara frigorífica a -4°C.

Tabla 3.3.- Composición de la fase oleosa y acuosa de la emulsión concentrada para la síntesis de micropartículas poliméricas con PPO y grado de reticulación 4,0%

Fase oleosa 13,89%	
Dodecano	450 µL
Span 80	150 µL
Fase acuosa 86,11%	
Disolución tampón	3 mL
Monómero	750 mg
BA	31,25 mg
Tirosinasa	7500 UI (2,6 mg)
PSA	7,5 mg



Esquema 3.1.- Síntesis de micropartículas por polimerización en emulsión concentrada

Los monómeros utilizados para la síntesis de micropartículas fueron acrilamida, bromuro de 1-vinil-3-etil-imidazol y 1-vinilimidazol. En todos los casos se optó por la bisacrilamida como agente entrecruzante (Figura 3.2). Se han realizado síntesis de micropartículas con grados de reticulación comprendidos entre 1,6 y 5,0%. La Tabla 3.4 muestra la cantidad de bisacrilamida utilizada en las síntesis para obtener micropartículas con distintos grados de reticulación, manteniendo siempre la misma cantidad de monómero, 750 mg.

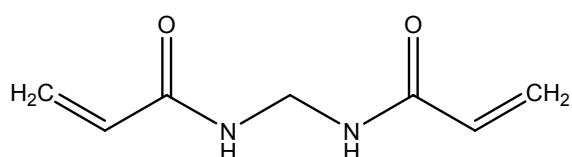


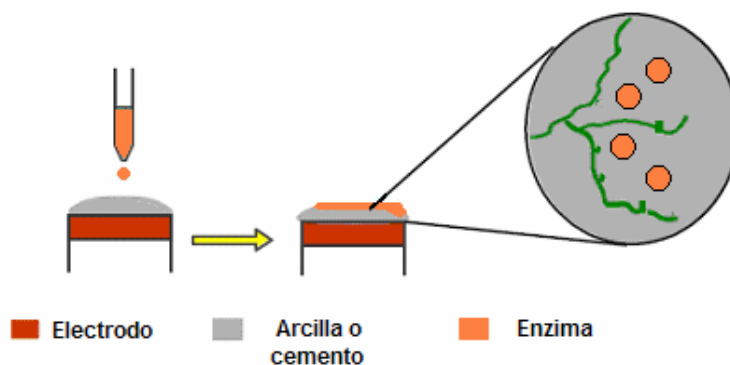
Figura 3.2.- Estructura de bisacrilamida

Tabla 3.4.- Cantidad de agente entrecruzante añadida a 750 mg de monómero necesario para obtener distintos grados de reticulación

Grado de reticulación (%)	Bisacrilamida (mg)
1,6	12,25
2,5	19,25
3,5	27,25
4,0	31,25
4,5	35,50
5,0	40,00

III.3.2.2. Adsorción en matrices inorgánicas

La adsorción de enzimas en matrices inorgánicas ha sido un método muy utilizado para la inmovilización de enzimas, ya que se trata de un proceso sencillo que mantiene la actividad del material biológico (Esquema 3.2). En este trabajo se propone la inmovilización de tirosinasa en arcillas y cementos de fosfato cálcico para su posterior utilización en biosensores. Para evitar la pérdida de enzima se lleva a cabo un entrecruzamiento químico entre las biomoléculas.



Esquema 3.2.- Método de inmovilización de enzimas mediante adsorción

a) Arcillas

Las arcillas que presentan estructura laminar pueden dividirse en 2 clases dependiendo de su capacidad de intercambio iónico: catiónicas que tienen capas de aluminio-silicatos cargadas negativamente y aniónicas con capas de hidróxido cargadas positivamente. La neutralidad de estos materiales se consigue por iones situados en el espacio interlaminar, que pueden ser intercambiados (Cosnier y Lous, 1996).

En este trabajo se ha utilizado una arcilla catiónica, la laponita, ($\text{Si}_8(\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.5}\text{H}_4\text{O}_{24})^{0.7}\text{Na}^{0.7+}$) (Figura 3.3) con cationes intercambiables en su espacio interlaminar, propiedad que ha resultado muy útil para la incorporación de mediadores. La capacidad de intercambio catiónico de la laponita es de 0,73 meq/g (Mousty, 2004).

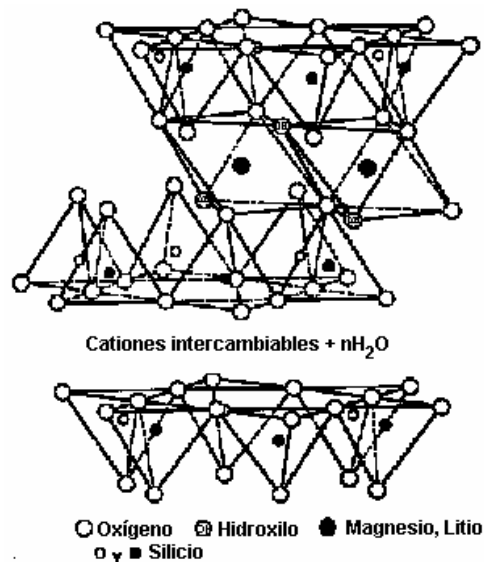


Figura 3.3.- Estructura de la laponita

b) Cementos de fosfato cálcico

Los fosfatos cálcicos CaPs tienen gran importancia debido a sus aplicaciones en medicina (regeneración ósea), agricultura (fertilizantes), farmacia (liberación controlada), industria alimentaria (aditivos) (Bohner, M., 2000). Se pueden diferenciar 2 categorías diferentes: (i) CaPs obtenidos por precipitación de una disolución acuosa a temperatura ambiente (CaPs de baja temperatura) y (ii) CaPs obtenidos por reacciones térmicas (CaPs de alta temperatura). Todos los cementos de fosfato cálcico están dentro de la primera categoría, y generalmente son fosfato dicálcico dihidrato (brushita), fosfato octacálcico e hidroxiapatita, presentes en tejidos humanos. En este trabajo se ha utilizado la brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como matriz para la inmovilización de enzimas ya que se puede sintetizar fácilmente además de ser un material biocompatible. La estructura cristalina de la brushita consiste en películas compactas de cadenas paralelas en donde los iones de calcio están coordinados por 6 átomos de oxígeno de las moléculas de agua (Figura 3.4).

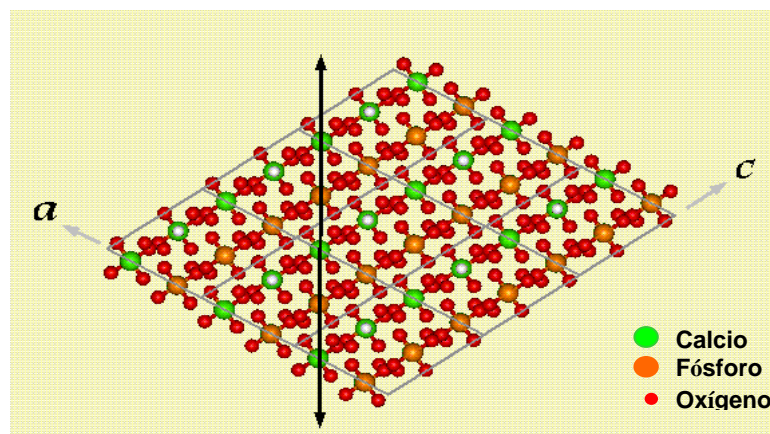


Figura 3.4.- Estructura de la brushita

III.3.3. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR

III.3.3.1. Tratamiento de los electrodos y células electroquímicas

El electrodo de trabajo de platino se lava sumergiéndolo en una disolución ácido sulfúrico:peróxido (1:1) durante 30 segundos. Para el lavado del electrodo de carbono vitrificado se utiliza etanol. A continuación, la superficie electródica se pule con pasta de alúmina 0,05 μm y se lava con agua desionizada para eliminar cualquier partícula residual. El electrodo de referencia se recarga con una disolución saturada de cloruro potásico. Cada cierto tiempo, se lleva a cabo la regeneración de los electrodos de platino, tanto auxiliar como de trabajo, llevándolos a potenciales alternos de -2V y +2V vs. ECS, durante 30 s, repitiendo 10 veces este paso en una disolución tampón de fosfato. El lavado de las células electroquímicas se realiza con una disolución ácido perclórico:agua desionizada (1:1).

La fabricación del biosensor es diferente según el método de inmovilización utilizado.

III.3.3.2. Biosensores fabricados con micropartículas poliméricas

Se deposita una cantidad exactamente pesada de micropartículas con enzima inmovilizada en la superficie del electrodo de trabajo y se retienen con una membrana de diálisis, que permite la entrada del sustrato al interior de la micropartícula (Figura 3.5). Se ha empleado una membrana de diálisis con un corte de peso molecular comprendido entre 12.000 y 14.000 D de Spectrum Medical Industries. Antes de su uso, la membrana se mantiene en una disolución tampón de fosfato sódico durante 24 horas y se conserva en dicha disolución a 4°C.

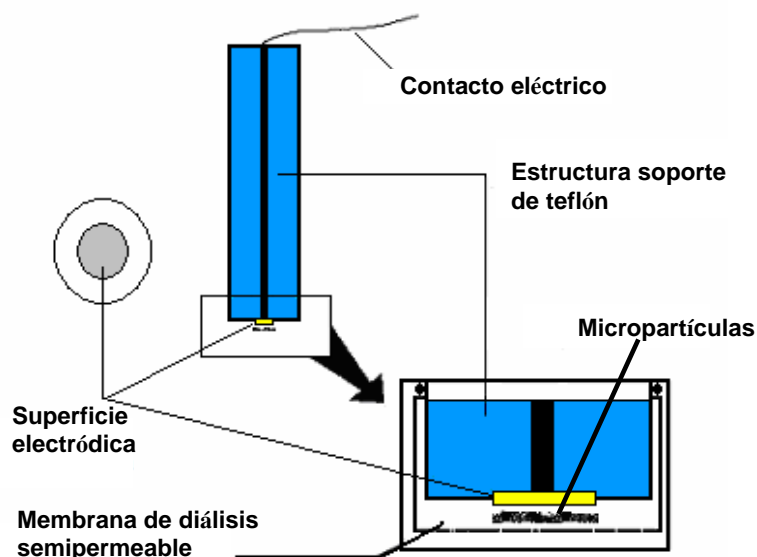


Figura 3.5.- Diseño del biosensor mediante atrapamiento

III.3.3.3. Biosensores fabricados con matrices inorgánicas

La fabricación del biosensor en este caso consiste en la deposición de una mezcla acuosa laponita-enzima o brushita-enzima en la superficie del transductor (Figura 3.6). Se prepara una suspensión de laponita o brushita por dispersión en agua desionizada mediante agitación durante toda la noche (2 mg/mL). La enzima se disuelve en disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 con una concentración de 2 mg/mL. Se realiza una mezcla acuosa enzima-brushita o enzima-laponita con 25 μ L de la disolución de enzima y 25 μ L de la suspensión de arcilla o brushita. Un volumen definido de la mezcla se coloca en la superficie del electrodo. Esa película se deja secar al aire a temperatura ambiente. Después, el electrodo se coloca en vapor de glutaraldehído durante 15 minutos para producir la reticulación enzimática. Posteriormente se mantiene en incubación en disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 durante 20-30 min con agitación constante de 500 rpm para eliminar la enzima que haya quedado sin inmovilizar.

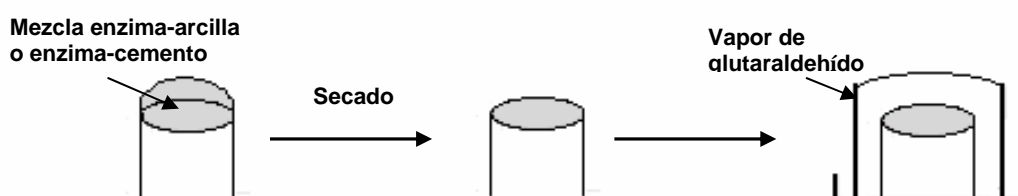


Figura 3.6.- Diseño del biosensor mediante adsorción

III.3.4. OBTENCIÓN DE LOS AMPEROGRAMAS

Para realizar las medidas amperométricas, se añaden 10-20 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 a la célula electroquímica termostaticada y se estabiliza el sistema al potencial de trabajo hasta obtener una línea base recta. Se aplica un potencial de -0,1 V al electrodo de trabajo (biosensor) ya que este potencial permite medir la reducción de la o-quinona, formada en la reacción enzimática, a catecol. Una vez estabilizada la corriente, se añade a la célula electroquímica una cantidad conocida de compuesto fenólico que genera un aumento de la intensidad de corriente, como consecuencia de la reducción de la orto-quinona producida enzimáticamente, hasta llegar al estado estacionario donde la intensidad de corriente se mantiene constante. Se realiza una nueva adición de sustrato que da lugar a otro incremento en la intensidad de corriente, alcanzando de nuevo el estado estacionario. Así sucesivamente hasta que se llega a la concentración de saturación de la enzima, situación en la que todos sus centros activos están unidos a moléculas de sustrato. La intensidad de corriente generada por la reducción del producto de la reacción enzimática tendrá una relación directa con la concentración de compuesto fenólico. Este proceso se refleja en la Figura 3.7.

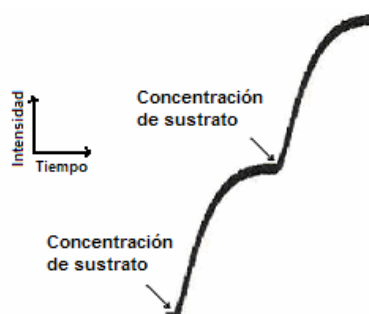
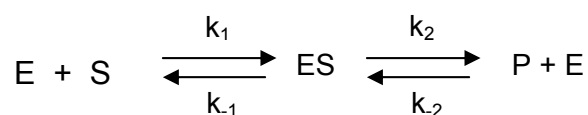


Figura 3.7.- Medida de la intensidad de corriente en condiciones de estado estacionario

Un mecanismo simplificado de las reacciones catalizadas por enzimas se puede ilustrar con el siguiente esquema (Motola, 1988):



donde E= enzima, S=sustrato, ES=complejo y P=producto.

La velocidad total de formación del complejo enzima-sustrato se puede definir como

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] + k_{-2}[P][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (3)$$

Si se asume que en las condiciones iniciales la concentración de producto es cero:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = [ES](k_{-1} + k_2) \quad (4)$$

que se puede reescribir como:

$$\frac{[ES]}{[E][S]} = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} = \frac{1}{K_M} \quad (5)$$

siendo K_M = constante de Michaelis-Menten

Considerando la intensidad máxima (I_{max}) cuando toda la enzima está en forma de complejo ES,

$$I_{max} = k_2[E]_{tot} \quad (6)$$

Por otra parte, bajo cualquier otra condición caracterizada por $[E_{tot}] \neq [ES]$,

$$I = k_2[ES] \quad (7)$$

Sabiendo que la cantidad de enzima total es la suma de la enzima que está libre más la enzima que forma complejo con el sustrato,

$$[E] = [E]_{tot} - [ES] \quad (8)$$

que se puede expresar de la siguiente forma:

$$[E] = \frac{I_{max}}{k_2} - \frac{I}{k_2} \quad (9)$$

Comparando las ecuaciones 5 y 9 se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{1}{K_M} = \frac{k_2[ES]}{[S](I_{max} - I)} \quad (10)$$

que se puede reescribir como:

$$K_M = [S] \frac{I_{max} - I}{I} \quad (11)$$

Despejando la intensidad de corriente,

$$I = \frac{[S]I_{max}}{K_M + [S]} \quad (12)$$

Comparando las ecuaciones 6 y 12,

$$I = \frac{[S]k_2[E]_{tot}}{K_M + [S]} \quad (13)$$

Esta ecuación indica que la intensidad de corriente es directamente proporcional a la cantidad de enzima cuando $[S] \gg K_M$, por lo que:

$$I = I_{max} = k_2[E]_{tot} \quad (14)$$

Sin embargo, cuando $[S] \ll K_M$, la intensidad de corriente es directamente proporcional a la concentración de sustrato, siempre que las determinaciones de sustrato se realicen a una concentración constante de enzima:

$$I = \frac{k_2[E]_{tot}}{K_M} [S] = \frac{I_{max}}{K_M} [S] = cte [S] \quad (15)$$

III.3.5. OBTENCIÓN DE LOS VOLTAMPEROGRAMAS CÍCLICOS

Los voltamperogramas cíclicos se obtuvieron a una velocidad de barrido de 10mV/s y un intervalo de potencial de -1 a +1 V para el estudio del biosensor de PAA y a una velocidad de barrido de 50mV/s entre 0 y +0,6V para el estudio del biosensor de laponita.

III.3.6. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL BIOSENSOR

Los parámetros analíticos estudiados en todos los biosensores han sido la sensibilidad, intensidad de corriente máxima, intervalo lineal, límite de detección, tiempo de respuesta, repetibilidad y precisión intermedia. La sensibilidad se calcula a partir de la pendiente del intervalo lineal. El intervalo lineal corresponde con el mayor número de resultados que presentan un coeficiente de regresión igual o superior al 99%. El cálculo del límite de detección se basa en la relación señal/ruido=3. La intensidad de corriente máxima o intensidad de corriente alcanzada al producirse la saturación enzimática, se expresa en forma de densidad de corriente máxima en las

tablas, relacionándolo con la superficie del electrodo. El tiempo de respuesta se estima mediante el tiempo que se transcurre entre la adición del analito a la célula y la obtención del 95 % de la respuesta.

Para evaluar la precisión del método, se determinan dos propiedades analíticas básicas, repetibilidad y precisión intermedia, expresadas mediante el coeficiente de variación (CV). En el estudio de la repetibilidad, todas las condiciones se mantienen idénticas, realizando 10 medidas de la misma disolución de sustrato con el mismo biosensor y el mismo día. Este estudio se realiza a 3 niveles de concentración de sustrato, a la concentración más baja y más alta del intervalo lineal y a una concentración intermedia.

Los CV obtenidos se comparan con los propuestos como máximos aceptables por Horwitz, que a través de su ecuación empírica (Horwitz, 1982) muestra el aumento del coeficiente de variación a medida que disminuye la concentración del analito en estudio (Tabla 3.5).

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5 \lg C)} \quad (16)$$

Tabla 3.5.- Máximos coeficientes de variación porcentuales aceptables en función de la concentración de analito a medir

% de analito	Coefficiente de variación (%)
100	2
10	2,8
1	4
0,1	5,7
0,01	8
0,001	11,3
0,0001	16

Para el estudio de precisión intermedia, se realizan 10 medidas de una disolución de sustrato de concentración intermedia de la zona lineal, manteniendo las

mismas condiciones experimentales y repitiendo las 10 medidas durante 2 días sucesivos. Con los resultados obtenidos se realizan los gráficos de cajas y bigotes descritos por Jonh Tukey en 1977. Estos gráficos consisten en un rectángulo (Figura 3.8) que contiene los datos correspondientes al segundo (Q_2) y tercer cuartil (Q_3), es decir la caja central indica el intervalo en el que se concentra el 50% de los datos. Los bigotes indican gráficamente los valores mínimo (X_{\min}) y máximo (X_{\max}). La barra central indica la mediana de la distribución y el aspa indica la media.

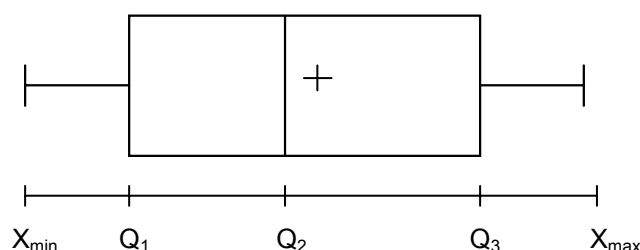


Figura 3.8.- Gráfico de cajas y bigotes

Para averiguar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medidas realizadas con el biosensor según el día, se comparan las medias mediante la distribución t de Student y las desviaciones típicas mediante la distribución F de Snedecor.

Como parámetros cinéticos se calculan el coeficiente de Hill, mediante la representación de Hill (17) y la constante de Michaelis-Menten, mediante la ecuación de Lineweaver-Burk (18). En la ecuación de Hill se representa en abcisas la concentración de sustrato expresada en logaritmo y en ordenada el $\lg [V/(V_{\max}-V)]$. El coeficiente de Hill es la pendiente de la recta y nos indica si la reacción enzimática sigue una cinética de Michaelis-Menten, que ocurre cuando éste tiene un valor próximo a 1.

$$\lg \frac{V}{V_{\max} - V} = -\lg K_M + n \lg S \quad (17)$$

Si este coeficiente de Hill se aleja de 1, significa que el proceso global del biosensor no presenta una cinética de Michaelis-Menten, por lo que no se pueden calcular los parámetros correspondientes a la cinética enzimática implicada en el proceso. Esto ocurre cuando el proceso de difusión es más lento que la reacción

enzimática. Cuando sucede al contrario, se utiliza la ecuación de Lineweaver-Burk para el cálculo de la constante de Michaelis-Menten, K_M (5), representando en abscisas la inversa de la concentración de sustrato y en ordenadas la inversa de la intensidad de corriente obtenida. A partir de la ordenada en el origen se calcula el valor de V_{max} y a partir de la pendiente de la recta se calcula K_M .

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} \quad (18)$$

III.3.7. OTRAS MEDIDAS

UV-VIS

Con objeto de estudiar la eficacia catalítica de la enzima inmovilizada, se compararon las absorbancias de las disoluciones de o-quinonas producidas enzimáticamente siguiendo dos procedimientos distintos, en el primero el sustrato se puso en contacto con una disolución de enzima y en el segundo con una suspensión de micropartículas con enzima inmovilizada. Los espectros se realizaron midiendo las o-quinonas generadas después de la adición de catecol a una longitud de onda de 380 nm (Cummings et al., 2001).

IR

Utilizamos esta técnica en la caracterización de las micropartículas de líquidos iónicos y para la caracterización del biosensor de brushita. Para realizar los espectros IR de las micropartículas de líquidos iónicos poliméricos se prepararon pastillas de micropartículas y KBr del 1%, pesando 100 mg de KBr y 1 mg de micropartículas. Para los espectros IR de brushita, se prepararon disoluciones de brushita y enzima (2 mg/mL) y se colocó una cantidad de esa mezcla en la superficie de zirconio.

III.4. Bibliografía

Bohner, M., **2000**. Injury. 31, 37-47

Cosnier, S., Lous, K.L., **1996**. J. Electroanal. Chem. 406, 243-246

Cummings, E.A., Linquette-Mailley, S., Mailley, P., Cosnier, S., Eggins, B.R., McAdams, E.T., **2001**. Talanta. 55, 1015-1027

Horwitz W. **1982**. Anal. Chem. 54, 67-76

Mottola, H.A., **1988**. John Wiley & Sons, Inc. New York, 55-57

Mousty, C., **2004**. Applied clay science. 27, 159-177

Terrerros, A. Tesis Doctoral. **1999**. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

Tukey, J. **1977**. Exploratory Data Analysis, Addison-Wesley

IV. RESULTADOS

IV.1. Biosensor amperométrico de tirosinasa unida al electrodo mediante una membrana de diálisis

Antes de comenzar el estudio de los distintos biosensores de tirosinasa, se revisó el comportamiento de un biosensor de tirosinasa sujeta a un electrodo de carbono vitrificado mediante una membrana de diálisis, analizando la influencia del pH y de la temperatura.

Las enzimas desarrollan su actividad catalítica en un intervalo de pH y temperatura determinado. El control de estos factores es muy importante en una reacción enzimática ya que a partir de una determinada temperatura y también a valores extremos de pH se produce la desnaturalización de la proteína, modificándose su estructura y perdiendo su capacidad catalítica.

Para realizar este estudio se procedió del siguiente modo: se tomaron 0,1 mg de tirosinasa (260 UI) y esa cantidad se depositó sobre la superficie del electrodo de carbono vitrificado. La tirosinasa se mantuvo en contacto con el electrodo mediante una membrana de diálisis. El electrodo resultante se sumergió en una disolución de tampón fosfato de pH determinado junto con un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar y se aplicó un potencial de -0,1V vs. ECS. Una vez estabilizada la línea base se registró la respuesta generada por el catecol (5 μ M). En el estudio de la temperatura, el pH de la célula termostatizada se mantuvo siempre a 6,0 mediante una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M y en el estudio del pH, la temperatura fue siempre de 20 °C y se utilizó una disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico que permite estudiar un amplio intervalo de pHs.

Como se observa en la Figura 4.1, la máxima corriente se produce a pH 6,0. A pH 5,0 y 7,0 se observa un descenso de intensidad de corriente del 30 y 50% respectivamente. La Figura 4.2 muestra cómo la intensidad de corriente aumenta a medida que se incrementa la temperatura hasta llegar a una temperatura, en este caso, 25°C donde la intensidad de corriente es máxima. Para temperaturas superiores a 25°C, se produce un descenso de la intensidad de corriente como consecuencia del proceso de desnaturalización enzimática. Este descenso es suave hasta 35°C (a esa temperatura se mantiene el 80 % de la intensidad de corriente máxima), observándose una caída brusca de la corriente al superar los 35°C perdiéndose hasta un 80 % de la actividad al alcanzar los 40°C. Se ha realizado la representación de Arrhenius para conocer la energía de activación de la PPO libre (Figura 4.3), observándose una única recta de cuya pendiente se deriva una energía de activación (E_a) de 14,26 KJ/mol.

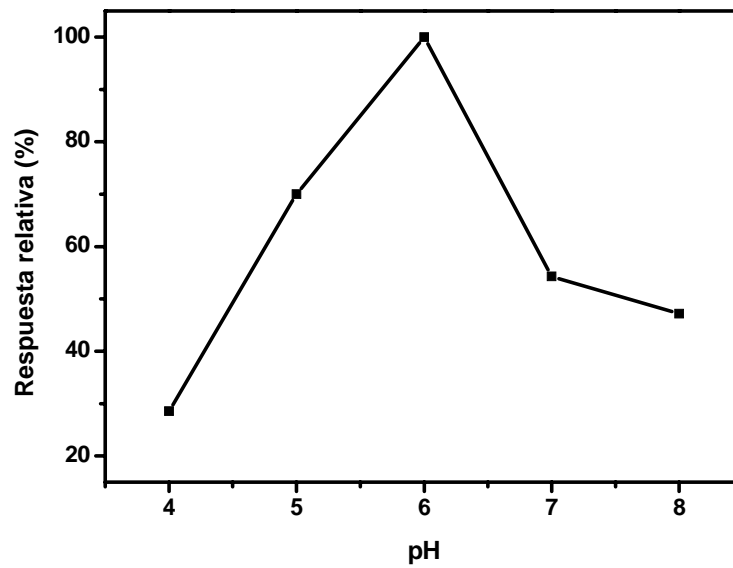


Figura 4.1.- Actividad enzimática en función del pH al añadir 5 μM de catecol. Disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico, -0,1V vs. ECS y 20°C

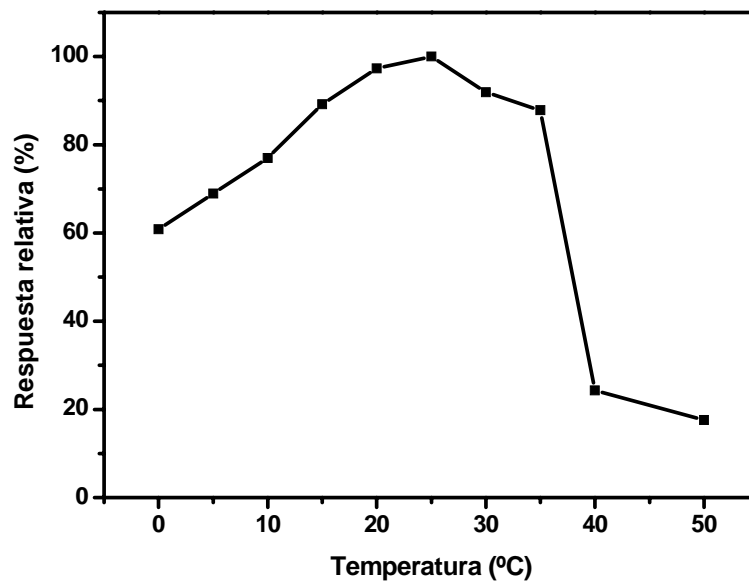


Figura 4.2.- Actividad enzimática en función de la temperatura al añadir 5 μM de catecol. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y -0,1V vs. ECS

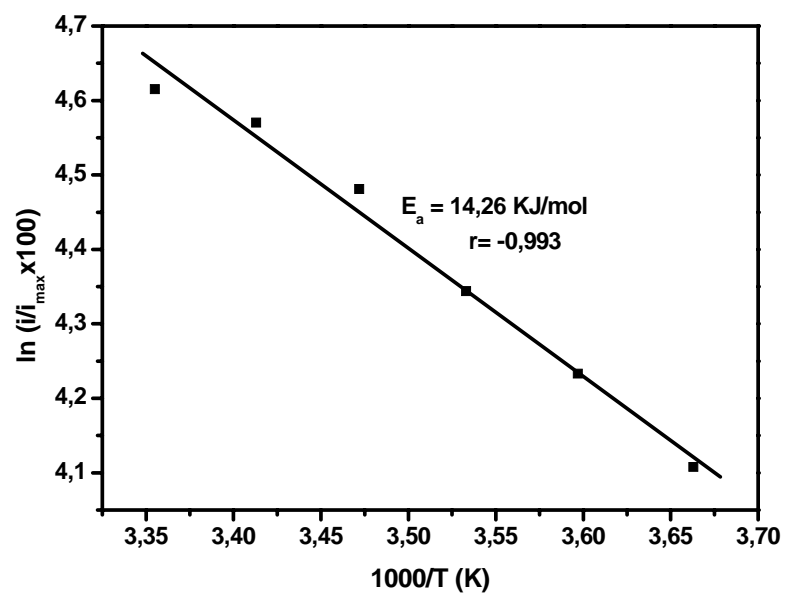


Figura 4.3.- Representación de Arrhenius para PPO sujeta al electrodo por una membrana de diálisis

IV.2. Biosensor amperométrico enzimático fabricado con microgeles de poliacrilamida

IV.2.1. POLÍMERO DE ACRILAMIDA

Los hidrogeles se describen como redes macromoleculares entrecruzadas o inmersas en un fluido (Birch y col., 1990) que sufren cambios de volumen reversibles como respuesta a estímulos externos tales como pH, temperatura, campo eléctrico, etc. Estos hidrogeles pueden existir en 2 fases, hinchados y colapsados. Los hidrogeles son capaces de absorber grandes cantidades de agua porque ello minimiza la energía libre de la mezcla del polímero con el disolvente, pero son insolubles en ella debido a que las cadenas poliméricas están interconectadas. La red tridimensional del polímero es estabilizada por el agente entrecruzante, el cual determina sus propiedades de hinchamiento. En el interior de los hidrogeles se pueden inmovilizar biomoléculas por atrapamiento físico.

La poliacrilamida (PAA) (ver monómero en Figura 4.4) es un polímero que forma geles sensibles a la temperatura, y puede prepararse como hidrogeles y microgeles. Este polímero ha sido utilizado como matriz para electroforesis, encapsulación de drogas y más recientemente como sistema de inmovilización enzimático. En nuestro grupo de trabajo se han utilizado microgeles de PAA para la inmovilización de distintas enzimas y se han desarrollado biosensores monoenzimáticos de glucosa oxidasa (Rubio Retama y col., 2003) y galactosa oxidasa (Hervás Perez y col., 2006) y bienzimáticos de colinioxidasa y acetilcolinesterasa (Sánchez-Paniagua y col., 2007). Las micropartículas liofilizadas y almacenadas a -4°C pueden ser usadas después de 3 años de su síntesis, manteniendo la misma actividad enzimática. Con el fin de investigar una nueva aplicación analítica para estos biosensores, se utilizaron estas mismas micropartículas para la inmovilización de la enzima tirosinasa y posterior desarrollo de un biosensor para la determinación de fenoles.

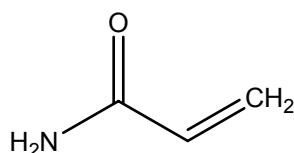


Figura 4.4.- Estructura del monómero de archilamida

IV.2.2. SÍNTESIS DE MICROGELES DE POLIACRILAMIDA

La síntesis de microgeles de poliacrilamida se ha realizado mediante el método de polimerización por emulsión concentrada, tal y como se describe en el apartado 3.2.1, variando el grado de reticulación (η) de 1,6 a 5,0%. La concentración de PPO inmovilizada en las micropartículas ha sido de 2.500UI/mL de fase acuosa.

Con el fin de conocer cómo afecta la reacción de polimerización a la eficacia catalítica de la enzima inmovilizada se midió la actividad enzimática de las micropartículas con enzima y la actividad enzimática de la misma cantidad de enzima libre. Para ello se compararon las absorbancias obtenidas de las o-quinonas producidas enzimáticamente en 2 tipos de muestras: disolución de enzima y disolución de micropartículas con enzima inmovilizada a las que se les añade catecol. Se prepararon 2 muestras: (i) una dispersión formada por 3 mg de micropartículas (en las cuales se habían inmovilizado 29,89 UI de enzima) ($\eta = 4,0\%$) en 5 mL de disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0 y (ii) una disolución de 29,89 UI de enzima en 5 mL de la misma disolución tampón. En ambos casos se añadieron 0,5 mM de catecol y se determinó la actividad enzimática de ambas muestras mediante las medidas espectrofotométricas a 380 nm de las o-quinonas generadas enzimáticamente tras la adición de catecol según el método propuesto por Cumming y col. (Cummins y col., 2001). Se encontró que la actividad enzimática de la dispersión de micropartículas fue un 74% de la actividad enzimática de la disolución de enzima. Es decir, el método de inmovilización propuesto supone una pérdida del 26% de la actividad enzimática.

IV.2.3. CARACTERIZACIÓN DE MICROGELES DE POLIACRILAMIDA

IV.2.3.1. Microscopía electrónica de barrido y analizador de partículas

El estudio morfológico de las micropartículas se ha realizado mediante microscopía electrónica de barrido y un analizador de partículas. En la Figura 4.5 se muestran micrografías obtenidas con micropartículas de poliacrilamida vacías con grado de reticulación 4,0% y micropartículas PAA con PPO y grados de reticulación de 4,0 y 5,0%. De acuerdo con los resultados obtenidos con el analizador de partículas (Figura 4.6) las micropartículas generadas por la reacción de polimerización presentan una distribución de tamaños con diámetros entre 2-12 μm , siendo el tamaño medio de 5,2 μm para micropartículas con tirosinasa, muy próximo al tamaño medio de las micropartículas vacías que fue de 5 μm . Hay que destacar que tanto en las

micropartículas vacías como en las que contienen PPO aproximadamente el 50 % de ellas tienen un diámetro comprendido entre 2 y 4 μm .

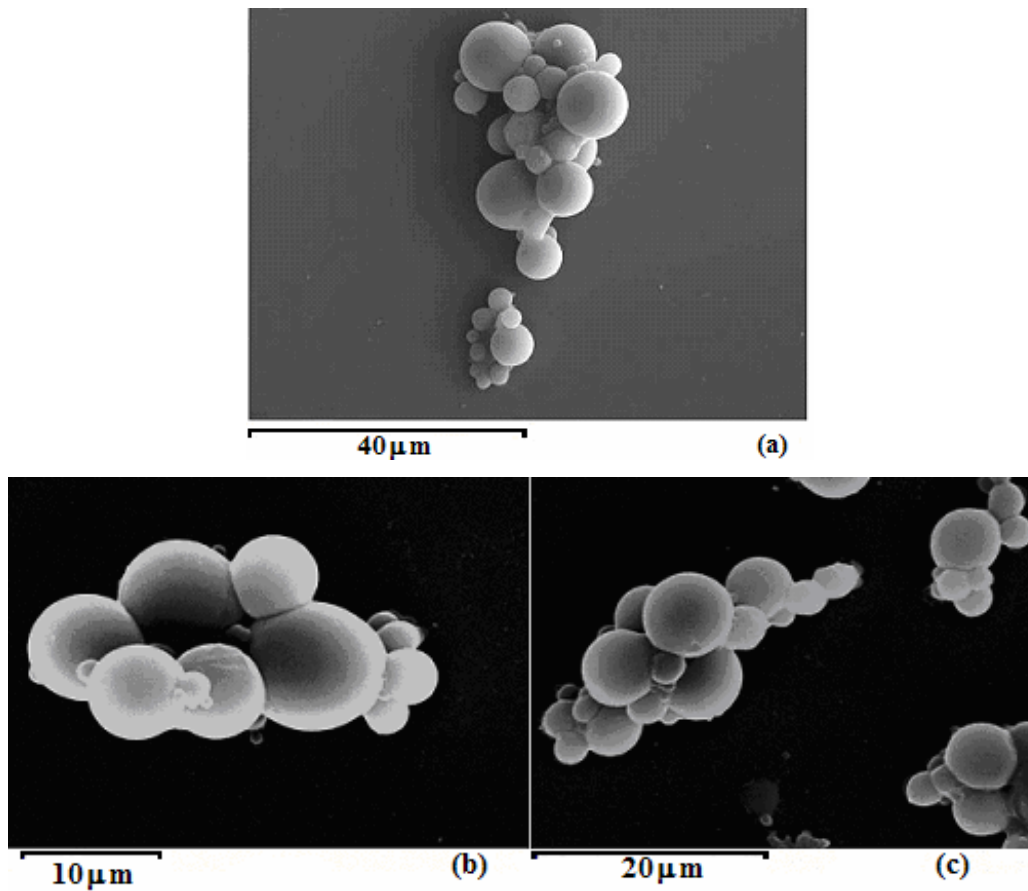


Figura 4.5.- SEM de micropartículas de PAA (a) vacías ($\eta=4,0\%$) y con tirosinasa y grados de reticulación (b) 4,0 y (c) 5,0%

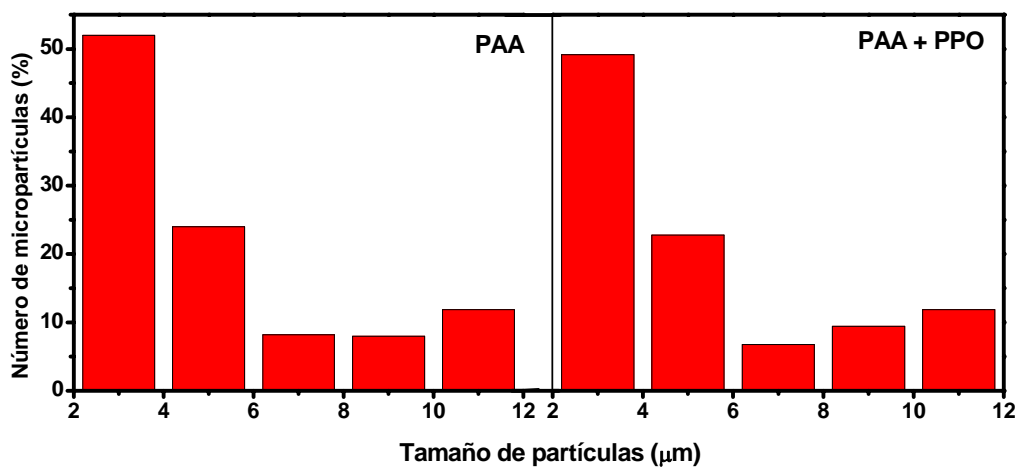


Figura 4.6.- Distribución de tamaños para micropartículas de poliacrilamida ($\eta=4,0\%$) sin y con enzima dispersas en una disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0

IV.2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido

Los termogramas de DSC se realizaron utilizando micropartículas con distinto grado de reticulación, variando de 2,5 a 5,0%. La presencia de agua en las muestras da lugar a un proceso endotérmico como consecuencia de la evaporación, que produce un pico intenso alrededor de 110 °C y dificulta el estudio de la temperatura de transición vítrea (T_g) del microgel, ya que en el caso de la PAA es del orden de 160 °C y el pico correspondiente a la evaporación del agua no ha alcanzado la línea base a esta temperatura. Por ello, antes de realizar el barrido calorimétrico se procedió al secado de las micropartículas a 150° C durante 15 minutos.

Los termogramas realizados en el intervalo de temperaturas de 25°C a 300°C, muestran 2 procesos. Primero se observa un salto en la capacidad calorífica, a una temperatura entre 150°C y 200°C dependiendo de la cantidad de agente entrecruzante, correspondiente a la transición vítrea de la poliacrilamida seguido de un pico endotérmico alrededor de 274°C que se identifica con la descomposición de los microgeles. En la primera etapa de la descomposición de la PAA se produce la liberación de amoníaco y la formación de un grupo imida con la correspondiente pérdida de peso molecular (Silva y col., 2000). El termograma de los microgeles de poliacrilamida con PPO y grado de reticulación 4,0%, se muestra en la Figura 4.7. Para el cálculo de la T_g se considera la temperatura media a la que se produce el salto en la capacidad calorífica, y en la Figura 4.8 se muestra esa temperatura para todas las micropartículas estudiadas.

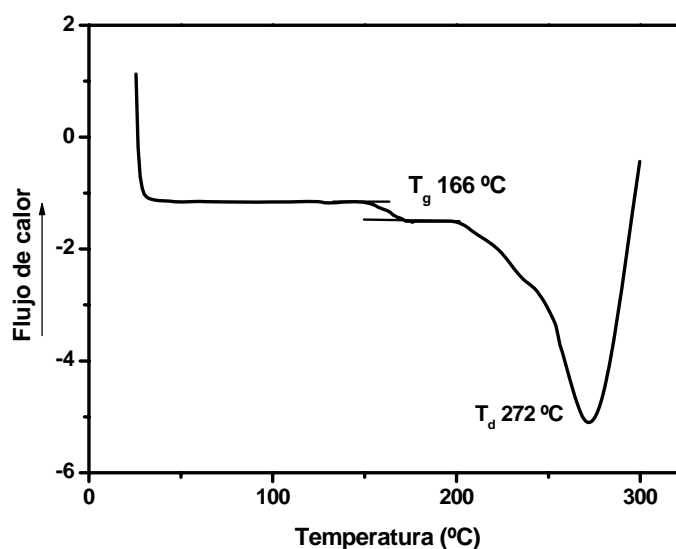


Figura 4.7.- Termograma de microgeles de poliacrilamida (4,0%) con PPO

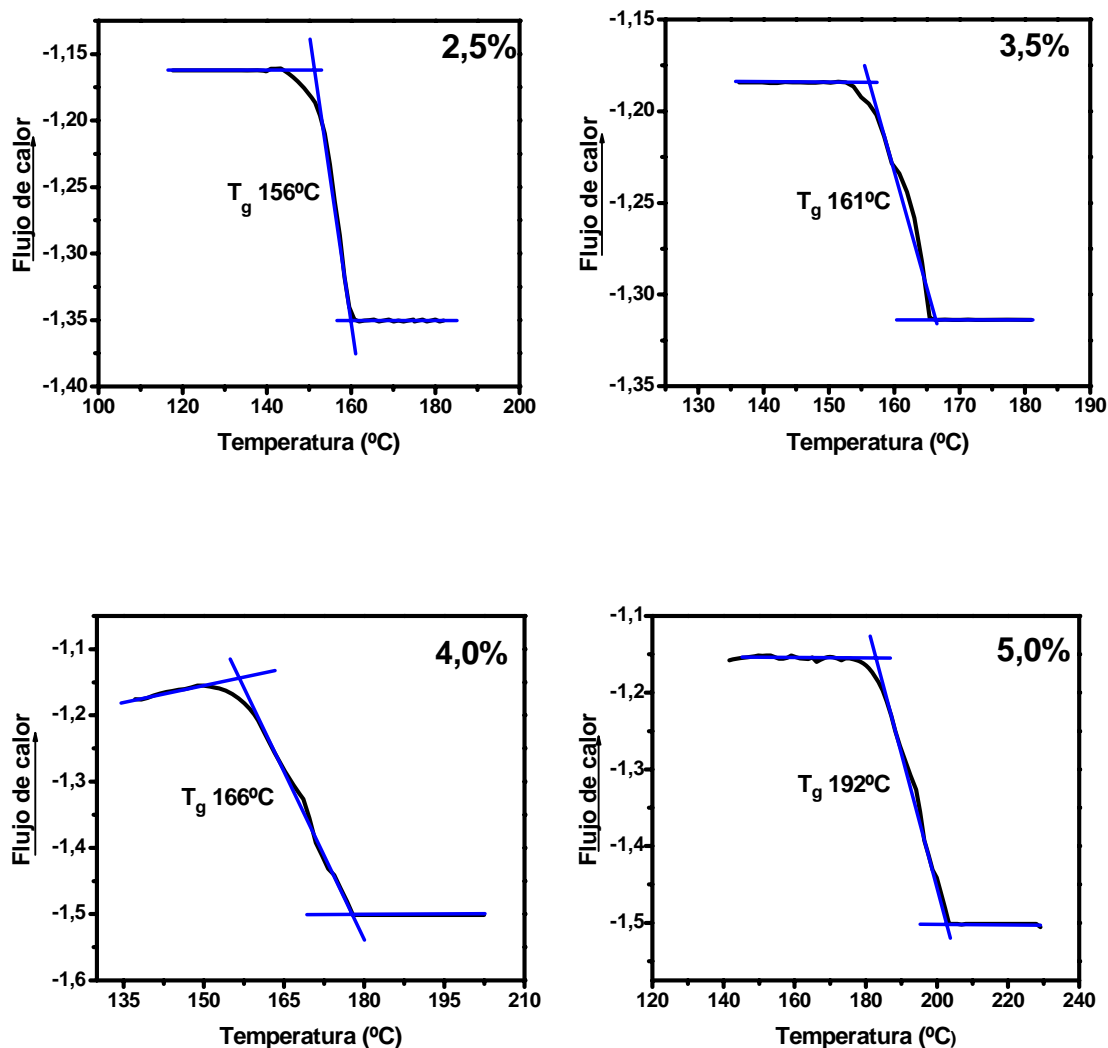


Figura 4.8.- Registros calorimétricos de micropartículas PAA con distinto grado de reticulación

La temperatura de transición vítrea aparece en polímeros amorfos y está relacionada con la rigidez del polímero, por ello se ve influido por factores que modifican la estructura del polímero, tales como concentración de agente entrecruzante o atrapamiento de sustancias en su interior. La temperatura de transición vítrea de las micropartículas sin enzima presenta una relación lineal con el grado de reticulación, como se observa en la Figura 4.9 y que se ajusta a la siguiente expresión:

$$T(^{\circ}C) = 174 + 3,7\eta(\%) \quad (19)$$

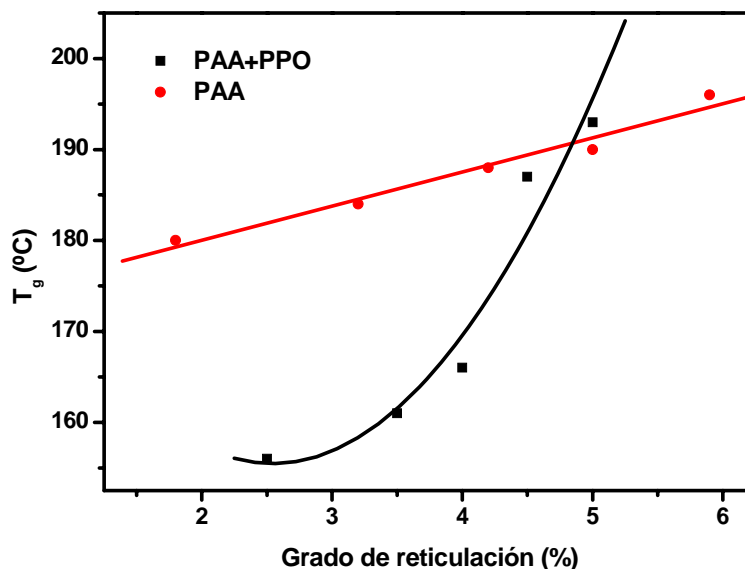


Figura 4.9. Efecto del contenido de agente entrecruzante en la temperatura de transición vítrea de las micropartículas de PAA sin y con PPO

Al inmovilizar la tirosinasa también se observa un aumento de la T_g respecto al grado de reticulación aunque en este caso, la relación no es lineal (Figura 4.9). Cuando el grado de reticulación es pequeño, la T_g de las micropartículas con enzima es mucho menor que la T_g de las micropartículas vacías, y a medida que aumenta el grado de reticulación esta diferencia se va haciendo más pequeña hasta alcanzar un punto en donde el valor de transición vítrea es prácticamente similar en ambos casos y que corresponde a un grado de reticulación del 5,0%. La diferencia existente entre la temperatura de transición vítrea para micropartículas con enzima y grados de reticulación entre 2,5 a 4,0% en comparación con las micropartículas vacías, se puede deber a que la presencia de la enzima produzca un efecto plastificante en el microgel (Rubio Retama y col., 2003) disminuyendo el valor de la T_g . Para valores de entrecruzamiento del 5,0%, los valores de T_g se aproximan. Este comportamiento lo atribuimos a que a partir de una concentración de agente entrecruzante, la movilidad de la cadena polimérica se ve más afectada por el alto grado de reticulación que por el efecto plastificante de la enzima.

IV.2.3.3. Difracción de rayos X

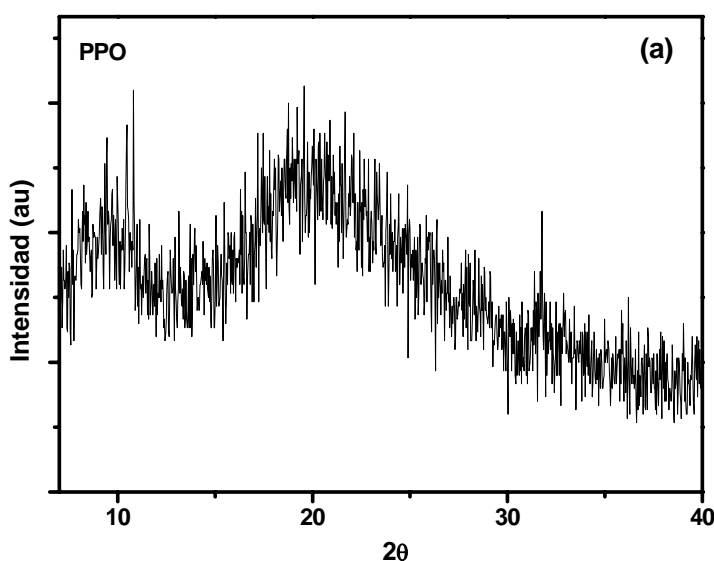
La caracterización estructural se ha realizado por difracción de rayos X barriendo la región angular comprendida entre $2\theta=7^\circ$ y $2\theta=40^\circ$, para micropartículas

vacías y con tirosinasa. Además se ha realizado un difractograma de la tirosinasa libre (Figura 4.10a). La Figura 4.10b muestra los difractogramas obtenidos con micropartículas de PAA y 4,0%, con o sin enzima, observando una estructura amorfa en ambos espectros con 2 halos con un máximo en $2\theta_1=15$ grados y $2\theta_2=22$ grados. El espaciado d correspondiente a estas reflexiones, es 6,25 Å y 4.27 Å respectivamente, calculados utilizando la fórmula de Bragg (6):

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (20)$$

siendo λ la longitud de onda de los rayos X (1.63Å), n el número de orden (1), d es la distancia en Å y θ el ángulo de reflexión.

Estas distancias podrían estar relacionadas con la distancia entre grupos amida dentro de una cadena de polímero y la distancia entre los grupos amida de una molécula de bisacrilamida respectivamente. Además, en microgeles con enzima aparece un pico a $2\theta=32$ grados (distancia 2,96 Å) que pensamos debe estar relacionado con la presencia de PPO dentro del gel, observándose un pico a esa misma distancia en el caso del difractograma de la enzima sólo (Figura 4.10a). Más concretamente podría estar relacionado con la presencia de cobre en la tirosinasa ya que la distancia de los átomos de cobre en el centro activo de la enzima es de 3 Å (Allan y Walter, 1988; Kahn y Andrawis, 1985). Además, se han realizado los difractogramas de las micropartículas PAA con distinto grado de reticulación, observándose en todos los casos 2 halos cuyas distancias prácticamente no varían y un pico a una distancia de 2,96 Å (Figura 4.10c).



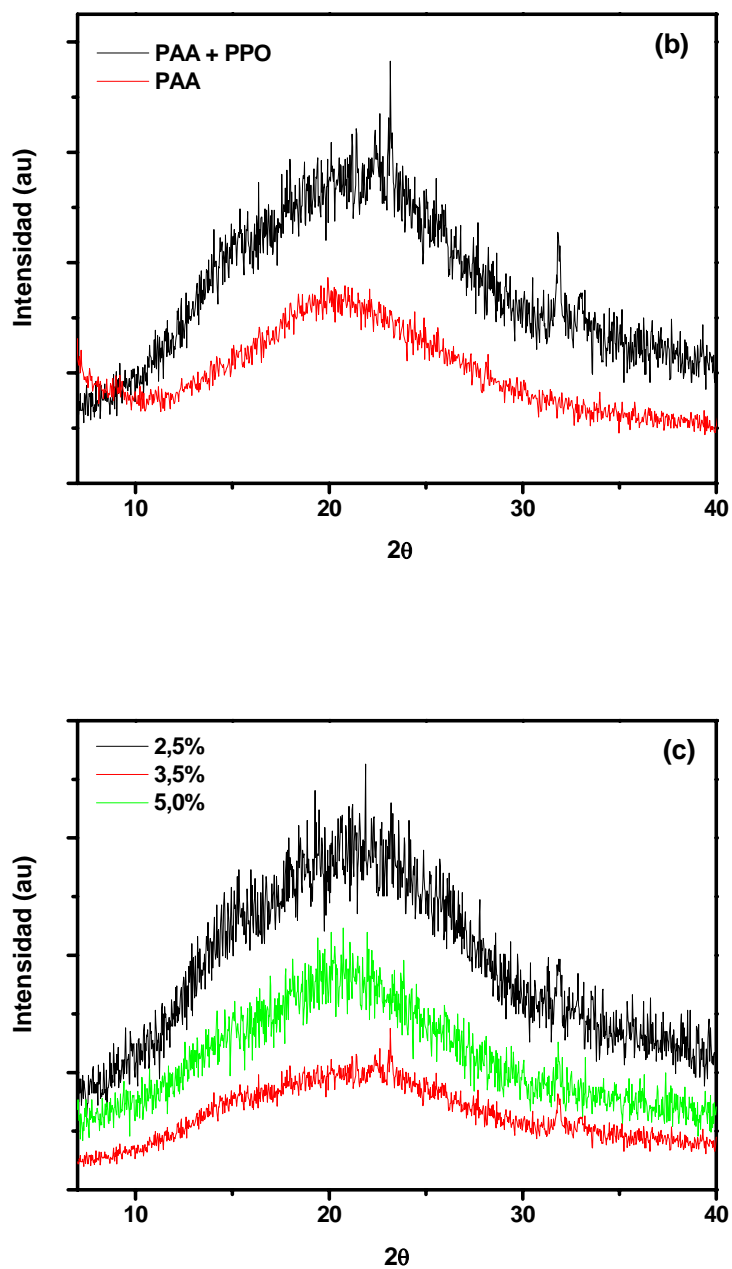


Figura 4.10.- Difractogramas de rayos X de (a) PPO, (b) microgeles de PAA $\eta = 4\%$ sin y con PPO y (c) microgeles de PAA con PPO y distinto grado de reticulaci3n

IV.2.4. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO CON MICROGELES DE PAA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Una vez caracterizados los microgeles de PAA y teniendo en cuenta las ventajas que ofrece el atrapamiento del material biológico (Rubio Retama y col., 2005) se han considerado como sistema de inmovilización de la tirosinasa para formar parte de un biosensor amperométrico diseñado para la determinación de compuestos fenólicos.

Con el objetivo de optimizar el diseño del biosensor para conseguir la máxima respuesta y en el menor tiempo, se ha realizado un estudio individualizado de aquellos factores experimentales que pueden influir en el sistema de inmovilización y en la respuesta del biosensor.

Entre los factores estudiados se encuentran los siguientes:

- Optimización del sistema de inmovilización enzimático
 - Concentración de agente iniciador
 - Concentración de monómero
 - Grado de reticulación
- Optimización de la respuesta del biosensor
 - Potencial aplicado
 - pH
 - Temperatura
 - Carga enzimática

IV.2.4.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático

IV.2.4.1.1. Concentración de agente iniciador

Un factor clave en esta modalidad de inmovilización de enzimas es la temperatura a la cual se realiza la polimerización. Como la reacción de polimerización es exotérmica, se produce liberación de calor con el consiguiente aumento de temperatura en el medio de reacción. La temperatura alcanzada depende de la cantidad de agente iniciador utilizado en la síntesis. Por esta razón, se realizaron distintas síntesis de micropartículas variando la cantidad de agente iniciador, persulfato de amonio (PSA) desde 9,86 hasta 21,92 mM. En la Figura 4.11 se muestra la variación del perfil de temperatura con el tiempo para las distintas concentraciones de PSA, observándose cómo la temperatura máxima de polimerización se incrementa

al aumentar la concentración de iniciador. Cuando la concentración de PSA es 9,86 mM, la temperatura de polimerización no supera los 20°C, razón por la cual se seleccionó esta concentración de iniciador para inmovilizar tirosinasa.

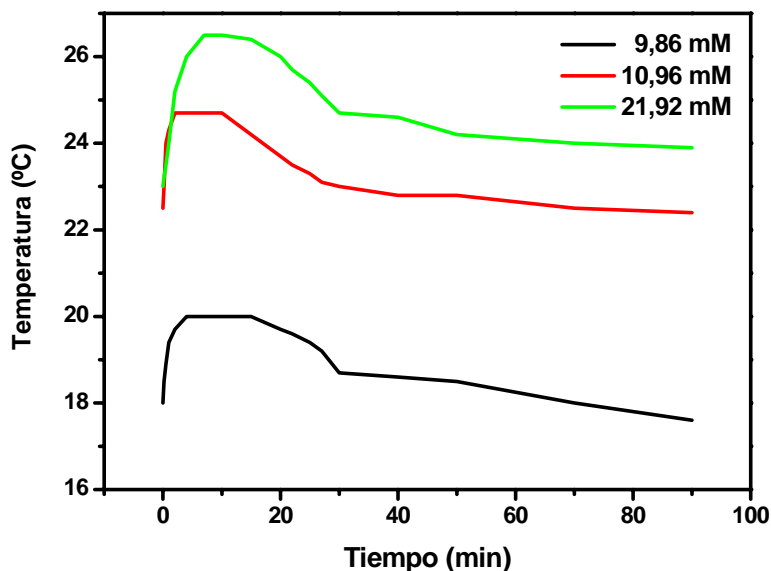


Figura 4.11.- Temperatura del medio de reacción a lo largo del proceso de polimerización en la síntesis de micropartículas según la concentración de PSA.

Además, la concentración de iniciador afecta a la cinética de la reacción de polimerización, factor importante para mantener al enzima el mínimo tiempo en el medio de reacción. Para realizar este estudio se prepararon emulsiones con distinta concentración de PSA. Para cada una de ellas, se llenaron 13 viales con 250 μ L de emulsión concentrada cada uno. En cada vial se añadió una determinada cantidad de TEMED a diferentes tiempos, parándose dicha reacción en todos los viales a la vez. Se procedió a la precipitación de las micropartículas con acetona y se centrifugó durante 20 minutos a 4500 rpm. A continuación se secaron en un horno a 100 °C durante 24 horas. Finalmente se pesó cada muestra anotando la cantidad de polímero obtenido con respecto al tiempo de reacción.

Cuando se utiliza una concentración de persulfato de amonio de 9,86 mM, el grado de conversión del monómero alcanza el 97% una vez transcurridos 65 minutos de reacción (Figura 4.12), un valor ligeramente superior al encontrado con PSA 10,96 mM, que alcanza el 97 % de conversión en 55 minutos.

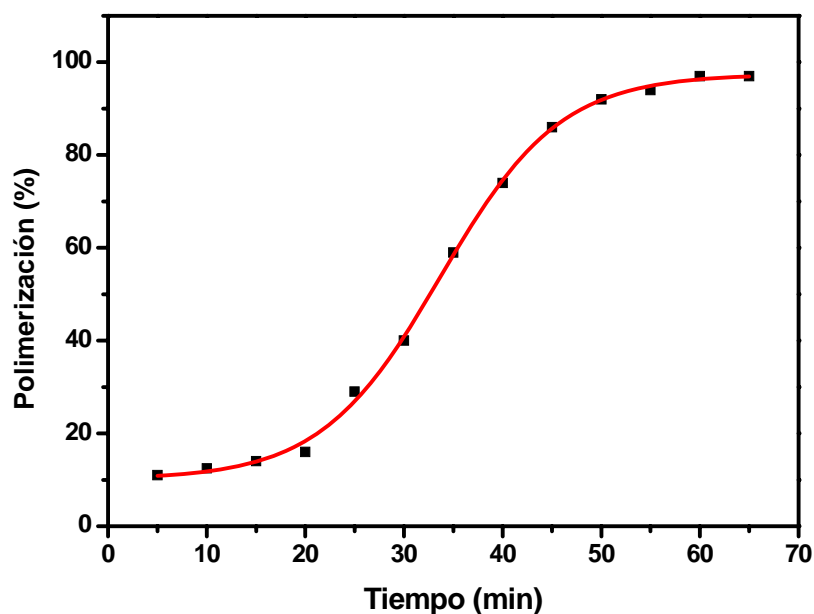


Figura 4.12.- Grado de conversión del monómero en función del tiempo. Concentración de agente iniciador 9,86 mM.

IV.2.4.1.2. Concentración de monómero

En este apartado se ha estudiado la influencia que la cantidad de monómero incorporado en la fase acuosa de la emulsión tiene en la inmovilización de la enzima. Para ello, se sintetizaron micropartículas de poliacrilamida con tirosinasa, manteniendo siempre el mismo grado de reticulación ($\eta=4,0\%$) y variando la concentración de monómero 0,90 M, 1,23 M y 1,80 M. Se preparó un biosensor con cada una de las micropartículas, y se realizaron las correspondientes curvas de calibrado, a 20°C y -0,1V vs. ECS, midiendo la corriente generada por las adiciones sucesivas de catecol en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, hasta llegar a una concentración de sustrato correspondiente a la saturación enzimática (Figura 4.13). En el recuadro se representa el perfil de la intensidad de corriente generada por el biosensor de PPO tras la adición de catecol (3 μM) a la disolución tampón, pH 6,0 de la célula electroquímica. El tiempo de respuesta del biosensor, entendido como el tiempo necesario para alcanzar el 95 % de la corriente estable, fue elevado, del orden de 5 minutos.

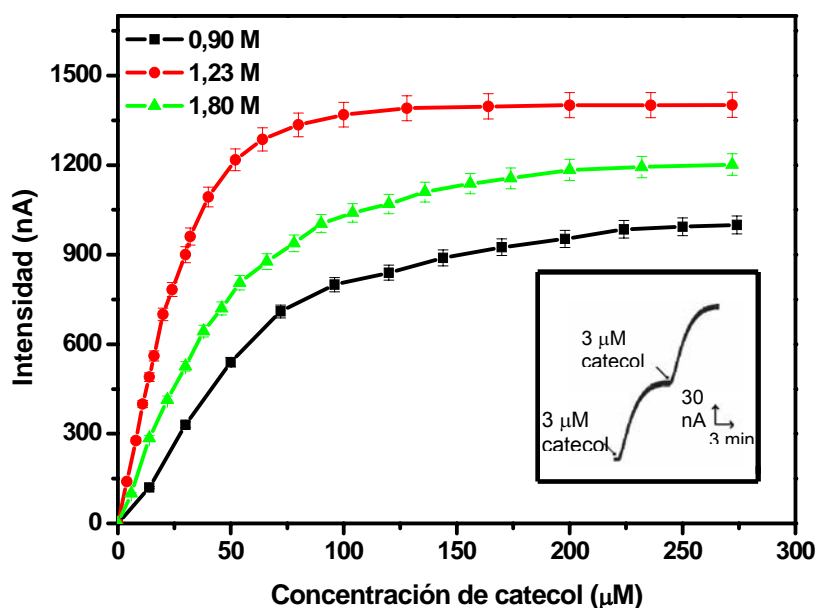


Figura 4.13.- Influencia de la concentración de monómero en la respuesta del biosensor. Grado de reticulación siempre igual a 4,0%. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, -0,1V vs. ECS, 20°C. Recuadro.- Perfil intensidad-tiempo obtenido con el biosensor preparado con microgeles de PAA

La Figura 4.13, la máxima respuesta se obtuvo con el biosensor formado por micropartículas con una concentración de monómero de 1,23 M. Una concentración de monómero de 0,90 M no resultó suficiente para producir la retención total de la enzima como demuestra la actividad enzimática encontrada en el líquido sobrenadante resultante obtenido en la preparación del microgel, lo que explica la menor respuesta del biosensor que contiene estas micropartículas. Concentraciones de monómero superiores a 1,23 M también conducen a un descenso de la corriente generada en el biosensor, que atribuimos a la existencia de una barrera difusional muy compacta que por un lado ralentiza el movimiento del sustrato y producto de la reacción enzimática, y por otro, dificulta el contacto entre el sustrato y el centro activo de la enzima. No fue posible calcular las constantes cinéticas de la reacción enzimática porque los coeficientes de Hill obtenidos en todos los casos fueron mayores de 1,15 (Tabla 4.1). Estos resultados parecen indicar que la difusión del sustrato y del producto a través de la película polimérica son los procesos más lentos de todos los que tienen lugar en la medida del biosensor y, por lo tanto, los procesos limitantes.

Tabla 4.1.- Propiedades analíticas del biosensor en función de la concentración de monómero

Concentración de monómero (M)	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
0,90	1,14	350,25	14,28	$9,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	0,9997 (3)	1,0
1,23	1,17	469,30	20,03	$5,0 \times 10^{-7} - 2,4 \times 10^{-5}$	0,9928 (10)	0,3
1,80	1,20	310,60	17,17	$1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-5}$	0,9975 (5)	1,3

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Para el estudio del tamaño de las micropartículas se prepararon suspensiones de las micropartículas en disolución tampón de fosfato pH 6,0 y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 4.14. El máximo de la distribución de tamaños se desplaza desde 3 μm , en las micropartículas con 0,90 M de acrilamida hasta 5 μm al aumentar la concentración de monómero a 1,80 M. Se ha optado por un valor de concentración de monómero de 1,23 M ya que además de obtenerse partículas con un tamaño medio pequeño, el biosensor formado con estas micropartículas es con el que se obtiene una respuesta mayor.

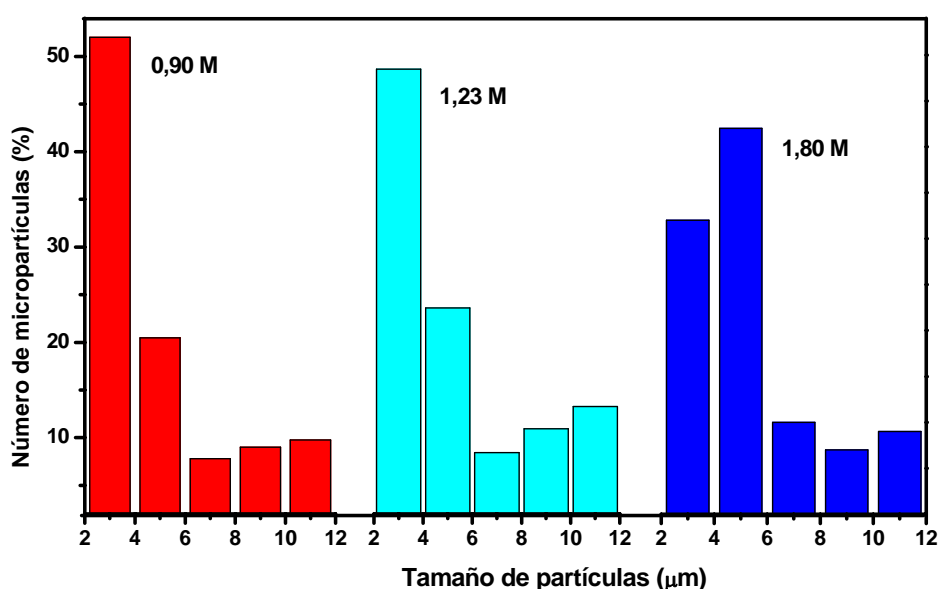


Figura 4.14.- Distribución de tamaños de micropartículas de poliacrilamida con distinta concentración de monómero, dispersas en disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0.

IV.2.4.1.3. Grado de reticulación

Las micropartículas de poliacrilamida tienen estructura de red polimérica capaz de retener moléculas en su interior, esta red se consigue incluyendo el monómero y un agente entrecruzante, en este caso NN'-metilen-bis-acrilamida. La proporción de agente entrecruzante, respecto a la de monómero, determina el tamaño de poro de la matriz polimérica. Este tamaño de poro es un factor importante en la eficacia de la inmovilización de enzimas, debiéndose encontrar, en cada caso, el tamaño de poro óptimo para la enzima, que guarda relación con el tamaño de la proteína.

Para realizar este estudio se sintetizaron micropartículas de poliacrilamida con tirosinasa inmovilizada en su interior, con distintos grados de reticulación $\eta=2,5$; 3,5; 4,0 y 5,0 % y la misma concentración de monómero (1,23 M), con cada tipo de micropartículas se preparó un biosensor y comparó su respuesta. Las medidas se realizaron a -0,1V vs. ECS y 25°C, en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 como electrolito soporte sobre la que se adicionaron sucesivamente cantidades de catecol hasta llegar a la concentración de catecol correspondiente a la saturación enzimática. Tras cada adicción se midió la respuesta del biosensor y se trazó la curva de calibrado correspondiente que se muestra en la Figura 4.15.

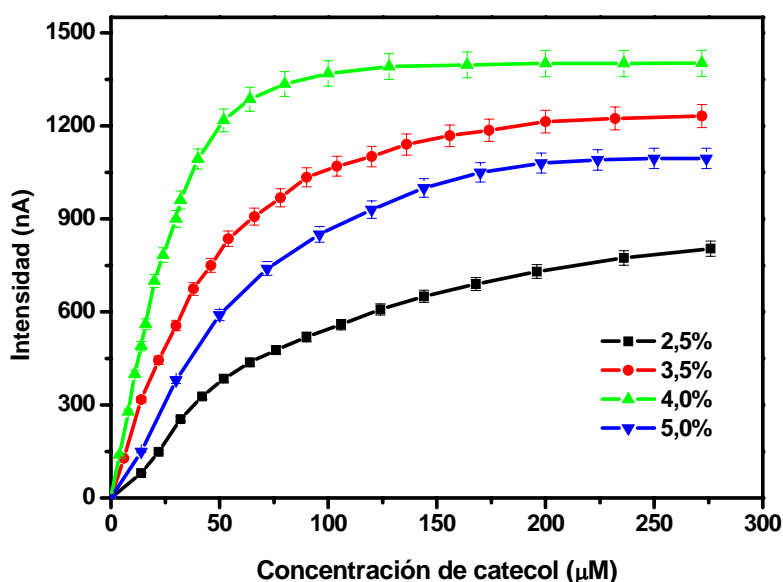


Figura 4.15.- Influencia de la concentración de agente entrecruzante en la respuesta del biosensor. Concentración de monómero siempre de 1,23 M. El resto de las condiciones experimentales coinciden con las de la Figura 4.13.

La máxima intensidad de corriente se obtuvo con las micropartículas de $\eta=4,0\%$. Grados de reticulación inferiores generan menores respuestas, que junto con la detección de actividad enzimática en el líquido sobrenadante obtenido en la síntesis, indica la salida de enzima de las micropartículas probablemente debido al tamaño de poro de estos microgeles, superior al tamaño de la enzima. El descenso de la intensidad de corriente máxima cuando el grado de reticulación es superior a $4,0\%$, se atribuye a que el tamaño de poro es tan pequeño que dificulta el movimiento de sustrato y producto de la reacción enzimática a través de la matriz polimérica, y a que la red polimérica es tan densa que al sustrato le resulta difícil acceder a los centros activos de la enzima, que se encuentran muy protegidos. En la Tabla 4.2 se muestran las propiedades analíticas de los biosensores realizados, y de acuerdo con los resultados obtenidos, para posteriores estudios se utilizó un grado de reticulación de $4,0\%$.

Tabla 4.2.- Propiedades analíticas del biosensor en función del grado de reticulación

Grado de reticulación (%)	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
2,5	1,24	110,00	11,91	$3,5 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-5}$	0,9934 (4)	1,8
3,5	1,15	295,36	17,60	$7,5 \times 10^{-7} - 2,2 \times 10^{-5}$	0,9947 (6)	0,8
4,0	1,17	469,30	20,03	$5,0 \times 10^{-7} - 2,4 \times 10^{-5}$	0,9928 (10)	0,3
5,0	1,53	168,21	15,66	$1,0 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-5}$	0,9963 (4)	1,0

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

El grado de reticulación también influye en el tiempo de respuesta del biosensor. Así, para el grado de reticulación de $4,0\%$ de intensidad de corriente óptima se obtiene un tiempo de respuesta de 5 minutos. A medida que nos alejamos del valor óptimo de grado de reticulación, incrementándolo, el tiempo de respuesta aumenta. Como anteriormente se ha explicado, en la respuesta del biosensor intervienen 3 procesos: difusión, cinética enzimática y proceso electroquímico. El tiempo de respuesta es alto y se podría atribuir a dificultades en el proceso de difusión ya que la matriz polimérica constituye una barrera difusional importante. Para intentar explicarlo, se realizó la siguiente experiencia: Se observó si el tiempo de respuesta se veía afectado por la velocidad de agitación observándose que al aumentar la agitación, el tiempo de

respuesta disminuía, como consecuencia de que la difusión del sustrato a través de la matriz se veía favorecida.

IV.2.4.2. Optimización de la respuesta del biosensor

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de síntesis de micropartículas, en este apartado se estudiaron las variables analíticas que afectan a la respuesta del biosensor.

IV.2.4.2.1. Potencial aplicado

La dependencia de la respuesta del biosensor en función del potencial se evaluó en el intervalo de -0,15 a 0,0 V vs. ECS (Figura 4.16). Para la preparación del biosensor se utilizaron 3 mg de micropartículas PAA con tirosinasa, $\eta = 4,0 \%$ y 1,23 M de monómero y se registró la corriente generada al añadir 25 μM de catecol en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, a 25°C.

La respuesta amperométrica aumenta cuando el potencial pasa de 0 a -0,1 V vs. ECS, y se observa un descenso en la corriente para potenciales más negativos que puede ser atribuido a la contaminación en la superficie electródica como consecuencia de la polimerización de las o-quinonas producidas en la reacción enzimática (Liu y col., 1994) o a la reducción del oxígeno en la superficie electródica, lo que conlleva una menor disponibilidad de oxígeno para la reacción enzimática, con el consiguiente descenso en la concentración de quinona (Shan y col., 2003a). Para posteriores estudios se utilizó como potencial de trabajo -0,1V vs. ECS.

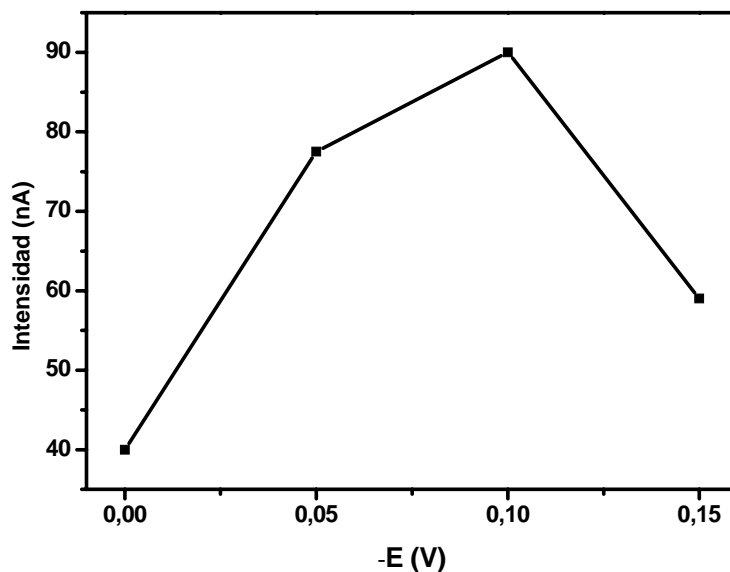


Figura 4.16.- Influencia del potencial del electrodo de trabajo en la respuesta del biosensor al añadir 25 μM de catecol. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y 20 $^{\circ}\text{C}$.

IV.2.4.2.2. pH

Para no cambiar la naturaleza de los aniones ya que podrían interaccionar con el sustrato y enzima, en este estudio se utilizó una disolución tampón compuesta por 0,05 M acetato /0,05 M fosfato sódico, ajustando el pH al valor deseado. Para preparar el biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas ($\eta = 4,0\%$ y 1,23 M de monómero) y se registró la corriente generada en el electrodo de trabajo, biosensor, sometido a un potencial de -0,10 V vs. ECS, al añadir una concentración determinada de catecol a la célula electroquímica que contenía 10 mL de una disolución tampón de 0,05 acetato M/0,05 M fosfato sódico a 20 $^{\circ}\text{C}$. El intervalo de pH estudiado fue de 4,0-8,0. Este estudio se ha realizado a 2 concentraciones de catecol, correspondientes a la zona lineal (20 μM) y a la zona de saturación (200 μM) de la curva de calibrado.

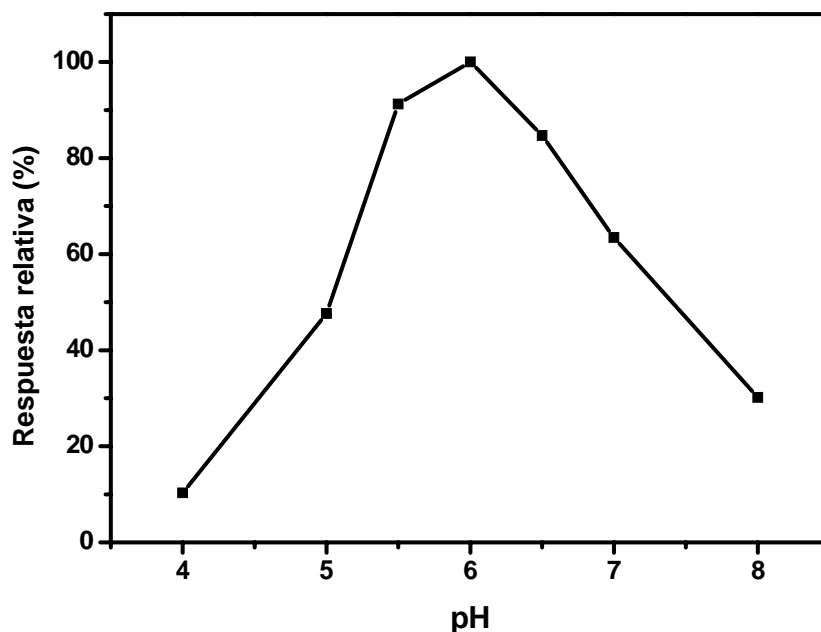


Figura 4.17.- Respuesta relativa del biosensor en función del pH al añadir 200 μM de catecol. Disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico, -0,1V vs. ECS y 20 °C.

La respuesta del biosensor en función del pH tiene forma de campana para ambas concentraciones de catecol, observándose un valor máximo a pH 6,0 (Figura 4.17) que coincide con el pH óptimo para la enzima libre. Teniendo en cuenta que la reducción electroquímica de la o-quinona requiere 2 hidrógenos, se ha realizado un estudio del efecto del pH en la intensidad de la corriente de reducción de la quinona a un potencial de -0,1 V vs. ECS en un electrodo de carbono vitrificado, pero no se han observado diferencias significativas cuando el pH varió de 4,0 a 8,0. Este resultado nos permite concluir que los cambios observados en la respuesta del biosensor al variar al pH no se deben a la reducción electroquímica del producto de la reacción enzimática, sino exclusivamente a la dependencia de la actividad enzimática con el pH.

IV.2.4.2.3. Temperatura

La temperatura es un factor importante, no sólo por su efecto sobre cada uno de los procesos que transcurren en el biosensor, como difusión, reacción catalítica y reacción electródica, sino también por su efecto en el proceso de desnaturalización que sufren las proteínas al superar una temperatura dada. Es necesario conocer el

intervalo de temperatura en el que la enzima es activa y así, dentro de éste intervalo, poder seleccionar como temperatura de trabajo la de mayor actividad enzimática. Para controlar la temperatura se utilizó una célula electroquímica termostatzada. Para preparar el biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas con $\eta = 4,0\%$ y se registró la corriente generada al añadir 20 μM y 200 μM de catecol a la célula electroquímica que contenía 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y -0,10V vs. ECS. El intervalo de temperaturas del estudio fue 0°C-50°C. Todas las experiencias se realizaron a saturación de oxígeno.

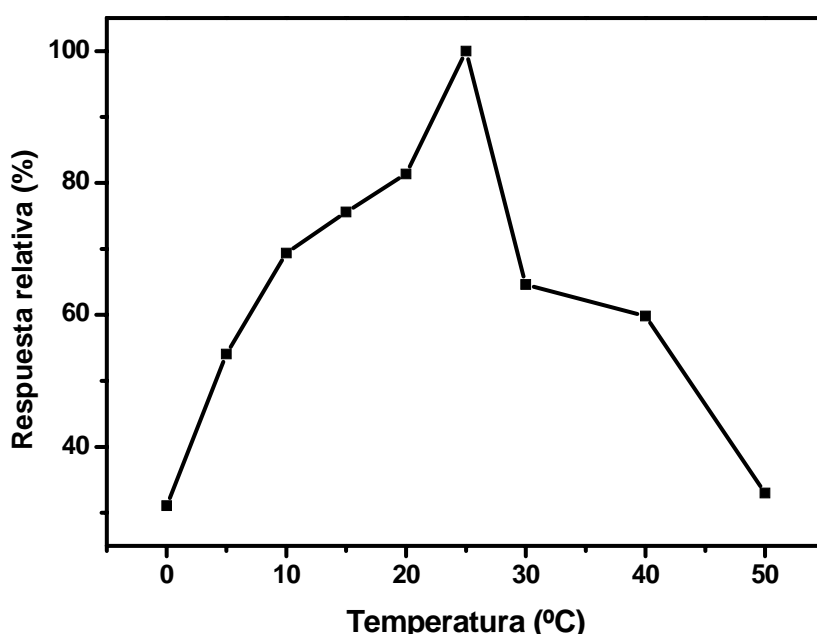


Figura 4.18.- Efecto de la temperatura en la respuesta del biosensor al añadir 200 μM de catecol. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y -0,1V vs. ECS.

En la Figura 4.18 se muestra el perfil obtenido al añadir una concentración de catecol correspondiente a la zona de saturación. Para ambas concentraciones de catecol se observan 2 tramos: una rama ascendente que refleja el incremento de la respuesta del biosensor a medida que la temperatura aumenta debido al aumento de las constantes de velocidad de los procesos involucrados en la medida del biosensor, hasta alcanzar la intensidad de corriente máxima a 25°C. Posteriormente se observa un tramo descendente que refleja el proceso de pérdida de actividad por desnaturalización de la enzima. Cuando la temperatura supera los 25 °C aumenta el

número de moléculas que no realizan su actividad catalítica y la respuesta del biosensor disminuye.

Dado que la intensidad de corriente del dispositivo analítico propuesto aumenta de forma apreciable con la temperatura interesa trabajar a temperaturas elevadas, pero es necesario asegurar que a la temperatura de trabajo no se produce la desnaturalización de la proteína, por este motivo se realizó un estudio de estabilidad térmica de la enzima. Para ello se procedió del siguiente modo, se añadió una cantidad de catecol correspondiente a la saturación enzimática (200 μM) a una disolución tampón pH 6,0 y una vez alcanzado el estado estacionario, se mantuvo el potencial constante durante un largo periodo de tiempo. A temperaturas comprendidas entre 25 y 50 $^{\circ}\text{C}$, se observó un descenso de la corriente con el tiempo, proceso que se vio más acentuado al ir aumentando la temperatura. Por el contrario, a temperaturas de 20 $^{\circ}\text{C}$ o inferiores, la respuesta del biosensor no sufrió cambios durante 1 hora manteniéndose al mismo nivel de intensidad. Este resultado nos asegura que la desnaturalización de la GOx no comienza si no se superan los 20 $^{\circ}\text{C}$, utilizándose esta temperatura para experiencias posteriores.

Para muchas reacciones, la dependencia de la constante de velocidad de una reacción respecto a la temperatura puede expresarse mediante la ecuación de Arrhenius:

$$K = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (21)$$

donde A es el factor de frecuencia, que puede tratarse como constante para un sistema reaccionante dentro de un pequeño intervalo de temperaturas, como en este caso, E_a es la energía de activación de la reacción (kJ/mol) y R es la constante de los gases (8,314 J/Kmol).

Esta ecuación se suele expresar en forma logarítmica:

$$\ln K = \ln A - E_a / RT \quad (22)$$

Por otra parte, la intensidad de corriente máxima medida se puede expresar como:

$$i_{\max} = \frac{nFBdK_c [E_{tot}]}{2} \quad (23)$$

donde n es el número de electrones que intervienen en la reacción electroquímica, F es la constante de Faraday, B es el área del electrodo, d es el espesor de la capa de micropartículas, $[E_{tot}]$ es la cantidad de enzima inmovilizada en el biosensor y K_c es la constante catalítica. Despejamos K_c (ecuación 24), teniendo en cuenta que varios parámetros de esta ecuación se pueden englobar en una constante (C),

$$K_c = \frac{2}{nFBd[E_{tot}]} i_{max} = C \times i_{max} \quad (24)$$

Sacando logaritmos:

$$\ln K_c = \ln C + \ln i_{max} \quad (25)$$

De acuerdo con Arrhenius:

$$\ln K_c = \ln A - E_a / RT \quad (26)$$

igualando las expresiones obtenemos:

$$\ln i_{max} = \ln A / C - E_a / RT \quad (27)$$

Como $i_{m\acute{a}x.}$ es proporcional a V_{max} , y si englobamos todas las constantes en K' obtendremos la siguiente expresión:

$$\ln V_{max} = K' - E_a / RT \quad (28)$$

Si tenemos en cuenta que el proceso más afectado por la temperatura es la cinética enzimática, podemos considerar despreciable el efecto de los otros procesos y mediante esta última ecuación podremos calcular la energía de activación de la tirosinasa inmovilizada en el microgel de PAA.

Se ha realizado la representación de Arrhenius de los biosensores formados por micropartículas de PAA con PPO y distinto grado de reticulación, en el intervalo de temperaturas donde no se produce desnaturalización enzimática (0-20°C) (Figura 4.19). En todos los casos, excepto para micropartículas con $\eta=2,5\%$ se observan claramente 2 regiones de cuyas pendientes se derivan 2 energías de activación (E_a).

La energía de activación en la región de bajas temperaturas varía desde 50,67 KJ/mol a 84,14 KJ/mol cuando el grado de reticulación aumenta de 3,5% a 5,0%. Sin embargo, la E_a en la zona de alta temperatura es más pequeña y su variación en función del grado de reticulación es menor. Este cambio de pendiente se ha estudiado para micropartículas de PAA con otras enzimas inmovilizadas, apareciendo siempre a una temperatura de 10°C aproximadamente, y atribuyéndose a un cambio a la transición de volumen del microgel ya que el polímero de acrilamida es temperatura dependiente (Hervás Pérez y col., 2006; Sánchez-Paniagua y col., 2007). Según esta interpretación, por encima de la temperatura de corte, el microgel está hinchado, la enzima está rodeada de agua y la energía de activación se aproxima más a la que presenta la enzima sujeta al electrodo mediante una membrana de diálisis (14,26 KJ/mol, ver Figura 4.3) y a la energía de activación de la PPO en disolución (7 kJ/mol) (Shan y col., 2003a).

Sin embargo, a bajas temperaturas el microgel se encuentra en la fase colapsada, la cantidad de agua retenida en el microgel es reducida dificultando la reacción sustrato-enzima y consecuentemente, la energía de activación se ve aumentada. Además, en la región de bajas temperaturas, se observa un aumento de la E_a con el grado de reticulación que podemos atribuir al compactamiento de la matriz cuando el polímero está colapsado, que crece con la reticulación, lo que hace que la reacción enzima-sustrato esté muy dificultada. En la región de altas temperaturas este efecto no aparece debido a que el polímero está hinchado, por lo que la enzima está rodeada de agua, y por lo tanto la energía de activación apenas se modifica con el grado de reticulación. Este comportamiento se ve totalmente modificado en el caso de micropartículas con ($\approx 2.5\%$ en donde se observa una única región lineal, probablemente debido al tamaño de poro tan grande del polímero. En una matriz polimérica con bajo grado de reticulación, las 2 fases del polímero, hinchada y colapsada pueden tener un efecto similar en la enzima, porque en ambas fases la enzima está rodeada de agua, por lo que están menos afectadas por el entorno.

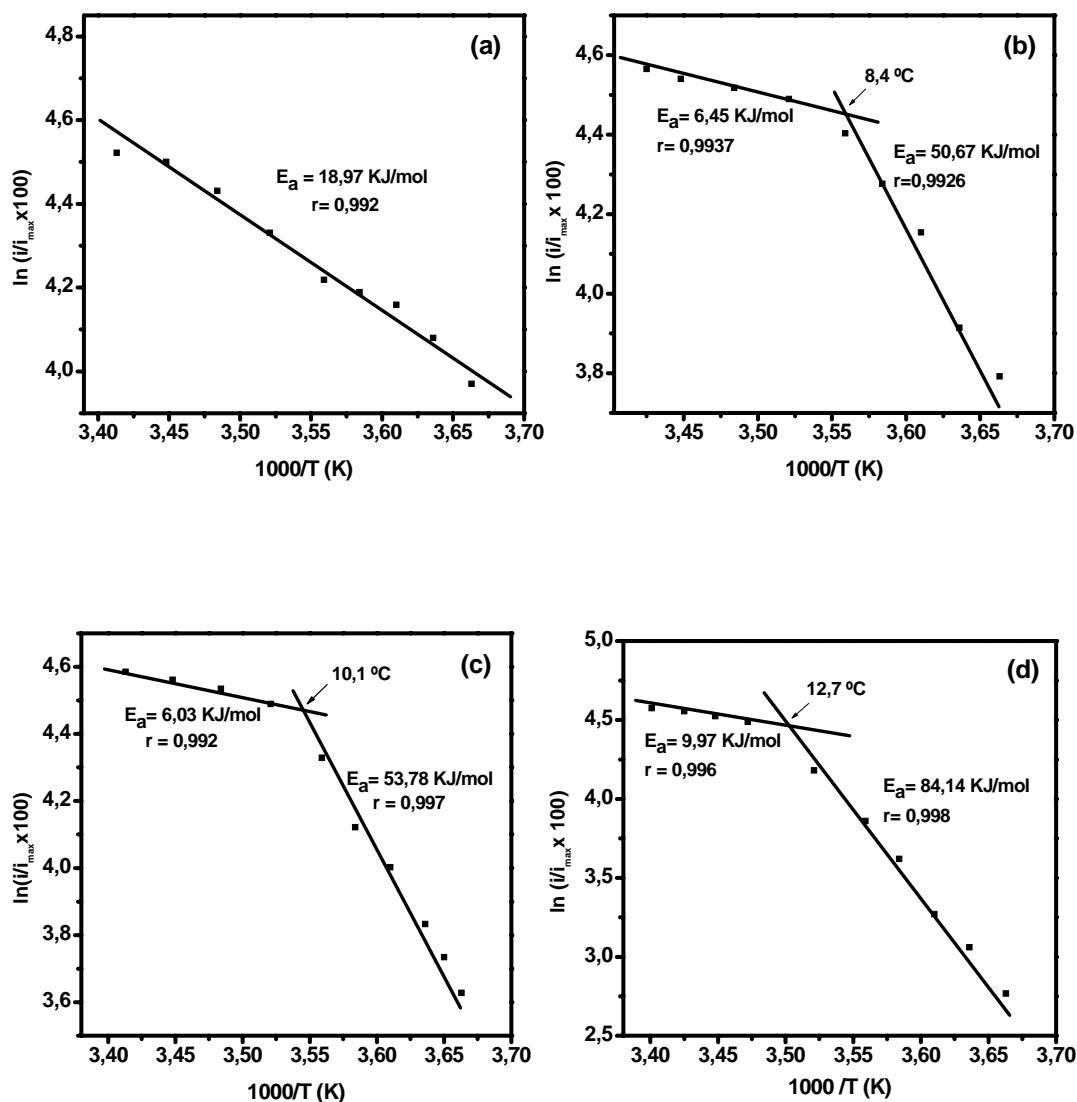


Figura 4.19.- Representación de Arrhenius para PPO inmovilizada en microgeles de poliacrilamida con grado de reticulación (a) 2,5%; (b) 3,5%; (c) 4,0% y (d) 5,0%.

Para corroborar esta hipótesis, se determinó el tamaño de las micropartículas a distintas temperaturas. Como se puede ver en la Figura 4.20, a temperaturas inferiores a $10^{\circ}C$, el 70-75% de las micropartículas presentan un tamaño medio de $4,0 \mu m$. Sin embargo, por encima de esta temperatura son menos del 55% las micropartículas que tienen este tamaño medio, apareciendo partículas con un tamaño de hasta $11 \mu m$ y siendo el tamaño medio de las micropartículas superior a $6 \mu m$ para temperaturas superiores a $20^{\circ}C$. Este comportamiento puede sólo explicarse por el hinchamiento del polímero.

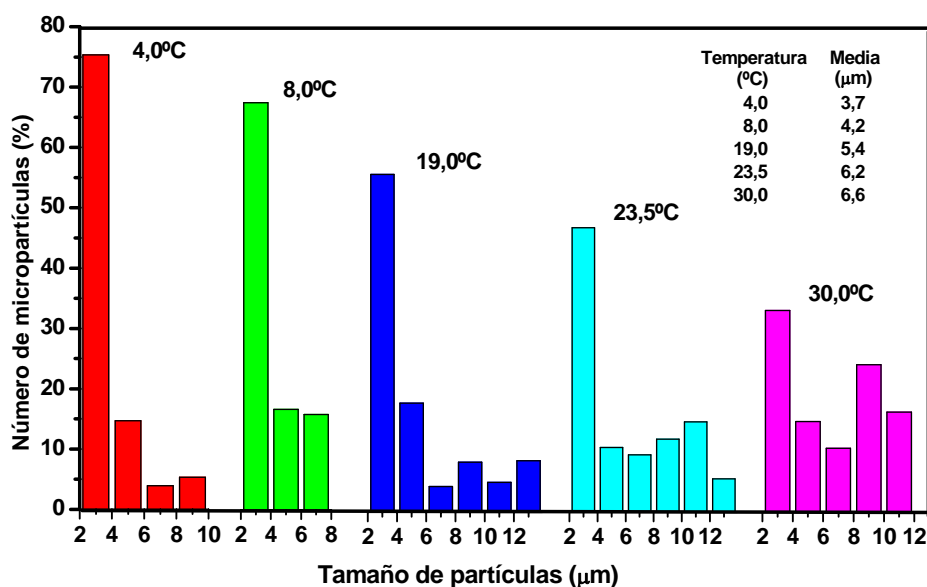


Figura 4.20.- Influencia de la temperatura en la distribución de tamaños de micropartículas de PAA ($\eta = 4,0\%$) con PPO, dispersas en disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0

IV.2.4.2.4. Diseño de experimentos

Para conocer no sólo los efectos individuales de cada variable (pH y temperatura) en la respuesta del biosensor, sino también la interacción entre ellas, se realizó un diseño de experimentos.

Dentro de las etapas de un diseño de experimentos se destacan: (i) selección de factores, (ii) selección de niveles de los factores, (iii) construcción del diseño codificado, (iv) cálculo de coeficientes e (v) interpretación de los resultados.

Para este trabajo se seleccionó un diseño compuesto central rotatable de dos factores y cinco niveles rotacionales, seleccionando como factores pH y temperatura, y ensayándose a 5 niveles. La matriz del diseño se muestra en la Tabla 4.3, realizándose 14 experiencias correspondientes a todas las combinaciones posibles de temperatura y pH. El orden de realización de las experiencias fue completamente aleatorio.

Se realizaron 2 diseños, el primero utilizando una concentración de catecol de la zona lineal de la curva de calibrado ($20\mu\text{M}$), y otro para la zona de saturación ($200\mu\text{M}$), con el fin de comparar estos resultados con los obtenidos con el método convencional.

Tabla 4.3.- Diseño compuesto central rotatable para dos factores y cinco niveles. Matriz experimental y niveles de los factores

FACTORES CODIFICADOS		NIVELES DE LOS FACTORES	
pH	T	pH	T
+1	-1	7,5	5,0
0	0	6,0	15,0
-1	+1	4,5	25,0
0	0	6,0	15,0
+1	+1	7,5	25,0
0	0	6,0	15,0
-1	-1	4,5	5,0
$-\sqrt{2}$	0	3,9	15,0
0	0	6,0	15,0
0	$+\sqrt{2}$	6,0	29,1
$+\sqrt{2}$	0	8,1	15,0
0	0	6,0	15,0
0	$-\sqrt{2}$	6,0	0,9
0	0	6,0	15,0

La respuesta del biosensor, intensidad de corriente, se trató matemáticamente para obtener la superficie respuesta. El modelo matemático fue el polinomio de segundo orden, ecuación siguiente, donde los términos β son coeficientes desconocidos, los términos X_1 y X_2 representan las variables independientes, la variable Y es la variable respuesta y ε es el error aleatorio.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$$

A partir de los resultados experimentales obtenidos, se dedujeron los siguientes modelos estadísticos:

Concentración de catecol en la zona lineal:

$$Y = 167 + 7,5 \text{ pH} + 5,6 \text{ T} - 65 \text{ pH}^2 - 49 \text{ T}^2 - 7,5 \text{ pH T} \quad (R=0,9021)$$

Concentración de catecol en la zona de saturación:

$$Y = 872 - 4,6 \text{ pH} + 109 \text{ T} - 212 \text{ pH}^2 - 44 \text{ T}^2 - 76 \text{ pH T} \quad (R=0,6024)$$

En la Figura 4.21 se muestran las superficies-respuesta obtenidas para los modelos estadísticos obtenidos a las dos concentraciones de sustrato estudiadas que se ajustaron mediante el programa de análisis de datos Statgraphics (STATGRAFICS, 1992). Como indica el ajuste estadístico de los modelos, R, sólo el diseño realizado a concentraciones bajas de sustrato puede ser tenido en cuenta desde el punto de vista analítico, ya que el realizado con alta concentración del sustrato sólo justifica el 60 % de los resultados.

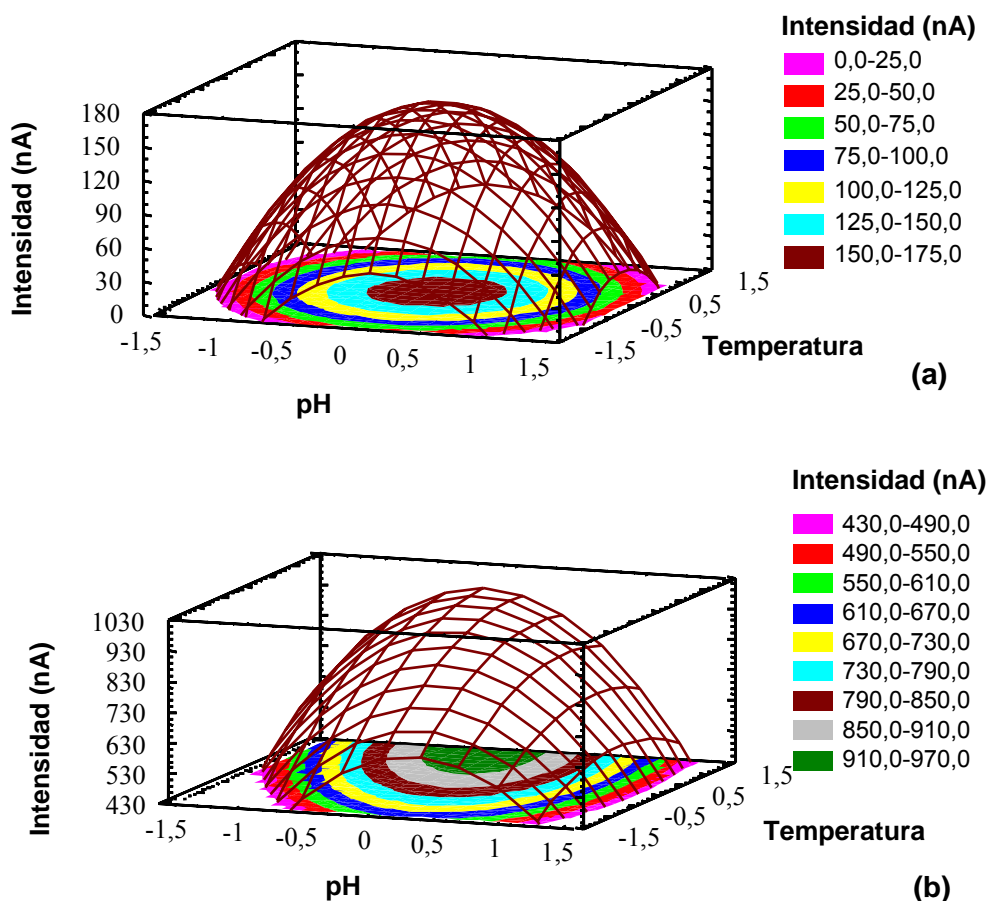


Figura 4.21.- Superficie de respuesta para la zona de (a) baja y (b) alta concentración de sustrato

En la Figura 4.22 se muestra el diagrama de Pareto para la intensidad de corriente obtenido con el diseño realizado en la zona lineal de la curva de calibrado. El diagrama de Pareto permite conocer si los efectos individuales de los factores estudiados, sus interacciones y su efecto cuadrático son estadísticamente significativos. Si el valor p asociado al resultado observado es menor que el nivel de significación establecido, 0,05, se concluye que ese efecto es estadísticamente significativo. Por tanto y teniendo en cuenta los valores p de la Tabla 4.4, el único efecto significativo es el efecto cuadrático de las variables.

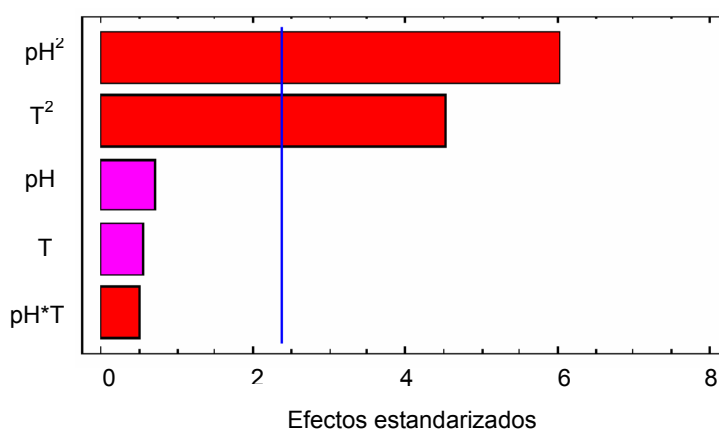


Figura 4.22.- Diagrama estandarizado de Pareto para la intensidad de corriente (nA) donde se muestran los efectos en la zona lineal

Tabla 4.4. .- Valor p obtenidos para los distintos efectos

Efectos	valor p
pH*T	0,6264
T	0,5893
pH	0,4949
T ²	0,0027
pH ²	0,0005

En la Tabla 4.5 se resumen las condiciones experimentales óptimas obtenidas por el método convencional y utilizando el diseño de experimentos. En la región de saturación enzimática, los valores óptimos obtenidos por ambos métodos son semejantes, sin embargo, en la región de concentración baja de sustrato, el valor de pH óptimo concuerda en ambas condiciones, pero los valores de temperatura

obtenidos es esta región difieren significativamente. La temperatura óptima encontrada para esta región a partir del diseño de experimentos, se sitúa 10°C por debajo de la obtenida por el método convencional.

Tabla 4.5. Condiciones experimentales óptimas obtenidas por el método convencional y por el diseño experimental

METODOLOGÍA	VARIABLES	20 μ M (lineal)	200 μ M (saturación)
Convencional	pH	6,0	6,0
Diseño experimental	pH	6,1	5,6
Convencional	T (°C)	25,0	25,0
Diseño experimental	T (°C)	15,6	29,0

Como se ha dicho anteriormente, sólo se pueden obtener conclusiones analíticas de este estudio a concentraciones bajas. La similitud en los valores óptimos de pH confirma el efecto reversible del pH en la actividad enzimática de la PPO, sin embargo, la diferencia encontrada en los valores óptimos de la temperatura, sólo puede ser explicada por el efecto irreversible que este factor ejerce en la actividad enzimática cuando se llega a la temperatura de desnaturalización de la enzima. Para confirmar esta explicación, se realizó un estudio adicional que consistió en disminuir la temperatura desde valores elevados (50°C) hasta valores en los que no se obtuviese ninguna respuesta. Como era de esperar, la respuesta obtenida fue considerablemente menor que la obtenida por el método convencional y realizado partiendo de bajas temperaturas y al ir incrementándolas hasta llegar a la temperatura de desnaturalización. El experimento aleatorio llevado a cabo en el diseño, permite discernir si el efecto de los factores sucede de una manera reversible o irreversible.

IV.2.4.2.5. Carga enzimática

Otro parámetro importante para optimizar el biosensor es la carga enzimática, que permite ampliar su campo de aplicación con distintos intervalos de linealidad. Hay 2 formas de modificar la cantidad de enzima en la proximidad del electrodo:

- Concentración de enzima utilizada en la síntesis de las micropartículas
- Cantidad de micropartículas, con la misma cantidad de enzima, colocadas en la superficie del electrodo

a) Concentración de enzima utilizada en la síntesis de micropartículas

Se han sintetizado micropartículas de poliacrilamida, con grado de reticulación 4,0%, variando la cantidad de tirosinasa inmovilizada en su interior desde 1.667 a 3.333 UI por mililitro de fase acuosa. Para preparar los biosensores se depositó siempre la misma cantidad de micropartículas en la superficie electródica (3mg). Se adicionaron sucesivamente cantidades de catecol hasta llegar a la concentración de catecol correspondiente a la saturación enzimática, se midió la respuesta del biosensor tras cada adición y se trazó la correspondiente curva de calibrado (Figura 4.23). Las medidas se realizaron a -0,1V vs. ECS en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, a 20°C.

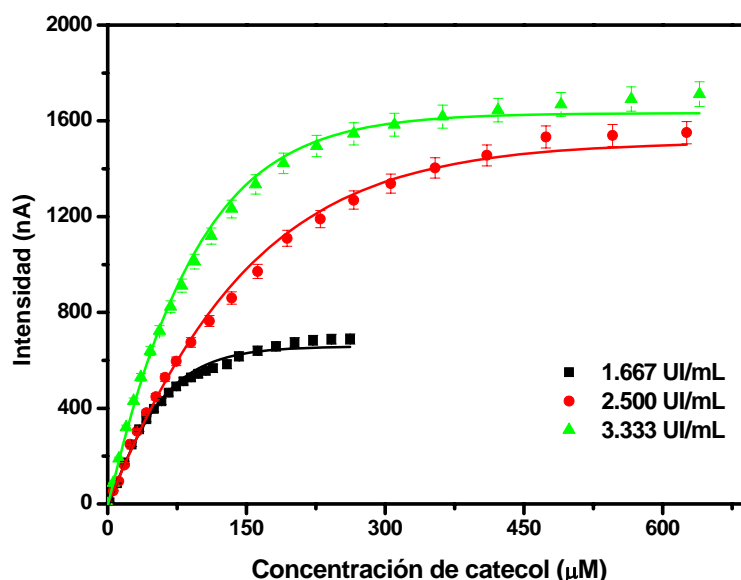


Figura 4.23.- Curvas de calibrado de biosensores preparados con 3 mg de micropartículas con distinta concentración de enzima. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, 20°C y -0,10V vs. ECS.

Como era de esperar, la intensidad de corriente aumentó al aumentar la concentración de enzima inmovilizada en las micropartículas. El límite superior del intervalo lineal de la respuesta llega a alcanzar una concentración de 62 µM cuando la cantidad de enzima en la fase acuosa de la síntesis fue 3.333 UI/mL. Mayores concentraciones de enzima en la fase acuosa, no produjeron intervalos lineales más amplios.

b) Cantidad de micropartículas colocadas en el electrodo

Otra manera de comprobar el efecto de la carga enzimática en la respuesta del biosensor nos llevó a preparar biosensores en los que la cantidad de micropartículas depositada en la superficie del electrodo se fue modificando, y se registraron las correspondientes curvas de calibrado. Las micropartículas utilizadas en esta experiencia tienen un grado de reticulación de 4,0% y 2.500 UI de enzima/mL fase acuosa, la cantidad de micropartículas depositada en la superficie electródica fue de 1, 2 y 3 mg (Figura 4.24). Las medidas se realizaron en una disolución tampón de fosfato pH 6,0, -0,1V vs. ECS, a 20°C.

Al igual que en el caso anterior, el intervalo lineal también aumentó a medida que aumentaba la cantidad de micropartículas en el electrodo y el límite superior del intervalo lineal llegó a alcanzar la concentración de 62 μM cuando la cantidad de micropartículas fue de 3 mg.

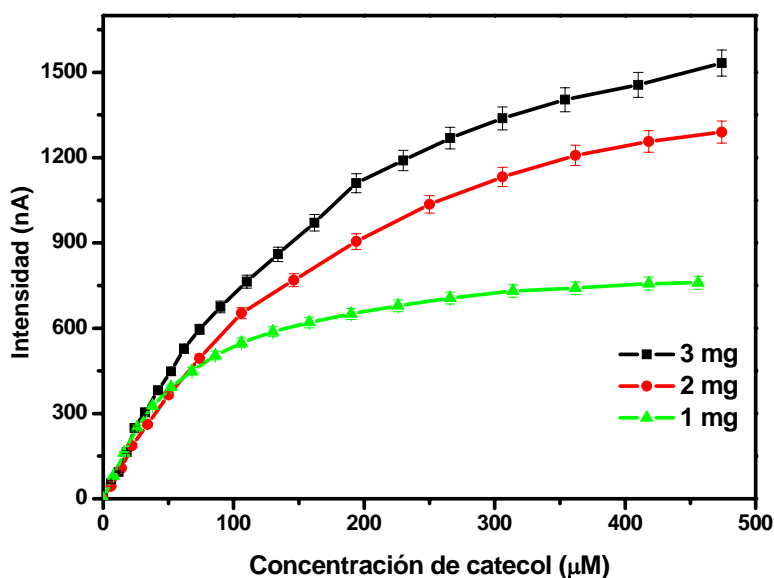


Figura 4.24.- Curvas de calibrado de biosensores preparados con distintas cantidades de micropartículas en la superficie del electrodo (2500 UI PPO/mL de fase acuosa). Condiciones experimentales como en la Figura 4.23.

En las Tablas 4.6 y 4.7, se muestra la sensibilidad, densidad de corriente, intervalo lineal y límite de detección para cada uno de los biosensores ensayado. Los biosensores cargados con 1 mg de micropartículas necesitan 2 min para alcanzar una corriente igual al 95% de la corriente correspondiente al estado estacionario, mientras

que este tiempo aumenta a 5 min cuando los biosensores contienen 3 mg de micropartículas. El aumento en el tiempo de respuesta observado al aumentar la cantidad de micropartículas depositadas en la superficie del electrodo se explica como una consecuencia del mayor grosor de la capa polimérica que debe atravesar el sustrato y el producto de la reacción enzimática para llegar a la superficie eléctrica, aumentando la barrera difusional. Al aumentar la concentración de enzima en las micropartículas no se observaron cambios en los tiempos de respuesta ya que la capa de material biológico fue siempre del mismo espesor. Por ello consideramos más interesante utilizar esta modalidad cuando sea necesario aumentar la respuesta del biosensor.

Tabla 4.6.- Propiedades analíticas de los biosensores en función de la cantidad de micropartículas depositadas en el electrodo (2.500 UI de enzima por mililitro de fase acuosa)

Cantidad de micropartículas en el electrodo	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
1 mg	1,16	139,03	10,86	$2,0 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-5}$	0,9992 (5)	0,9
2 mg	1,17	105,66	18,71	$3,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$	0,9946 (6)	1,3
3 mg	1,17	123,27	22,27	$1,5 \times 10^{-6} - 6,2 \times 10^{-5}$	0,9925 (10)	0,7

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Tabla 4.7.- Propiedades analíticas de los biosensores en función de la cantidad de enzima utilizada en la síntesis, utilizando 3 mg de micropartículas en todos los casos

Concentración de enzima en las micropartículas	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
1.667 UI/mL	1,37	136,91	9,84	$3,0 \times 10^{-6} - 3,4 \times 10^{-5}$	0,9976 (6)	2,6
2.500 UI/mL	1,17	123,27	22,27	$1,5 \times 10^{-6} - 6,2 \times 10^{-5}$	0,9925 (10)	0,7
3.333 UI/mL	1,94	203,23	24,86	$1,5 \times 10^{-6} - 6,2 \times 10^{-5}$	0,9945 (8)	0,6

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Estos resultados nos indican que la adecuada selección de la carga enzimática permitirá controlar el intervalo lineal y ajustarlo a la aplicación analítica correspondiente, así como reducir el tiempo de respuesta del biosensor.

IV.2.4.3. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas

Una vez conocidas las condiciones óptimas de trabajo de los biosensores preparados con tirosinasa atrapada en micropartículas de poliacrilamida, se realizó una curva de calibrado en estas condiciones experimentales, es decir, se utilizaron micropartículas con grado de reticulación 4,0% con 3.333 UI de enzima /mL de fase acuosa de síntesis y concentración de monómero 1,23 M, se preparó el biosensor con 3 mg de micropartículas y las medidas amperométricas se realizaron en una disolución tampón de fosfato sódico pH 6,0, 20°C y -0,1V vs. ECS. En la Figura 4.25 se muestra la curva de calibrado obtenida. Este biosensor presentó las siguientes propiedades analíticas:

- Sensibilidad $206 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$
- Densidad de corriente máxima $24,90 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$
- Intervalo lineal $5,0 \times 10^{-7} - 6,8 \times 10^{-5} \text{ M}$
- Límite de detección $0,5 \text{ } \mu\text{M}$

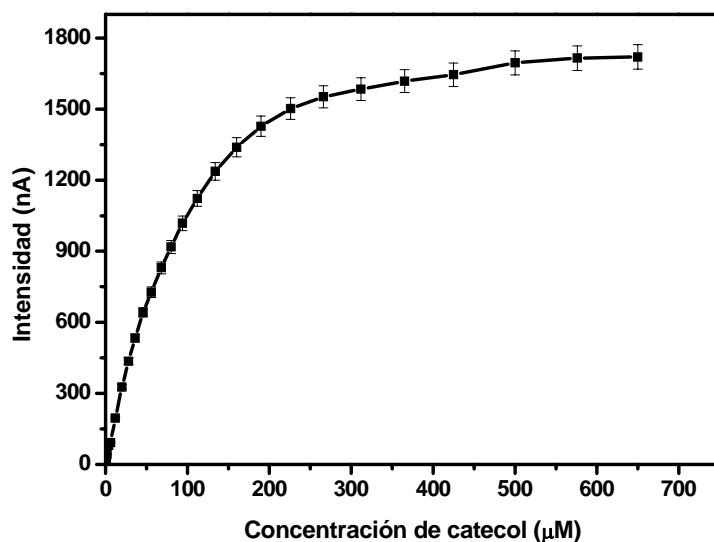


Figura 4.25.- Curva de calibrado obtenida con el biosensor fabricado con tirosinasa inmovilizada en micropartículas de PAA. Condiciones experimentales óptimas.

IV.2.4.4. Estudio de precisión

Una propiedad analítica básica a determinar en todo proceso analítico es la precisión. Para evaluar la precisión se realizó primero un estudio de repetibilidad, realizando todas las medidas en las mismas condiciones analíticas y segundo, de precisión intermedia, variando como mínimo una condición, en este caso el día. El estudio de repetibilidad se llevó a cabo a 3 niveles de concentración de sustrato (zona baja, intermedia y alta) dentro de la zona lineal y el estudio de precisión intermedia sólo a la concentración de sustrato correspondiente a la zona intermedia.

La repetibilidad del biosensor se evaluó realizando 10 medidas de cada disolución de catecol. Las concentraciones de catecol utilizadas fueron 0,5 μM , 30 μM y 60 μM . Para el estudio de precisión intermedia se utilizó la disolución de catecol de 30 μM , realizándose 20 medidas en 2 días diferentes (10 medidas cada día). Los resultados de la repetibilidad se expresan mediante el coeficiente de variación (CV), y se comparan con los obtenidos empíricamente por Horwitz. A medida que disminuye la concentración de analito, los coeficiente de variación aumentan, tal y como dedujo Horwitz, obteniéndose unos CV de 10,56, 4,30 y 1,35% para concentraciones de catecol de 0,5, 30 y 60 μM respectivamente. Al comparar los resultados obtenidos con los CV máximos aceptados por Horwitz según la concentración de analito, (ver Tabla 3.5), en todos los casos los CV obtenidos con el biosensor se encuentran muy por debajo de los aceptables.

En la Figura 4.26 se muestra el gráfico de cajas y bigotes obtenido con los resultados del estudio de precisión intermedia. Se observa que la dispersión de las medidas realizadas el primer día (CV 4,30%) es mayor que para las medidas del segundo día (CV 2,39%). El valor p obtenido al comparar las medias (0,2268) y las varianzas (0,0847) de las medidas realizadas los diferentes días es en ambos casos mayor de 0,05, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las medidas realizadas con el biosensor según el día.

En definitiva, los resultados obtenidos demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con el biosensor formado por micropartículas de poliacrilamida en la determinación de catecol.

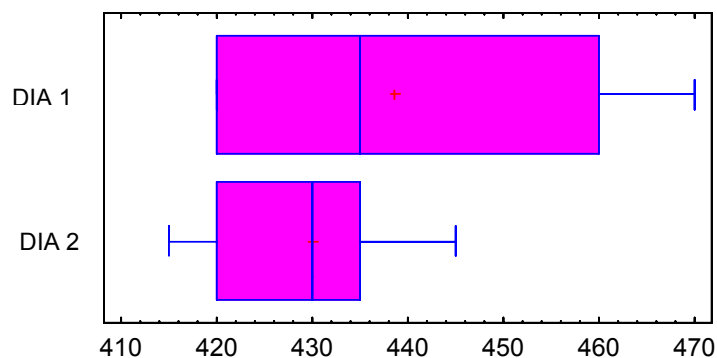


Figura 4.26.- Gráfico de cajas y bigotes

IV.2.4.5. Estabilidad

La estabilidad se ha estudiado desde 2 puntos de vista:

- Estabilidad de los microgeles
- Estabilidad del biosensor

Una de las características más importantes de este sistema de inmovilización enzimática es su fácil preparación y la estabilidad de la enzima dentro del microgel. Se ha comprobado que la actividad enzimática cuando la enzima está atrapada en microgeles de PAA, tras su liofilización, se mantiene inalterable al menos durante 2 años.

Por otro lado, también es necesario conocer la estabilidad del biosensor una vez fabricado, ya que determina el tiempo de vida de este dispositivo como herramienta analítica. Para llevar a cabo el estudio de estabilidad, el biosensor se almacenó en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 a -4°C y se midió periódicamente la respuesta del biosensor a $10\ \mu\text{M}$ de catecol. El biosensor exhibió alrededor de un 90% de la actividad inicial durante 27 días y después se produjo un descenso brusco de la respuesta. En la Figura 4.27 se muestra la evolución temporal de la respuesta.

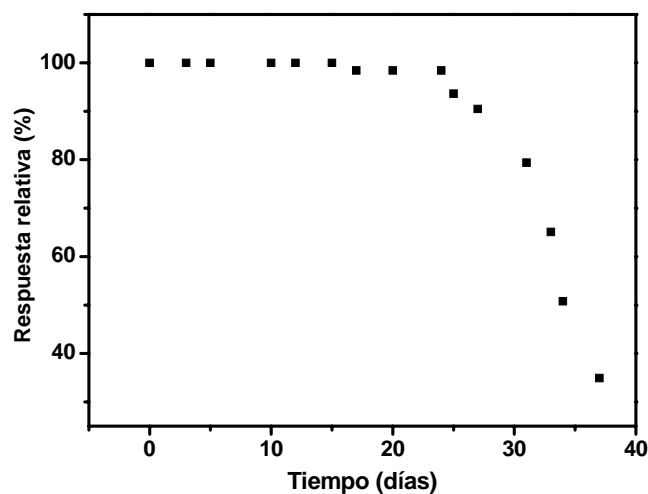
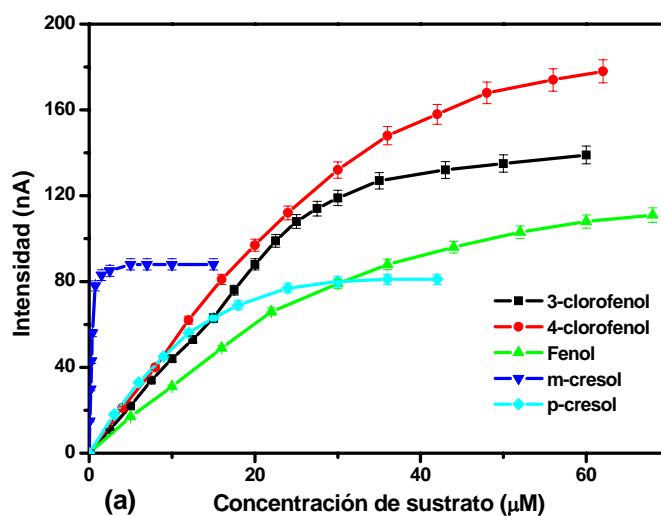


Figura 4.27.- Estabilidad del biosensor de PPO preparado con microparticulas de poliacrilamida

IV.2.4.6. Determinación de distintos fenoles simples en medio acuoso

Con el fin de conocer la respuesta del biosensor a distintos mono y difenoles, se realizó un estudio comparativo. Las curvas de calibrado obtenidas con monofenoles: fenol, p-cresol, m-cresol, 3-clorofenol, 4-clorofenol y difenoles: dopamina y catecol se representan en la Figura 4.28. La Tabla 4.8 muestra las propiedades analíticas del biosensor basado en microgeles de PAA con PPO para diferentes sustratos, incluyendo sensibilidad, intervalo lineal y límite de detección. Los parámetros cinéticos de la reacción enzimática no pudieron calcularse debido al alto valor de los coeficientes de Hill para todos los sustratos estudiados.



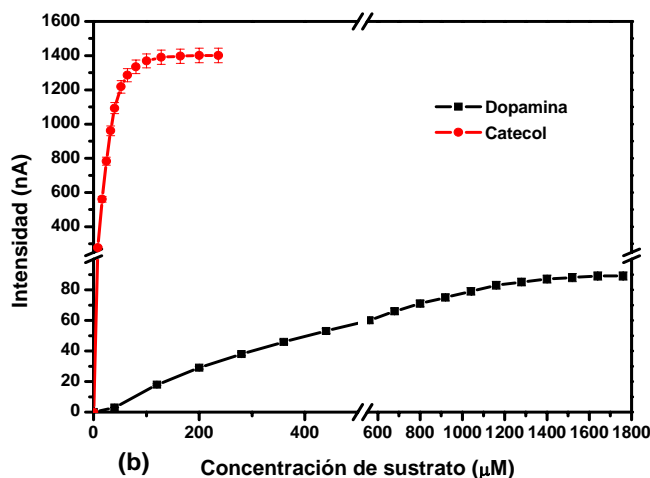


Figura 4.28.- Curvas de calibrado para diferentes (a) mono y (b) difenoles. Disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0, -0,1 V vs. ECS y 20°C

Tabla 4.8.- Propiedades analíticas del biosensor formado de microgeles PAA con PPO para diferentes sustratos

Sustrato	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (µA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (µM)
3-clorofenol	2,10	61,97	2,13	2,5 x 10 ⁻⁶ - 2,5 x 10 ⁻⁵	0,9991 (10)	0,2
4-clorofenol	2,30	67,47	2,57	2,0 x 10 ⁻⁶ - 2,4 x 10 ⁻⁵	0,9962 (6)	0,03
Fenol	2,40	41,36	1,71	5,0 x 10 ⁻⁶ - 2,2 x 10 ⁻⁵	0,9998 (4)	1,4
m-cresol	1,50	2000,00	1,26	1,0 x 10 ⁻⁷ - 0,4 x 10 ⁻⁶	0,9986 (4)	0,02
p-cresol	1,46	60,00	1,16	1,6 x 10 ⁻⁶ - 1,2 x 10 ⁻⁵	0,9946 (5)	0,09
Dopamina	1,54	1,66	1,27	1,2 x 10 ⁻⁴ - 3,6 x 10 ⁻⁴	0,9947 (4)	39,6
Catecol	1,17	469,30	20,03	5,0 x 10 ⁻⁷ - 2,4 x 10 ⁻⁵	0,9928 (10)	0,3

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

De las curvas de calibrado se puede deducir que la afinidad de la enzima fue similar para los sustratos estudiados, salvo en el caso de m-cresol y catecol, sustratos por los que la PPO presentó una mayor afinidad. Comparando la respuesta máxima, en el caso de los monofenoles, el 4-clorofenol tiene la respuesta mayor seguido de 3-clorofenol, fenol, m-cresol y p-cresol con la menor y similar respuesta. En los difenoles, el catecol presentó la respuesta mayor.

Este comportamiento se puede explicar a partir de los 3 pasos del proceso total del biosensor. Los 2 primeros están relacionados con la reacción enzimática, que de acuerdo con Solomon y col. (1996), implica la pérdida del hidrógeno en los compuestos fenólicos y su consecuente enlace entre el carbono de la posición orto de estos compuestos y el oxígeno de la forma oxi de la enzima para generar el difenol. El tercer paso está relacionado con la reacción electródica, ya que la quinona producida enzimáticamente debe reducirse en el electrodo.

La acidez del compuesto fenólico debe ser favorable en el primer paso de la reacción enzimática, y al comparar las constantes de acidez de estos compuestos encontramos los valores siguientes: 3-clorofenol (9.13), 4-clorofenol (9.42), fenol (10.00), m-cresol (10.09) y p-cresol (10.26). Aunque estas constantes son muy similares, la respuesta del biosensor se correlaciona con la acidez en todos los casos excepto en los cloro derivados. El segundo paso de la reacción enzimática se ve influenciado por el efecto aceptor/donador que los sustituyentes del benceno confieren al carbono que se unirá al oxígeno de la tirosinasa. En los compuestos fenólicos estudiados, la secuencia de carácter donador es la siguiente: 4-clorofenol < 3-clorofenol < m-cresol < p-cresol.

Finalmente, se ha considerado el comportamiento electroquímico de las quinonas producidas en la reacción enzimática. Con este objetivo, y debido a la inestabilidad de los compuestos generados enzimáticamente, se ha realizado una serie de voltamperometrías cíclicas en el electrodo de carbono vitrificado. En la Figura 4.29 se muestran, los voltamperogramas cíclicos del fenol (a y b), PPO (c y d) y fenol y PPO (e y f) realizados a 10 mV/s, en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0. Estos voltamogramas se han realizado directamente en el electrodo de carbono vitrificado (a, c y e) o en este electrodo cubierto con una membrana de diálisis (b, d y f) que permite la difusión de la enzima al electrodo y por tanto, la reacción electroquímica. Se puede observar que el fenol no experimenta ningún proceso redox en el intervalo de potencial estudiado, mientras que la tirosinasa presenta un proceso redox solamente cuando el electrodo no estaba cubierto con membrana. El producto de la reacción enzimática, quinona producida al mezclar PPO con fenol, presentó un pico muy claro de reducción en ambas condiciones. Los mismos voltamperogramas se realizaron con las quinonas producidas por los otros compuestos fenólicos. Los potenciales de reducción obtenidos a partir de dichos voltamperogramas y las

corrientes observadas al potencial de trabajo utilizado para la realización de las curvas amperométricas (-0,1V) se muestran en la Tabla 4.9.

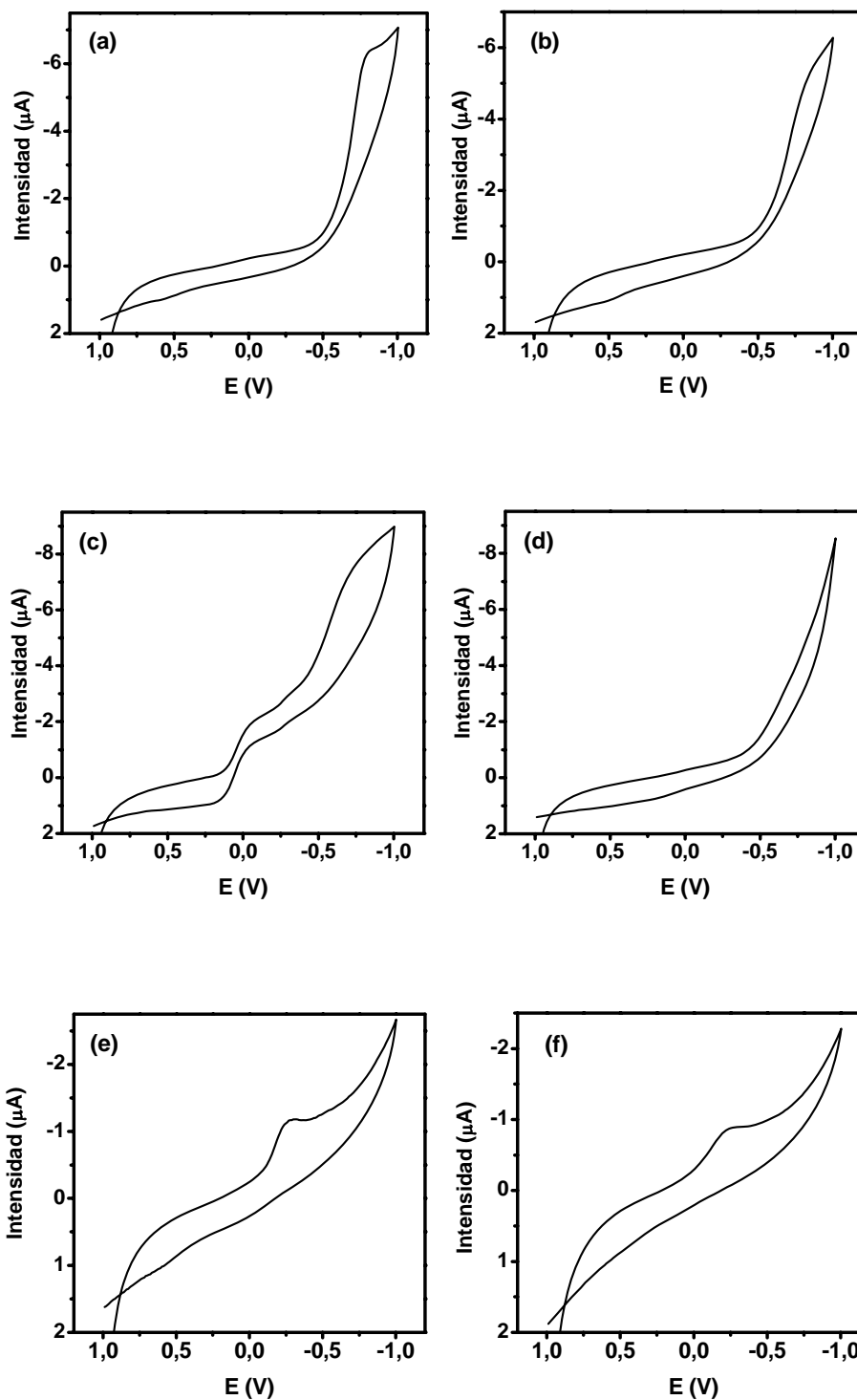


Figura 4.29.- Voltamperogramas cíclicos de 200 mM fenol (a) sin y (b) con membrana de diálisis, 2 mg PPO (c) sin y (d) con membrana de diálisis y 200 mM fenol + 2 mg PPO (e) sin y (f) con membrana de diálisis. ($v= 10$ mV/s, disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0)

La quinona más fácil de reducir electródicamente es la del 4-clorofenol, seguida de 3-clorofenol, fenol, p-cresol y m-cresol. Las corrientes medidas a -0,1V para cada uno de los compuestos descienden en el mismo orden, coincidiendo con los resultados experimentales.

Cuando se utiliza como sustrato o-aminofenol, no se observa señal a -0,1V pero aparece una señal leve a un potencial de -0,6V. Este resultado se podría explicar considerando por una lado la reacción enzimática en la cual el grupo amino podría reaccionar con el oxígeno del centro activo de la enzima como si fuera el segundo grupo hidroxilo del catecol, previniendo la formación de la quinona correspondiente, o considerando el proceso electroquímico, suponiendo que el producto de la reacción enzimática fuese la correspondiente quinona, este compuesto se reduce en un potencial de -0.519 V, mucho más negativo que el potencial utilizado en las medidas amperométricas.

Tabla 4.9.- Potencial de reducción de los compuestos fenólicos obtenidos por voltamperometría cíclica y corriente generada por una disolución de 60 μ M de compuesto fenólico a -0,1V

Sustrato	E_{red} (V)	I (nA)
4-clorofenol	-0,166	171
3-clorofenol	-0,206	126
Fenol	-0,217	98
p-cresol	-0,273	73
m-cresol	-0,285	82
o-aminofenol	-0,519	0

Comparando entre sí todos los fenoles simples, la mayor respuesta se obtuvo al utilizar catecol como sustrato. La intensidad de corriente generada, sin embargo, muestra un apreciable descenso al utilizar como sustrato dopamina si se compara con el catecol y esto puede ser debido a un nuevo efecto, ya que, en este caso, la quinona producida enzimáticamente puede transformarse en dopaminocromo, especie que presenta un comportamiento electroquímico muy diferente a las quinonas (García-Molina et al., 2005). El tiempo de respuesta fue menor en el caso de los difenoles, siendo el catecol el que presentó el menor tiempo. Estos resultados parecen ser

debidos a que, a diferencia de los monofenoles que en contacto con la PPO sufren dos reacciones químicas, los difenoles sólo participan en la segunda reacción enzimática.

IV.2.4.7. Utilización en medios no acuosos

Es frecuente encontrar compuestos fenólicos en muestras liposolubles, por ello es interesante conocer el comportamiento del biosensor en medios no acuosos. Estos biosensores no dieron respuesta ante la presencia de catecol en disoluciones no acuosas, concretamente en mezclas de disolventes orgánicos (acetonitrilo, hexano, cloroformo, etc) con una disolución tampón de fosfato sódico.

IV.2.4.8. Determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales

Los estudios expuestos hasta el momento han demostrado que el biosensor formado por micropartículas de PAA posee propiedades analíticas adecuadas para poder ser utilizados en la determinación de compuestos fenólicos en muestras reales. Por eso, el biosensor se utilizó para el análisis de compuestos fenólicos en aguas residuales procedentes de una estación depuradora (EDAR) de una industria olivarera destinada a la obtención de aceite de orujo, cuyo contenido en estos compuestos se desconocía. Las muestras de aguas analizadas corresponden a las distintas etapas del tratamiento de las aguas residuales (Pérez López y Espigares García, 1995). En primer lugar se produce un tratamiento primario para eliminar los sólidos en suspensión que consta de las etapas de homogeneización y tratamiento físico-químico. Posteriormente, un tratamiento secundario o tratamiento biológico con el fin de reducir la materia orgánica presente en el agua residual. Finalmente, existe un proceso de depuración donde se utiliza un biorreactor de membrana para separar por filtración los contaminantes orgánicos. Al realizar el análisis de compuestos fenólicos en este agua, sólo se obtuvo respuesta para las muestras que solo habían sufrido el tratamiento primario, no observándose señal una vez realizado el tratamiento biológico. Se midió la concentración de compuestos fenólicos totales expresada en fenol y se realizó el estudio de recuperación. Para ello se cogieron 5 alicuotas del agua de 6 mL cada una. Con 3 mL se midió la corriente generada por el biosensor, y para el cálculo de la concentración se extrapoló en la curva de calibrado de fenol, obteniéndose un valor de compuestos fenólicos en agua de 41 μM expresado en fenol. A los 3 mL de agua restantes se les añadió una cantidad de fenol conocida (40 μM) midiéndose de nuevo la corriente y la concentración de fenol por extrapolación en la curva de calibrado. La diferencia entre las concentraciones de ambas muestras debe

corresponder con la concentración de fenol añadido. Este resultado permite el cálculo de la recuperación que se mantuvo en torno al 80% (Tabla 4.10)

Tabla 4.10.- Resultados de recuperación del biosensor formado por micropartículas de PAA

Muestra	Fenol añadido (μM)	Fenol encontrado (μM)	Recuperación (%)
1	40,0	30,1	78,1
2	40,0	20,8	68,8
3	40,0	30,0	75,0
4	40,0	30,3	81,3
5	40,0	30,5	87,5

IV.3. Biosensor amperométrico enzimático fabricado con microgeles de polímeros de líquidos iónicos

IV.3.1. POLÍMERO DE LÍQUIDOS IÓNICOS

Los líquidos iónicos (LIs) son sales orgánicas formadas por iones muy asimétricos y de gran tamaño. Los cationes generalmente son orgánicos y voluminosos (imidazolios, piridinius, tetraalquilamonios y tetraalquilfosfonios). Los aniones generalmente son inorgánicos tales como haluros, sulfatos, bromuros, boratos, triflato, etc. En la Figura 4.30 se representan los iones más comunes, aunque existen muchos más, lo que hace que las combinaciones sean muy numerosas. La elección del catión y el anión determina las propiedades físico-químicas del LI. Los líquidos iónicos han sido el foco de muchas investigaciones debido a su estabilidad química, baja presión de vapor y alta conductividad iónica (Rogers y col., 2002). Son considerados disolventes verdes aplicándose en la industria química como sustituyentes de disolventes tóxicos. Dentro de los posibles campos de aplicación de los LIs se destaca la electroquímica (Ohno, 2005) donde se pueden utilizar como electrolitos, la química de polímeros (Kubisa, 2005; Percec y Grigoras, 2005, Mallakpour y Kowsari, 2005), como dispositivos de almacenamiento de energía (baterías, células solares) y su utilización en biocatálisis (Van Rantwijk y col., 2002; Park y Kazlauskas, 2003).

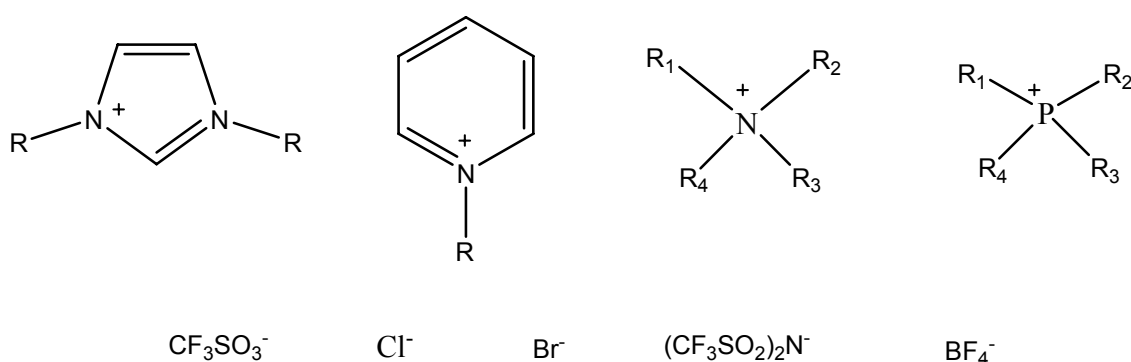


Figura 4.30.- Estructura de los cationes y aniones más utilizados en la síntesis de líquidos iónicos

Hay muy pocos ejemplos de geles que involucren a polímeros de líquidos iónicos. La mayoría de estos trabajos se basan en el desarrollo de electrolitos poliméricos para dispositivos electroquímicos. Ohno y col. (2003) publicaron algunos ejemplos de polímeros con estructura de líquidos iónicos para su aplicación como electrolitos. Snedden y col. (2003) y Abu Bin Hasan y col. (2005) propusieron la síntesis de geles iónicos por un entrecruzamiento de monómeros de vinilo en LI, para su aplicación como membranas y geles electrolitos.

La síntesis de monómeros (Bonhote y col., 1996) y polímeros (Ohno y col., 2004) de LI se desarrolló durante la pasada década. Recientemente se ha publicado la polimerización directa de los monómeros de LI formados por imidazol y la subsecuente modificación del polímero por medio de una reacción de intercambio aniónico, dando como resultado polímeros solubles en disolventes orgánicos (Marcilla et al., 2004). Se podría así acceder a una gran variedad de líquidos iónicos poliméricos lineales con un único monómero polimerizado, generalmente con anión bromuro o cloruro.

Sólo hay un ejemplo en la literatura que realiza la síntesis de micropartículas de polímeros de LI. Muldoon y Gordon (2004) sintetizaron micropartículas poliméricas preparadas en su totalidad a partir de líquidos iónicos por una polimerización en suspensión del 1-butil-3-imidazol bis(trifluorometilsulfonil) imida, para su posible aplicación en el campo de la catálisis.

Recientemente, los LI se han propuesto como alternativa a los disolventes orgánicos en la conversión enzimática de moléculas. Por ejemplo, la acetilación del 1-feniletanol catalizado por lipasa de *Pseudomonas Cepacia* es rápida y enantioselectiva utilizando como disolventes los líquidos iónicos en vez del tolueno (Park y Kazlauskas, 2001). Además, la acetilación de glucosa catalizada por lipasa B de *Candida Antarctica* es más selectiva en líquidos iónicos porque la glucosa es más soluble en estos disolventes que en otros orgánicos. Schöfer y col. (2001) describen que las lipasas muestran buena actividad, en algunos casos superior enantioselectividad, cuando se utiliza como disolvente líquido iónico puro en reacciones de transesterificación del 1-feniletanol.

Si nos centramos en los sensores enzimáticos, la estabilidad de la enzima es un requisito indispensable para su utilización como parte de estos dispositivos. Como la actividad enzimática se mantiene cuando éstas se encuentran disueltas en líquidos iónicos pensamos que la inmovilización de las enzimas en polímeros de líquidos iónicos mantendrá la actividad enzimática pudiéndose utilizar para el diseño de biosensores. Además, por las características fisico-químicas de los LIs esperamos que el atrapamiento de enzimas en una red de polímeros de líquidos iónicos puede dar como resultado un sistema que permita trabajar en medios no acuosos. Por ello

decidimos sintetizar micropartículas de polímeros iónicos por el método ya expuesto, atrapar enzima en su interior y preparar biosensores amperométricos con este nuevo material biológico para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos.

En este trabajo se seleccionaron líquidos iónicos formados por el catión imidazol y anión bromuro para preparar micropartículas de LI polimerizados (LIPs). Una vez obtenida la red polimérica, con una sencilla reacción de intercambio iónico se pueden obtener micropartículas de LIPs de distinta composición y como consecuencia, con distintas características fisico-químicas, con enzimas en su interior. La síntesis de micropartículas de LIPs abre la posibilidad de controlar la solubilidad de los polímeros de líquidos iónicos mediante la estructura del anión y esto los hace especialmente atractivos como sistemas de inmovilización del material biológico para biosensores, para su posible uso en medios acuosos y no acuosos.

Para comenzar este estudio se llevó a cabo la síntesis, optimización y caracterización de micropartículas de LIPs de distinta composición. Se inmovilizaron dos enzimas; en primer lugar la glucosa oxidasa (GOx) como enzima modelo para el estudio y optimización del sistema de inmovilización enzimático y en segundo lugar se inmovilizó la tirosinasa. Una vez concluida esta etapa, se utilizaron dichas micropartículas como componente biológico en el diseño de biosensores amperométricos para la determinación de glucosa y de compuestos fenólicos respectivamente. Finalmente se procedió a la optimización de la medida de los biosensores propuestos.

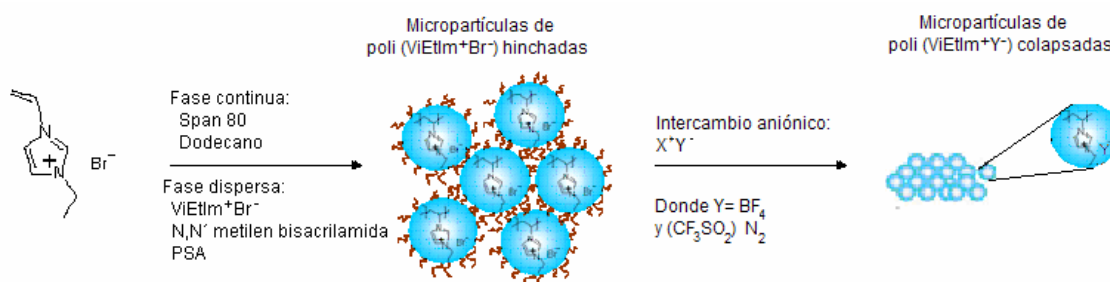
IV.3.2. SÍNTESIS DE MICROGELES DE LÍQUIDOS IÓNICOS POLIMÉRICOS

IV.3.2.1. Síntesis de micropartículas de poli bromuro 1-vinil-3-etil-imidazol

La síntesis de micropartículas de poli bromuro 1-vinil-3-etil-imidazol (poli[ViEtIm⁺][Br⁻]) sin y con enzima se realizó utilizando el método de polimerización en emulsión concentrada (Esquema 4.1), ya utilizado en la síntesis de microgeles de PAA, obteniéndose micropartículas con grados de reticulación comprendidos entre 1,6 y 5,0%.

En primer lugar se sintetizaron y caracterizaron micropartículas sin enzima. Para inmovilizar la glucosa oxidasa se añadieron 425 UI de GOx/mL de la fase acuosa

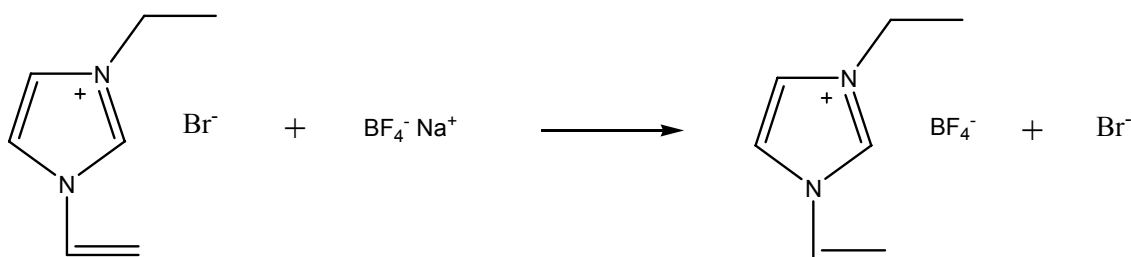
de la emulsión. También se sintetizaron micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] con PPO, utilizando una cantidad de tirosinasa de 2.500 UI/mL de fase acuosa. Para comprobar la eficacia catalítica de la PPO inmovilizada en estas micropartículas, se utilizó el mismo método espectrofotométrico que el utilizado con las micropartículas de poli(acrilamida) obteniéndose un porcentaje de actividad enzimática del 60% en las micropartículas con PPO respecto a la enzima libre.



Esquema 4.1.- Síntesis de micropartículas de líquidos iónicos poliméricos

IV.3.2.2. Método de intercambio aniónico

Para obtener nuevas micropartículas de LIPs se llevó a cabo una reacción de intercambio aniónico (Marcilla y col., 2004), Así se obtuvieron micropartículas de poli (tetrafluoroborato de 1-vinil-3-etil-imidazol) (poli [$\text{ViEtIm}^+\text{BF}_4^-$]), poli (triflato de 1-vinil-3-etil-imidazol) (poli [$\text{ViEtIm}^+\text{CF}_3\text{SO}_3^-$]), poli (dodecilbenzenosulfonato de 1-vinil-3-etil-imidazol) (poli [$\text{ViEtIm}^+\text{DBSA}^-$]), poli (trifluorometanosulfonimida de 1-vinil-3-etil-imidazol) (poli [$\text{ViEtIm}^+\text{CF}_3\text{SO}_2\text{N}^-$]) y poli(bispentafluoroetanosulfonimida de 1-vinil-3-etil-imidazol) (poli [$\text{ViEtIm}^+\text{CF}_3\text{CF}_2\text{SO}_2\text{N}^-$]). El intercambio aniónico es un proceso sencillo y rápido de realizar, en el que las micropartículas sintetizadas se dispersan en agua y se mezclan con un exceso de una disolución acuosa de la sal correspondiente al anión que se desea intercambiar en el polímero (relación $\text{ViEtIm}^+\text{Br}^-$: sal 1:2 (mol:mol)). Inmediatamente después de mezclarse ambas disoluciones, se forma un nuevo polímero como resultado de la reacción de intercambio aniónico, precipitando, como consecuencia de que el polímero resultante se colapsa en el disolvente utilizado (Esquemas 4.1 y 4.2). El precipitado obtenido se filtra, y se centrifuga con acetona y agua a 4500 rpm durante 15 minutos. Después se liofiliza en una bomba de vacío hasta peso constante.



Esquema 4.2.- Reacción de intercambio aniónico

Para conseguir micropartículas de poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻], se añadieron 0,10 g de micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] a 15 mL de agua y se disolvieron 0,10 g de NaBF₄ en 2 mL de agua. Se añadió gota a gota la disolución de sal sobre la dispersión de micropartículas. Después de agitarse durante 15 minutos se formó un precipitado blanco ya que los microgeles con el nuevo anión colapsan en agua. El precipitado se liofilizó obteniéndose un peso final de 0,08 g (rendimiento del 72,56%). Para preparar micropartículas de poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻], se añadieron 0,10 g de micropartículas poli [ViEtIm⁺][Br⁻] a 15 mL de agua y 0,28 g de Li(CF₃SO₂)₂N a 2 mL de agua, se mezclaron gota a gota como en el caso anterior, se agitó y se pesó el precipitado obtenido (0,13 g, rendimiento del 63,69%). En la Figura 4.31 se muestra por un lado las micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] dispersas en agua ya que se encuentran hinchadas en este disolvente y por otro, el precipitado obtenido una vez realizado el intercambio aniónico, ya que los microgeles de poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻] colapsan en disolución acuosa.

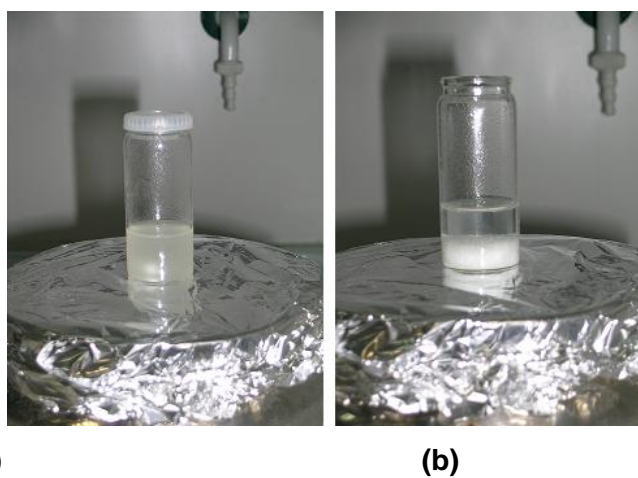
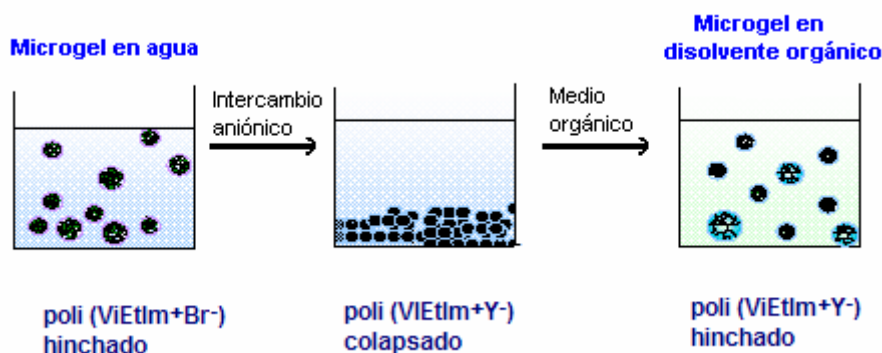


Figura 4.31.- Micropartículas (a) poli[ViEtIm⁺][Br⁻] y (b) poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻] obtenidas tras el intercambio aniónico de (a) con NaBF₄

IV.3.3. CARACTERIZACIÓN DE MICROGELES DE LÍQUIDOS IÓNICOS POLIMÉRICOS

IV.3.3.1. Hinchamiento de los microgeles en distintos disolventes

El hinchamiento de las micropartículas sintetizadas en un disolvente difiere según el anión del que esté formado el líquido iónico. Así, las micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] y poli[ViEtIm⁺][DBSA⁻] se hinchan en agua y etanol pero en estos mismos disolventes, se colapsan las micropartículas con anión BF₄⁻, (CF₃SO₂)₂N⁻, CF₃SO₃⁻ y CF₃CF₂SO₂)₂N⁻, hinchándose en disolventes orgánicos tales como acetona y tetrahidrofurano (Esquema 4.3). Esta característica puede ser importante en el diseño de biosensores que trabajen en medio acuoso y no acuoso.



Esquema 4.3.- Hinchamiento de los microgeles de poli[ViEtIm⁺][Y⁻] dependiendo del anión

IV.3.3.2. Microscopia electrónica de barrido

En la Figura 4.32 se muestran las micrografías obtenidas mediante SEM de micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻], poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻] y poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻]. Se observa que después del intercambio iónico, las nuevas micropartículas presentan una forma esférica al igual que las micropartículas precursoras, pero generalmente mayor tamaño como consecuencia del mayor tamaño de los nuevos aniones. La inmovilización de la enzima tirosinasa y glucosa oxidasa produce micropartículas poli[ViEtIm⁺][Br⁻] esféricas (Figura 4.33) con una gran polidispersidad de tamaños.

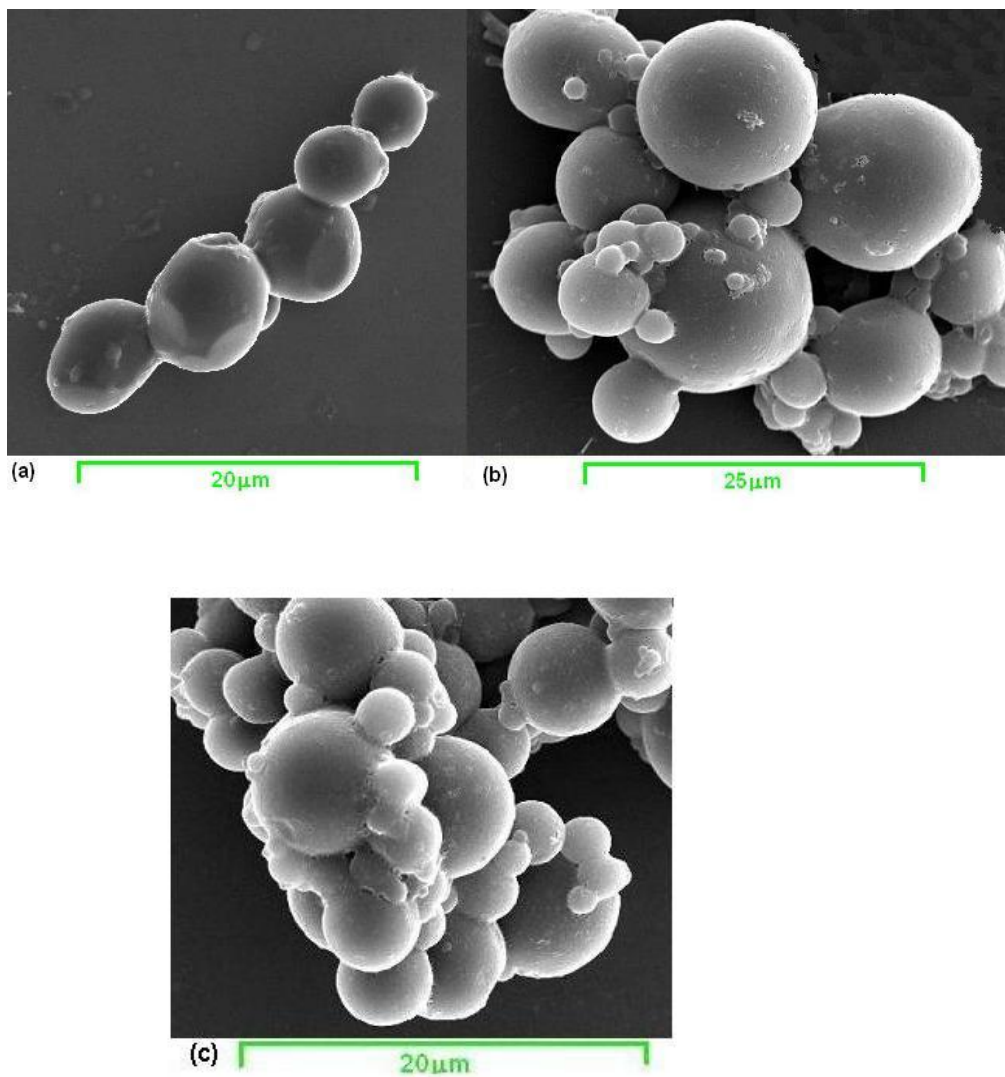


Figura 4.32.- Micrografías SEM de micropartículas: (a) poli[ViEtIm⁺][Br⁻], (b) poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻] y (c) poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻]

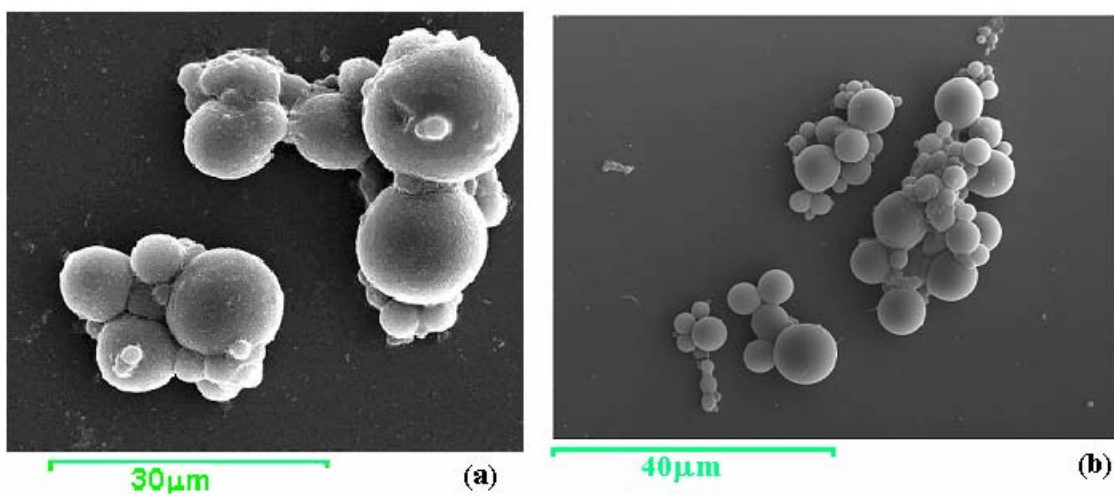


Figura 4.33.- Micrografías SEM de micropartículas poli[ViEtIm⁺][Br⁻] (a) con GOx y (b) PPO

IV.3.3.3. Analizador de partículas

Como anteriormente se ha mostrado, la estructura del anión tiene una influencia enorme en el hinchamiento o colapso de las micropartículas de LIPs dependiendo del disolvente utilizado. La Tabla 4.11 muestra el tamaño medio de partícula el cual fue medido con el analizador de partículas Galai-cis. Para realizar la medida se han utilizado disolventes en los cuales las micropartículas estén hinchadas. Así, para el análisis del tamaño en micropartículas con anión bromuro se utilizaron como disolventes agua y metanol, obteniéndose unos tamaños medios entre 3 y 5 μm . Por otro lado, las micropartículas formadas de aniones hidrofóbicos tales como CF_3SO_3^- , $(\text{CF}_3\text{CF}_2\text{SO}_2)_2\text{N}^-$, $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$, DBSA y BF_4^- , se hinchan en disolventes no polares como acetona y tetrahidrofurano, formando microgeles con un tamaño medio entre 4-8 μm .

Tabla 4.11.- Tamaño medio de partícula para micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Y⁻]

ANION	Tamaño promedio de las partículas (μm)				
	η (%)	Agua	Metanol	Acetona	Tetrahidrofurano
Br^-	1,6	3,6	4,6		
	5,0	4,0	5,2		
CF_3SO_3^-	5,0		4,5	4,8	
$(\text{CF}_3\text{CF}_2\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	5,0			6,4	
$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	1,6			7,8	
	2,5			7,1	3,9
	5,0			5,9	5,4
BF_4^-	5,0			6,4	6,0
DBSA ⁻	1,6		5,8		
	2,5		5,9		

Al inmovilizar glucosa oxidasa y tirosinasa en micropartículas de LIPs se obtuvieron micropartículas con un intervalo de tamaños entre 2 y 12 μm , y un tamaño medio de partícula de 4 y 5 μm respectivamente (Figura 4.34).

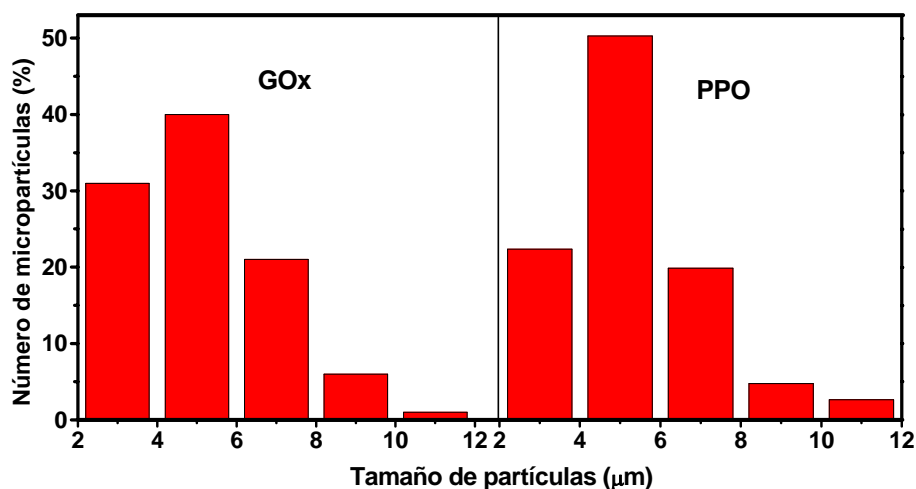


Figura 4.34.- Distribución de tamaños de micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] con enzima inmovilizada dispersas en una disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0

IV.3.3.4. Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo

Para investigar la naturaleza química de las micropartículas y saber si el intercambio aniónico se ha producido con éxito se llevó a cabo una caracterización mediante espectrofotometría de absorción en el infrarrojo. Para este estudio se prepararon pastillas de micropartículas y KBr del 1%, pesando 100 mg de KBr y 1 mg de micropartículas. El espectro infrarrojo de las micropartículas iniciales poli[ViEtIm⁺][Br⁻], y el obtenido con micropartículas poli[ViEtIm⁺][Y⁻] (donde Y es BF₄⁻, DBSA⁻, (CF₃CF₂SO₂)₂N⁻, (CF₃SO₂)₂N⁻ y CF₃SO₃⁻ se muestra en la Figura 4.35. En todos los espectros infrarrojos, las bandas que se atribuyen al catión poli [ViEtIm⁺] entre 2800-3300 y 1550 cm⁻¹ están claramente identificadas. El intercambio aniónico se puede observar por la desaparición de algunas bandas y la aparición de nuevas bandas atribuidas al nuevo anión. Cuando el anión es bromuro aparecen bandas a 1652, 1445 y 1171 cm⁻¹. Si se produce el intercambio aniónico se observan nuevas bandas correspondientes al anión BF₄⁻ (2800-3000, 1171 y 1057 cm⁻¹), DBSA⁻ (2929, 2857, 1039 y 1009 cm⁻¹), CF₃SO₃⁻ (1260, 1165, 1033 y 872 cm⁻¹), (CF₃SO₂)₂N⁻ (1354, 1194, 1136 y 1053 cm⁻¹) y (CF₃CF₂SO₂)₂N⁻ (1344, 1225, 1170 y 980 cm⁻¹), lo que confirma que la reacción de intercambio iónico se produce correctamente.

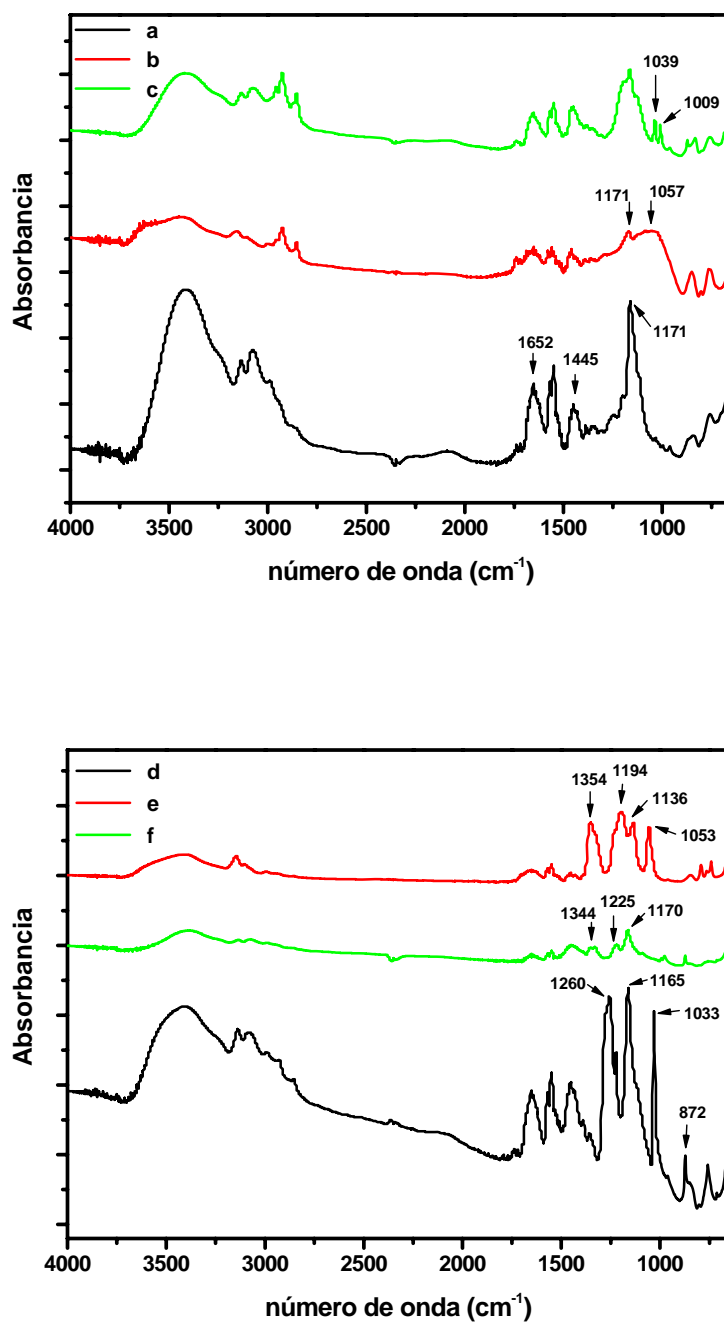


Figura 4.35.- Espectros de infrarrojo correspondientes a micropartículas (a) poli[ViEtIm⁺][Br⁻], (b) poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻], (c) poli [ViEtIm⁺][DBSA⁻], (d) poli [ViEtIm⁺][CF₃SO₃⁻], (e) poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻] y (f) poli [ViEtIm⁺][(CF₃CF₂SO₂)₂N⁻].

IV.3.3.5. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X

Con el fin de completar el estudio de la reacción de intercambio aniónico se ha realizado un análisis de los elementos de las micropartículas de LIPs con distintos

aniones, mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS). Esta técnica no informa de una manera exacta sino aproximada, es decir, se realiza un análisis semicuantitativo de elementos.

Se realizaron los espectros EDS de las micropartículas formadas por distintos aniones observándose cómo en el espectro correspondiente a las micropartículas poli[ViEtlm⁺][Br⁻], aparece la presencia de 4 elementos constituyentes: carbono, nitrógeno, oxígeno y bromo. Sin embargo, en el espectro correspondiente a micropartículas con anión [CF₃SO₂)₂N⁻] y [CF₃CF₂SO₂)₂N⁻] el pico correspondiente al bromo ha desaparecido por completo y aparecen dos nuevos picos que indican la presencia de fluor y azufre, resultado que confirma el intercambio aniónico. Resultados similares se obtuvieron con otras micropartículas de LIPs, en donde la concentración de anión bromuro fue siempre menor al 0,5%. Esta técnica tiene la limitación de que la información obtenida sólo corresponde a la capa externa de las micropartículas. Aunque, no se puede demostrar que en el interior de las micropartículas se haya producido el intercambio aniónico, los resultados obtenidos con IR e hinchamiento de los microgeles en distintos disolventes, parecen indicar que el intercambio se produce en toda la micropartícula.

IV.3.3.6. Estabilidad térmica

Con el fin de estudiar la influencia del anión en las propiedades de los microgeles de LIPs, se realizó un estudio de estabilidad térmica. En la Figura 4.36 se muestran los resultados del análisis termogravimétrico (TGA) de diferentes micropartículas de LIPs con diferentes aniones (Br⁻, BF₄⁻, DBSA⁻, (CF₃CF₂SO₂)₂N⁻, CF₃SO₃⁻ y (CF₃SO₂)₂N⁻). La estructura del anión influye en la estabilidad térmica con el siguiente orden: (CF₃SO₂)₂N⁻ > (CF₃CF₂SO₂)₂N⁻ > CF₃SO₃⁻ > DBSA⁻ > BF₄⁻ > Br⁻. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente con LIPs lineales (Marcilla y col., 2005). En el caso de las micropartículas de LIPs con anión Br⁻, CF₃SO₃⁻ y DBSA⁻, el proceso de descomposición consta de 2 etapas (velocidad de calentamiento de 10°C/min). Por último, se realizó un estudio de la influencia del grado de reticulación en la estabilidad térmica. La Figura 4.37 muestra el TGA de micropartículas con anión Br⁻ y DBSA⁻ en función del grado de reticulación (1,6; 2,5 y 5,0%), observándose como el agente entrecruzante no afecta a la estabilidad térmica.

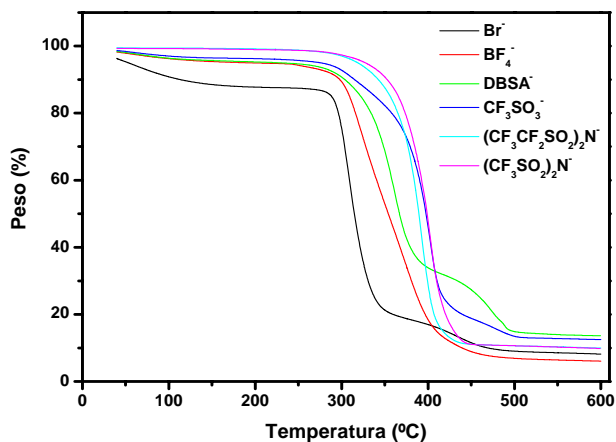


Figura 4.36.-Análisis termogravimétrico de micropartículas de poli [ViEtm⁺][Y⁻]

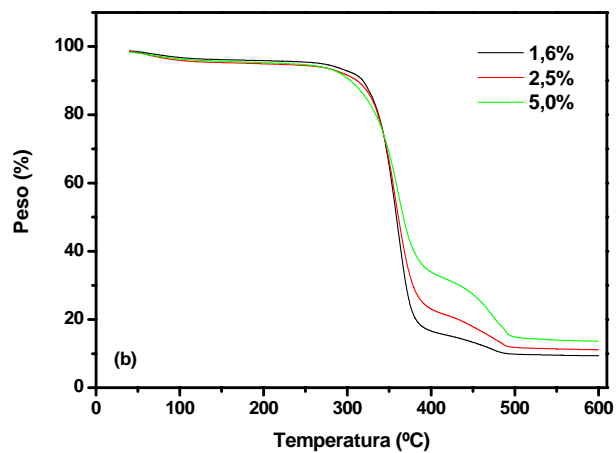
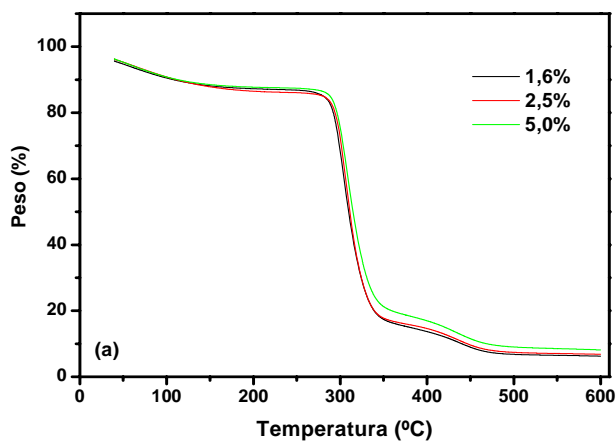


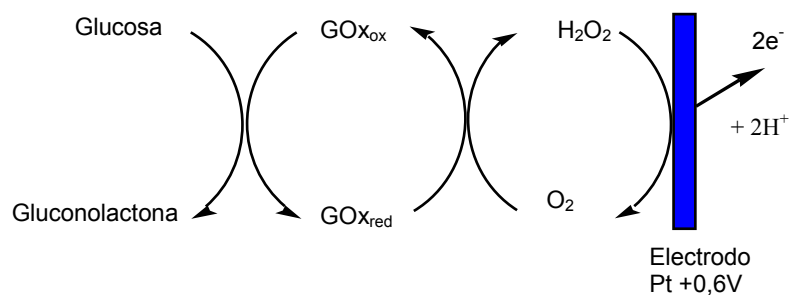
Figura 4.37.- Análisis termogravimétrico de micropartículas de (a) poli[ViEtm⁺][Br⁻] y (b) poli[ViEtm⁺][DBSA⁻], en función del grado de reticulación

IV.3.4. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO CON MICROGELES DE LIPs PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Para comprobar la utilidad de este nuevo material como sistema de inmovilización enzimático y dado que el comportamiento de las enzimas es poco predecible, antes de inmovilizar la PPO en este sistema polimérico decidimos comenzar por una enzima cuyo comportamiento fuera más conocido, seleccionamos la glucosa oxidasa, GOx, por su robustez, con actividad enzimática en un amplio intervalo de pH y temperatura, bajo precio, etc... Estas características de la GOx han hecho posible la amplia propuesta de biosensores para la determinación de glucosa que tanto han ayudado a los enfermos de diabetes.

La GOx inmovilizada en micropartículas de LIPs fue utilizada como material biológico de un biosensor amperométrico. Se optimizaron los parámetros que afectan a la respuesta de este dispositivo analítico y se estudió su posible utilización en medios no acuosos.

Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de platino, al que se aplicó un potencial de +0.6V vs. ECS. El proceso de medida se ilustra en el siguiente esquema y como vemos se basa en la detección amperométrica de la oxidación del peróxido de hidrógeno, producto de la reacción enzimática entre glucosa y glucosa oxidasa.



Esquema 4.4.- Reacción global catalizada por glucosa oxidasa

IV.3.4.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático

Se estudiaron las distintas variables experimentales que afectan a la síntesis de micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con el objetivo de optimizar las características de las micropartículas obtenidas para su uso como material biológico del biosensor amperométrico. Las variables estudiadas fueron:

- Concentración de agente iniciador
- pH de síntesis
- Concentración de monómero
- Grado de reticulación

IV.3.4.1.1. Concentración de agente iniciador

En primer lugar se estudia la influencia de la concentración de PSA en la velocidad de reacción y la temperatura de polimerización. Se realizan 3 síntesis de micropartículas de LIPs variando la concentración de iniciador desde 9,86 a 21,92 mM. Tanto la velocidad de reacción como la temperatura de polimerización aumentan con la concentración de iniciador, al igual que ocurre para las micropartículas de PAA. La temperatura máxima en el reactor es menor de 24°C cuando se utiliza una concentración de iniciador de 10,96 mM y esta concentración fue la seleccionada en el caso de la inmovilización de glucosa oxidasa. Sin embargo, cuando se atrapa PPO, la concentración de PSA se reduce a 9,86 mM para mantener la temperatura máxima en 20°C. Respecto al porcentaje de polimerización, cuando la concentración de iniciador es 10,96 mM, se produce el 95% de la conversión del monómero en 70 minutos, mientras que el tiempo de reacción fue de 90 minutos para 9,86 mM.

IV.3.4.1.2. pH de síntesis

En este apartado se describe cómo el pH de la fase acuosa de la emulsión precursora de la síntesis influye en las características de las micropartículas obtenidas y en la respuesta del biosensor preparado con dichas micropartículas. Se sintetizaron micropartículas con GOx, utilizando como fase acuosa una disolución tampón de acetato/fosfato a pHs 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0. Se prepararon los biosensores correspondientes y se obtuvieron las curvas de calibrado para cada uno de ellos a 25°C y +0,6 V vs. ECS, por las adiciones sucesivas de glucosa a 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, hasta llegar a la concentración de saturación enzimática.

Como se observa en la Figura 4.38, la máxima respuesta se obtuvo con las micropartículas sintetizadas a pH 4,0 por lo que fue éste el pH seleccionado como óptimo para posteriores síntesis. Atribuimos este resultado a que el polímero está cargado positivamente a los pHs de trabajo y si tenemos en cuenta que la glucosa oxidasa tienen un punto isoeléctrico de 4,2 (Ram y col., 2000), a pH 4,0 prácticamente no tiene carga, a pH 3,0 tiene carga neta positiva mientras que a pH 5,0 y 6,0 la

proteína presenta carga negativa. Por tanto, a pH 4,0 no existen fuerzas de atracción/repulsión entre el polímero y la enzima, debido a la carga neta nula de la glucosa oxidasa. El estudio del líquido sobrenadante obtenido en la síntesis de las micropartículas demuestra que no tiene actividad enzimática. A pH 3,0 se producen fuerzas de repulsión entre el polímero y la enzima, y parte de la glucosa oxidasa se pierde en la polimerización como muestra la actividad enzimática que presenta el sobrenadante y además, a ese pH ha podido comenzar la desnaturalización de la enzima. A pHs 5,0 y 6,0, el sobrenadante no muestra actividad enzimática y existen fuerzas de atracción entre la glucosa oxidasa y el polímero por lo que los centros activos de la enzima se pueden ver íntimamente unidos al polímero, dificultando el contacto entre éstos y el sustrato siendo ésta probablemente la causa del descenso en la intensidad, que se acentúa con la carga de la proteína.

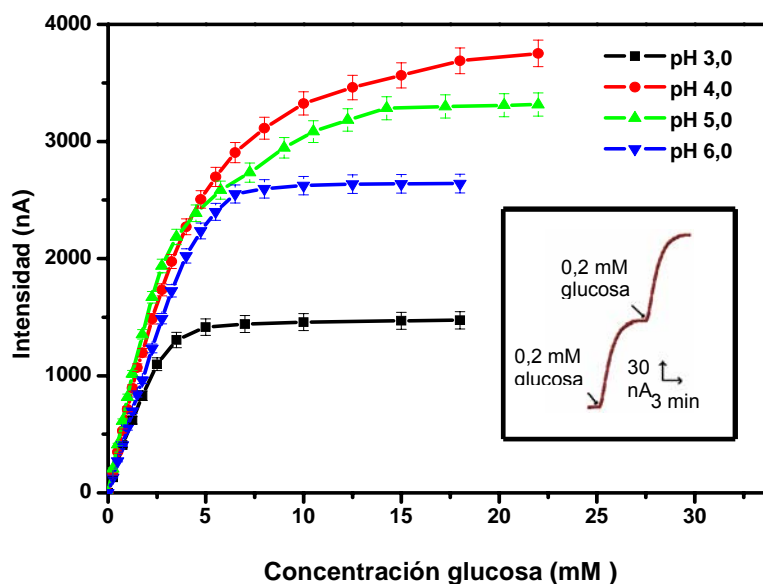


Figura 4.38.- Respuesta del biosensor a diferentes pH de fase acuosa de la emulsión precursora de las micropartículas. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, +0,6V vs. ECS y 25°C. Recuadro.- Perfil intensidad-tiempo obtenido con el biosensor de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con GOx

En el recuadro de la Figura 4.38 se observa el perfil de la intensidad con el tiempo al añadir 0,2 mM de glucosa, siendo el tiempo de respuesta de 4 minutos. Los coeficientes de Hill mayores en todos los biosensores a 1,1, parecen indicar que el proceso limitante en la medida del biosensor es la difusión del sustrato y producto a través de la partícula polimérica. Por esta razón, no fue posible calcular las constantes cinéticas de la reacción enzimática.

Tabla 4.12.- Propiedades analíticas de los biosensores formados por micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con GOx al variar el pH de la disolución acetato/fosfato utilizada en la síntesis de micropartículas

pH de síntesis	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
3,0	1,12	7,75	21,04	5,0 x 10 ⁻⁵ - 7,5 x 10 ⁻⁴	0,9997 (6)	12,0
4,0	1,15	10,06	55,71	2,5 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻³	0,9999 (11)	7,4
5,0	1,15	11,79	47,36	5,0 x 10 ⁻⁵ - 1,2 x 10 ⁻³	0,9996 (9)	9,0
6,0	1,17	7,97	37,73	5,0 x 10 ⁻⁵ - 1,5 x 10 ⁻³	0,9997 (10)	10,0

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.3.4.1.3. Concentración de monómero

En este apartado se ha estudiado la influencia que la cantidad de monómero incorporado en la fase acuosa de la emulsión tiene en la inmovilización de la glucosa oxidasa. Para ello, se sintetizaron micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con grado de reticulación 3,2% con glucosa oxidasa (425 UI/mL de fase acuosa pH 4,0), y distintas concentraciones de monómero 0,90 M, 1,23 M, 1,80 M y 2,46 M. Con estas micropartículas se prepararon distintos biosensores, se realizaron las curvas de calibrado (Figura 4.39) y se comparó su respuesta. Las medidas se realizaron a +0,6 V vs. ECS y 25°C, en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 sobre la que se realizaron adiciones sucesivas de glucosa.

Como vemos en la Tabla 4.13, la máxima respuesta se obtuvo con las micropartículas con 1,23 M de monómero. A altas concentraciones de monómero, el descenso de corriente se atribuye a que existe una barrera difusional grande que dificulta el movimiento de sustrato y producto de la reacción enzimática. Al descender la concentración de monómero a 0,90 M también disminuye la respuesta, probablemente debido a la pérdida de enzima como consecuencia del gran tamaño de los poros de la red polimérica formada cuando se usa una cantidad de monómero pequeña. La actividad enzimática observada en el líquido sobrenadante cuando la concentración de monómero utilizada en la síntesis es 0,90M confirma esta hipótesis.

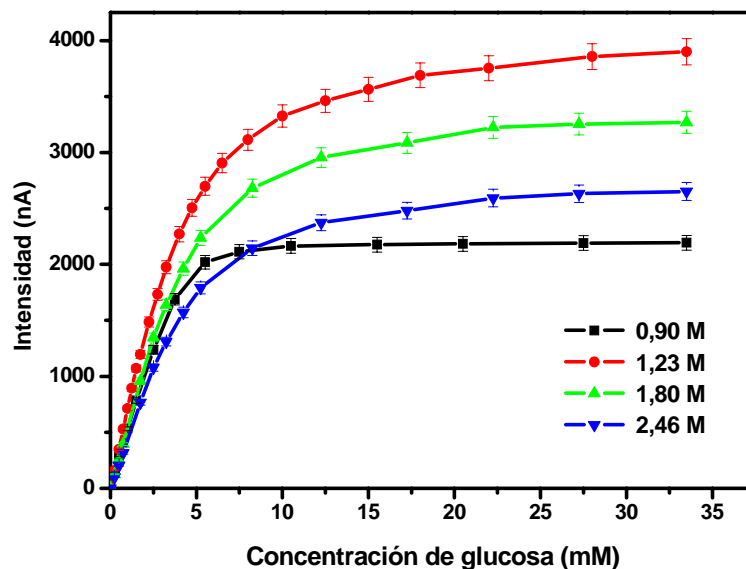


Figura 4.39.- Influencia de la concentración de monómero en la respuesta del biosensor. Grado de reticulación igual a 3,2%. Condiciones experimentales como en la Figura 4.38

Tabla 4.13.- Propiedades analíticas de los biosensores de glucosa al variar la concentración de monómero

Concentración de monómero (M)	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
0,90	1,13	7,54	31,34	$2,5 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$	0,9987 (7)	9,0
1,23	1,15	10,06	55,71	$2,5 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$	0,9999 (11)	7,4
1,80	1,17	7,76	46,70	$2,5 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-3}$	0,9998 (7)	9,0
2,46	1,20	6,21	37,88	$2,5 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-3}$	0,9998 (7)	10,0

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Además, se estudió la dependencia del tamaño de las micropartículas con la concentración de monómero (Figura 4.40). El tamaño medio varía entre $3,5 \mu\text{m}$ para una concentración de monómero de $0,90 \text{ M}$ y $5,0 \mu\text{m}$ cuando la concentración de

monómero fue de 2,46. Se observa, por tanto, un ligero aumento del tamaño medio de partícula al aumentar la concentración de monómero.

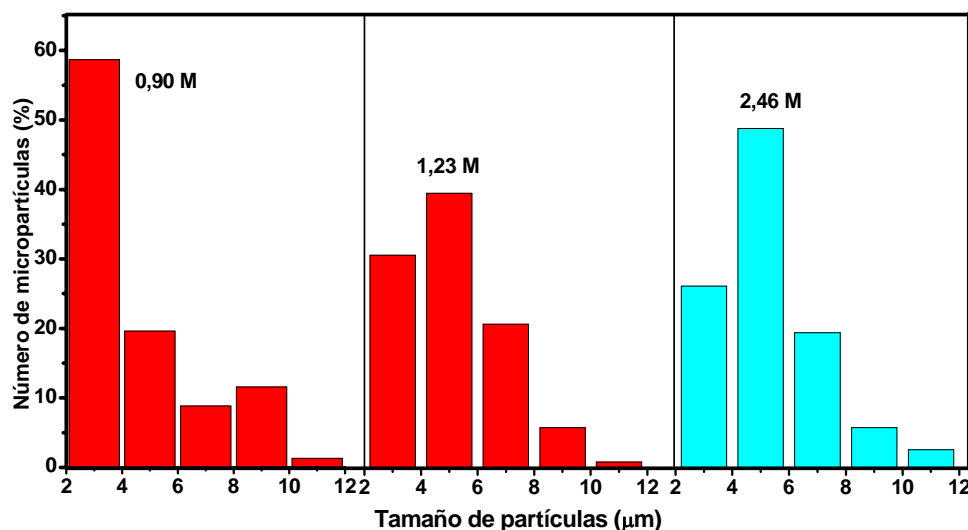


Figura 4.40.- Distribución de tamaños de micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con GOx y distinta concentración de monómero, dispersas en una disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0

IV.3.4.1.4. Grado de reticulación

Para realizar este estudio se sintetizaron micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con glucosa oxidasa (425 UI/mL de fase acuosa pH 4,0), 1,23 M de monómero y diferentes cantidades de agente entrecruzante. La Figura 4.41 muestra las curvas de calibrado obtenidas con los biosensores preparados con micropartículas cuyo grado de reticulación varió de 1,6 a 4,5 %. Las medidas se realizaron a +0,6 V vs. ECS y 25°C, en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 sobre la que se realizaron adiciones sucesivas de glucosa.

La máxima respuesta se obtuvo con micropartículas con un grado de reticulación de 3,2% (Tabla 4.14). Como en el apartado anterior, atribuimos este comportamiento a que las micropartículas con grado de reticulación bajo presentan un tamaño de poro demasiado grande para retener a la enzima, y así lo confirma la aparición de actividad enzimática en los líquidos sobrenadantes. El descenso en la respuesta cuando el entrecruzamiento es mayor de 3,2% se debería a que el tamaño de poro es tan pequeño y la red polimérica tan compacta, que además de ralentizar el

acceso del sustrato a la micropartícula podría dificultar el contacto entre el sustrato y los centros activos de la enzima.

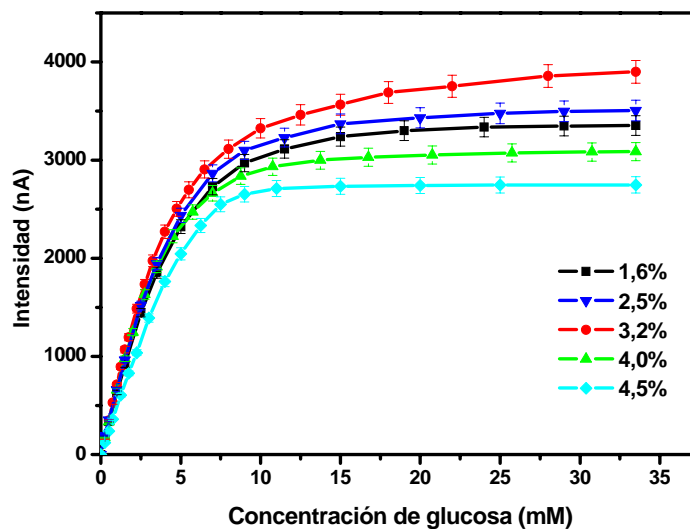


Figura 4.41.- Influencia de la proporción de agente entrecruzante en la respuesta del biosensor. Concentración de monómero siempre igual a 1,23 M. Condiciones experimentales como en la Figura 4.38

Tabla 4.14.- Propiedades analíticas de los biosensores de glucosa al variar el grado de reticulación

Grado de reticulación (%)	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
1,6	1,14	8,72	47,89	$5,0 \times 10^{-5}$ - $1,5 \times 10^{-3}$	0,9986 (8)	12,0
2,5	1,15	9,06	50,09	$2,5 \times 10^{-5}$ - $1,5 \times 10^{-3}$	0,9989 (8)	12,0
3,2	1,15	10,06	55,71	$2,5 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-3}$	0,9999 (11)	7,4
4,0	1,20	9,28	43,61	$2,5 \times 10^{-5}$ - $1,5 \times 10^{-3}$	0,9998 (9)	8,0
4,5	1,20	6,93	39,24	$5,0 \times 10^{-5}$ - $1,5 \times 10^{-3}$	0,9999 (7)	10,0

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.3.4.2. Optimización de la respuesta del biosensor

Una vez conocida la influencia de las variables de síntesis, se seleccionaron las condiciones óptimas y las micropartículas resultantes se utilizaron en la preparación del biosensor amperométrico. En este apartado se estudiaron las variables analíticas que afectan a su respuesta:

- Potencial aplicado
- pH
- Temperatura
- Carga enzimática

IV.3.4.2.1. Potencial aplicado

La influencia del potencial aplicado en la respuesta del biosensor se evaluó registrando la corriente generada por la adición de 0,25 mM de glucosa a una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, a 25°C. El potencial estudiado se fue aumentando desde +0,2V a +0,8V vs. ECS con un incremento de 0,1V. Se produjo un aumento de la intensidad de corriente entre potenciales de +0,2V a +0,6V y se mantuvo constante una vez alcanzado este valor (Figura 4.42). Para posteriores estudios, se utilizó un potencial de +0,6V.

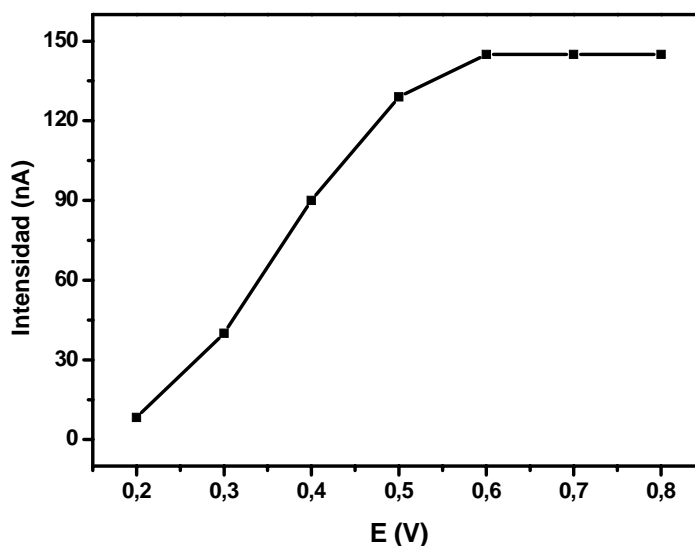


Figura 4.42.- Influencia del potencial aplicado en la respuesta del biosensor al añadir 0,25 mM de glucosa. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y 25°C.

IV.3.4.2.2. pH

Para preparar el biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] (3,2%) y se registró la corriente generada por la adición de glucosa a una disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico a 25 °C y +0,60V vs. ECS. El intervalo de pH estudiado fue de 4,0-8,0. El estudio se realizó para dos concentraciones diferentes de glucosa: una concentración situada en la zona lineal (0,25 mM) y una concentración correspondiente a la zona de saturación de la curva de calibrado (20 mM) no observándose cambios significativos en los resultados obtenidos para ambas concentraciones.

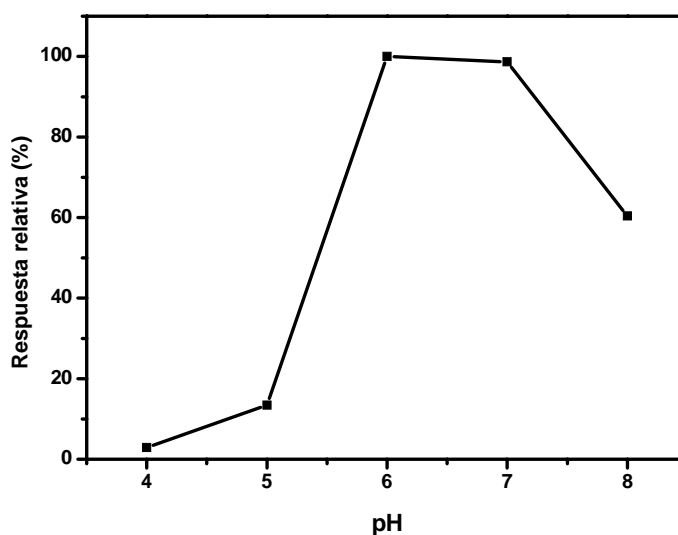


Figura 4.43.- Efecto del pH en la respuesta biosensor al añadir 20 mM de glucosa. Disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico, +0,6V vs. ECS y 25°C.

Aunque el pH óptimo en la síntesis de micropartículas fue 4,0 (apartado 3.4.1.2), al realizar la medida, el pH óptimo de la disolución tampón se mantiene entre 6,0 y 7,0 (Figura 4.43). Este resultado se explica teniendo en cuenta el efecto de este parámetro en la reacción enzimática y electroquímica. En la oxidación electroquímica del peróxido de hidrógeno se generan dos iones hidrógeno, por lo que un aumento en la concentración de protones hace que el equilibrio se vea desplazado hacia la izquierda, es decir, un aumento del pH favorece que se produzca la oxidación del producto enzimático y por otro lado, la actividad de la glucosa oxidasa es máxima a pH 6,0.

IV.3.4.2.3. Temperatura

El efecto de la temperatura en la respuesta del biosensor se investigó de forma similar, en las 2 zonas de la curva de calibrado, utilizando una concentración de glucosa de 0,25 y 20 mM, con saturación de oxígeno. Para controlar la temperatura se utilizó una célula electroquímica termostatazada, siendo el intervalo de temperaturas del estudio 0°C-60°C.

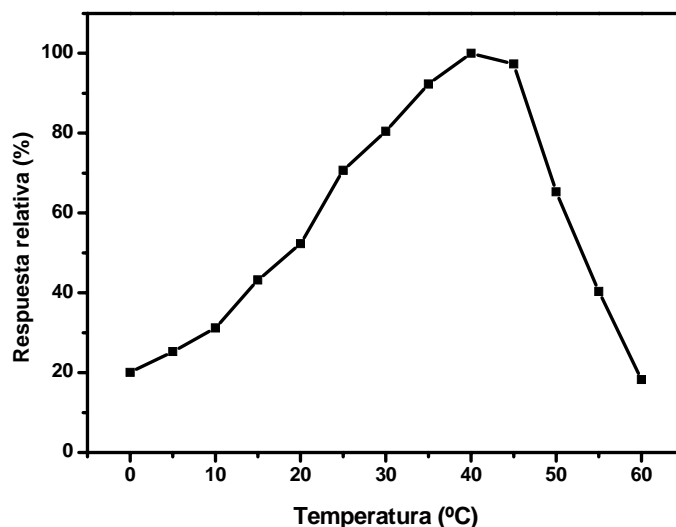


Figura 4.44.- Efecto de la temperatura en la respuesta del biosensor al añadir 20 mM de glucosa. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y +0,6V vs. ECS.

La gráfica de la respuesta del biosensor en función de la temperatura, tanto para la zona lineal como para la de saturación, tiene forma de campana con un primer tramo ascendente en el que se refleja cómo la temperatura tiene un efecto positivo en la respuesta del biosensor, un punto de máxima intensidad de corriente que se encuentra a 40°C y un tramo descendente que refleja la pérdida de actividad enzimática originada por la desnaturalización de la enzima. En la Figura 4.44 se muestra el perfil obtenido al utilizar una concentración de glucosa correspondiente a la zona de saturación enzimática.

Se realizó un estudio de estabilidad térmica de la enzima, con el fin de asegurar que a la temperatura de trabajo no se produce la desnaturalización de la GOx. Para ello, se añadieron 20 mM de glucosa a la disolución tampón y una vez alcanzado el estado estacionario, se mantuvo el potencial constante durante una hora. Cuando se trabaja a temperaturas entre 30 y 50°C, se observa un descenso de la

corriente con el tiempo, proceso que es más acentuado a medida que aumenta la temperatura. A temperaturas de 25°C o inferiores, la respuesta del biosensor no sufrió cambios con el tiempo, manteniéndose al mismo nivel de intensidad, resultado que nos asegura que la desnaturalización de la GOx no comienza si no se superan los 25°C. Por esta razón, las experiencias posteriores se realizaron a 25°C.

La representación de Arrhenius (Figura 4.45) se realizó con los resultados obtenidos en el estudio de temperatura, considerando únicamente el intervalo de temperaturas en donde no se produce desnaturalización enzimática (0-25°C). Se puede observar un único tramo lineal de cuya pendiente se deriva una energía de activación de 33,95 KJ/mol, significativamente mayor que la encontrada en la bibliografía para la enzima libre, estimada en 14,63 KJ/mol (Cosnier y col., 2001), pero en buena concordancia con los valores normalmente encontrados para glucosa oxidasa inmovilizada (Shan y col., 2007). Así como la poliacrilamida es un hidrogel muy estudiado y su comportamiento muy conocido, no ocurre lo mismo con este hidrogel. Para conocer si el microgel de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] es dependiente de la temperatura dentro del intervalo de temperaturas estudiado, se calculó el tamaño del microgel, utilizando como disolvente una disolución tampón de fosfato sódico, en un intervalo de temperaturas entre 5 y 30 °C. No se observaron cambios significativos ni en el tamaño medio ni en el intervalo de tamaños de las partículas (Figura 4.46). El hecho de que en la representación de Arrhenius sólo se observe un tramo lineal nos hace pensar que el microgel de LIPs no sufre cambios de volumen en el intervalo de temperaturas estudiado, a diferencia del microgel de acrilamida, dependiente de la temperatura, donde aparecen dos tramos lineales que atribuimos al cambio de estado hinchado/colapsado del microgel.

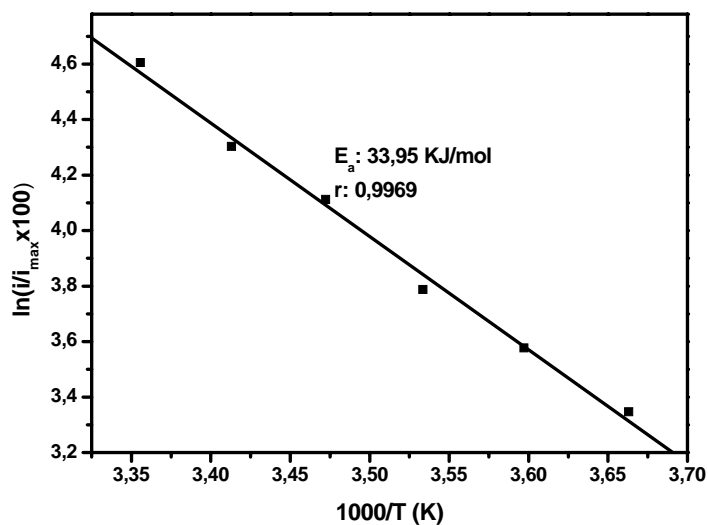


Figura 4.45.- Representación de Arrhenius para micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con GOx y grado de reticulación 3,2% obtenida con los resultados de la Figura 4.44

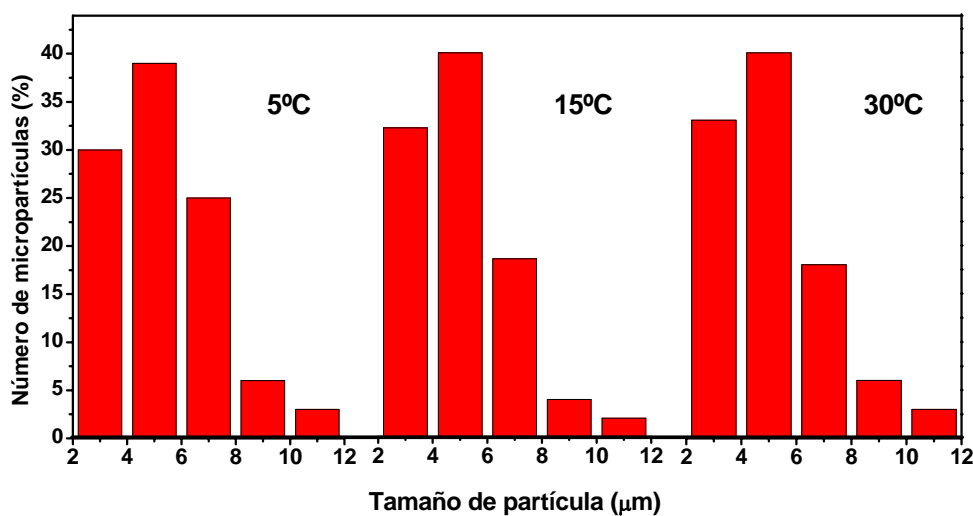


Figura 4.46.- Influencia de la temperatura en la distribución de tamaños de micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con GOx, dispersas en una disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0

IV.3.4.2.4. Carga enzimática

Con el objetivo de ampliar al máximo el intervalo de linealidad del biosensor, se ha estudiado el efecto de la carga enzimática, variando por un lado la concentración de enzima inmovilizada en las micropartículas preparando el biosensor con la misma

cantidad de micropartículas y por otro cambiando la cantidad de micropartículas colocadas en la superficie del electrodo, siempre con la misma concentración de enzima. Esta última modalidad de modificación de la carga enzimática también se estudió con el fin de reducir el tiempo de respuesta del biosensor.

a) Concentración de enzima utilizada en la síntesis de micropartículas

Se sintetizaron micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] con distinta cantidad de glucosa oxidasa inmovilizada en su interior (255 UI, 425 UI, 765 UI y 1.020 UI por mililitro de fase acuosa). Para preparar el biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas ($\eta=3,2\%$) con distinta carga enzimática, y se realizaron las curvas de calibrado (Figura 4.47).

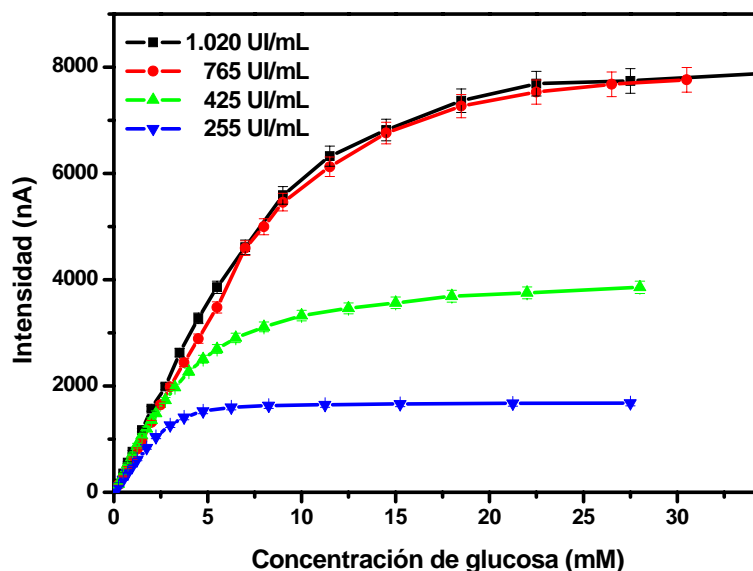


Figura 4.47.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores preparados con 3 mg de micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con distinta concentración de enzima. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, +0,6V vs. ECS y 25°C.

La intensidad de corriente aumenta conforme se incrementa la concentración de enzima en la micropartículas, hasta llegar a una cantidad de enzima de 765 UI/mL de fase acuosa por encima de la cual no se consigue mayor respuesta. Podemos pensar que al utilizar una cantidad de enzima de 1.020 UI/mL de fase acuosa se ha producido un proceso de saturación quedando enzima en la superficie de las micropartículas que posteriormente se disuelve en el líquido sobrenadante. Esta

hipótesis se ve apoyada por la actividad enzimática que presentó el líquido sobrenadante.

b) Cantidad de micropartículas colocadas en el electrodo

Se depositaron distintas cantidades de micropartículas en la superficie del electrodo (1, 2 y 3 mg de micropartículas siempre con $\eta = 3,2\%$ y 765 UI de enzima/mL de fase acuosa) y se registraron las curvas de calibrado obtenidas con los correspondientes biosensores (Figura 4.48).

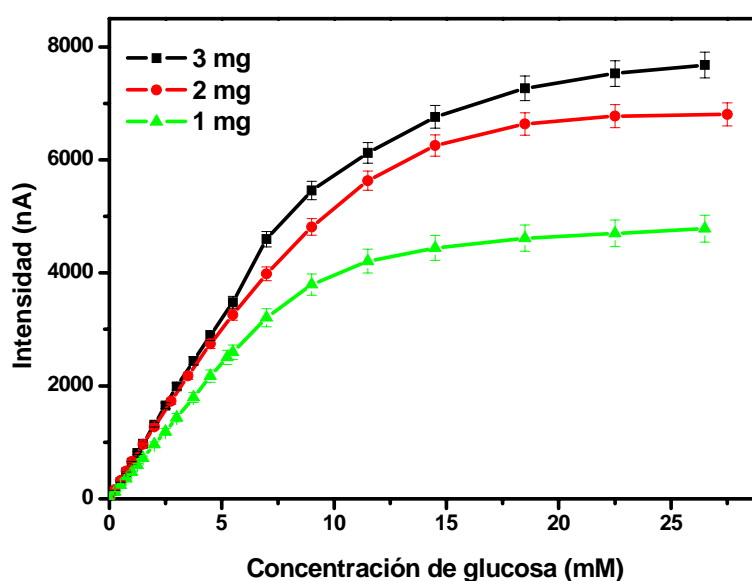


Figura 4.48.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores preparados con distinta cantidad de micropartículas poli $[\text{ViEtIm}^+][\text{Br}^-]$ en la superficie del electrodo (concentración de enzima de 765UI/mL). Condiciones experimentales como en la Figura 4.47.

Al analizar el intervalo lineal obtenido en cada caso, se puede observar cómo la modificación de la carga enzimática en cualquiera de las dos modalidades supone un cambio en dicho intervalo. Como consecuencia, la carga enzimática del biosensor se seleccionará de acuerdo con la aplicación analítica del mismo y las concentraciones del analito en las muestras objeto de estudio. Por un lado, el intervalo lineal se extendió hasta 8 mM cuando la cantidad de GOx en la fase acuosa pasó de 255 a 765 UI/mL o cuando la cantidad de micropartículas depositadas en el electrodo fue de 3 mg. Aunque con ambos métodos se consigue ampliar la zona lineal, el segundo tiene la desventaja de ir acompañado de un aumento apreciable en el tiempo de respuesta. Al utilizar el biosensor preparado con 3 mg de micropartículas se obtuvo un tiempo de

respuesta de 4 min, que se redujo a 2,5 min con el biosensor preparado con 1 mg. En la Tabla 4.15 se presentan las propiedades analíticas de los biosensores con distintas cargas enzimáticas.

Tabla 4.15.- Propiedades analíticas del biosensor en función de la carga enzimática.

Concentración de enzima en las micropartículas	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
255 UI/mL	1,14	6,96	23,99	$2,0 \times 10^{-5}$ - $1,7 \times 10^{-3}$	0,9997 (6)	11,0
425 UI/mL	1,15	10,06	55,71	$3,0 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-3}$	0,9991 (9)	3,9
765 UI/mL	1,20	9,60	110,91	$2,5 \times 10^{-5}$ - $8,0 \times 10^{-3}$	0,9995 (13)	7,4
1.020 UI/mL	1,20	11,56	115,17	$2,5 \times 10^{-5}$ - $8,0 \times 10^{-3}$	0,9983 (9)	8,0
Cantidad de micropartículas en el electrodo						
1 mg	1,16	6,78	60,10	$3,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-3}$	0,9972 (12)	9,3
2 mg	1,19	9,66	96,77	$3,0 \times 10^{-5}$ - $5,5 \times 10^{-3}$	0,9994 (10)	5,9
3 mg	1,21	9,32	109,71	$2,5 \times 10^{-5}$ - $8,0 \times 10^{-3}$	0,9995 (13)	7,4

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.3.4.3. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas

Para finalizar este estudio de optimización de las variables experimentales se realizó la curva de calibrado obtenida con el biosensor de glucosa utilizando micropartículas de poli $[\text{ViEtIm}^+][\text{Br}^-]$ con 765 UI de GOx en 1 mL de fase acuosa, grado de reticulación 3,2%, concentración de monómero de 1,23 M y pH 4,0 de síntesis. Para preparar el biosensor se depositaron 3 mg de micropartículas y se realizó la curva de calibrado por las adiciones sucesivas de glucosa en una disolución tampón de fosfato sódico pH 6,0, 25°C y +0,6 V vs. ECS (Figura 4.49).

Las propiedades analíticas obtenidas fueron:

- Sensibilidad $9,70 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$
- Densidad de corriente máxima $111,27 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$
- Intervalo lineal $2,5 \times 10^{-5} - 8,0 \times 10^{-3} \text{ M}$
- Límite de detección $7 \text{ } \mu\text{M}$

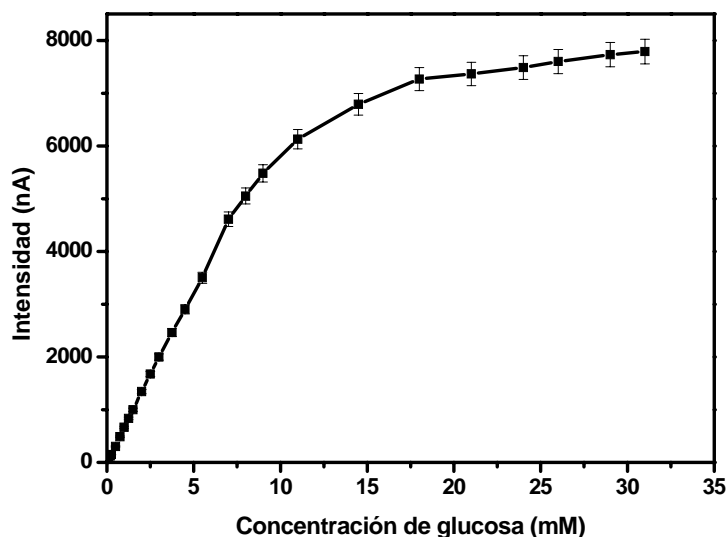


Figura 4.49.- Curva de calibrado obtenida con el biosensor de glucosa preparado con micropartículas de poli $[\text{ViEtIm}][\text{Br}^+]$ obtenida con las condiciones de trabajo óptimas

IV.3.4.4. Estudio de precisión

Para evaluar la repetibilidad de la medida se realizaron 10 medidas de una disolución de glucosa. El estudio se realizó con 3 disoluciones de distinta concentración de glucosa dentro del intervalo lineal, utilizando siempre el mismo biosensor y realizando todas las experiencias el mismo día. Los coeficientes de variación obtenidos al utilizar concentraciones de glucosa de 0,025, 3,5 y 7 mM fueron 12,37, 5,9 y 2,4% respectivamente. Todos los CV obtenidos con el biosensor son menores que los CV máximos aceptables en función de la concentración de analito según Horwitz (ver Tabla 3.5).

En segundo lugar se estudió la precisión intermedia, para ello se utilizó una disolución de 3,5 mM de glucosa y se realizaron 20 medidas en 2 días consecutivos (10 medidas cada día). En la Figura 4.50 se muestra el gráfico de cajas y bigotes obtenido, observándose que la dispersión de las medidas en ambos días es muy parecida con un CV de 5,94% el primer día y 4,82% el segundo. El valor p obtenido

para la comparación de las medias fue 0,2474 y para la comparación de las varianzas 0,4912, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las medidas realizadas en los dos días de estudio.

Los resultados obtenidos demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con el biosensor formado por micropartículas de LIPs en la determinación de glucosa.

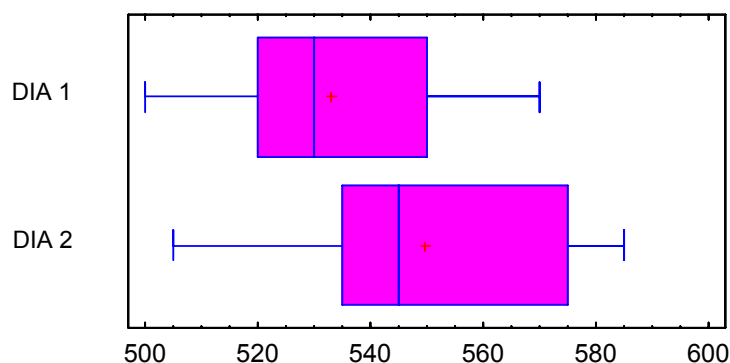


Figura 4.50.- Gráfico de cajas y bigotes

IV.3.4.5. Estabilidad

Al igual que ocurre con los microgeles de poliacrilamida, los microgeles de LIPs cuando se encuentran liofilizados mantienen la actividad enzimática de la GOx al menos durante 1 año y medio. En relación con la estabilidad del biosensor, para su estudio se sumergió el biosensor en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y se almacenó a -4°C . Periódicamente, se midió la respuesta del biosensor a una concentración de glucosa de 0,25 mM. Como se observa en la Figura 4.51, el biosensor mantiene el 90% de la señal inicial después de 342 días lo que le confiere una excelente estabilidad. Este estudio sigue en curso.

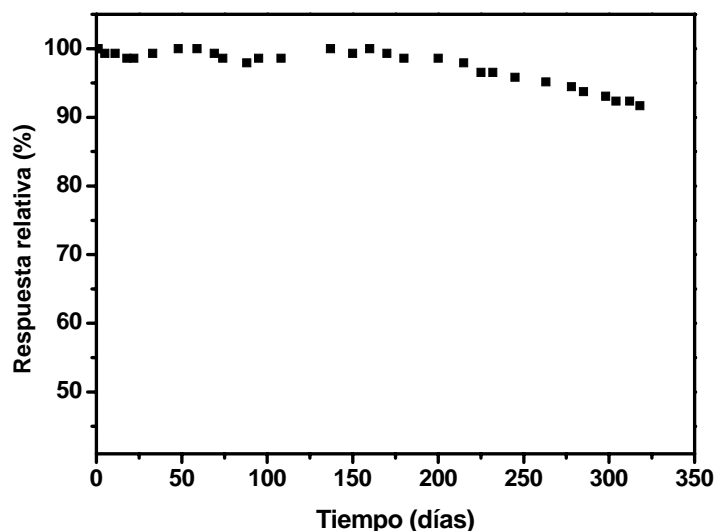


Figura 4.51.- Estabilidad del biosensor de PPO preparado con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻]

IV.3.4.6. Comparación de los biosensores formados por micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Y⁻] en medios de diferente polaridad

Con el fin de encontrar un biosensor que pueda ser utilizado tanto en medios acuosos como orgánicos, se ha estudiado el comportamiento del mismo según la composición de las micropartículas que contienen el material biológico, frente a disolventes de distinta polaridad. Las micropartículas utilizadas han sido poli[ViEtIm⁺] con diferentes aniones, Br⁻, BF₄⁻ y (CF₃SO₂)₂N⁻.

a) Medio acuoso

Para realizar este estudio se registraron las curvas de calibrado correspondientes a los biosensores formados por micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Y⁻], utilizando como disolvente una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0 (Figura 4.52). Como se observa en la Tabla 4.16, las mejores propiedades analíticas se obtuvieron con el biosensor que contenía micropartículas con anión bromuro. Como ya se ha indicado, las micropartículas de líquidos iónicos poliméricos están hinchadas o colapsadas en agua dependiendo del anión. En el caso concreto estudiado, las micropartículas con anión bromuro están hinchadas en disolución tampón mientras que las micropartículas formadas por los otros 2 aniones se colapsan en este disolvente, posible causa de la diferencia tan significativa de respuesta.

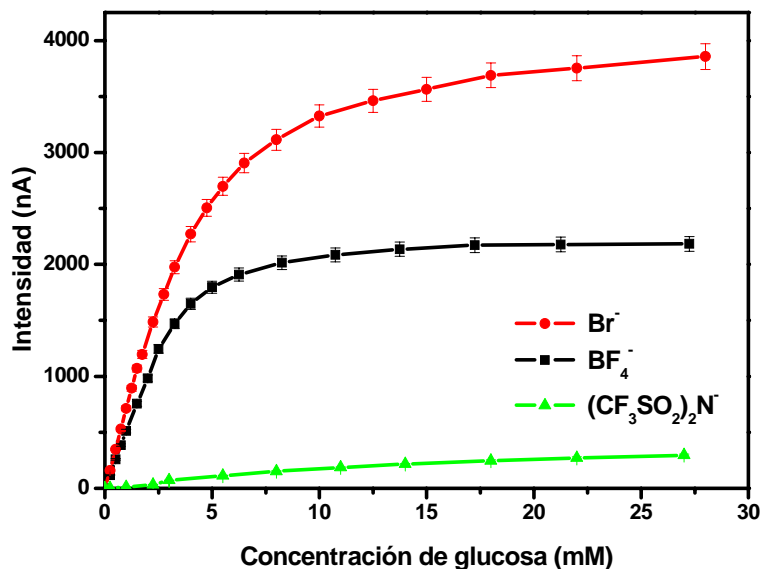


Figura 4.52.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores compuestos por micropartículas de poli [ViEtIm⁺] con diferente anión. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, +0,6V vs. ECS y 25°C.

Tabla 4.16.- Propiedades analíticas de los biosensores formados por micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Y]

Anión	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
Br ⁻	1,15	10,06	55,71	3,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻³	0,9991 (9)	3,9
BF ₄ ⁻	1,20	7,11	31,20	2,5 x 10 ⁻⁵ - 2,5 x 10 ⁻³	0,9996 (11)	12
(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻	1,20	0,29	4,59	2,5 x 10 ⁻⁴ - 8,0 x 10 ⁻³	0,9987 (6)	250

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

b) Medio no acuoso

En primer lugar se estudió la respuesta del biosensor preparado con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] en distintos disolventes. Se usaron disolventes con distinta hidrofobicidad tales como dioxano (lg P= -1,1), acetonitrilo (lg P= -0,33),

etanol ($\lg P = -0,24$), cloroformo ($\lg P = 2,00$) y hexano ($\lg P = 3,50$). En la Figura 4.53 se muestran las curvas de calibrado obtenidas con el biosensor cuando se utilizan mezclas de disolvente:disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0, todas ellas con la misma proporción de disolvente:disolución tampón (98,5:1,5; v:v) pero modificando la naturaleza del disolvente. El estudio no se pudo realizar en disolvente puro, y se tuvo que añadir una pequeña cantidad de disolución acuosa ya que es necesario para disolver el sustrato en el disolvente considerado.

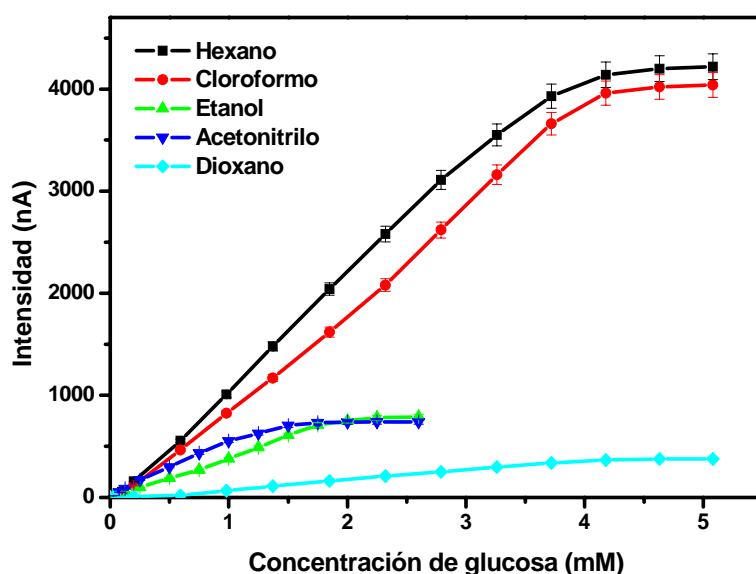


Figura 4.53.- Curvas de calibrado obtenidas con el biosensor formado por micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] utilizando como disolvente mezclas disolvente orgánico/disolución tampón de fosfato sódico pH 6,0 (98,5:1,5; v:v), +0,6V vs. ECS y 25°C.

Aunque los microgeles de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] están hinchados en etanol, mientras que en los demás disolventes se colapsan, la densidad de corriente y sensibilidad aumentó a medida que aumentaba la hidrofobicidad del disolvente, observándose una intensidad de corriente máxima con hexano (Tabla 4.17). Esto se puede deber a que los disolventes con un $\lg P < 2$, muy hidrofílicos, atrapan el agua circundante de la enzima, necesaria para su actividad, disminuyendo la respuesta del biosensor y en cambio, en los disolventes con un mayor $\lg P$ la interacción con el agua que rodea a la enzima es prácticamente despreciable. Según estos resultados el efecto de la polaridad del disolvente es mayor que el efecto del hinchamiento del microgel en estos disolventes.

El coeficiente de Hill obtenido cuando se utilizó como disolvente de trabajo mezclas disolvente orgánico/disolución tampón, siempre fue mayor que 1,2, indicando una desviación de la cinética de Michaelis Menten. El tiempo de respuesta aumentó respecto al obtenido en medio acuoso, siendo en todos los casos alrededor de 8 minutos.

Tabla 4.17.- Propiedades analíticas del biosensor formado por micropartículas de poli[ViEtlm⁺][Br⁻] utilizando diferentes mezclas disolvente orgánico-disolución tampón de fosfato sódico pH 6,0 (98,5:1,5 (v:v)) como medio de trabajo

Disolvente	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
Acetonitrilo	1,25	0,71	2,50	6,0 x 10 ⁻⁴ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9977 (7)	600
Dioxano	1,30	4,05	5,96	8,0 x 10 ⁻⁵ - 8,0 x 10 ⁻⁴	0,9972 (6)	50
Etanol	1,27	5,33	11,28	7,0 x 10 ⁻⁵ - 1,0 x 10 ⁻³	0,9963 (6)	100
Cloroformo	1.26	13,45	57,74	5,0 x 10 ⁻⁵ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9987 (8)	100
Hexano	1.23	16,22	60,26	5,0 x 10 ⁻⁵ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9996 (9)	50

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Para completar este estudio, se vio la influencia que tiene el contenido en agua del disolvente en las propiedades del biosensor, y para ello se aumentó la proporción de disolución tampón en la mezcla, utilizando acetonitrilo como disolvente orgánico (Figura 4.54). No se pudo realizar este estudio con hexano y cloroformo debido a la inmiscibilidad de estos disolventes con agua. En la Tabla 4.18 se puede observar un aumento de la densidad de corriente máxima cuando la cantidad de disolución tampón aumenta a 20%. Estos valores se mantiene prácticamente constantes al aumentar el contenido de agua al 30%, lo que indica que con 20% de disolución tampón en la mezcla se ha alcanzado la cantidad de agua necesaria para producirse la máxima actividad enzimática en estos medios. Además, se observó una disminución del tiempo de respuesta a medida que aumentaba la cantidad de disolución acuosa en la mezcla siendo de 6 min para mezclas acetonitrilo:disolución tampón 80:20.

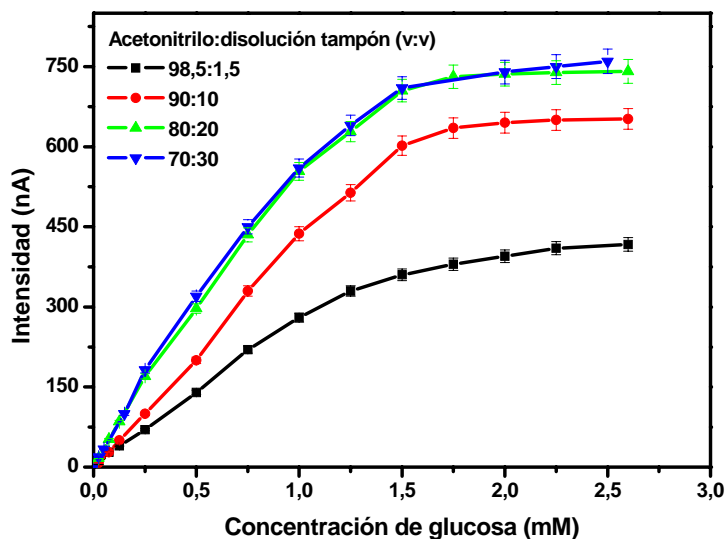


Figura 4.54.- Respuesta del biosensor formado por micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] dependiendo de la cantidad de disolución tampón de fosfato (pH 6,0) en las mezclas acetoneitrilo-disolución tampón, +0,6V vs. ECS y 25°C.

Tabla 4.18.- Propiedades analíticas del biosensor formado por micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] en función de la cantidad de disolución tampón de fosfato utilizada en la mezcla acetoneitrilo/disolución tampón

Acetoneitrilo: disolución tampón (v:v)	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
98,5:1,5	1,25	4,05	5,96	8,0 x 10 ⁻⁵ - 8,0 x 10 ⁻⁴	0,9972 (6)	50
90:10	1,23	5,76	9,31	8,0 x 10 ⁻⁵ - 5,0 x 10 ⁻⁴	0,9999 (6)	50
80:20	1,20	7,74	10,59	8,0 x 10 ⁻⁵ - 1,0 x 10 ⁻³	0,9978 (6)	20
70:30	1,17	7,89	10,71	3,0 x 10 ⁻⁵ - 1,0 x 10 ⁻³	0,9963 (7)	30

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Posteriormente, se desarrollaron biosensores con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻], poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻] y poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻] y se estudió su respuesta a glucosa utilizando mezclas disolvente:disolución tampón de fosfato sódico pH 6,0 (80:20), siendo los disolventes seleccionados acetoneitrilo, etanol y dioxano.

Con el biosensor preparado con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻], la respuesta que se obtuvo en estos disolventes fue muy pequeña (menor de 100 nA). En la Figura 4.55 se muestran las curvas de calibrado obtenidas para biosensores formados por partículas de LIPs con anión Br⁻ y BF₄⁻, en distintos disolventes. En el caso de utilizar acetonitrilo y dioxano, el biosensor que presentó una mayor intensidad de corriente fue el preparado con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻] que se atribuye a que en los disolventes estudiados, las micropartículas con anión BF₄⁻ están hinchadas. En cambio, al utilizar como disolvente etanol fue el biosensor formado con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] el que presentó mayor respuesta y mejores propiedades analíticas ya que estas micropartículas se encuentran hinchadas en este medio (Tabla 4.19). Como hipótesis ante la respuesta tan pequeña obtenida al utilizar micropartículas de poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻] pensamos que como estas micropartículas se forman por intercambio aniónico de micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con el anión (CF₃SO₂)₂N⁻, al ser el anión a intercambiar mucho más grande que el anión precursor, puede ocurrir modificación de la matriz polimérica como consecuencia de la reacción de intercambio. El tiempo de respuesta aumentó en los biosensores formados con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻] y poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻], siendo en ambos casos de 10 min aproximadamente.

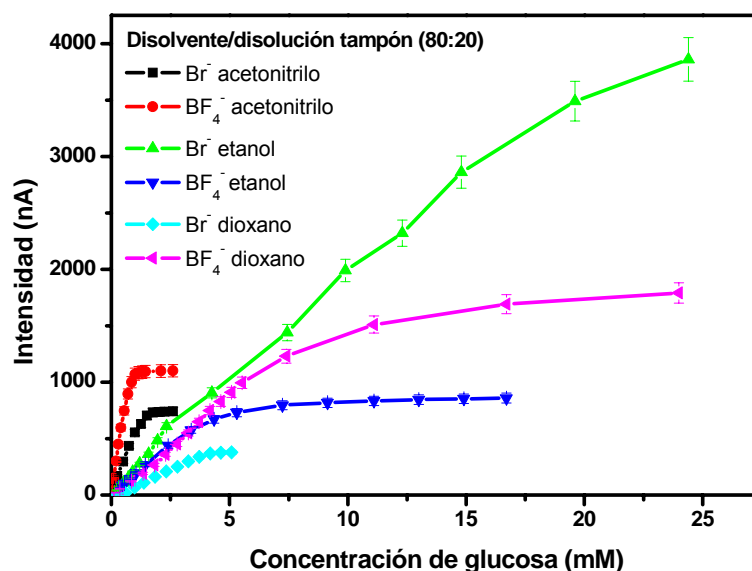


Figura 4.55.- Curvas de calibrado de los biosensores formados por micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] y poli[ViEtIm⁺][BF₄⁻], utilizando como disolvente mezclas disolvente orgánico/disolución tampón pH 6,0 (80:20 v:v), +0,6V vs. ECS y 25°C

Tabla 4.19.- Propiedades analíticas de los biosensores preparados con micropartículas de poli[ViEtlm⁺] y distintos aniones, utilizando mezclas disolvente:disolución tampón (80:20)

	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
Acetonitrilo					
Br ⁻	7,74	10,59	8,0 x 10 ⁻⁵ - 1,0 x 10 ⁻³	0,9978 (6)	20
BF ₄ ⁻	21,34	15,73	2,5 x 10 ⁻⁵ - 4,0 x 10 ⁻⁴	0,9999 (6)	6
Dioxano					
Br ⁻	1,48	5,39	6,0 x 10 ⁻⁴ - 3,3 x 10 ⁻³	0,9975 (7)	200
BF ₄ ⁻	2,54	26,00	3,6 x 10 ⁻⁴ - 3,7 x 10 ⁻³	0,9925 (8)	110
Etanol					
Br ⁻	3,37	60,00	2,7 x 10 ⁻⁵ - 1,5 x 10 ⁻³	0,9987 (10)	76
BF ₄ ⁻	2,62	12,27	6,7 x 10 ⁻⁵ - 2,4 x 10 ⁻³	0,9997 (8)	67

J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.3.4.7. Estudio de interferencias

El biosensor enzimático opera a un potencial de +0,6 V vs. ECS, para producirse la oxidación del peróxido de hidrógeno. A este potencial en muestras de sueros humanos, la presencia de especies fácilmente oxidables tales como el ácido ascórbico y el ácido úrico interfieren en la determinación de glucosa.

El Nafion es una matriz polielectrolítica cargada negativamente que, depositada en la superficie del electrodo, puede ser útil para eliminar estas interferencias ya que puede reducir, incluso impedir el acceso a la superficie electródica de sustancias cargadas negativamente, por repulsión electrostática (Zhou y col, 1997; Lim y col, 2005; Choi y col, 2005). Al utilizar una disolución de trabajo con un pH de 6,0, tanto el ácido úrico (pka 5,4) como el ácido ascórbico (pKa 4,2) presentan carga neta negativa por lo que el Nafion, que también está cargado negativamente, podría impedir el acceso de estas sustancias a la superficie del electrodo.

Con el fin de conocer la posible aplicación de este biosensor en la determinación de glucosa en sueros, se realizó un estudio de interferencias. Se ha estudiado la respuesta del biosensor enzimático de LIPs (GOx-biosensor) frente al ácido ascórbico y ácido úrico, observándose señales significativas para ambos compuestos, incluso superiores a las de la glucosa. Con el fin de eliminar estas interferencias, se depositó una capa de Nafion en la superficie del electrodo. Para ello, se depositaron 50 μL de una disolución de Nafion al 5% (p/p) sobre la superficie electródica, la película se secó al aire durante 15 minutos, y después, se sometió a 80°C durante 45 minutos. Posteriormente, las micropartículas de poli $[\text{ViEtIm}^+][\text{Br}^-]$ se colocaron sobre la película de Nafion y se mantuvieron próximas a la superficie del electrodo mediante una membrana de diálisis (GOx-Nafion-biosensor). La Figura 4.56a ilustra la intensidad de corriente producida por disoluciones de 0,25 mM de ácido ascórbico, ácido úrico y glucosa cuando se utilizó un biosensor preparado sin membrana de Nafion, obteniéndose respuesta en los tres casos. Por el contrario, cuando se utilizó el biosensor con Nafion (Figura 4.56b) no se observó respuesta al añadir ácido úrico mientras que la señal del ácido ascórbico disminuyó hasta un 96%.

Dado que los niveles normales de glucosa, ácido ascórbico y ácido úrico en sangre son en torno a 4 mM, 0,1 mM y 0,5 mM respectivamente, al determinar glucosa con el biosensor sin Nafion, en una disolución que contenga esos compuestos a esos niveles, del 100% de la respuesta obtenida, el 75,5% corresponderá a glucosa, el 4,5% a ácido ascórbico y el 20% a ácido úrico. Sin embargo, al añadir la capa de Nafion al biosensor, del 100% de la respuesta obtenida, un 99,2% corresponderá a glucosa y sólo un 0,8% al ácido ascórbico, desapareciendo totalmente la señal del ácido úrico. Por tanto, y aunque la membrana de Nafion también reduce la respuesta del biosensor a la glucosa, resulta útil para eliminar las señales de estas especies interferentes. Según estos resultados, consideramos que la incorporación de una película de Nafion al biosensor, permitirá su uso en la determinación de glucosa en sueros.

La pequeña señal de ácido ascórbico que aparece aún cuando se ha aplicado la capa de Nafion, se podría deber a la carga positiva del polímero, que reducirá el efecto de repulsión que se produce entre el Nafion y las especies interferentes.

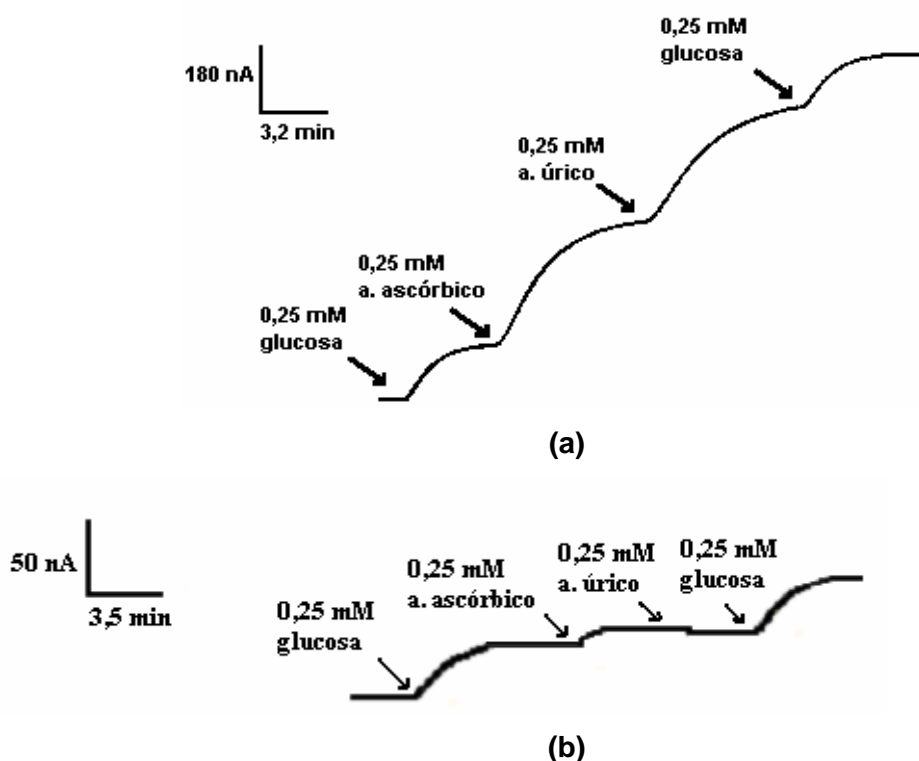


Figura 4.56.- Respuesta del biosensor (a) sin capa de Nafion y (b) con película de Nafion a 0,25 mM de glucosa, ácido ascórbico y ácido úrico.

IV.3.4.8. Determinación de glucosa en sueros sanguíneos

Para comprobar la utilidad de estos biosensores, se tomaron 5 muestras de sueros y se determinó la concentración de glucosa mediante los biosensores propuestos: GOx-biosensor y GOx-Nafion-biosensor. Como método de referencia para la determinación de glucosa de estos sueros se utilizó el método espectrofotométrico de hexoquinasa descrito por Young (Young, 1990). En la Tabla 4.20 se exponen los resultados obtenidos.

Los valores de glucosa encontrados en los sueros con el biosensor preparado sin película de Nafion fueron siempre mayores que los obtenidos con el método de referencia con diferencias entre 3,5-13,0%, lo que parece indicar que las muestras de suero contienen sustancias que interfieren en la medida electroquímica. Por el contrario, las medidas de glucosa en suero obtenidas con el biosensor que incluye la capa de Nafion fueron similares a las obtenidas con el método espectrofotométrico, las diferencias entre ellos nunca fueron mayores del 3,8% y en ambos sentidos, dando errores positivos y negativos, lo que confirma que la película de Nafion reduce

considerablemente las interferencias causadas por estos compuestos, obteniéndose un biosensor más selectivo a glucosa y con una buena precisión ($CV \leq 2,7\%$).

Tabla 4.20.- Resultado de las medidas de glucosa en sueros utilizando un método espectrofotométrico de referencia y los biosensores propuestos

Muestra	Método de referencia	GOx-BIOSENSOR			GOx-Nafion BIOSENSOR		
	Glucosa (mg/dL)	Glucosa ^a (mg/dL)	CV (%)	Error relativo ^b (%)	Glucosa ^a (mg/dL)	CV (%)	Error relativo ^b (%)
1	84,0	89,6±1,7	1,9	+6,6	80,8±1,0	1,2	-3,8
2	80,0	82,8±2,1	2,5	+3,5	78,9±2,2	2,7	-1,3
3	76,0	80,5±0,2	0,2	+5,9	76,1±0,7	0,9	-0,1
4	86,0	97,2±1,1	1,1	+13,0	85,4±2,2	2,6	-0,4
5	89,0	98,1±1,2	1,2	+10,1	90,1±1,0	1,1	+1,2

^a Media de 3 medidas

^b Desviación entre los resultados del método de referencia y del biosensor

Tabla 4.21.- Resultados de recuperación de los biosensores propuestos

Muestra	GOx-BIOSENSOR			GOx-Nafion BIOSENSOR	
	Glucosa añadida (mg/dL)	Glucosa encontrada ^a (mg/dL)	Recuperación (%)	Glucosa encontrada ^a (mg/dL)	Recuperación (%)
1	72,0	72,2±0,8	100,2	71,1±1,2	98,7
2	72,0	71,2±1,3	98,9	73,1±1,9	101,4
3	72,0	70,5±1,5	97,9	70,9±2,1	98,4
4	72,0	67,9±4,7	94,3	76,0±2,3	105,5
5	72,0	71,5±1,7	99,3	70,5±1,8	97,9

^a Media de 3 medidas

Además se realizó un estudio de la recuperación, utilizando una mezcla con los 5 sueros utilizados anteriormente. De esa mezcla se tomaron 5 muestras de 2mL cada

una. Con 1 mL de este suero, se midió la corriente generada por el biosensor, y se calculó la concentración de glucosa extrapolando en la curva de calibrado de fenol. Al mililitro de suero restante se le adicionaron 72 mg/dL de glucosa calculando de nuevo la concentración de glucosa. La diferencia entre las concentraciones de glucosa obtenidas entre la segunda y la primera medida deberá ser igual a la concentración de glucosa añadida. La recuperación obtenida con el biosensor con capa de Nafion se mantiene entre 97,9 y 105,5% (Tabla 4.21). Los resultados obtenidos con este biosensor demuestran que es un método analítico exacto y preciso para la determinación de glucosa.

A pesar de la existencia de especies interferentes en el caso de utilizar el biosensor sin película de Nafion, recuperación obtenida se mantuvo entre 94,3 y 100,2%, lo que confirma que estas especies generan una señal en el transductor, pero no interaccionan con el analito, es decir, aunque la señal registrada no puede relacionarse con la concentración de glucosa, la señal generada por la glucosa no se ve afectada por la presencia de estas especies.

IV.3.5. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO CON MICROGELES DE LIPs PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Una vez comprobado que este sistema polimérico es adecuado para la inmovilización de GOx, se procedió al atrapamiento de PPO en estas micropartículas con el objetivo de diseñar un biosensor para compuestos fenólicos. Al igual que para el biosensor de glucosa, se estudiaron en primer lugar las variables experimentales que afectan al sistema de inmovilización enzimática (pH de síntesis y grado de reticulación) y posteriormente las variables analíticas que afectan a la respuesta del biosensor (pH, temperatura y carga enzimática).

IV.3.5.1. pH de síntesis

Para estudiar la influencia del pH de síntesis en la respuesta del biosensor, se sintetizaron micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] (4,0%) con tirosinasa (2.500 UI por mililitro de fase acuosa) y distintos pHs de fase acuosa de la emulsión precursora (4,0-7,0), se prepararon los biosensores correspondientes y se realizaron las curvas de calibrado (Figura 4.57). Las medidas se realizaron a -0,1V vs. ECS y 20°C, en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 sobre la que se realizaron adiciones sucesivas de catecol, hasta alcanzar la saturación enzimática.

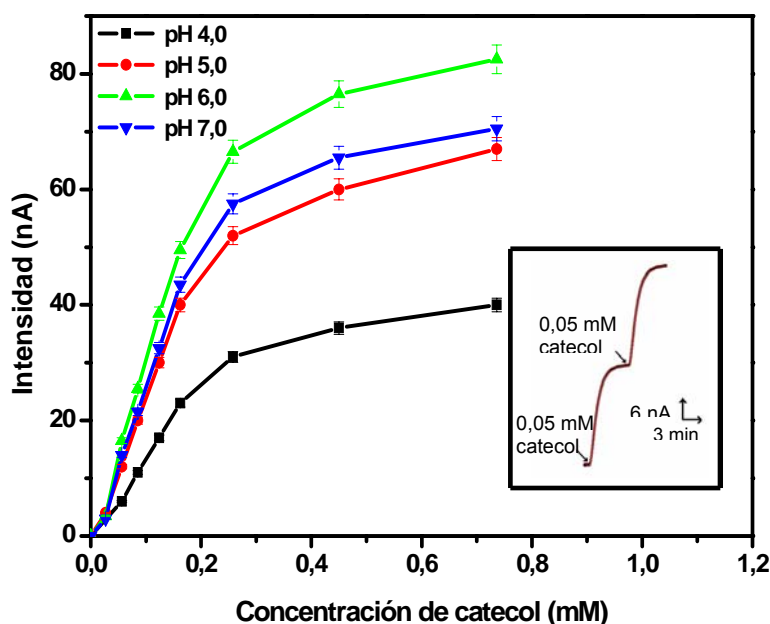


Figura 4.57.- Influencia del pH de la fase acuosa de la emulsión precursora de las micropartículas, en la respuesta del biosensor. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, 20°C y -0,1V vs. ECS

Tabla 4.22.- Propiedades analíticas de los biosensores preparados con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] en función del pH de síntesis

pH de síntesis	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
4,0	1,16	2,29	0,64	6,0 x 10 ⁻⁵ - 1,6 x 10 ⁻⁴	0,9996 (4)	60,0
5,0	1,15	3,78	1,01	5,6 x 10 ⁻⁵ -1,6 x 10 ⁻⁴	0,9999 (5)	50,0
6,0	1,16	4,51	1,21	5,6 x 10 ⁻⁵ -1,6 x 10 ⁻⁴	0,9990 (5)	27,0
7,0	1,17	4,01	1,04	5,6 x 10 ⁻⁵ -1,6 x 10 ⁻⁴	0,9995 (5)	35,0

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Se observó una mejora de las propiedades analíticas al utilizar un pH de síntesis de 6,0 (Tabla 4.22). Teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico de la tirosinasa es 4,7 (Robb y Gutteridge, 1981) y que el polímero presenta carga positiva a todos los pHs de estudio, a pH 4,0 la enzima tiene carga neta positiva, por lo que existen fuerzas de repulsión entre el polímero y la enzima, produciéndose pérdida de enzima en la síntesis de las micropartículas, ya que aparece actividad enzimática en el líquido sobrenadante. A los demás pHs, la enzima está cargada negativamente, existiendo fuerzas de atracción entre la tirosinasa y el polímero, siendo estas fuerzas mayores a medida que aumenta el pH. Esto podría traer consigo una mayor dificultad de contacto entre los centros activos de la enzima y el sustrato cuando el pH aumenta, pero el pH óptimo es 6,0 correspondiente con el de máxima actividad y estabilidad enzimática. Hay que tener en cuenta que en el caso de inmovilizar la glucosa oxidasa en micropartículas de LIPs, el pH óptimo de síntesis era 4,0, ya que a ese pH no existían fuerzas electrostáticas entre la enzima y el polímero, y cuando se producían fuerzas de atracción entre ambos la intensidad de corriente disminuía (pH 5,0 y 6,0), aunque el pH de máxima actividad enzimática para GOx también es 6,0. Esta diferencia en el pH de síntesis al inmovilizar GOx o PPO en micropartículas de LIPs se puede deber a que el efecto del pH en la actividad enzimática de la PPO es mucho más acentuado que en la GOx. El perfil de la curva de intensidad frente a tiempo al añadir 0,05 mM de catecol se observa en el recuadro de la Figura 4.57, siendo el tiempo de respuesta alrededor de 4 min. Las constantes cinéticas de la reacción enzimática no se pudieron calcular ya que los coeficientes de Hill obtenidos en todos los casos fueron iguales o mayores a 1,5.

IV.3.5.2. Grado de reticulación

Se realizaron síntesis de micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] con PPO (2.500UI/mL de fase acuosa) y diferentes grados de reticulación entre 3,2 y 5,0%, manteniendo constante la concentración de monómero (1,23 M) y se utilizaron como componente biológico en el diseño de biosensores (Figura 4.58). Las curvas de calibrado para cada biosensor se obtuvieron a 20°C y -0,1 V vs. ECS, por las adiciones sucesivas de catecol a 10 mL de una disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0, hasta llegar a la concentración de saturación enzimática. Las propiedades analíticas mejoraron al utilizar un entrecruzamiento de 4,0% tal y como se observa en la Tabla 4.23, aunque la respuesta del biosensor fue mucho menor que la obtenida al utilizar micropartículas de PAA. Si se compara el grado de reticulación óptimo (3,2%) cuando se utilizan las micropartículas poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con glucosa oxidasa cuyo peso molecular es 160.000 D, con el grado de reticulación óptimo (4,0%) cuando se inmoviliza tirosinasa con peso molecular de 128.000 D, podemos observar que el grado de reticulación depende del peso molecular de la enzima. A medida que aumenta el peso molecular de la enzima se necesita un grado de reticulación menor, o lo que es lo mismo, el tamaño de poro óptimo se hace más grande. Esto se ha estudiado para el polímero poli(acrilamida) inmovilizando enzimas con distintos pesos moleculares teniendo como resultado que en la inmovilización de la glucosa oxidasa el grado de reticulación óptimo fue 3,2% (Rubio Retama y col., 2005), para tirosinasa 4,0% (Hervás Pérez y col., 2006), para galactosa oxidasa 6,5% (Hervás Pérez y col., 2006) y colina oxidasa 7,0% (Sánchez-Paniagua y col., 2007).

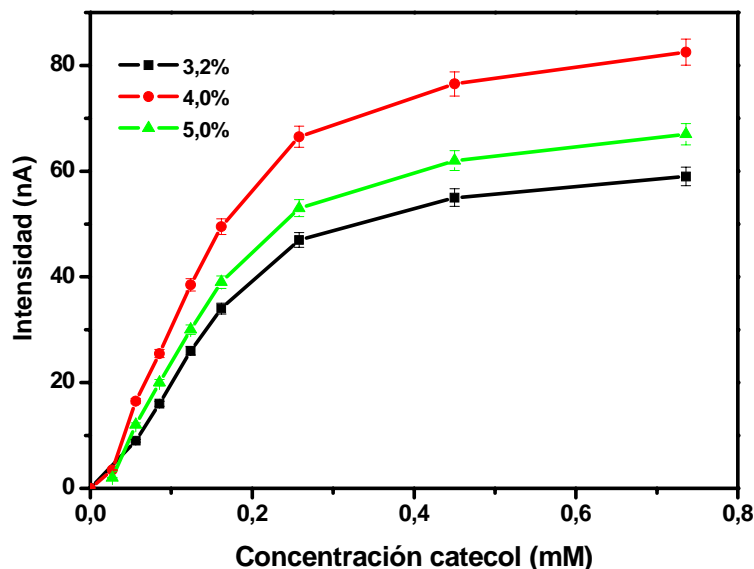


Figura 4.58.- Influencia de la proporción de agente entrecruzante en la respuesta del biosensor. Condiciones experimentales como en la Figura 4.57. Recuadro: Perfil intensidad-tiempo obtenido con el biosensor de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con PPO

Tabla 4.23.- Propiedades analíticas de los biosensores preparados con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] dependiendo del grado de reticulación

Grado de reticulación (%)	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
3,2	1,15	3,42	0,86	5,6 x 10 ⁻⁵ - 1,6 x 10 ⁻⁴	0,9981 (5)	56,0
4,0	1,16	4,51	1,21	5,6 x 10 ⁻⁵ - 1,6 x 10 ⁻⁴	0,9990 (5)	27,0
5,0	1,20	3,66	1,00	5,6 x 10 ⁻⁵ - 1,0 x 10 ⁻⁴	0,9989 (4)	35,0

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.3.5.3. pH y Temperatura

Se estudió la influencia del pH y la temperatura en la respuesta del biosensor, utilizando micropartículas poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con PPO y registrando la corriente generada por la adición de 0,7 mM de catecol a 10 mL de una disolución tampón a un potencial de -0,1V vs. ECS. En el caso del estudio del pH se mantuvo la temperatura constante a 20°C y se varió el pH de una disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M

fosfato sódico entre 4,0-8,0, observándose una respuesta máxima a un pH de 6,5. Para estudiar la influencia de la temperatura, se utilizó siempre una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5 y se varió la temperatura entre 0°C-60°C, obteniéndose el máximo a un valor de 30°C.

El estudio de estabilidad térmica enzimática, se realizó añadiendo 0,7 mM de catecol a la disolución tampón y manteniendo el biosensor durante una hora a un potencial constante de -0,1V vs. ECS. A temperaturas iguales o superiores a 30°C se observó un descenso de corriente con el tiempo, y a 25°C se mantuvo siempre al mismo nivel, no produciéndose desnaturalización de la PPO, utilizándose esta temperatura para experiencias posteriores.

IV.3.5.4. Carga enzimática

Para intentar aumentar las propiedades analíticas del dispositivo, se varió la carga enzimática aumentando la concentración de enzima inmovilizada en las micropartículas. En la Figura 4.59 se representan las curvas de calibrado obtenidas con los biosensores formados por micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con 2.500, 3.333 y 5.000 UI de PPO por mililitro de fase acuosa de la emulsión precursora, trabajando a pH 6,5 y 25°C. Los resultados mejoraron al aumentar la carga enzimática (Tabla 4.24), obteniéndose una sensibilidad con la máxima carga enzimática de 15,67 mA M⁻¹ cm⁻², pero aún así no son comparables con los obtenidos al utilizar poliacrilamida (sensibilidad 203,23 mA M⁻¹ cm⁻²) como sistema de inmovilización de PPO.

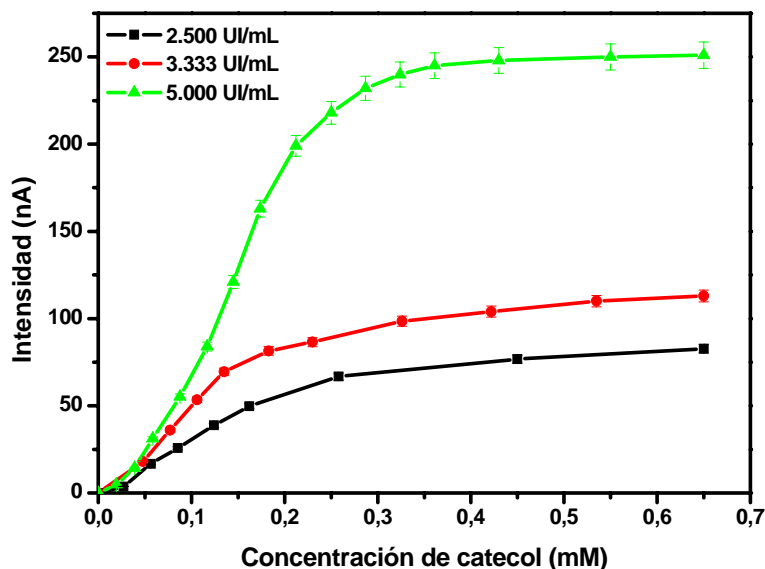


Figura 4.59.- Influencia de la carga enzimática en la respuesta del biosensor formado por micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻]. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5, 25°C y -0,1V vs. ECS.

Tabla 4.24.- Propiedades analíticas de los biosensores preparados con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] dependiendo de la cantidad de enzima en la síntesis

Concentración de enzima en las micropartículas	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
2.500 UI/mL	1,16	4,81	1,18	5,0 x 10 ⁻⁵ - 1,6 x 10 ⁻⁴	0,9944 (5)	50,0
3.333 UI/mL	1,16	8,46	1,49	4,8 x 10 ⁻⁵ - 1,3 x 10 ⁻⁴	0,9994 (5)	30,0
5.000 UI/mL	1,20	15,67	3,59	3,9 x 10 ⁻⁵ - 2,1 x 10 ⁻⁴	0,9989 (5)	30,0

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.3.5.5. Comparación de los biosensores formados por micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Y⁻] en medios de diferente polaridad

a) Medio acuoso

Se procedió a la síntesis de micropartículas de poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻] y poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻] mediante una reacción de intercambio aniónico a partir de las micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con PPO. Las respuestas de los biosensores preparados con estas micropartículas para la determinación de catecol en disolución acuosa fueron menores que las obtenidas utilizando microgeles con anión bromuro, como se observa en la Figura 4.60.

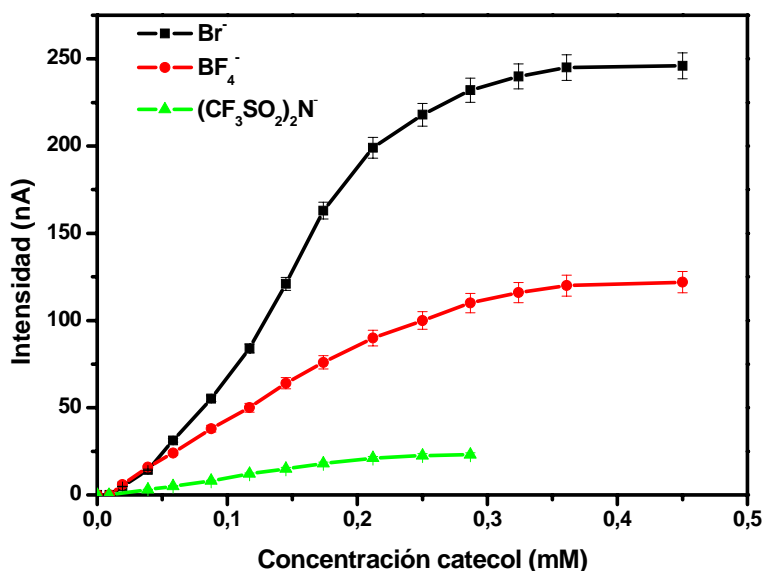


Figura 4.60.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores compuestos por micropartículas de poli [ViEtIm⁺] con diferente anión. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5, -0,1V vs. ECS y 25°C

b) Medio no acuoso

Los biosensores formados por micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Y⁻] con PPO se intentaron utilizar para la determinación de catecol en distintas mezclas disolvente orgánico/disolución tampón (98,5:1,5) no observándose respuesta en ningún caso ni para ningún disolvente (etanol, dioxano, acetonitrilo, cloroformo y hexano). Se aumentó la cantidad de disolución tampón utilizada en la mezcla y se realizó la curva de calibrado al trabajar en mezclas acetonitrilo:disolución tampón 80:20 obteniéndose

una intensidad de corriente máxima de 60 nA con el biosensor formado por micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻], con un tiempo de respuesta de 8 min.

IV.3.5.6. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas

Dado los resultados obtenidos con este estudio, lo damos por terminado ya que consideramos que no es viable un dispositivo analítico con esta respuesta, como lo corrobora la curva de calibrado obtenida en condiciones óptimas (biosensor formado por micropartículas poli [ViEtIm⁺][Br⁻] con 5.000 UI de PPO por mililitro de fase acuosa y grado de reticulación 4,0%, pH 6,5, 25°C y -0,1V vs. ECS) (Figura 4.61). La sensibilidad fue de 17,94 mA M⁻¹ cm⁻² con una densidad de corriente máxima de 4,34 μA cm⁻², intervalo lineal 3,9 x 10⁻⁵ - 2,0 x 10⁻⁴ M y límite de detección 20 μM.

Para realizar la síntesis de micropartículas poli [ViEtIm⁺][Br⁻] se preparan 2 fases: fase oleosa y fase acuosa. En la fase acuosa se disuelve el monómero [ViEtIm⁺][Br⁻] junto con la enzima. En el caso de GOx los resultados obtenidos utilizando este sistema de inmovilización han sido buenos, en cambio con PPO la respuesta es muy pequeña. Estos resultados los atribuimos a que en la fase acuosa se encuentran el bromuro del líquido iónico junto con el cobre del centro activo de la enzima, pudiéndose producir interacciones entre ambos elementos que hacen que la enzima pierda su actividad enzimática. En el caso de los biosensores preparados con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][BF₄⁻] y poli [ViEtIm⁺][(CF₃SO₂)₂N⁻], la respuesta también es muy pequeña ya que estas micropartículas se forman a partir de las precursoras de bromuro.

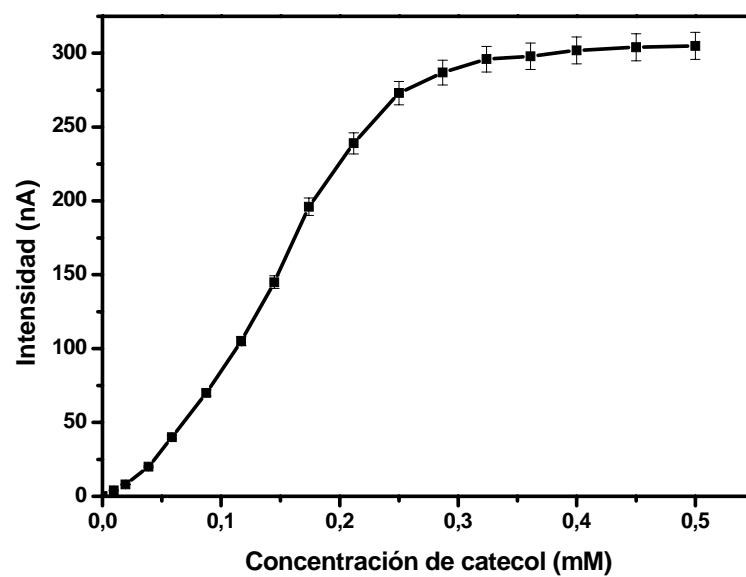


Figura 4.61.- Curva de calibrado obtenida con el biosensor de catecol con micropartículas de poli [ViEtIm⁺][Br⁻] trabajando en condiciones experimentales óptimas

IV.4. Biosensor amperométrico enzimático fabricado con microgeles de poli (vinilimidazol)

IV.4.1. POLÍMERO DE VINILIMIDAZOL

Como se ha visto en el capítulo anterior, el sistema de inmovilización basado en micropartículas de poli bromuro (1-vinil-3-etil imidazol) es adecuado para la inmovilización de glucosa oxidasa, sin embargo, al inmovilizar PPO con el objetivo de conseguir un dispositivo de medida de catecol, el biosensor resultante dio una respuesta débil y las propiedades analíticas fueron peores que las obtenidas con el biosensor de PAA.

Se procedió al estudio de un nuevo monómero, vinilimidazol (Figura 4.62) con la misma estructura que el monómero de LI pero sin tener el anión bromuro, ya que la débil respuesta obtenida al inmovilizar PPO en LIPs nos hizo pensar en la posible interacción entre el bromuro utilizado en la síntesis del LI y el cobre de la PPO. El poli (vinilimidazol) forma hidrogeles sensibles al pH (Molina y col., 2004; Pacios y Pierola., 2006) presentando estructura neutra o carga positiva dependiendo del pH.

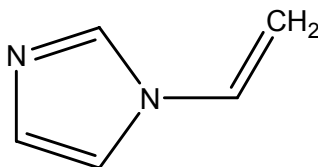


Figura 4.62.- Estructura del monómero vinilimidazol

En primer lugar se procedió a la síntesis de micropartículas de poli (vinilimidazol) en las que se llevó a cabo la inmovilización de las enzimas glucosa oxidasa y tirosinasa. A continuación se caracterizaron las micropartículas y finalmente se utilizaron en el diseño de biosensores amperométricos para la determinación de glucosa y fenoles respectivamente.

IV.4.2. SÍNTESIS DE MICROGELES DE POLI (VINILIMIDAZOL)

Como en los casos anteriores, se realizó la síntesis de micropartículas de poli (vinilimidazol), utilizando el método de polimerización en emulsión concentrada, variando el grado de reticulación entre 2,0 a 5,0%, dependiendo de la enzima inmovilizada. El estudio se comenzó inmovilizando glucosa oxidasa en las micropartículas, inmovilizando en las micropartículas una concentración de GOx de 425UI/mL de fase acuosa.

Posteriormente, se sintetizaron micropartículas de poli (vinilimidazol) con tirosinasa (2.500UI/mL de fase acuosa) y se realizó un estudio de la eficacia catalítica de la enzima inmovilizada, obteniéndose una eficacia del 65%.

IV.4.3. CARACTERIZACIÓN DE MICROGELES DE POLI (VINILIMIDAZOL)

La caracterización de las micropartículas con glucosa oxidasa y tirosinasa se llevó a cabo mediante microscopia electrónica de barrido y analizador de partículas (Figuras 4.63 y 4.64). Las micropartículas obtenidas presentaron una gran dispersión de tamaños, teniendo micropartículas entre 2-16 μm , con un tamaño medio de 3,5 μm en ambos casos, tamaño muy parecido al obtenido con micropartículas de poli (vinilimidazol) sin enzima.

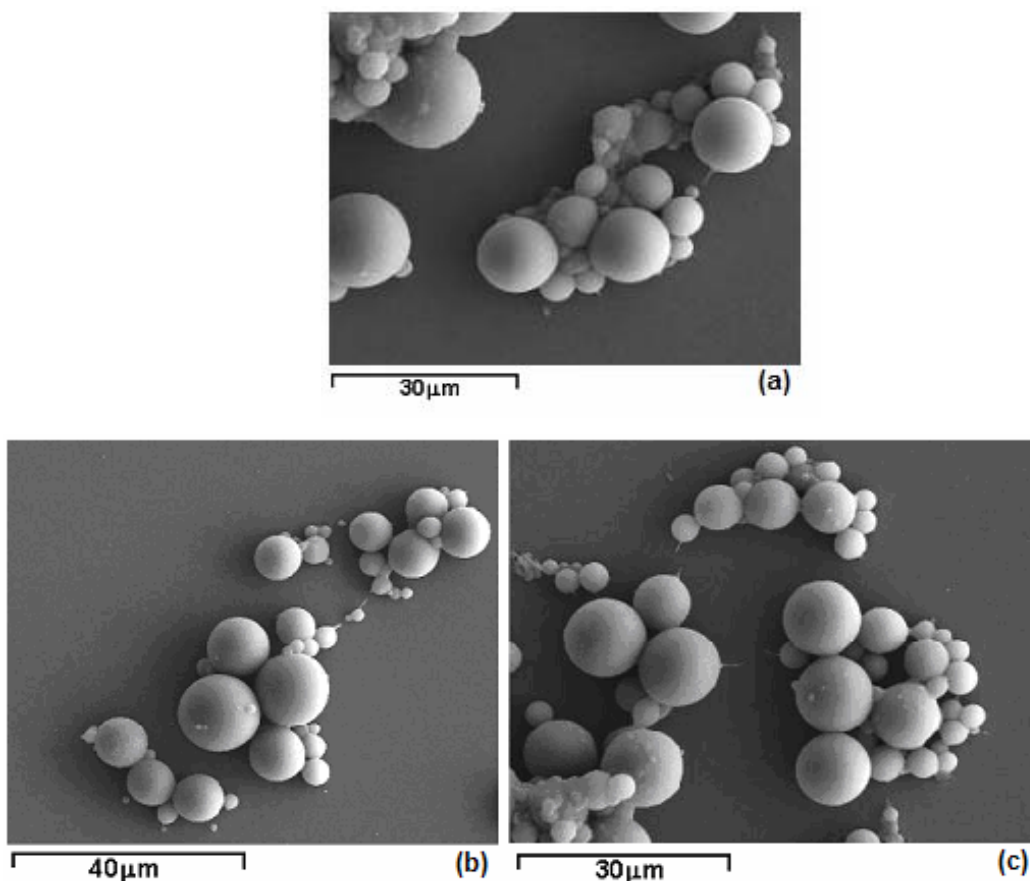


Figura 4.63.- Micrografías de micropartículas de poli (vinilimidazol) (a) vacías, (b) con glucosa oxidasa y (c) con tirosinasa

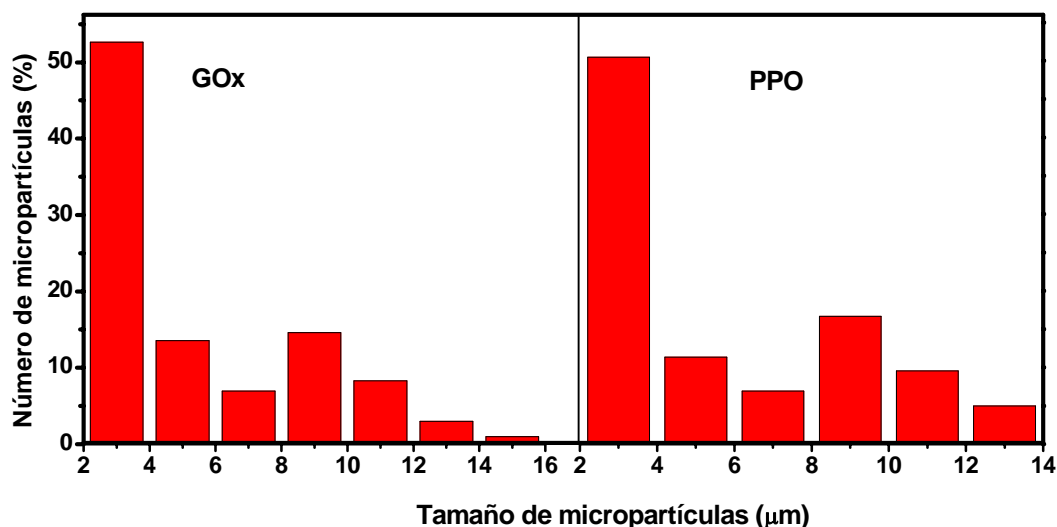


Figura 4.64.- Distribución de tamaños de micropartículas de poli (vinilimidazol) con glucosa oxidasa y tirosinasa dispersas en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0

IV.4.4. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO CON MICROGELES DE POLI (VINILIMIDAZOL) PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Las micropartículas de poli (vinilimidazol) con GOx se utilizaron como componente biológico en el diseño de un biosensor de glucosa. En primer lugar se llevó a cabo el estudio y optimización de los factores que influyen en el sistema de inmovilización enzimático (pH de síntesis, concentración de monómero y grado de reticulación) y posteriormente se estudiaron los factores que afectan directamente a la medida realizada por el biosensor (potencial, pH, temperatura y carga enzimática).

IV.4.4.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático

IV.4.4.1.1. pH de síntesis

Se estudió la respuesta del biosensor en función del pH de la fase acuosa utilizada en la emulsión. Se sintetizaron micropartículas de poli (vinilimidazol) variando el pH de síntesis entre 4,0 y 7,0, se prepararon biosensores con las distintas micropartículas y se obtuvieron las correspondientes curvas de calibrado que se muestran en la Figura 4.65. Las medidas se realizaron a +0,6V vs. ECS y 25°C, en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 sobre la que se realizaron adiciones sucesivas de glucosa. En la Tabla 4.25 se reflejan las propiedades analíticas obtenidas para los distintos biosensores según el pH de síntesis de las micropartículas. La máxima actividad se observó con las

micropartículas sintetizadas a pH 6,0, aunque el intervalo lineal y límite de detección prácticamente fue el mismo para todos los biosensores.

Este polímero presenta la misma estructura que el poli[ViEtIm⁻][Br⁺] pero a diferencia de éste, puede presentar carga positiva o carga neta nula dependiendo del pH. El poli (vinilimidazol) presenta un pKa de aproximadamente 5 (Molina y col., 2004) por lo que a pH 4,0 tendrá carga positiva y a valores de pHs iguales o superiores a 5,0 no presentará carga. Cuando se inmoviliza la glucosa oxidasa en micropartículas de LI el pH de síntesis óptimo fue 4,0 ya que a ese pH no existen fuerzas de repulsión/atracción entre el polímero y la enzima ya que aunque el polímero presenta a todos los pHs de trabajo carga positiva, a ese pH la carga neta de la glucosa oxidasa es prácticamente nula (su punto isoeléctrico es 4,2). Al utilizar micropartículas de poli (vinilimidazol) no existen fuerzas electrostáticas entre la enzima y el polímero a ningún pH, ya que el polímero sólo presenta carga a pH 4,0 y la glucosa oxidasa a ese pH presenta carga neta nula. Así, el pH óptimo de síntesis para la inmovilización de GOx en micropartículas de poli (vinilimidazol) es 6,0, correspondiente al pH de máxima actividad y estabilidad enzimática. Además, si comparamos el tiempo de respuesta del biosensor preparado con el polímero sin carga (poli (vinilimidazol)) y el preparado con el polímero cargado (poli[ViEtIm⁺][Br⁻]), observamos un considerable descenso en el caso del polímero sin carga, obteniéndose un tiempo de 90 segundos, tal y cómo se muestra en el recuadro de la Figura 4.65. No se pudieron calcular las constantes cinéticas de la reacción enzimática debido a que los coeficientes de Hill para todos los biosensor fueron mayores a 1,3, que parecen indicar que al igual que ocurría con los biosensores anteriores formados por micropartículas poliméricas, de todos los procesos que intervienen en la medida del biosensor, el proceso limitante es la difusión de sustrato/producto a través de la película polimérica.

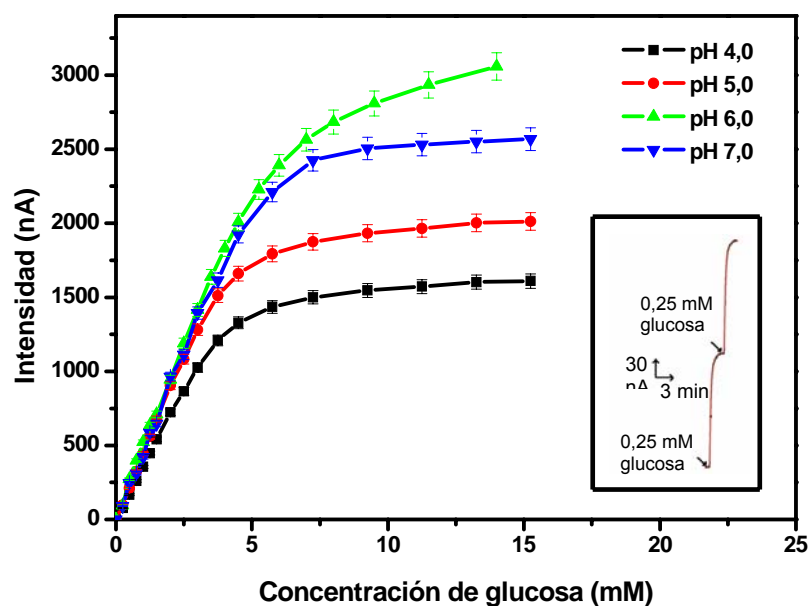


Figura 4.65.- Curvas de calibrado de los biosensores preparados con micropartículas de poli (vinilimidazol) sintetizadas con diferentes pHs de fase acuosa. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, +0,6V vs. ECS y 25°C. Recuadro: Perfil intensidad-tiempo obtenido con el biosensor de poli (vinilimidazol) con GOx

Tabla 4.25.- Propiedades analíticas de biosensores de glucosa oxidasa dependiendo del pH de la fase acuosa utilizada en la síntesis de micropartículas de poli (vinilimidazol)

pH de síntesis	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
4,0	1,40	5,29	23,00	5,0 x 10 ⁻⁵ - 5,0 x 10 ⁻³	0,9999 (7)	50,0
5,0	1,70	6,61	28,74	5,0 x 10 ⁻⁵ - 5,0 x 10 ⁻³	0,9999 (6)	20,0
6,0	1,60	8,39	43,86	2,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻³	0,9996 (15)	20,0
7,0	1,70	6,61	36,69	2,0 x 10 ⁻⁵ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9987 (5)	20,0

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.4.4.1.2. Concentración de monómero

Se sintetizaron micropartículas de poli (vinilimidazol) con glucosa oxidasa, grado de reticulación de 3,2% y pH de síntesis 6,0 variando la concentración de monómero de 0,90 a 1,80 M. Con estas micropartículas se prepararon distintos biosensores y se comparó su respuesta, a 25°C, pH 6,0 y a un potencial de +0,6V vs. ECS. En la Figura 4.66 se representan las curvas de calibrado correspondientes para

cada concentración de monómero. La máxima corriente se obtuvo con el biosensor formado por micropartículas cuya concentración de monómero fue 1,23 M (Tabla 4.26). Al disminuir la cantidad de monómero se produjo un descenso en la intensidad de corriente y sensibilidad debido a pérdida de enzima en la síntesis, aunque no se observó ningún cambio en el intervalo lineal y límite de detección. El descenso de intensidad de corriente observado a altas concentraciones de monómero, se atribuye a la existencia de una mayor barrera difusional que dificulta el movimiento de sustrato y producto de la reacción enzimática a través de la capa de biomaterial.

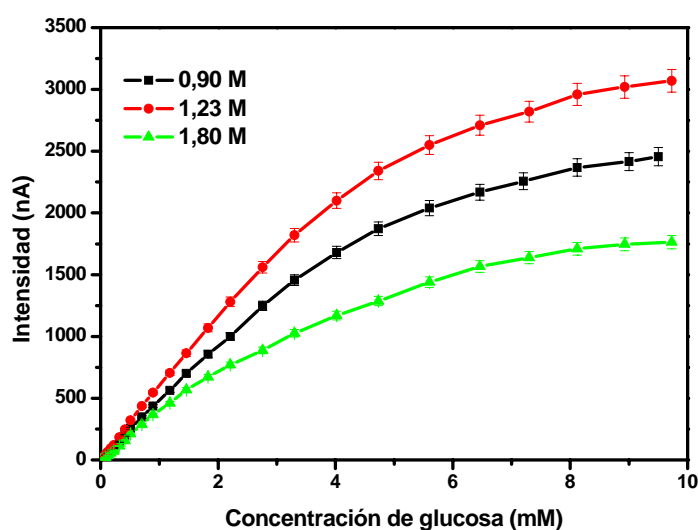


Figura 4.66.- Influencia de la concentración de monómero utilizada para la síntesis de micropartículas de poli (vinilimidazol) en la respuesta del biosensor. Grado de reticulación de 3,2%. Condiciones experimentales como en la Figura 4.65

Tabla 4.26.- Propiedades analíticas de los biosensores de glucosa oxidasa con distinta concentración de monómero utilizada en la síntesis de micropartículas de poli (vinilimidazol)

Concentración de monómero (M)	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
0,90	1,30	6,71	35,09	$2,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$	0,9992 (14)	20,0
1,32	1,60	8,39	43,86	$2,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$	0,9996 (15)	20,0
1,80	1,90	6,15	25,20	$4,0 \times 10^{-5} - 9,0 \times 10^{-4}$	0,9979 (11)	40,0

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.4.4.1.3. Grado de reticulación

Se sintetizaron micropartículas de poli (vinilimidazol) con diferentes grados de reticulación (de 2,0% a 4,0%), manteniendo la concentración de monómero constante (1,23 M), se prepararon distintos biosensores y se realizaron las correspondientes curvas de calibrado (Figura 4.67). Las medidas se obtuvieron a un potencial de +0,6 V vs. ECS y 25°C, en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 sobre la que se realizaron adiciones sucesivas de glucosa. La máxima respuesta se obtuvo con el biosensor formado con micropartículas con grado de reticulación 3,2%, además presentó el mayor intervalo de linealidad y el límite de detección más bajo (Tabla 4.27). El grado de reticulación óptimo en el atrapamiento de la glucosa oxidasa en micropartículas poliméricas fue siempre de 3,2% independientemente del monómero utilizado, acrilamida (Rubio Retama y col., 2005), bromuro de 1-vinil-3-etilimidazol o vinilimidazol. Esto apoya la hipótesis de que el factor determinante para el grado óptimo es la molécula inmovilizada y no el monómero utilizado.

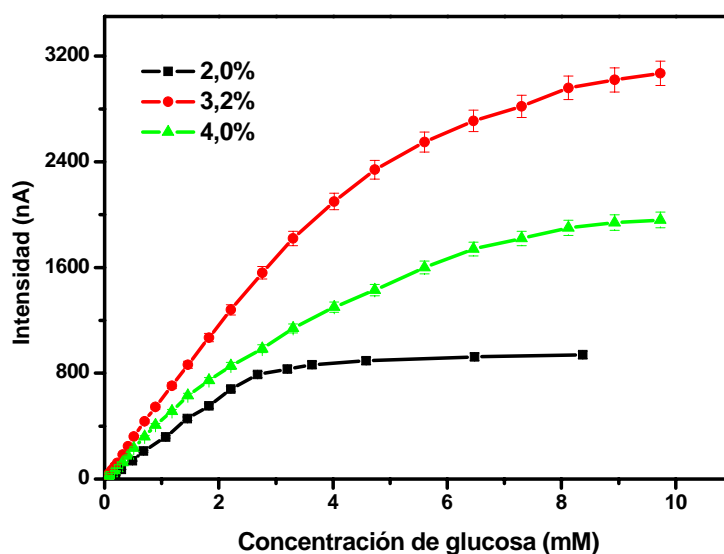


Figura 4.67.- Influencia de la proporción de agente entrecruzante en la respuesta del biosensor. Condiciones experimentales como en la Figura 4.65

Tabla 4.27.- Estudio de las propiedades analíticas dependiendo del grado de reticulación de las micropartículas de poli (vinilimidazol)

Grado de reticulación (%)	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
2,0	1,40	4,62	13,41	$3,0 \times 10^{-4} - 3,0 \times 10^{-3}$	0,9989 (8)	50,0
3,2	1,60	8,39	43,86	$2,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$	0,9990 (15)	20,0
4,0	2,10	6,41	28,00	$4,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$	0,9975 (12)	40,0

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Como se ha hecho referencia en capítulos anteriores, las micropartículas preparadas con baja concentración de agente entrecruzante presentan un tamaño de poro demasiado grande para retener a la enzima eficientemente, como muestra la existencia de actividad enzimática en el líquido sobrenadante. El descenso en la respuesta cuando el grado de reticulación es mayor de 3,2% se debería a que el tamaño de poro es tan pequeño que además de ralentizar el acceso del sustrato a la micropartícula podría dificultar el contacto entre el sustrato y los centros activos de la enzima.

IV.4.4.2. Optimización de la respuesta del biosensor

Para optimizar la respuesta del biosensor se ha llevado a cabo el estudio de los siguientes factores: potencial, pH, temperatura y carga enzimática.

IV.4.4.2.1. Potencial aplicado

Para estudiar la influencia del potencial se midió la intensidad de corriente obtenida con una disolución de glucosa 0,25 mM variando el potencial del electrodo de trabajo de +0,2 a +0,8 V vs. ECS. Como se muestra en la Figura 4.68, se produce un aumento rápido de la intensidad de corriente entre potenciales de +0,2 y +0,6 V vs. ECS, manteniéndose constante a partir de este valor. De acuerdo con este resultado en todas las experiencias posteriores, se utilizó un potencial de +0,6V vs. ECS.

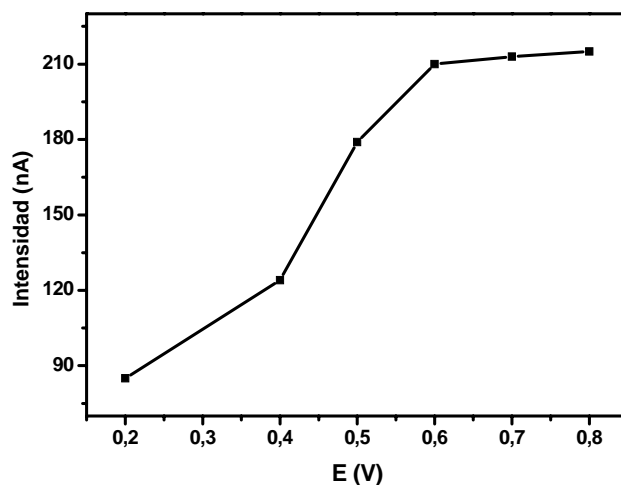


Figura 4.68.- Influencia del potencial aplicado al electrodo de trabajo en la respuesta del biosensor al añadir 0,25 mM de glucosa. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, 25°C

IV.4.4.2.2. pH

El efecto del pH en la respuesta del biosensor se estudió en un intervalo de pHs comprendido entre 4,0 y 8,0. Se preparó el biosensor con las micropartículas de poli (vinilimidazol) y $\eta=3,2\%$ y se midió la respuesta frente a una concentración de glucosa de 9 mM (Figura 4.69). La respuesta del biosensor se mantuvo por encima del 90% de la intensidad de corriente máxima entre los pHs 5,5 y 7,0, utilizándose para posteriores experiencias un pH de 6,0 con el que se obtuvo la máxima intensidad.

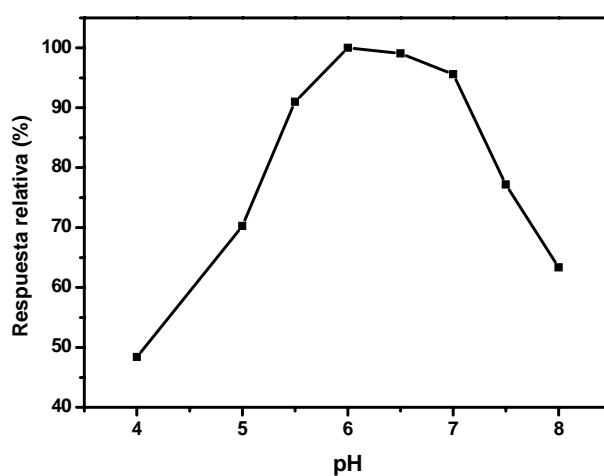


Figura 4.69.- Efecto del pH en la respuesta biosensor al añadir 9 mM de glucosa. Disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico, +0,6V vs. ECS y 25°C.

IV.4.4.2.3. Temperatura

En este apartado se estudió la variación de la intensidad de corriente obtenida al añadir 9 mM de glucosa, dependiendo de la temperatura, la cual se varió entre 0°C-75°C. Para controlar la temperatura se utilizó una célula electroquímica termostatzada y las medidas se realizaron bajo condiciones de saturación de oxígeno.

El intervalo de temperaturas en el cual la intensidad de corriente se mantiene entre el 80-100% de la intensidad de corriente máxima se encuentra entre 45 y 65°C (Figura 4.70), temperaturas significativamente superiores a la temperatura óptima de la enzima en disolución (30°C) (Ying y col., 2002), por lo que deducimos que este medio estabiliza a la enzima. A partir de 60°C el descenso en la respuesta es brusco, probablemente debido a la desnaturalización de la enzima. El estudio de estabilidad térmica de la enzima, reveló una clara disminución de la corriente con el tiempo a temperaturas superiores de 40°C. Por el contrario, a 40°C, la intensidad de corriente se mantiene constante a lo largo del tiempo, por esta razón se seleccionó esta temperatura como óptima.

El cálculo de la energía de activación de la glucosa oxidasa inmovilizada en micropartículas de poli (vinilimidazol) se realizó mediante la representación de Arrhenius, considerando únicamente el intervalo de temperaturas en donde no se produce desnaturalización enzimática (0-40°C). Como muestra la Figura 4.71, aparecen dos regiones lineales de cuya pendiente se derivan dos energías de activación: 35,78 KJ/mol para la zona de bajas temperaturas y 8,78 KJ/mol para la zona de altas temperaturas, siendo ésta última parecida a la encontrada en la bibliografía para la enzima libre, estimada en 14,63 KJ/mol (Cosnier y col., 2001). La obtención de 2 regiones lineales nos sorprendió, ya que este microgel no sufre cambios de volumen en el intervalo de temperaturas estudiado (Figura 4.72), y teniendo en cuenta lo explicado en los anteriores capítulos para las representaciones de Arrhenius, pensábamos encontrar un único tramo lineal.

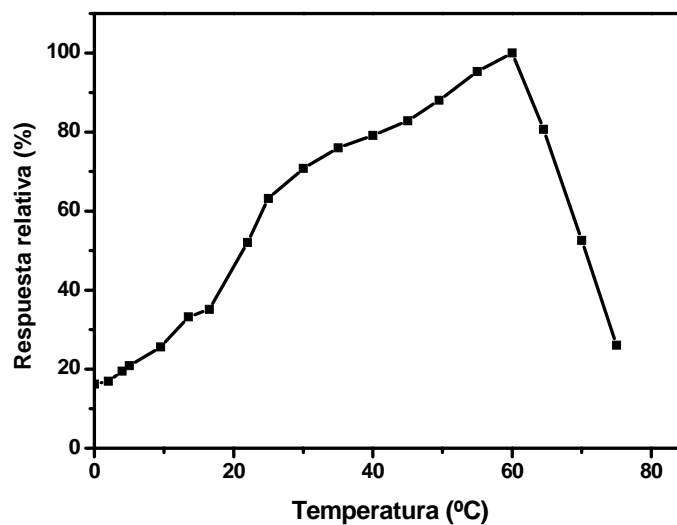


Figura 4.70.- Respuesta relativa del biosensor en función de la temperatura al añadir 9 mM de glucosa. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y +0,6V vs. ECS.

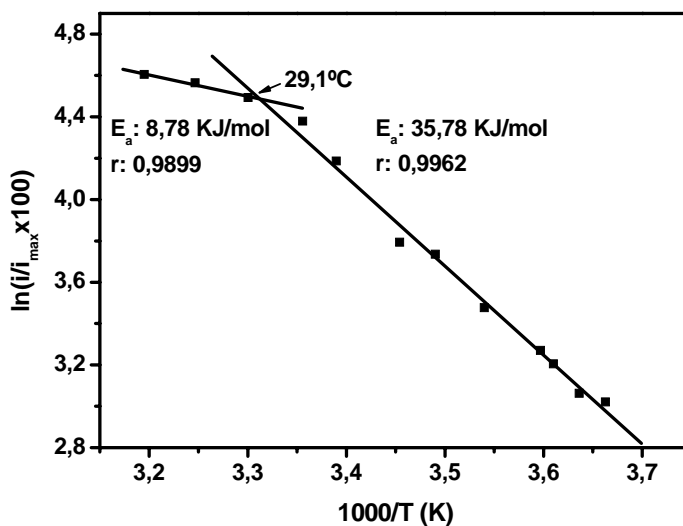


Figura 4.71.- Representación de Arrhenius para el biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) con GOx obtenida con los resultados de la Figura 4.70

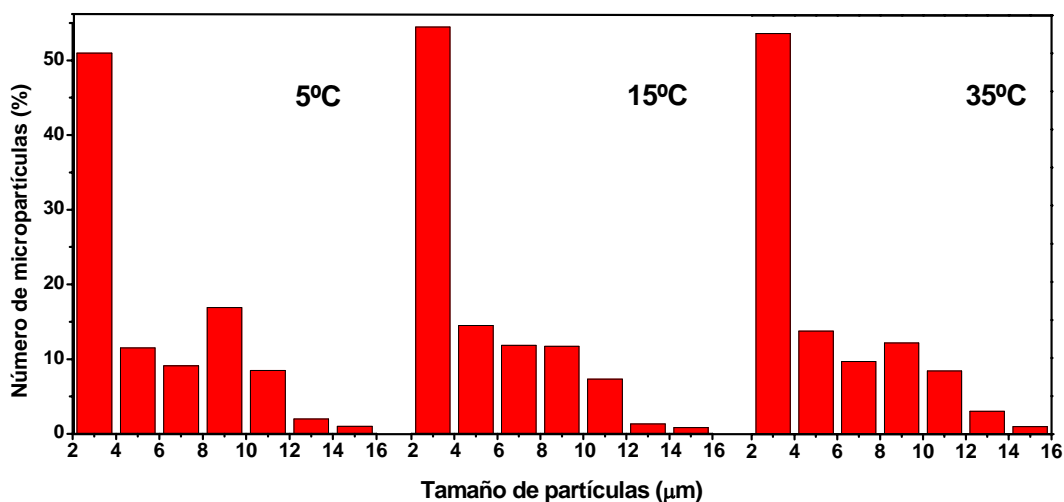


Figura 4.72.- Influencia de la temperatura en la distribución de tamaños de micropartículas de poli (vinilimidazol) ($\eta = 3,2\%$) con GOx, dispersas en disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0

IV.4.4.2.4. Carga enzimática

Este estudio se ha realizado primero cambiando la concentración de enzima inmovilizada en las micropartículas y preparando los biosensores con la misma cantidad de micropartículas y luego variando la cantidad de micropartículas depositadas en el electrodo, siempre con la misma concentración de enzima.

a) Concentración de enzima utilizada en la síntesis de micropartículas

Se sintetizaron micropartículas de poli (vinilimidazol) con distinta cantidad de glucosa oxidasa inmovilizada en su interior (255 UI, 425 UI, 765 UI y 1.020 UI GOx por mililitro de fase acuosa). Para preparar el biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas ($\eta=3,2\%$) con distinta carga enzimática, y se realizaron las curvas de calibrado a 25 °C, pH 6,0 y +0,6V vs. ECS (Figura 4.73). Se observa un ligero aumento de la intensidad de corriente al aumentar la cantidad de glucosa inmovilizada hasta llegar a una concentración de 765 UI GOx/mL de fase acuosa donde la intensidad de corriente fue máxima. El intervalo lineal fue prácticamente el mismo a partir de 425 UI/mL de glucosa oxidasa inmovilizada (Tabla 4.28).

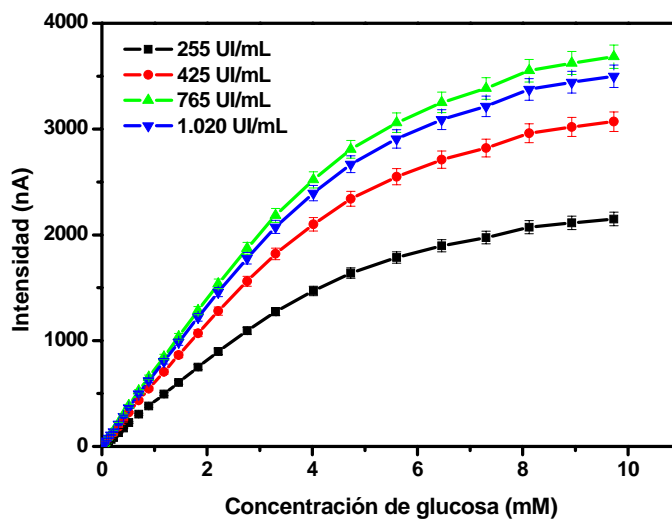


Figura 4.73.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores preparados con micropartículas de poli (vinilimidazol) con distinta concentración de enzima. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, +0,6V vs. ECS y 40°C.

b) Cantidad de micropartículas colocadas en el electrodo

Con el fin de reducir el tiempo de respuesta del biosensor, se varió la cantidad de partículas colocadas en el electrodo. Se prepararon 3 biosensores formados todos ellos de micropartículas de poli (vinilimidazol) con grado de reticulación 3,2 % y 765 UI GOx/mL de fase acuosa pH 6,0 y se varió la cantidad de partículas depositadas en el electrodo de 1 a 3 mg. Las curvas de calibrado de cada biosensor se realizaron a 25°C, pH 6,0 y 0,6 V vs. ECS (Figura 4.74). El tiempo de respuesta disminuyó de 90 a 60 segundos cuando se depositaron en el electrodo 1 mg de micropartículas.

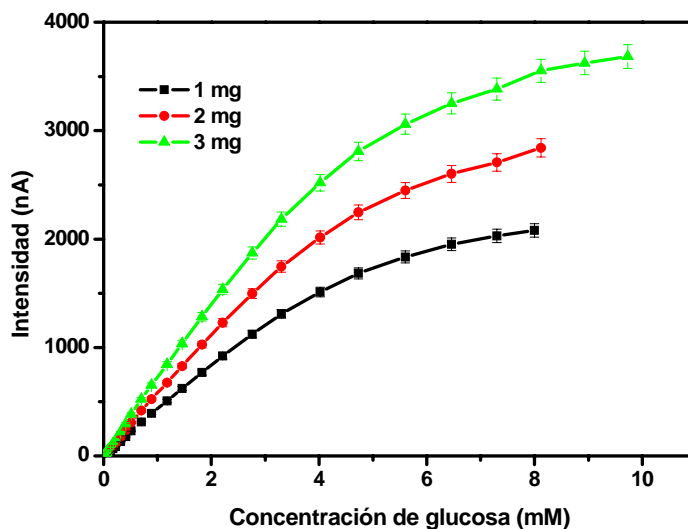


Figura 4.74.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores preparados con distinta cantidad de micropartículas (765UI de GOx por mililitro de fase acuosa) en la superficie del electrodo. Condiciones experimentales como en la Figura 4.73

Tabla 4.28.- Propiedades analíticas del biosensor en función de la carga enzimática

Concentración de enzima en las micropartículas	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
255 UI/mL	1,60	5,58	30,70	$2,0 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-4}$	0,9999 (9)	20,0
425 UI/mL	1,60	8,39	43,86	$2,0 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-3}$	0,9990 (15)	20,0
765 UI/mL	1,55	10,07	52,63	$2,0 \times 10^{-5}$ - $2,2 \times 10^{-3}$	0,9991 (15)	10,0
1.020 UI/mL	1,65	9,57	50,00	$2,5 \times 10^{-5}$ - $2,2 \times 10^{-3}$	0,9991 (14)	10,0
Cantidad de micropartículas en electrodo						
1 mg	1,40	5,74	29,71	$2,0 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-4}$	0,9999 (7)	20,0
2 mg	1,55	8,29	40,60	$2,0 \times 10^{-5}$ - $1,5 \times 10^{-3}$	0,9993 (13)	10,0
3 mg	1,60	10,07	52,63	$2,0 \times 10^{-5}$ - $2,2 \times 10^{-3}$	0,9991 (15)	10,0

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.4.4.3. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas

Una vez conocido el efecto de las variables que afectan a la respuesta del biosensor, se realizó la curva de calibrado para glucosa (Figura 4.75) con un biosensor preparado con micropartículas de poli (vinilimidazol), grado de reticulación 3,2%, 1,23 M de monómero y pH de síntesis 6,0; las medidas se realizaron a un potencial de +0,6V vs. ECS, pH 6,0 y 40°C. Este biosensor presentó las siguientes propiedades analíticas:

- Sensibilidad 14,24 mA/M cm²
- Densidad de corriente máxima 55,43 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$
- Intervalo lineal $2,0 \times 10^{-5}$ - $3,3 \times 10^{-3}$ M
- Límite de detección 10 μM

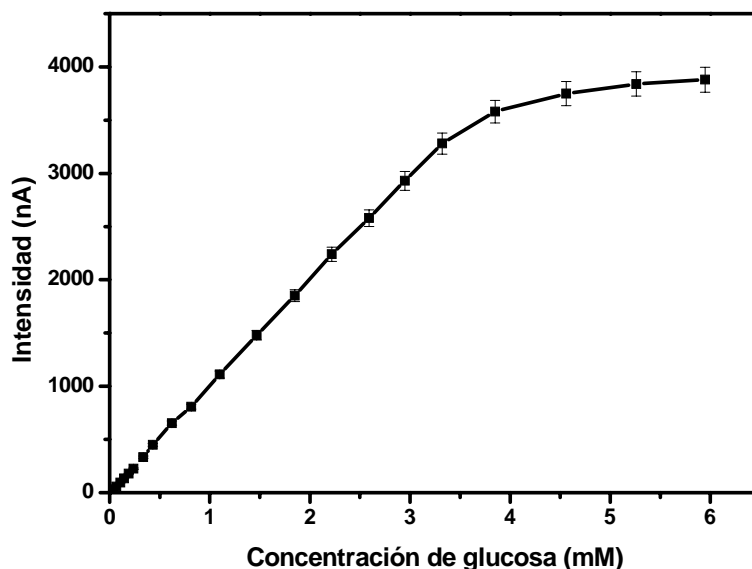


Figura 4.75.- Curva de calibrado obtenida con el biosensor de glucosa con micropartículas de poli (vinilimidazol) en condiciones experimentales óptimas

IV.4.4.4. Estudio de precisión

En el estudio de la repetibilidad de la medida se realizaron 10 medidas, el mismo día y con el mismo biosensor, utilizando disoluciones de glucosa de 0,02, 0,5 y 3 mM, obteniéndose coeficientes de variación de 9,52, 4,15 y 2,95% respectivamente. Al igual que ocurría para el biosensor formado por micropartículas de LIPs, a medida que la concentración de glucosa disminuye, se obtienen coeficientes de variación mayores, todos ellos menores que los CV máximos aceptables en función de la concentración de analito según Horwitz (ver Tabla 3.5).

Para el estudio de la precisión intermedia se utilizó una disolución de glucosa de 0,5 mM, realizándose 10 medidas cada día durante 2 días consecutivos. En la Figura 4.76 se muestra el gráfico de cajas y bigotes obtenido, observándose que la dispersión de las medidas en ambos días es muy parecida (CV 4,15% el primer día y 4,82% el segundo). El valor p obtenido para la comparación de las medias y de las varianzas fue 0,1482 y 0,6001, no observándose diferencias estadísticamente significativas en los dos días de estudio.

En definitiva, estos resultados demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con el biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) en la determinación de glucosa.

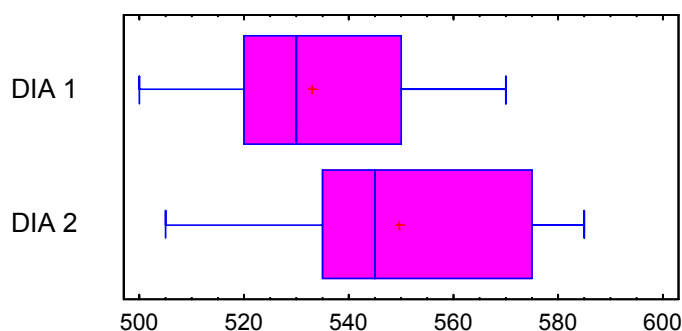


Figura 4.76.- Gráfico de cajas y bigotes

IV.4.4.5. Estabilidad

Las micropartículas liofilizadas mantienen la actividad enzimática de la GOx al menos durante 1 año, este estudio aún no ha concluido. Para conocer la estabilidad del biosensor se midió periódicamente la respuesta del mismo en una disolución de glucosa de 0,25 mM. Entre las medidas se mantuvo el biosensor en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 a -4°C . Como se observa en la Figura 4.77, una vez transcurridos 325 días el biosensor mantiene el 95 % de la señal inicial, lo que le confiere una excelente estabilidad, al igual que en el caso de los biosensores con micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻]. Este estudio sigue en curso.

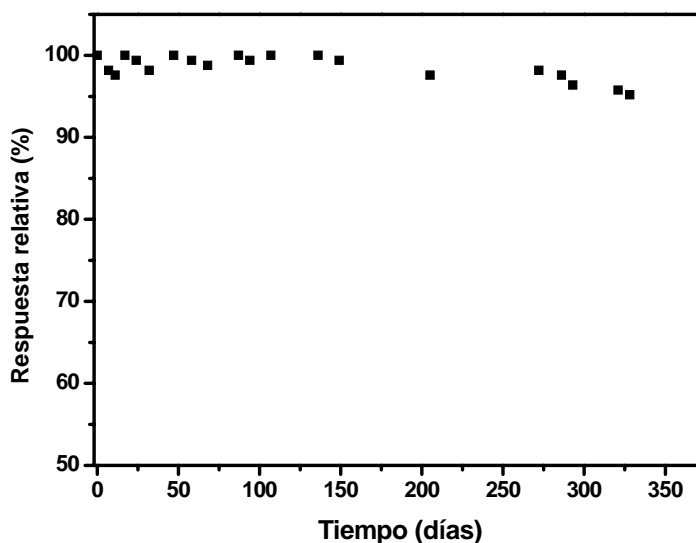


Figura 4.77.- Estabilidad del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol)

IV.4.4.6. Comparación de los biosensores formados por micropartículas de poli (vinilimidazol) en medios de diferente polaridad

Se realizó este estudio para conocer la utilización de este biosensor en medio no acuoso, seleccionando disolventes con distinta hidrofobicidad. El biosensor se preparó con 3 mg de micropartículas de poli (vinilimidazol) de grado de reticulación 3,2% y una concentración de glucosa oxidasa de 765 UI/mL de fase acuosa. Para realizar la medida, en la célula electroquímica se incluyen 10 mL de una mezcla disolvente orgánico/disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 (98,5 mL:1,5 mL), utilizando como disolventes etanol, dioxano, acetonitrilo, cloroformo y hexano (Figura 4.78). Esta pequeña cantidad de disolución tampón es necesaria para que el sustrato se disuelva en el medio considerado. Al igual que en el caso de las micropartículas de poli [ViEtIm⁻][Br⁺], las propiedades analíticas del biosensor mejoraron a medida que aumentaba la hidrofobicidad del disolvente, ya que los disolventes hidrofóbicos prácticamente no interactúan con el agua circundante de la enzima, manteniéndose su actividad. El disolvente utilizado con el que se obtuvieron las mejores propiedades analíticas fue el hexano, disolvente más hidrofóbico (Tabla 4.29). En cambio, con dioxano, disolvente hidrofílico, la intensidad de corriente fue muy pequeña, posiblemente debido a que estos disolventes atrapan el agua que rodea a la enzima, disminuyendo la actividad de GOx. El tiempo de respuesta en todos los casos se mantuvo entre 2 y 3 minutos.

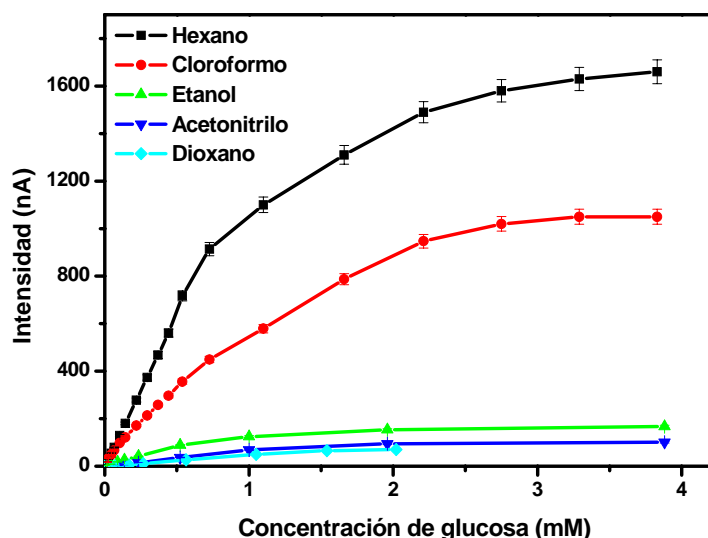


Figura 4.78.- Curvas de calibrado obtenidas con el biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) utilizando como disolvente mezclas de disolvente orgánico-disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M; 98,5:1,5; (v:v), +0,6V vs. ECS y 25°C.

Tabla 4.29.- Propiedades analíticas del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) utilizando diferentes mezclas disolvente-disolución tampón de fosfato sódico (98,5:1,5 (v:v)) como medio de trabajo

Disolvente	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
Dioxano	0,72	1,01	$2,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-3}$	0,9997 (4)	200
Acetonitrilo	1,10	1,53	$8,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-4}$	0,9988 (4)	80
Etanol	2,35	2,46	$4,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-4}$	0,9994 (5)	40
Cloroformo	8,87	15,00	$3,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-4}$	0,9973 (9)	10
Hexano	18,17	23,74	$2,0 \times 10^{-6}$ - $4,0 \times 10^{-4}$	0,9995 (10)	6

J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

El coeficiente de Hill obtenido al utilizar como medio de trabajo disolventes orgánicos fue siempre mayor a 1,7, lo que indica que la curva de calibrado resultante no se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten, siendo otro el proceso limitante. Además, se observó cómo al aumentar el porcentaje de agua en la mezcla disolvente/disolución tampón, aumentó la respuesta del biosensor, al utilizar como

disolvente acetonitrilo (Figura 4.79) aunque se observó un cambio en el perfil de la curva de calibrado al aumentar la cantidad de agua al 30% (Tabla 4.30).

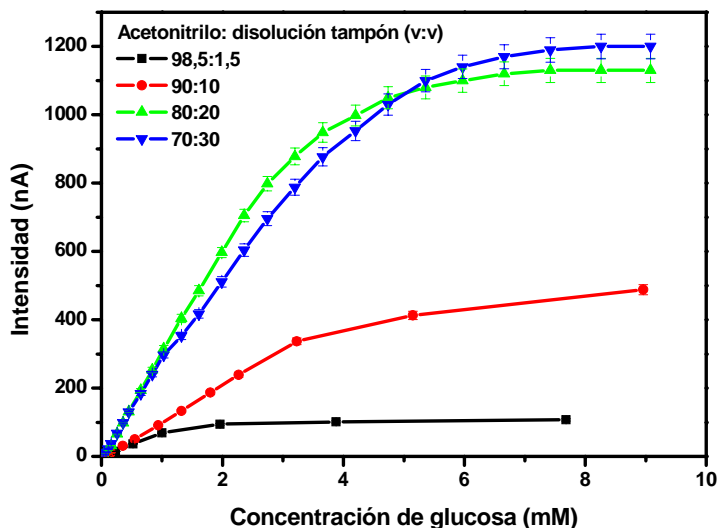


Figura 4.79.- Influencia de la cantidad de disolución tampón de fosfato (pH 6,0) en las mezclas acetonitrilo-disolución tampón, en la respuesta del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol). Condiciones experimentales como en la Figura 4.78

Tabla 4.30.- Propiedades analíticas del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) dependiendo de la cantidad de disolución tampón utilizada en la mezcla acetonitrilo/disolución tampón

Acetonitrilo: disolución tampón (v:v)	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
98,5:1,5	1,10	1,53	1,0 x 10 ⁻⁴ - 5,0 x 10 ⁻⁴	0,9988 (4)	100
90:10	1,52	8,36	1,0 x 10 ⁻⁴ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9997 (8)	100
80:20	4,38	16,14	7,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻³	0,9994 (13)	40
70:30	4,25	17,14	7,0 x 10 ⁻⁵ - 1,0 x 10 ⁻³	0,9996 (9)	40

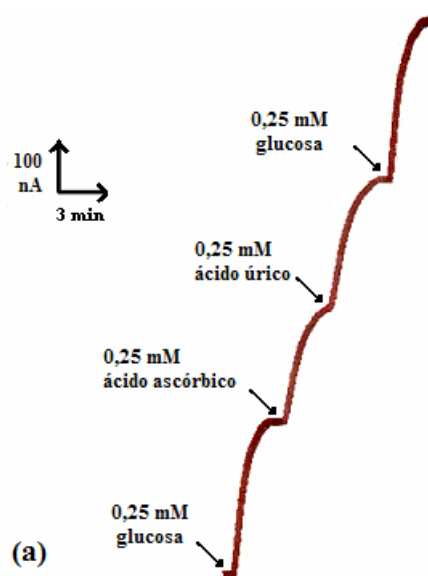
J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.4.4.7. Estudio de interferencias

Para conocer la posible aplicación de este dispositivo en la determinación de glucosa en sueros, se realizó un estudio de interferencias con el fin de eliminar las sustancias que puedan interferir en la medida. Se midió la respuesta a dos especies

fácilmente oxidables y presentes en el suero como son el ácido ascórbico y ácido úrico al utilizar un biosensor preparado con micropartículas de poli (vinilimidazol) con GOx (GOx-biosensor), observándose una respuesta similar a la de la glucosa en ambos casos (Figura 4.80). Para eliminar estas interferencias, se aplicó una película de Nafion al 5% (p/p) (50 μ L) en la superficie del electrodo, se secó al aire durante 15 minutos y se mantuvo durante 45 minutos a 80°C. Posteriormente, se colocaron las micropartículas sobre la superficie de Nafion y se mantuvieron unidas al electrodo mediante una membrana de diálisis (GOx-Nafion-biosensor). La Figura 4.80 ilustra la intensidad de corriente producida por disoluciones de 0,25 mM de glucosa, ácido ascórbico y ácido úrico cuando se utiliza un biosensor preparado sin y con membrana de Nafion.

En el caso del biosensor con Nafion, aunque la respuesta de la glucosa desciende ligeramente, se elimina por completo la señal producida por los dos ácidos. Como se veía en el capítulo anterior, con el biosensor de LIPs no se conseguía eliminar por completo la interferencia producida por el ácido ascórbico (ver Figura 4.56b). Esta diferencia entre ambos biosensores, radica en la carga de los polímeros, siendo neutro el poli (vinilimidazol) y positivo el LIP. Así, esta carga positiva reducirá el efecto de repulsión que se produce entre el Nafion y las especies estudiadas, permitiendo el acceso de una pequeña proporción de ácido ascórbico a la superficie electródica, no eliminándose por completo la interferencia.



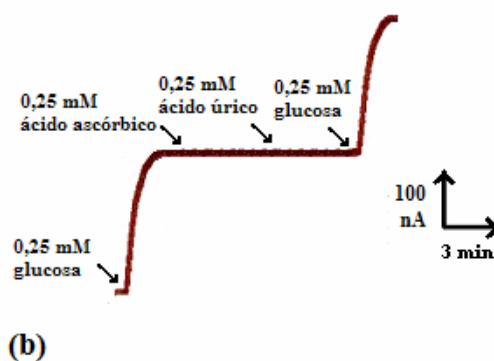


Figura 4.80.- Respuesta del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) (a) sin capa de Nafion y (b) con película de Nafion a 0,25 mM de glucosa, ácido ascórbico y ácido úrico

IV.4.4.8. Determinación de glucosa en sueros sanguíneos

Una vez eliminadas las interferencias a sustancias presentes en el suero, se determinó la concentración de glucosa de 5 muestras de sueros sanguíneos, mediante los biosensores de poli (vinilimidazol) fabricados sin y con película de Nafion. Como método de referencia para la determinación de glucosa de estos sueros se utilizó el método espectrofotométrico de hexoquinasa descrito por Young (Young, 1990). Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 4.31.

Al determinar la concentración de glucosa en los sueros con el biosensor preparado sin Nafion, los valores obtenidos siempre fueron mayores que los obtenidos con el método de referencia (diferencias entre 2,8-10,9 %), resultados coherentes si las muestras de suero contienen sustancias interferentes. Por el contrario, las diferencias entre los valores de glucosa obtenidos con el biosensor preparado con película de Nafion y el método de referencia fueron similares, nunca mayores del 2,6%, con errores positivos y negativos, confirmando que al depositar una capa de Nafion en la superficie electródica se eliminan las interferencias causadas por estas especies presentes en el suero, obteniéndose un biosensor más selectivo a glucosa y con una buena precisión ($CV \leq 1,6\%$).

Para el estudio de la recuperación, se obtuvo una mezcla con los 5 sueros utilizados anteriormente. Se tomaron 5 alícuotas de 2 mL cada una. Con 1 mL de este suero se midió la concentración de glucosa, comparándose la señal con la curva de calibrado patrón. Al otro mililitro de suero se le añadió una cantidad de glucosa conocida (72 mg/dL), midiéndose de nuevo la concentración de glucosa. La diferencia

de concentraciones entre ambas muestras, debe corresponder con la concentración de glucosa añadida. La recuperación obtenida fue similar con ambos biosensores y se mantuvo entre 96,4 y 102,8% (Tabla 4.32), lo que confirma que la señal de la glucosa no se ve afectada por la existencia de interferentes en la muestra. El método analítico de determinación de glucosa en sueros con el biosensor preparado con Nafion es un método exacto y preciso.

Tabla 4.31.- Resultado de las medidas de glucosa en sueros utilizando un método espectrofotométrico de referencia y los biosensores propuestos.

Muestra	Método de referencia	GOx-BIOSENSOR			GOx-Nafion BIOSENSOR		
	Glucosa (mg/dL)	Glucosa ^a (mg/dL)	CV (%)	Error relativo. ^b (%)	Glucosa ^a (mg/dL)	CV (%)	Error relativo. ^b (%)
1	75,0	80,4±1,1	1,3	+7,2	73,9±1,0	1,1	-1,5
2	83,0	88,2±1,0	1,0	+6,3	82,9±0,2	0,2	-0,1
3	95,0	97,7±0,3	0,3	+2,8	95,5±0,4	0,4	+0,5
4	89,0	98,7±2,1	2,1	+10,9	86,7±1,5	1,6	-2,6
5	92,0	99,2±1,2	1,2	+7,8	93,2±1,0	1,0	+1,3

^a Media de 3 medidas

^b Dsv.: Desviación entre los resultados del método de referencia y del biosensor

Tabla 4.32.- Resultados de recuperación de los biosensores propuestos

Muestra	GOx-BIOSENSOR			GOx-Nafion BIOSENSOR	
	Glucosa añadida (mg/dL)	Glucosa encontrada ^a (mg/dL)	Recuperación (%)	Glucosa encontrada ^a (mg/dL)	Recuperación (%)
1	72,0	70,7±0,9	98,2	73,3±1,2	101,8
2	72,0	71,5±2,3	99,3	72,1±1,9	100,1
3	72,0	69,0±1,2	95,8	69,4±2,1	96,4
4	72,0	70,9±3,2	98,5	74,0±2,3	102,8
5	72,0	73,5±1,9	102,1	70,8±1,8	98,3

^a Media de 3 medidas

IV.4.5. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO CON MICROGELES DE POLI (VINILIMIDAZOL) PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Comprobada la eficacia de este sistema de inmovilización con la GOx se trató de utilizar el mismo sistema en la inmovilización de PPO y utilizar las micropartículas en el diseño de un biosensor. Se optimizó el sistema de inmovilización y la respuesta del biosensor, utilizándose posteriormente este biosensor para la determinación de distintos compuestos fenólicos. Los parámetros estudiados han sido los siguientes:

- Optimización del sistema de inmovilización enzimático
 - Concentración de monómero
 - Grado de reticulación

- Optimización de la respuesta del biosensor
 - Potencial de trabajo
 - pH
 - Temperatura
 - Carga enzimática

IV.4.5.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático

Con el objetivo de optimizar el sistema de inmovilización de PPO se sintetizaron micropartículas de polivinilimidazol con tirosinasa inmovilizada en su interior, comenzando con distintas concentraciones de monómero (las mismas que las utilizadas para la inmovilización de glucosa oxidasa) y manteniendo un grado de reticulación de 3,2% y en segundo lugar con distintos grados de reticulación comprendidos entre 3,2 y 5,0% y la misma cantidad de monómero, 1,23 M. Se prepararon los correspondientes biosensores realizándose las curvas de calibrado para cada uno de ellos tal como muestran las Figuras 4.81 y 4.82. La máxima densidad de corriente y mayor intervalo de linealidad se obtuvo con las micropartículas de $\eta=4\%$ y concentración de monómero 1,23 M (Tabla 4.33). Como se puede observar, la concentración de monómero óptima fue la misma al inmovilizar glucosa oxidasa y tirosinasa. Por el contrario, el grado de reticulación óptimo varió al cambiar la enzima inmovilizada, siendo 3,2% para glucosa oxidasa y 4,0% para tirosinasa. Al igual que ocurría en el caso de micropartículas de poli[ViEtIm⁺][Br⁻] y PAA (Rubio Retama y col., 2003), esta diferencia en el entrecruzamiento se debe a la diferencia de

tamaño de las enzimas, al disminuir el peso molecular de la enzima atrapada se requiere menor tamaño de poro, es decir, mayor grado de reticulación. Los coeficientes de Hill obtenidos en todos los casos de entrecruzamiento estudiados fueron mayores de 1,5 lo que parece indicar que la difusión del sustrato y producto a través de la capa polimérica es la etapa limitante en el proceso global de medida del biosensor. En el recuadro de la Figura 4.81 se muestra la variación de la intensidad de corriente como consecuencia de la adición de 0,05 mM de catecol. El tiempo de respuesta del biosensor fue de 2 minutos.

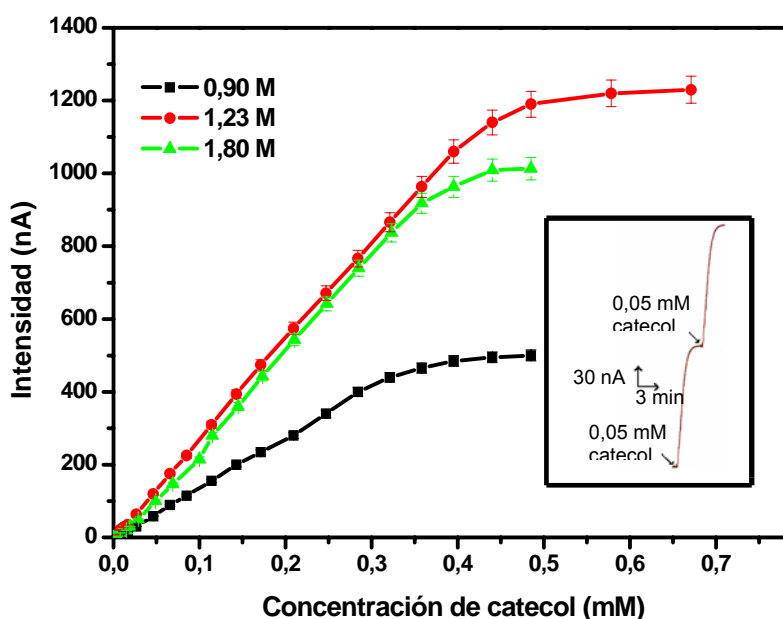


Figura 4.81.- Influencia de la concentración de monómero utilizada en la síntesis de micropartículas de poli (vinilimidazol) con PPO en la respuesta del biosensor. Grado de reticulación de 4,0%. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, 20°C y -0,1V vs. ECS. Recuadro: Perfil intensidad-tiempo originada por el biosensor de poli (vinilimidazol) con PPO.

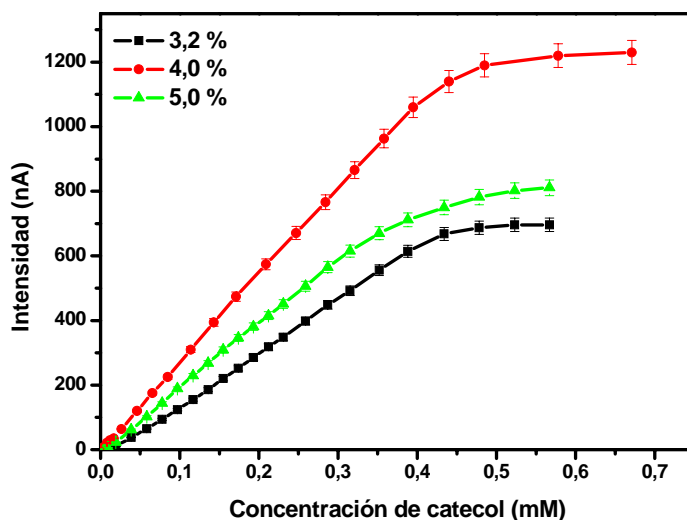


Figura 4.82.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores con micropartículas con diferente proporción de agente entrecruzante. Concentración de monómero de 1,23 M. Condiciones experimentales como en la Figura 4.81

Tabla 4.33.- Comparación de biosensores formados con micropartículas de poli (vinilimidazol) con distintas concentraciones de monómero y distintos grados de reticulación

Concentración de monómero (M)	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
0,90	1,50	20,07	7,10	$8,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	0,9991 (10)	8,0
1,23	1,70	38,70	17,71	$4,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-4}$	0,9997 (16)	4,0
1,80	2,00	38,03	14,47	$8,0 \times 10^{-6} - 3,5 \times 10^{-4}$	0,9989 (14)	8,0
Grado de reticulación (%)						
3,2	1,80	23,77	9,94	$2,0 \times 10^{-5} - 4,0 \times 10^{-4}$	0,9993 (16)	20,0
4,0	1,70	38,70	17,71	$4,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-4}$	0,9997 (16)	4,0
5,0	2,10	28,69	11,59	$2,0 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-4}$	0,9992 (14)	9,0

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.4.5.2. Optimización de la respuesta del biosensor

IV.4.5.2.1. Potencial, pH y temperatura

Este estudio se realizó con un biosensor formado de micropartículas de poli (vinilimidazol) de grado de reticulación 4,0% y concentración de monómero 1,23 M. En el caso del potencial, se midió la respuesta obtenida al añadir 0,1 mM de catecol variando el potencial de 0 a -0,2V vs. ECS. La máxima intensidad de corriente se obtuvo a un potencial de -0,1V vs. ECS, produciéndose un descenso en la corriente al aumentar o disminuir el potencial (Figura 4.83). El descenso de la intensidad de corriente para potenciales más negativos se puede deber a que se produce la polimerización de las o-quinonas producidas enzimáticamente o a la reducción del oxígeno lo que conlleva una disminución en la reacción enzimática y una menor formación de o-quinonas.

Para estudiar el efecto del pH y la temperatura se utilizó una concentración de catecol de 0,6 mM y se midió la intensidad de corriente obtenida a pHs comprendidos entre 4,0 y 8,0 y temperaturas entre 0 y 50°C. Como se observa en la Figura 4.84, el pH de máxima actividad fue 6,5, mientras que en el intervalo de temperatura de 10 a 30°C se obtuvo más del 90% de la intensidad de corriente máxima, con un máximo alrededor de 23°C (Figura 4.85). Al utilizar una temperatura de 23°C para el estudio de la estabilidad térmica de la enzima, se observó un descenso en la intensidad de corriente al cabo de una hora de haber alcanzado el estado estacionario. Sin embargo, con 20°C la corriente se mantuvo constante, no produciéndose desnaturalización enzimática, por lo que fue esta temperatura la utilizada en las siguientes experiencias.

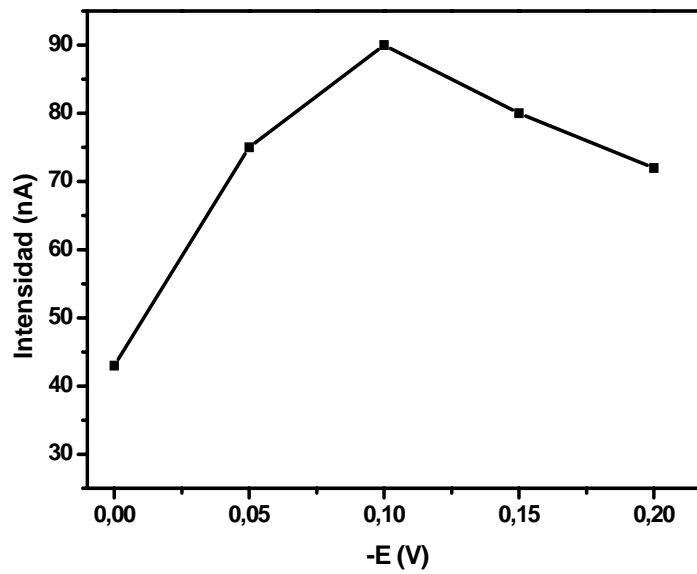


Figura 4.83.- Influencia del potencial en la respuesta del biosensor al añadir 0,1 mM de catecol. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y 20°C

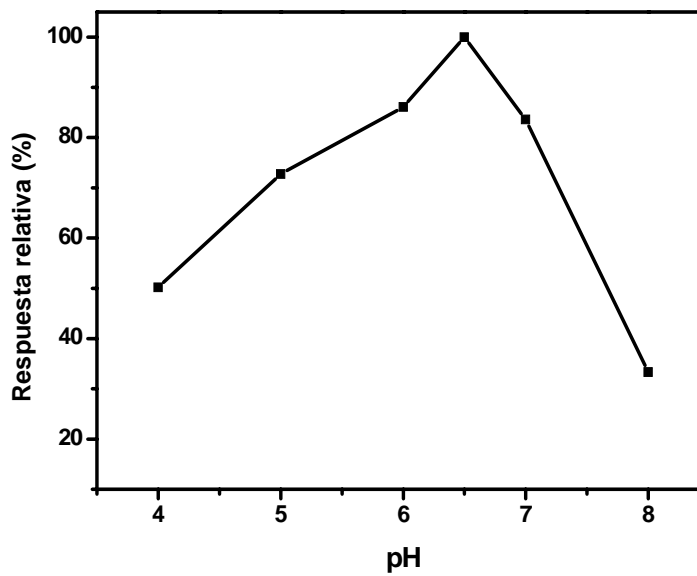


Figura 4.84.- Respuesta relativa del biosensor en función del pH al añadir 0,6 mM de catecol. Disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico, 20°C y -0,1V vs. ECS

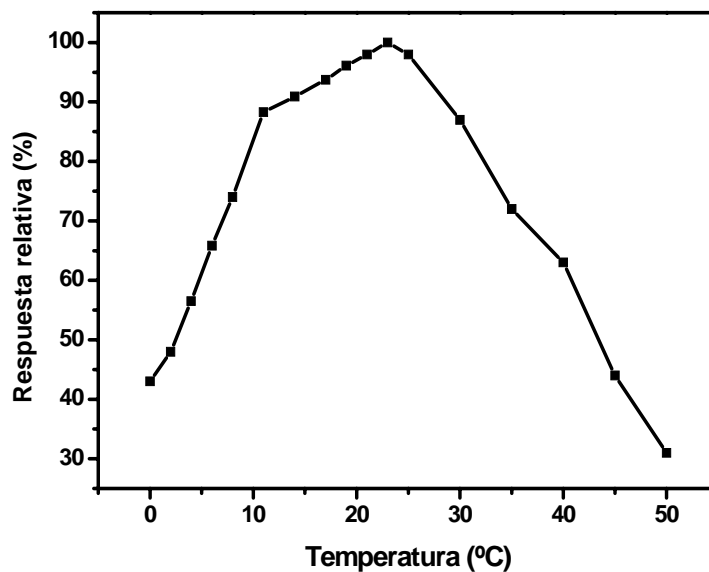


Figura 4.85.- Influencia de la temperatura en la respuesta del biosensor al añadir 0,6 mM de catecol. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5 y -0,1V vs. ECS

La representación de Arrhenius del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) se realizó considerando el intervalo de temperaturas donde no se produce desnaturalización de la enzima (0-20°C). Se observan 2 tramos lineales de cuyas pendientes se derivan 2 energías de activación (E_a), 43,30 KJ/mol para la zona de bajas temperaturas y 7,20 KJ/mol para la zona de altas temperaturas (Figura 4.86) siendo la temperatura de corte de 10,7°C. Teniendo en cuenta que el microgel de poli (vinilimidazol) no experimenta cambios de volumen en el intervalo de temperaturas estudiado y que tanto para glucosa oxidasa inmovilizada como para tirosinasa inmovilizada en este microgel aparecen dos regiones lineales en Arrhenius, podemos pensar que un aumento de temperatura produce otros cambios en el entorno que rodea a la enzima distintos al cambio de volumen, modificándose la conformación de la enzima atrapada. Algunos autores atribuyen la aparición de distintos tramos lineales en la representación de Arrhenius a cambios conformacionales de la enzima con la temperatura (Cosnier y col., 2001; Shan y col., 2007).

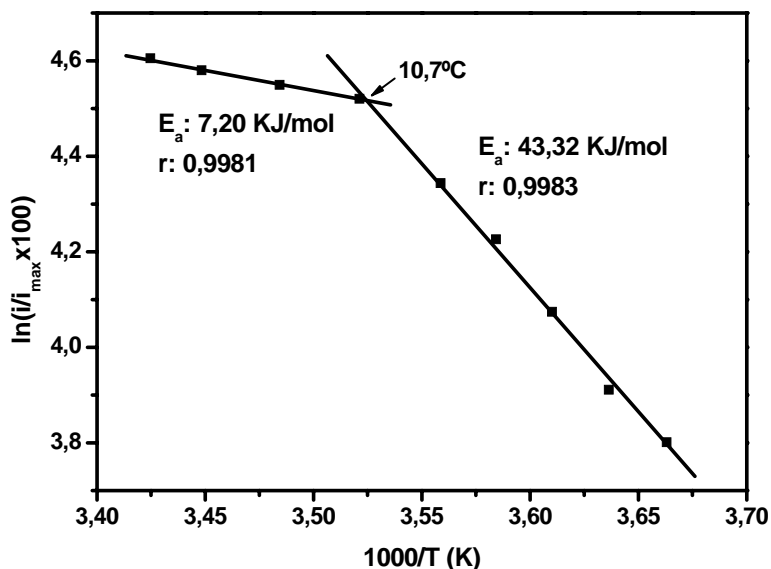


Figura 4.86.- Representación de Arrhenius para micropartículas de grado de reticulación 4,0% obtenida con los resultados de la Figura 4.85

IV.4.5.2.2. Carga enzimática

Por un lado se aumentó la concentración de enzima inmovilizada en las micropartículas de 2.500 a 5.000 UI por mililitro de fase acuosa con el fin de ampliar el intervalo de linealidad del biosensor y además se disminuyó la cantidad de micropartículas depositadas en la superficie del electrodo (de 3 a 1 mg) con el objetivo de disminuir el tiempo de respuesta del dispositivo analítico.

Para estudiar la influencia de la concentración de enzima utilizada en la síntesis se sintetizaron micropartículas de poli (vinilimidazol) con $\eta=4,0\%$ y distinta cantidad de tirosinasa inmovilizada en su interior (2.500, 3.333 y 5.000 UI/mL de fase acuosa). Para preparar el biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas y se realizaron las correspondientes curvas de calibrado midiendo la intensidad de corriente obtenida al añadir concentraciones sucesivas de catecol en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5, 20°C y $-0,1\text{V}$ vs. ECS (Figura 4.87).

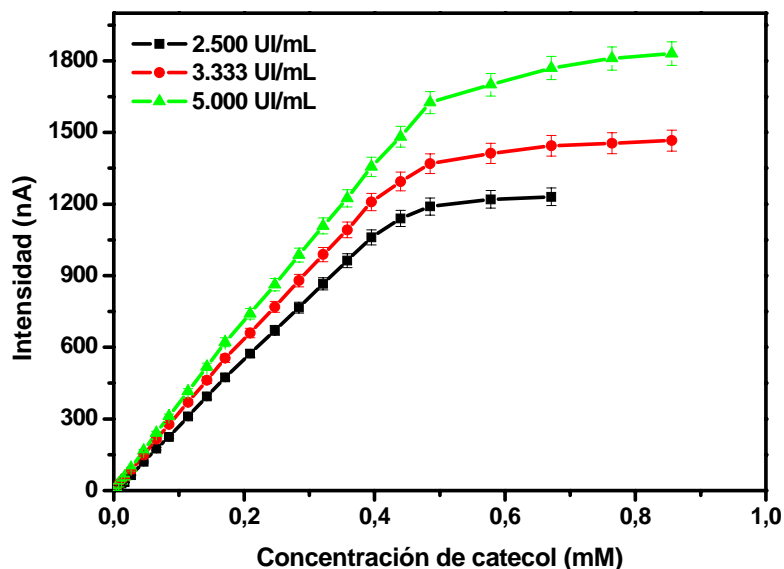


Figura 4.87.- Curvas de calibrado de los biosensores formados con 3 mg de micropartículas de poli (vinilimidazol) con distinta concentración de enzima. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5, -0,1V vs. ECS y 20°C.

En el caso de ver la influencia de la cantidad de micropartículas depositadas en el electrodo, se utilizaron micropartículas con la misma concentración de enzima (2.500 UI/mL de fase acuosa), se prepararon biosensores con 1, 2 y 3 mg de micropartículas y se registraron las curvas de calibrado correspondientes (Figura 4.88).

En la Tabla 4.34 se presentan las propiedades analíticas de los biosensores con distintas cargas enzimáticas. Se puede observar como la modificación de la carga enzimática supone un cambio en el intervalo lineal del biosensor. Además, la disminución de la cantidad de micropartículas depositadas en la superficie electrónica supone una disminución en el tiempo de respuesta, obteniéndose el menor tiempo de respuesta al utilizar el biosensor preparado con 1 mg de micropartículas (90 s).

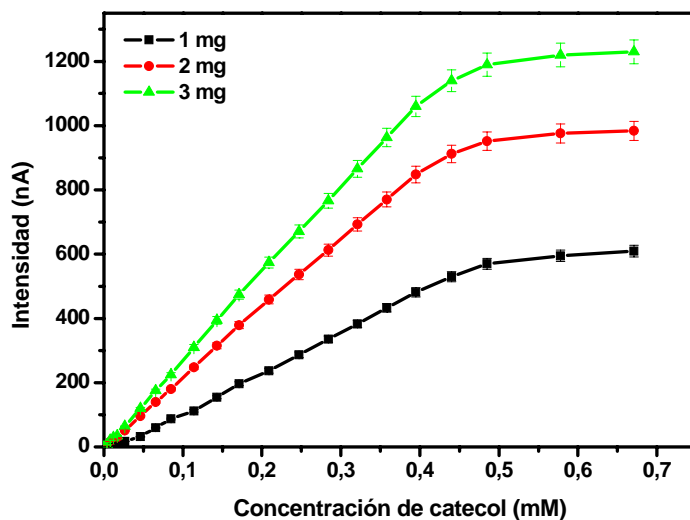


Figura 4.88.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores preparados con micropartículas de poli (vinilimidazol) (2.500UI/mL) con distinta cantidad de micropartículas en la superficie del electrodo. Condiciones experimentales como en la Figura 4.87

Tabla 4.34.- Propiedades analíticas del biosensor en función de la carga enzimática.

Concentración de enzima en las micropartículas	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
2.500 UI/mL	1,7	38,70	17,71	$4,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-4}$	0,9997 (16)	4,0
3.333 UI/mL	1,6	43,08	20,94	$4,0 \times 10^{-6} - 4,4 \times 10^{-4}$	0,9992 (17)	4,0
5.000 UI/mL	1,7	48,27	26,14	$2,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-4}$	0,9995 (18)	2,5
Cantidad de micropartículas en electrodo						
1 mg	1,4	17,72	8,71	$8,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-4}$	0,9986 (12)	8,0
2 mg	1,5	30,96	14,06	$7,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-4}$	0,9991 (10)	7,0
3 mg	1,7	38,70	17,71	$4,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-4}$	0,9997 (16)	4,0

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.4.5.3. Respuesta del biosensor en condiciones experimentales óptimas

Se realizó la curva de calibrado obtenida con el biosensor preparado con 3 mg de micropartículas de poli (vinilimidazol) para la determinación de catecol utilizando las condiciones experimentales óptimas. Las micropartículas utilizadas tenían una concentración de monómero 1,23 M, grado de reticulación 4,0% y concentración de enzima de 5.000UI/mL de fase acuosa. Las medidas se realizaron en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5, 20°C y potencial -0,1V vs. ECS. En la Figura 4.89 se representa la curva de calibrado obtenida al añadir diferentes concentraciones de catecol. Las propiedades analíticas obtenidas con este biosensor fueron las siguientes:

- Sensibilidad $58,98 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$
- Densidad de corriente máxima $29,36 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$
- Intervalo lineal $2,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$
- Límite de detección $2,5 \text{ } \mu\text{M}$

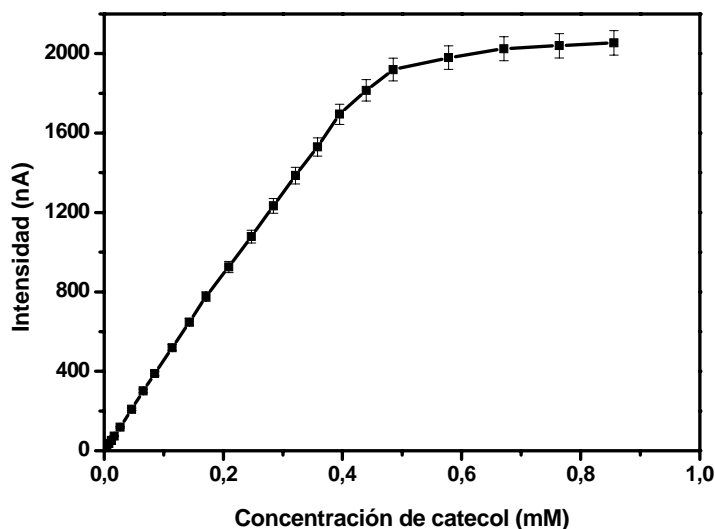


Figura 4.89.- Curva de calibrado obtenida con el biosensor de catecol formado de micropartículas de poli (vinilimidazol) en condiciones experimentales óptimas

IV.4.5.4. Estudio de precisión

En el estudio de la repetibilidad se realizaron 10 medidas de una disolución de catecol, con el mismo biosensor y el mismo día. Los coeficientes de variación obtenidos fueron 11,27, 6,44 y 4,52% para disoluciones de catecol de concentración 4,

200 y 350 μM de catecol respectivamente, CV mucho menores que los máximos aceptables por Horwitz (ver Tabla 3.5).

Para el estudio de la precisión intermedia se utilizó una disolución de catecol de 200 μM y se realizaron 20 medidas 2 días sucesivos. En la Figura 4.90 se muestra el gráfico de cajas y bigotes obtenido, observándose que la dispersión de las medidas es mucho mayor en el primer día (CV 6,44%) que en el segundo (CV 2,89%). Al comparar las medias y las varianzas obtenidas en los dos días de estudio mediante el cálculo del valor p , no se observaron diferencias estadísticamente significativas ya que este valor fue en ambos casos mayor de 0,05 (0,8916 al comparar las medias y 0,2200 para las varianzas)

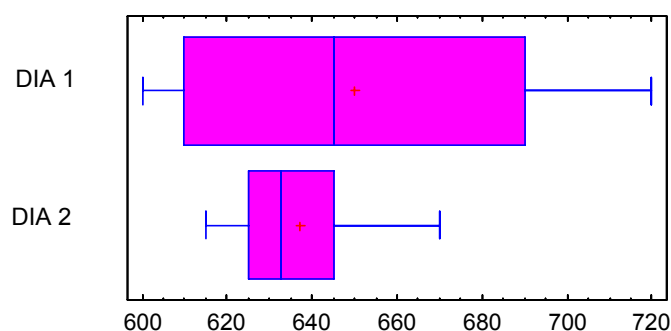


Figura 4.90.- Gráfico de cajas y bigotes

IV.4.5.5. Determinación de distintos fenoles simples en medio acuoso

Se estudió la respuesta del biosensor frente a distintos compuestos fenólicos. Los biosensores se prepararon utilizando micropartículas de poli (vinilimidazol) con grado de reticulación 4,0% y concentración de monómero 1,23 M, y se realizó la curva de calibrado para distintos compuestos fenólicos a 20°C, -0,1V vs. ECS en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5 (Figura 4.91). Si se compara la respuesta obtenida con estos fenoles frente a la respuesta del biosensor al catecol, se observa como la intensidad de corriente máxima obtenida con el catecol es como mínimo 10 veces mayor que la obtenida para los monofenoles. Esto se puede deber a que como el catecol es un difenol, sólo participa en la segunda reacción enzimática de la tirosinasa. En cambio, al utilizar como sustrato otro difenol, dopamina, la respuesta que se obtuvo fue la menor de todas, y esto puede ser debido a que la quinona que se produce enzimáticamente se puede transformar en dopaminocromo. Este descenso tan brusco de la corriente observado para la dopamina ocurría igual para el biosensor con micropartículas de PAA.

En la Tabla 4.35 se muestran las propiedades analíticas del biosensor de poli (vinilimidazol) para los diferentes compuestos fenólicos. En el caso de los monofenoles, la respuesta del biosensor aumentó de la siguiente forma: 4-clorofenol > 3-clorofenol > fenol > m- cresol > p-cresol, al igual que ocurría con el biosensor de PAA, En la respuesta del biosensor influye por un lado la reacción enzimática y por otro la electroquímica y el resultado depende de ambas reacciones. En la reacción electroquímica, la quinona producida enzimáticamente se tiene que reducir en el electrodo, y de las quinonas derivadas de los distintos compuestos fenólicos estudiados, la facilidad de reducción de la misma electródicamente al potencial de trabajo (-0,1V) sigue el siguiente orden: 4-clorofenol>3-clorofenol>fenol>p-cresol>m-cresol, tal y cómo se estudió en el apartado 2.4.6.

Los parámetros cinéticos de la reacción enzimática no pudieron calcularse debido al alto valor de los coeficientes de Hill para todos los sustratos estudiados. El tiempo de respuesta de los monofenoles fue mayor que para el caso del catecol, siendo aproximadamente de 3 minutos, resultados que pueden ser debidos a que los monofenoles sufren dos reacciones químicas y el catecol sólo participa en la segunda reacción enzimática.

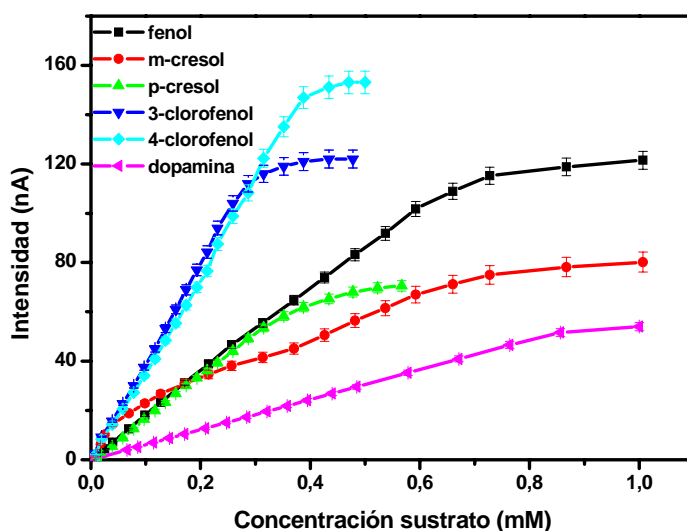


Figura 4.91.- Curvas de calibrado obtenidas con el biosensor de poli (vinilimidazol) para diferentes compuestos fenólicos. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, -0,1 V vs. ECS y 20°C.

Tabla 4.35.- Propiedades analíticas del biosensor preparado con micropartículas de poli (vinilimidazol) con PPO para diferentes compuestos fenólicos

Sustrato	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
3-clorofenol	2,05	5,64	1,74	2,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻⁴	0,9990 (10)	20
4-clorofenol	2,15	5,19	2,19	4,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻⁴	0,9994 (10)	20
Fenol	2,20	2,45	1,73	6,0 x 10 ⁻⁶ - 6,0 x 10 ⁻⁴	0,9993 (13)	6
m-cresol	1,60	1,09	1,15	1,0 x 10 ⁻⁴ - 4,0 x 10 ⁻⁴	0,9944 (7)	100
p-cresol	1,55	2,48	1,07	4,0 x 10 ⁻⁵ - 3,0 x 10 ⁻⁴	0,9992 (13)	40
Dopamina	1,50	0,87	0,80	6,0 x 10 ⁻⁵ - 8,0 x 10 ⁻⁴	0,9999 (16)	60

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.4.5.6. Comparación de los biosensores formados por micropartículas de poli (vinilimidazol) en medios de diferente polaridad

Se estudió la posibilidad de utilización del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) con PPO para la determinación de catecol en medios no acuosos, utilizando disolventes orgánicos tales como hexano, cloroformo, acetonitrilo, etanol y dioxano. El biosensor se preparó con 3 mg de micropartículas de poli (vinilimidazol) de grado de reticulación 4,0% y una concentración de PPO de 5.000 UI/mL de fase acuosa. Se realizaron las curvas de calibrado, a 20°C y -0,1V vs. ECS, midiendo la corriente generada por las adiciones sucesivas de catecol en 10 mL de una mezcla disolvente orgánico/disolución tampón de fosfato pH 6,0 (98,5 mL:1,5 mL), hasta llegar a una concentración de sustrato correspondiente a la saturación enzimática. Las respuestas observadas para todos los disolventes fue muy pequeña, variando la intensidad de corriente máxima entre 10 nA para cloroformo y hexano, 30 nA para el dioxano y 100 nA para el acetonitrilo, con una sensibilidad que fue máxima al utilizar como disolvente acetonitrilo (12,5 mA M⁻¹ cm⁻²). Con el fin de conocer la cantidad de disolución tampón necesaria en la mezcla, para producir la máxima actividad enzimática, se aumentó el porcentaje de disolución tampón de fosfato en las mezclas acetonitrilo/disolución tampón de 1,5 a 30%, observándose una mejora de las propiedades analíticas del biosensor a medida que aumenta la cantidad de disolución tampón en la mezcla hasta que el contenido de disolución acuosa fue del 20%. Al utilizar mezclas acetonitrilo:disolución tampón de fosfato (80:20) para la determinación

de catecol se induce un aumento en la sensibilidad de casi 3 veces (de $12,5 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ a $31,8 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) y en la intensidad de corriente máxima de casi 10 veces (de $1,6 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ a $12,0 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$), siendo el intervalo lineal y el límite de detección de $1,0 \times 10^{-5}$ - $3,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $5 \text{ } \mu\text{M}$ respectivamente (Figura 4.92). En todos los casos se puede observar cómo al trabajar con disolventes orgánicos como medio de trabajo, el tiempo de respuesta del biosensor aumenta (3 min) al compararlo con el tiempo obtenido al utilizar disoluciones tampón fosfato (90 s).

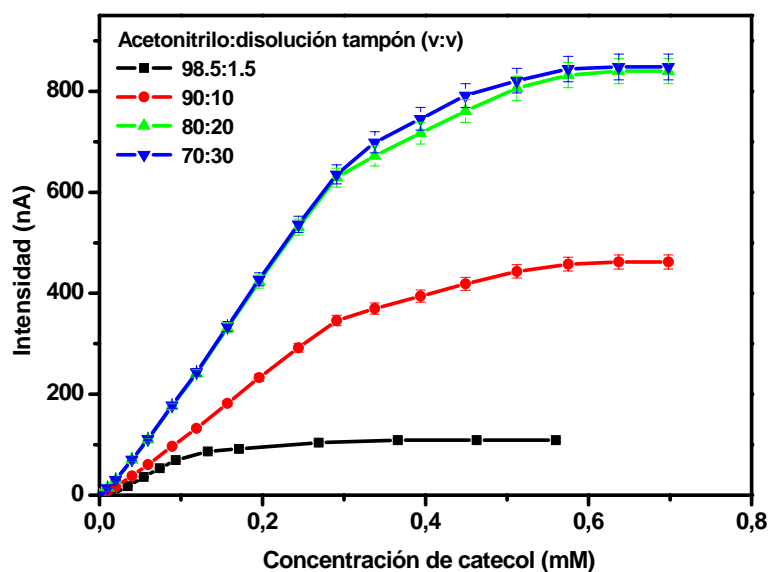


Figura 4.92.- Curvas de calibrado para los biosensores con micropartículas de poli (vinilimidazol) en mezclas acetoneitrilo:disolución tampón con diferentes cantidades disolución acuosa. $-0,1 \text{ V vs. ECS}$ y 20°C .

IV.4.5.7. Estabilidad

La actividad enzimática cuando la PPO está atrapada en microgeles de poli (vinilimidazol), tras su liofilización, se mantiene inalterable al menos durante un año. La estabilidad del biosensor se evaluó en los 2 medios de trabajo, almacenando el biosensor en una disolución tampón de fosfato pH 6,0 a 4°C después de su uso y registrando periódicamente la respuesta obtenida con $100 \text{ } \mu\text{M}$ de catecol. El biosensor cuyas medidas se realizan en medio acuoso mantiene el 90% de la señal inicial después de 10 días, mientras que el biosensor cuyas medidas se llevan a cabo en mezclas acetoneitrilo:disolución tampón (80:20) sólo dio señales superiores al 90 % de la inicial durante 5 días produciéndose un descenso brusco de la respuesta a partir del sexto día (Figura 4.93).

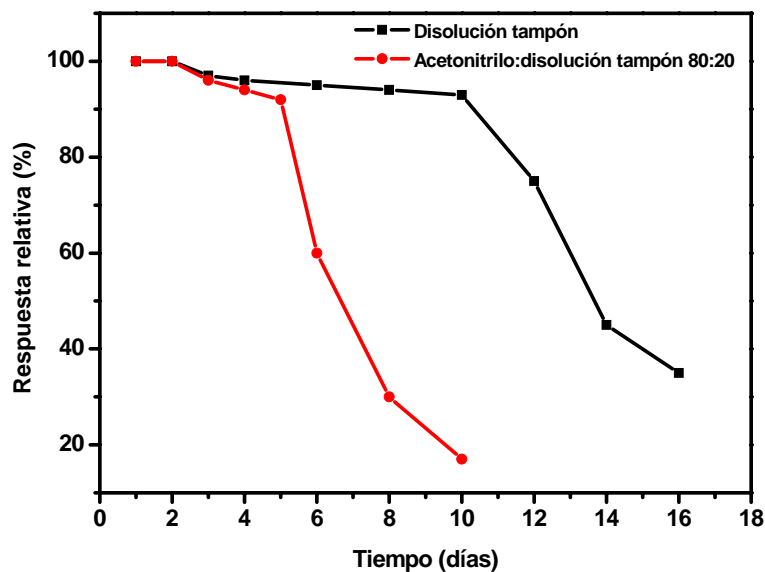


Figura 4.93.- Estabilidad del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) en disolución tampón de fosfato y mezclas acetonitrilo/disolución tampón 80:20 (v:v)

IV.4.5.8. Determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales

Para estudiar la posible aplicación del biosensor propuesto en la determinación de fenoles en aguas residuales con contenido de compuestos fenólicos desconocido, se realizó un estudio de recuperación. Para ello se cogieron 5 alicuotas del agua de 6 mL cada una. Con 3 mL se midió la corriente generada por el biosensor, extrapolando en la curva de calibrado de fenol y obteniéndose un valor de 46 μM de fenoles en aguas expresado en fenol. A los 3 mL de agua restantes se les añadió una cantidad de fenol conocida (40 μM) midiéndose de nuevo la concentración de fenol por extrapolación en la curva de calibrado. La diferencia de concentraciones entre la segunda y primera medida debe corresponder con la concentración de fenol añadido. La recuperación obtenida se mantuvo en torno al 80% (Tabla 4.36).

Tabla 4.36.- Resultados de recuperación del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol)

Muestra	Fenol añadido (μM)	Fenol encontrado^a (μM)	Recuperación (%)
1	40,0	30,0	75
2	40,0	31,6	79
3	40,0	35,0	87,5
4	40,0	35,0	87,5
5	40,0	30,0	75

IV.5. Biosensor amperométrico enzimático fabricado a partir de laponita

IV.5.1. INTRODUCCIÓN

En los apartados anteriores se han desarrollado distintos biosensores para la determinación de compuestos fenólicos, todos ellos basados en la inmovilización de PPO por atrapamiento en una matriz polimérica. En estos 2 últimos capítulos se propone un sistema de inmovilización enzimático basado en la adsorción de la enzima en distintas matrices inorgánicas. En este apartado se procedió a la adsorción de PPO en laponita (apartado 3.2.2) una matriz muy estudiada y adecuada para inmovilizar enzimas eficientemente en una superficie electródica (Poyard y col., 1996., Mousty y col., 2001., Mohammadi y col., 2005) y posteriormente, se utilizó como material biológico para el diseño de un biosensor amperométrico para la determinación de compuestos fenólicos. Además, dado que la laponita presenta una estructura laminar con cationes intercambiables en su espacio interlaminar, se procedió a la incorporación de un mediador redox para el diseño de un biosensor de laponita/azure B/PPO.

Aunque este dispositivo ya ha sido utilizado por otros autores para la determinación de algunos fenoles simples (Shan y col., 2003b), en este capítulo nos proponemos, por un lado, comparar este sistema de inmovilización por adsorción en matriz inorgánica con los sistemas de atrapamiento en matrices poliméricas propuestos y discutidos en los anteriores capítulos y, por otro lado, ampliar su campo de aplicación a la determinación de nuevos compuestos fenólicos por lo que se estudió su posible uso para la determinación de flavonoides, en concreto, quercetina y su derivado glicosilado, rutina.

La quercetina es uno de los flavonoides más distribuidos en vegetales y frutas, concretamente en cebolla, té verde, manzanas, peras, espinacas, etc. Es un antioxidante que inhibe la peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad en humanos (Meyer y col, 1998). La quercetina está muy presente como glicósido, bien como quercetin-3-rutinosa (rutina) en tomate, o quercetin-3-galactosa en manzana (Herrmann, 1976). La rutina, conocida como vitamina P, se encuentra en plantas como moras, sauco, té, espinacas y limón. Se usa generalmente para la terapia de insuficiencia venosa crónica ya que reduce la permeabilidad capilar (Kato y col., 1983). Además, parece que ayuda a la absorción de la vitamina C, impidiendo la oxidación de la misma. En la Figura 4.94 se muestra la estructura química de estos dos flavonoides.

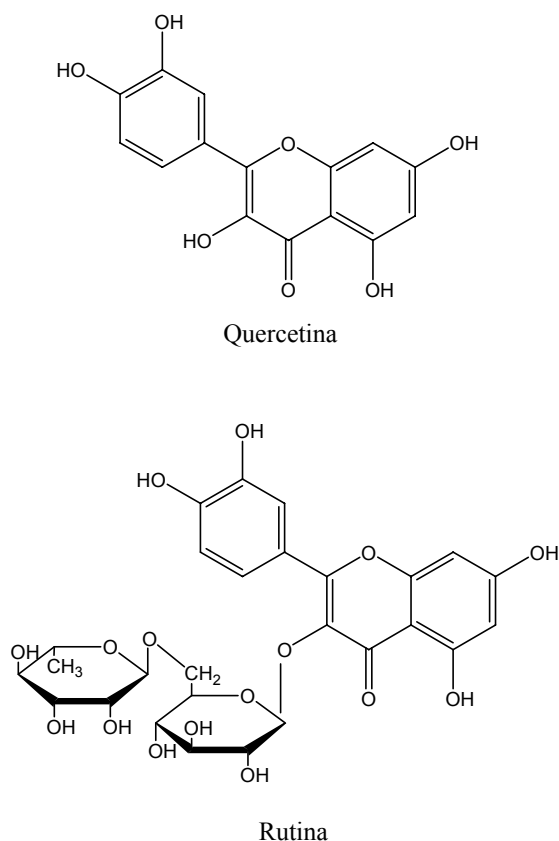


Figura 4.94.- Estructura química de quercetina y rutina (quercetin-3-rutinoso)

Entre los métodos actualmente propuestos para la determinación de rutina y quercetina, podemos destacar HPLC (Ishii y col., 2001; Ishii y col., 2003), electroforesis capilar (Xu y col., 2006) y quimioluminiscencia (Song y Hou, 2002). Ishii y col. determinaron rutina y quercetina en plasma humano mediante HPLC con detección UV, previa extracción en fase sólida, con el fin de estudiar las propiedades farmacocinéticas de la rutina. Xu y col. determinaron 4 flavonoides (quercetina, rutina, hiperóxido, quercitrina) en dos plantas medicinales de la familia de las Saururáceas mediante electroforesis capilar con detección electroquímica. Además, la rutina se ha determinado en orina y preparaciones farmacéuticas mediante el efecto inhibitorio que la rutina tiene en la reacción de quimioluminiscencia entre el luminol y el periodato. Los métodos electroquímicos se presentan como alternativa y por el momento, la determinación de rutina y quercetina se ha llevado a cabo por voltamperometría en diferentes electrodos como electrodo de carbono vitrificado (Kang y col., 2002), electrodo de pasta de carbono (Zoulis y Efstrahiou, 1996; Volikakis y Efstrahiou, 2000), electrodo de fibra de carbono (Aguilar-Sánchez y col., 2005), electrodo de oro (Zeng y col., 2006), electrodo de pasta de carbono modificado con nanotubos de carbono (Lin y col., 2006; Xiao y col., 2007) y electrodo de carbono vitrificado modificado con

nanotubos de carbono y β ciclodextrina (He y col., 2006). En la Tabla 4.37 se muestran las diferencias obtenidas, en los intervalos de linealidad y los límites de detección con los distintos métodos utilizados para la determinación de rutina y quercetina. Se han desarrollado biosensores de lacasa y tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en vino y té, pero no se obtuvo respuesta en ninguno de los dos casos para la quercetina y rutina (Gomes y col., 2004; Dall'Orto y col., 2005), por lo que nos parecía interesante conseguir un dispositivo capaz de determinar estos compuestos.

Tabla 4.37.- Métodos analíticos para la determinación de (a) quercetina y (b) rutina

Método	Intervalo lineal (M)	Límite de detección (M)	Referencia
Electroforesis capilar	$7,0 \cdot 10^{-7}$ - $5,7 \cdot 10^{-6}$ (a)	$3,2 \times 10^{-8}$ (a)	Xu y col., 2006
	$3,3 \cdot 10^{-7}$ - $2,6 \cdot 10^{-5}$ (b)	$0,8 \times 10^{-7}$ (b)	
Quimioluminiscencia	$1,6 \cdot 10^{-10}$ - $4,9 \cdot 10^{-8}$ (b)	$4,9 \times 10^{-11}$ (b)	Song y Hou, 2002
HPLC-detección UV	$6,5 \cdot 10^{-9}$ - $1,1 \cdot 10^{-6}$ (a)	$5,7 \times 10^{-10}$ (a)	Ishii y col., 2003
	$4,9 \cdot 10^{-9}$ - $1,6 \cdot 10^{-6}$ (b)	$1,2 \times 10^{-9}$ (b)	Ishii y col., 2001
Voltametría	$5,0 \cdot 10^{-8}$ - $5,0 \cdot 10^{-6}$ (a)	$4,0 \times 10^{-8}$ (a)	Lin y col., 2006
	$1,0 \cdot 10^{-7}$ - $1,0 \cdot 10^{-5}$ (b)	$2,0 \times 10^{-8}$ (b)	

IV.5.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR

La inmovilización de la enzima y preparación del biosensor se realizó de acuerdo con el procedimiento detallado en el capítulo Experimental, apartado 3.3.3. Se trata de un método de inmovilización sencillo y rápido, pero al ser un método físico, las uniones entre la enzima y la matriz son débiles, por lo que posteriormente se realizó un entrecruzamiento entre las moléculas de enzima mediante glutaraldehído (GA). El biosensor se preparó depositando una cantidad de 50 μ g de una mezcla laponita/PPO (1:1) sobre la superficie del electrodo. La película se dejó secar al aire a temperatura ambiente durante 3 horas y posteriormente se expuso el electrodo a vapor de GA durante 15 minutos con el fin de producir una reticulación química de las moléculas de enzima.

Shan y col. han propuesto un biosensor de laponita/PPO y han estudiado la morfología de la capa enzimática mediante microscopia electrónica de barrido (Shan et

al., 2003a). El tamaño de partícula de laponita es 40x10x1 nm, y la micrografía de la película laponita/PPO depositada en un electrodo de carbono vitrificado muestra una superficie compacta y lisa donde las partículas de arcilla y la enzima están unidas.

IV.5.3. RESPUESTA DEL BIOSENSOR DE LAPONITA/PPO A CATECOL, QUERCETINA Y RUTINA

Antes de proceder a la optimización del dispositivo, se estudió la respuesta del biosensor al catecol, quercetina y rutina (Figura 4.95). Las medidas se realizaron a un potencial de -0,1V vs. Ag/AgCl y 25°C, en 20 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 sobre la que se realizaron adiciones sucesivas de sustrato. Como se puede observar, la respuesta del biosensor fue mayor cuando se utiliza como sustrato rutina, en comparación con la obtenida con quercetina, por lo que la optimización del biosensor se llevó a cabo utilizando como sustrato rutina (Tabla 4.38). La sensibilidad y densidad de corriente máxima para rutina (7,5 mA M⁻¹ cm⁻² y 25,8 μA cm⁻²) fue marcadamente inferior a la obtenida con catecol con el mismo biosensor (2.700 mA M⁻¹ cm⁻² y 322 μA cm⁻²). El tiempo de respuesta para todos los sustratos fue de 12 segundos (Recuadro de la Figura 4.95), lo que pone de manifiesto la buena accesibilidad del sustrato al centro activo de la enzima en este sistema de inmovilización.

Para entender mejor la respuesta del biosensor de laponita frente a los diferentes compuestos fenólicos, se determinaron las constantes cinéticas del proceso. Al obtener índices de Hill próximos a uno en todos los casos, fue posible el cálculo de las constantes de Michaelis-Menten, utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk. Generalmente, los valores de la constante de Michaelis-Menten para catecol son menores cuando la PPO está inmovilizada que para la enzima libre (0,3 mM). Por ejemplo, K_m de catecol en electrodo de laponita/PPO y electrodo de pasta de carbono/PPO, fue 95 y 11 μM respectivamente (Shan y col., 2003a; Mailley y col., 2003). Esto se podría deber al proceso de reciclaje del sustrato en la superficie electródica (Besombes y col., 1996., Coche-Guerente y col., 1999a) ya que la quinona producida enzimáticamente se reduce electródicamente produciendo otra vez el sustrato (catecol). Este proceso de reciclaje da lugar a un aumento de la concentración del sustrato en la superficie del electrodo, produciéndose un aumento en la intensidad de corriente (amplificación de la señal) y generando valores más bajos de K_m aparente que los reales. Se calculó la K_{map} para quercetina y rutina cuando la PPO está inmovilizada, dando un valor de 1,5 y 1 mM respectivamente, mucho mayor que el

obtenido para catecol en esta matriz (95 μM) lo que confirma que el proceso de amplificación para quercetina y rutina está limitado, aún más limitado para quercetina, siendo posiblemente este el motivo de las diferencias de respuesta en el biosensor.

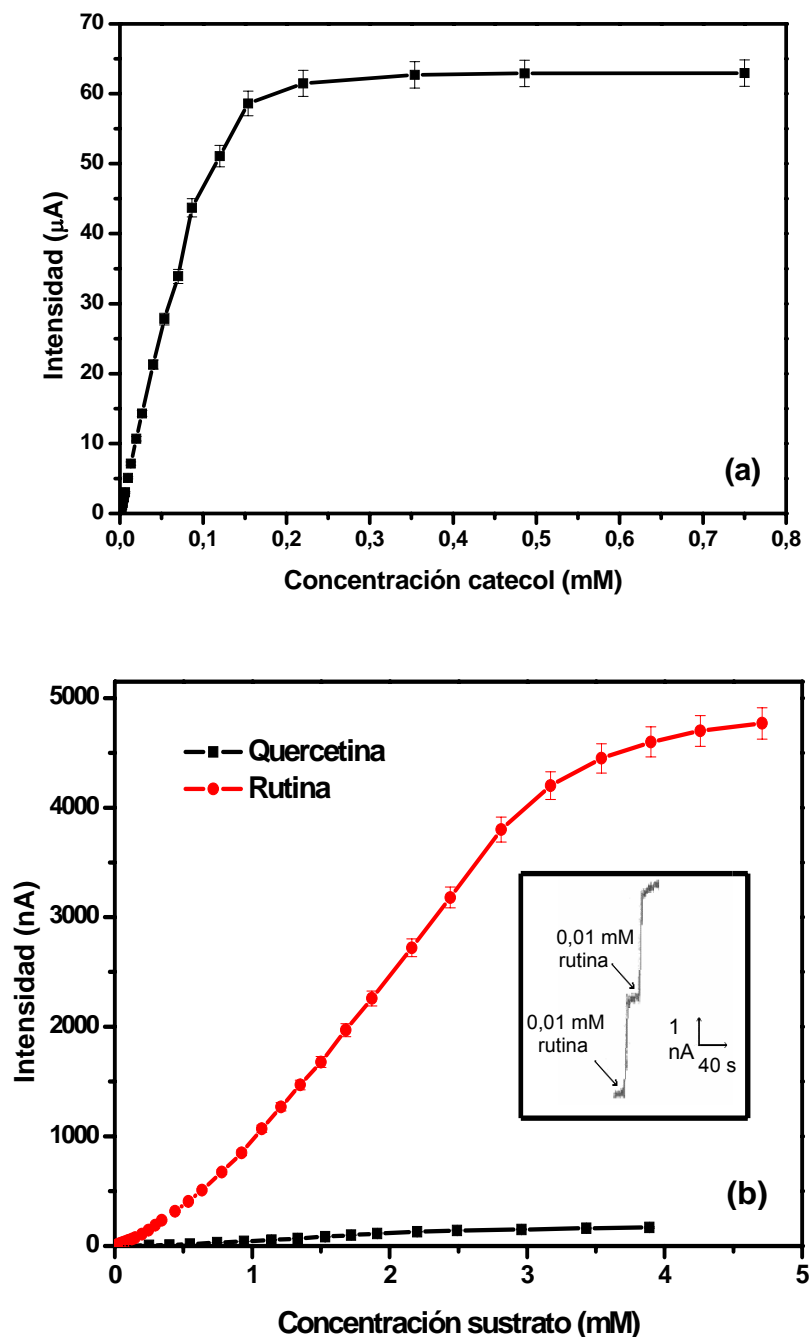


Figura 4.95.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores de laponita/PPO para (a) catecol y (b) quercetina y rutina. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, 25°C y -0,1V vs. Ag/AgCl. Recuadro.- Perfil intensidad-tiempo obtenido con el biosensor de laponita/PPO para rutina

Tabla 4.38.- Propiedades analíticas del biosensor de laponita/PPO dependiendo del sustrato a determinar

Sustrato	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
Catecol	1,02	2711,73	321,12	2,0 x 10 ⁻⁸ - 8,0 x 10 ⁻⁵	0,9986 (23)	0,02
Quercetina	1,03	0,40	0,90	4,0 x 10 ⁻⁴ - 2,0 x 10 ⁻³	0,9928 (10)	515
Rutina	1,02	7,50	25,80	4,0 x 10 ⁻⁴ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9942 (15)	6,2

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.5.4. OPTIMIZACIÓN DEL BIOSENSOR LAPONITA/PPO

IV.5.4.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimático

Shan y col. optimizaron los factores que afectan a la medida del biosensor de laponita/PPO para la determinación de fenoles simples y las mejores propiedades analíticas se obtienen con una proporción laponita/PPO (p/p) de 1 y manteniendo al electrodo en vapor de GA durante 15 minutos (Shan y col., 2003b). En nuestro trabajo se han mantenido estas condiciones y se han estudiado otros factores que están relacionados con la composición del electrodo:

- Secado de la película
- Cantidad de la mezcla laponita/PPO depositada sobre la superficie electródica

IV.5.4.1.1. Secado de la película

Una vez preparada la mezcla de PPO (2 mg/mL) y laponita (2 mg/mL), y depositada la cantidad exacta de mezcla (50 μg) en la superficie electródica, se procede a su secado. Este secado se puede realizar al aire durante 3 horas aproximadamente para que se produzca el secado total de la película, o sometiendo al electrodo a vacío durante 20 minutos. Después se procede a la reticulación química de las moléculas de enzima con glutaraldehído en ambos casos, manteniendo el electrodo durante 15 min en vapor de GA. Se realizan las curvas de calibrado (Figura 4.96) utilizando las 2 formas de secado, midiendo la respuesta del biosensor al añadir, a 20 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, concentraciones conocidas de rutina, realizando la medida a 25°C y -0,1V vs. Ag/AgCl. Todas las propiedades analíticas del biosensor empeoraron considerablemente cuando la película se secó mediante vacío (Tabla 4.39). Además, el tiempo de respuesta del

biosensor aumentó hasta 48 segundos al secar la película a vacío, por lo que en posteriores estudios la capa se dejó secar al aire. Este resultado confirma la importancia que el secado de la mezcla PPO/laponita tiene, ya que podría ocurrir que cuando el secado se produce rápidamente (en 20 minutos al vacío), la adsorción de la PPO no se puede producir de manera tan uniforme como en el caso de que el secado sea más lento (3 horas al aire).

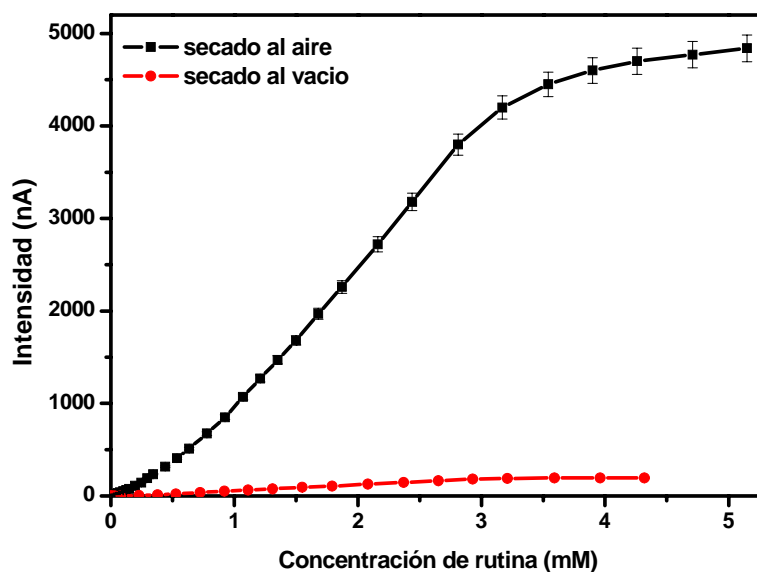


Figura 4.96.- Curvas de calibrado para el biosensor de laponita/PPO dependiendo de la forma de secado de la mezcla arcilla-enzima. Condiciones experimentales como en Figura 4.95

Tabla 4.39.- Propiedades analíticas del biosensor de laponita/PPO dependiendo de la forma de secado de la película sobre la superficie electródica

Forma de secado	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)	tr (s)
Vacío	1,08	0,3	1,0	4,0 x 10 ⁻⁴ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9994 (12)	229	48
Al aire	1,02	2,4		7,0 x 10 ⁻⁶ - 1,0 x 10 ⁻⁴	0,9994 (7)	6,2	12
		7,5	25,8	4,0 x 10 ⁻⁴ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9942 (15)		

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección; tr: tiempo de respuesta

IV.5.4.1.2. Cantidad de mezcla laponita/PPO depositada en el electrodo

La cantidad de película enzimática depositada en la superficie electródica constituye un parámetro importante que afecta en gran medida a la sensibilidad y densidad de corriente máxima del biosensor. Se varió la cantidad total de PPO y laponita depositada en la superficie del electrodo, manteniendo constante la proporción enzima:arcilla (p:p) en 1. Se prepararon 3 biosensores formados por una mezcla laponita-PPO de 25, 50 o 70 μg , y se realizaron las correspondientes curvas de calibrado que se muestran en la Figura 4.97. Las medidas se realizaron a $-0,1\text{V}$ vs. Ag/AgCl y 25°C , en 20 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 sobre la que se realizaron adiciones sucesivas de rutina.

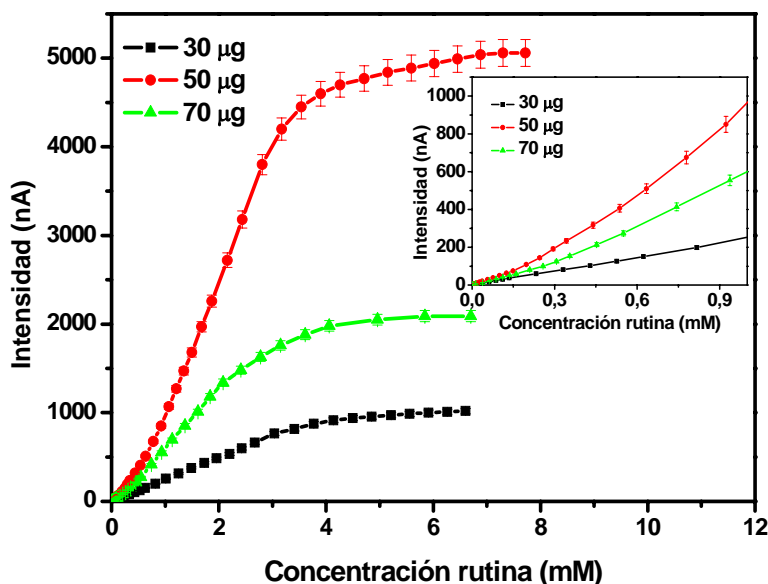


Figura 4.97.- Influencia de la cantidad de mezcla laponita/PPO depositada en el electrodo en la respuesta del biosensor. Condiciones experimentales como en Figura 4.95. Recuadro: zona lineal de la curva de calibrado para los distintos biosensores.

Un aumento en la cantidad de mezcla aumenta la cantidad de PPO presente entre la película de arcilla pero también aumenta la barrera difusional. Por eso, la cantidad óptima aparece como un balance entre estos 2 efectos. Cuando la película es muy fina, conteniendo 30 μg de la mezcla PPO/laponita, se obtuvo una respuesta pobre con una sensibilidad de $1,3 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Así, para una cantidad de mezcla laponita/PPO de 50 μg , el aumento de la carga enzimática mejora las características del biosensor, siendo éste el espesor óptimo, obteniéndose una sensibilidad máxima de $7,5 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. El aumento de cantidad de mezcla a 70 μg induce un marcado descenso de J_{max} que se puede deber a un aumento de la barrera difusional. Esto

hace que la oxidación enzimática ocurra más fácilmente en la superficie de la arcilla orientada hacia la disolución, el producto de la reacción enzimática encuentra más dificultad para acceder a la superficie electródica favoreciendo su difusión hacia la disolución tampón. Las propiedades analíticas de los correspondientes biosensores se muestran en la Tabla 4.40.

Tabla 4.40.- Influencia de la cantidad de mezcla en las propiedades analíticas del biosensor

Cantidad de mezcla laponita/PPO (μg)	n	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (μM)
30	1,02	1,3	5,2	$1,0 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-3}$	0,9990 (21)	12,7
50	1,02	2,4	25,8	$7,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	0,9994 (7)	6,2
		7,5		$4,0 \times 10^{-4} - 3,0 \times 10^{-3}$	0,9942 (15)	
70	1,04	1,8	10,7	$3,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	0,9950 (8)	37,8
		3,5		$2,0 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-3}$	0,9990 (13)	

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

Cuando la capa enzimática aumenta (50 y 70 μg), la curva de calibrado muestra 2 partes lineales (recuadro de la Figura 4.97), indicando una sensibilidad pequeña para bajas concentraciones de rutina (hasta 0,1 mM) seguido de un marcado aumento de sensibilidad para mayores concentraciones de sustrato. La baja sensibilidad encontrada cuando las concentraciones de rutina son bajas se puede atribuir a un fenómeno de adsorción de rutina a la matriz de laponita. Para concentraciones altas de rutina, los sitios de adsorción podrían estar saturados facilitando la permeabilidad de la rutina y su acceso al enzima, produciendo un aumento de sensibilidad.

IV.5.4.2. Optimización de la respuesta del biosensor

Para la optimización de las condiciones experimentales, potencial, pH y temperatura, se utilizó un biosensor formado por laponita/PPO, utilizando una cantidad de mezcla de enzima:arcilla de 50 μg (1:1) y produciendo una reticulación de PPO durante 15 minutos en vapor de glutaraldehído.

IV.5.4.2.1. Potencial aplicado

La influencia del potencial en la respuesta del biosensor se investigó midiendo la intensidad de corriente al añadir 0,5 mM de rutina a 20 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y 25°C, cuando el potencial varía entre -0,2 y 0 V vs. Ag/AgCl. Como muestra la Figura 4.98, la máxima respuesta se obtuvo a un potencial de -0,1V vs. Ag/AgCl. El descenso de la intensidad de corriente a potenciales menores a -0,1V ya se vio con los biosensores de micropartículas de LIPs y de poli (vinilimidazol) para la determinación de catecol, y como explicábamos se puede deber a un descenso en la concentración de oxígeno que produciría una disminución en la reacción enzimática, o bien a la polimerización de las o-quinonas producidas enzimáticamente.

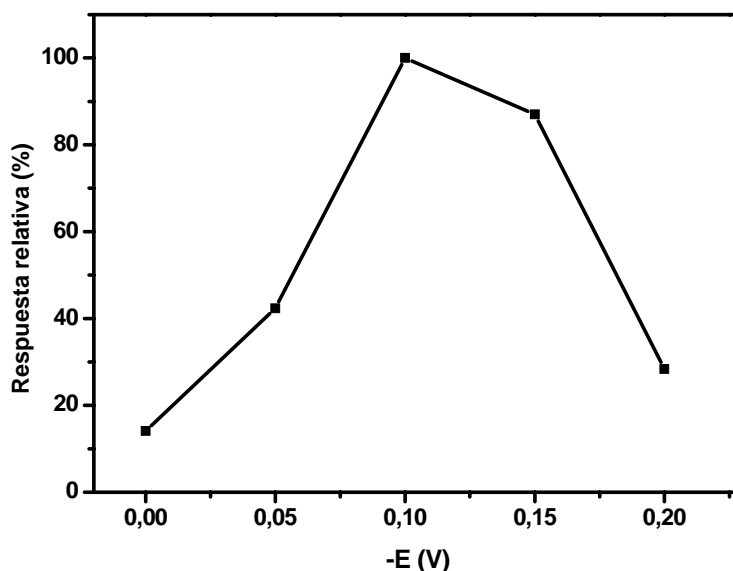


Figura 4.98.- Variación de la intensidad de corriente medida en función del potencial. 0,5 mM de rutina, disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y 20°C,

IV.5.4.2.2. pH

La influencia del pH de la disolución tampón se estudió en el intervalo de 5,5-8,0, midiendo la respuesta del biosensor a los distintos pHs para una concentración de rutina de 6 mM, a un potencial de -0,1V vs. Ag/AgCl y 25°C. Como muestra la Figura 4.99, se obtuvo un pH óptimo de 6,5 produciendo un descenso brusco de intensidad, del 60%, cuando ese valor de pH se encuentra una unidad por debajo y por encima del óptimo.

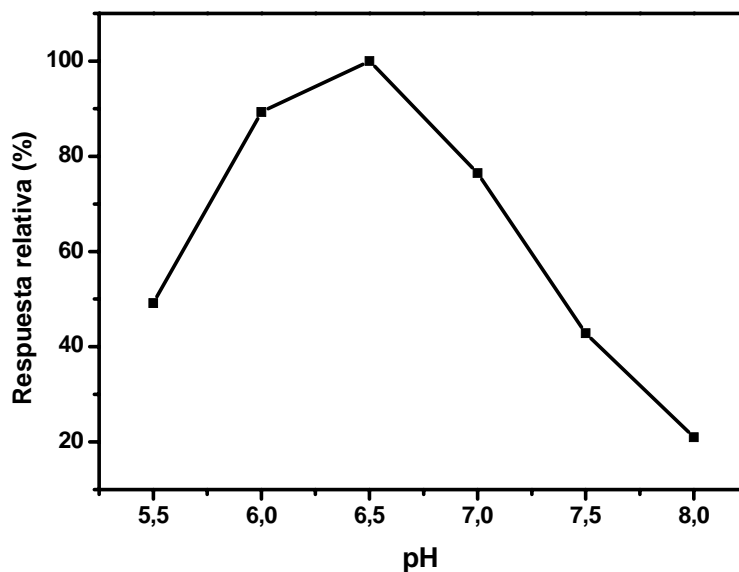


Figura 4.99.- Influencia del pH en la respuesta del biosensor. 6 mM de rutina, disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, -0,1V y 20°C

IV.5.4.2.3. Temperatura

La respuesta del biosensor dependiendo de la temperatura se estudió en el intervalo de 5-45 °C (Figura 4.100), registrando la corriente generada al añadir 6 mM de rutina a la célula electroquímica que contenía 20 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5 y -0,1V vs. Ag/AgCl. La temperatura óptima fue 30°C, pero al realizar el estudio de estabilidad térmica se vio como a temperaturas superiores a 25°C se producía desnaturalización enzimática por lo que se utilizó una temperatura de 25°C en posteriores estudios. La representación de Arrhenius (Figura 4.101) se realizó en el intervalo de temperaturas en el cual no se produce desnaturalización enzimática (5-25°C), observándose una única recta de cuya pendiente se deriva una energía de activación de 44,4 KJ/mol. En el caso del mismo biosensor de laponita/PPO pero utilizando catecol como sustrato, también se obtuvo un único tramo lineal en la representación de Arrhenius con una energía de activación de 35 KJ/mol (Shan y col., 2003a), por lo que deducimos que en este sistema de inmovilización no se producen cambios ni en el medio de inmovilización ni en la conformación de la enzima en el intervalo de temperaturas estudiado.

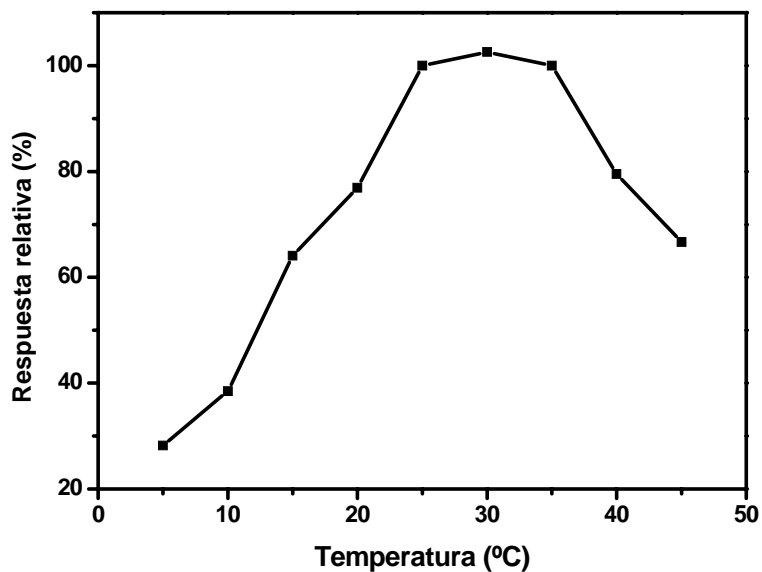


Figura 4.100.- Respuesta relativa del biosensor en función de la temperatura. 0,5 mM rutina, disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5 y -0,1V

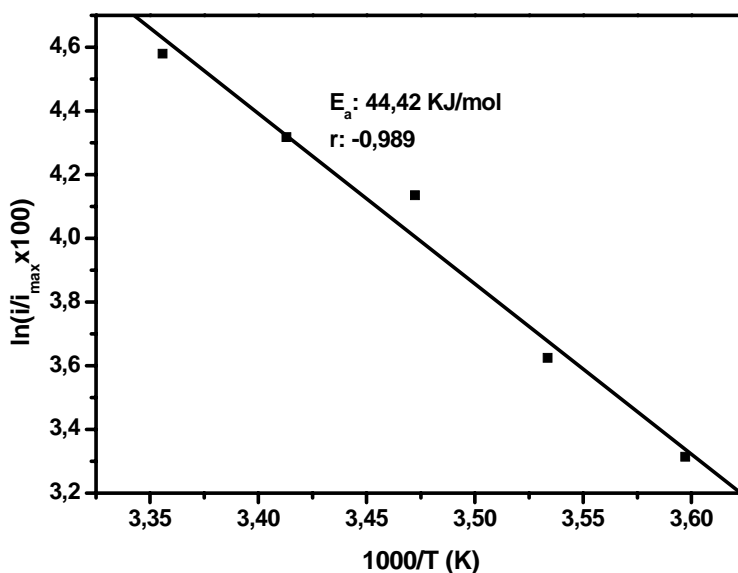


Figura 4.101.- Representación de Arrhenius para el biosensor de laponita/PPO obtenidas con los resultados de la Figura 4.100

La actividad del biosensor depende de diferentes factores. Difusión del sustrato, difusión del producto, actividad catalítica de la enzima inmovilizada y eficacia

de la reacción electroquímica. El coeficiente de difusión de la rutina en disolución fue calculado por Zeng y col. siendo alrededor de $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Zeng y col, 2006). Este valor es próximo al encontrado para el catecol en disolución, $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Coche-Guerente y col., 1999b), el cual disminuye a $2,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ cuando el catecol difunde hacia la película de laponita (Wang y Li., 1996). Con el fin de examinar la difusión o posible adsorción de la rutina hacia la película laponita-PPO, se llevó a cabo la siguiente experiencia. Se realizaron una serie de voltamperometrías cíclicas de rutina en la superficie del electrodo de carbono vitrificado, observándose siempre un pico de oxidación reversible sin ningún descenso de la intensidad del pico de corriente después de sucesivos barridos (Figura 4.102a). Además, se midió la oxidación electroquímica de la rutina en el biosensor PPO/laponita después de la desactivación de la enzima por calentamiento del electrodo a 65°C durante 30 minutos. La intensidad del pico de corriente de oxidación de la rutina con el electrodo modificado se mantuvo constante al variar la velocidad de rotación del electrodo indicando que se produce un proceso de adsorción de la rutina en la laponita (Figura 4.102b), no pudiéndose calcular el coeficiente de difusión de la rutina hacia la película de laponita.

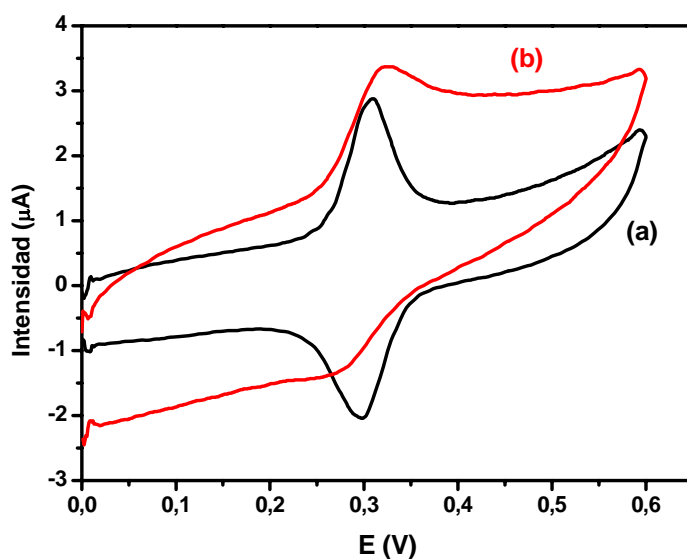


Figura 4.102.- Voltamperogramas cíclicos de 0,1 mM de rutina (a) en un electrodo de carbono vitrificado no modificado y (b) en un electrodo modificado de laponita/PPO inactiva. ($v = 50 \text{ mV/s}$, disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0).

IV.5.5. RESPUESTA DEL BIOSENSOR EN CONDICIONES EXPERIMENTALES ÓPTIMAS

Se realizó la curva de calibrado para rutina en las condiciones experimentales óptimas: el biosensor se preparó utilizando una cantidad laponita/PPO 50 μg (1:1) y realizando un entrecruzamiento con GA durante 15 minutos. Las medidas amperométricas se realizaron en 20 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,5, 25°C, aplicando un potencial de -0,1 V vs. Ag/AgCl (Figura 4.103). Se obtuvieron también dos zonas lineales con distinta pendiente, la primera con sensibilidad 3,4 $\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$, intervalo lineal $7,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$, y la segunda con una sensibilidad de 10,0 $\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$, intervalo lineal $4,0 \times 10^{-4}$ - $3,0 \times 10^{-3}$. El límite de detección fue de 2,5 μM , densidad de corriente máxima de 36,1 $\mu\text{A cm}^{-2}$ y el tiempo de respuesta de 12 segundos.

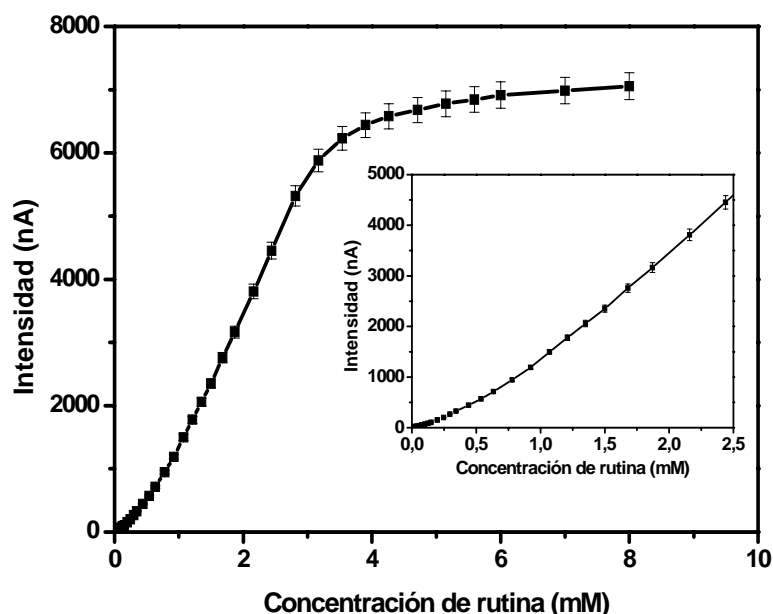


Figura 4.103.- Curva de calibrado para rutina con laponita/PPO en condiciones experimentales óptimas. Recuadro: zona lineal de la curva de calibrado para los distintos biosensores

IV.5.6. ESTUDIO DE PRECISIÓN

Se evaluó la precisión del método en la determinación de rutina estudiando la repetibilidad y precisión intermedia. En el estudio de la repetibilidad se realizaron 10 medidas de una disolución de rutina, con el mismo biosensor y el mismo día. Se seleccionaron 3 concentraciones de rutina, todas ellas dentro de la zona lineal. Los coeficientes de variación obtenidos al utilizar concentraciones de rutina de 7 μM , 0,5

mM y 3 mM fueron 9,79, 3,44 y 1,87% respectivamente, CV mucho menores que los máximos aceptables en función de la concentración de analito según Horwitz (ver Tabla 3.5).

Para el estudio de la precisión intermedia se realizaron 20 medidas de una disolución de 0,5 mM de rutina en 2 días consecutivos (10 medidas cada día). En la Figura 4.104 se muestra el gráfico de cajas y bigotes obtenido, observándose que la dispersión de las medidas es semejante el primer (CV 3,44%) y segundo día (3,79%). El valor p obtenido para la comparación de las medias fue 0,7747 y para la comparación de las varianzas 0,7711, no observándose diferencias estadísticamente significativas en los dos días de estudio (valor $p > 0,05$).

Los resultados obtenidos demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con el biosensor laponita/PPO en la determinación de rutina.

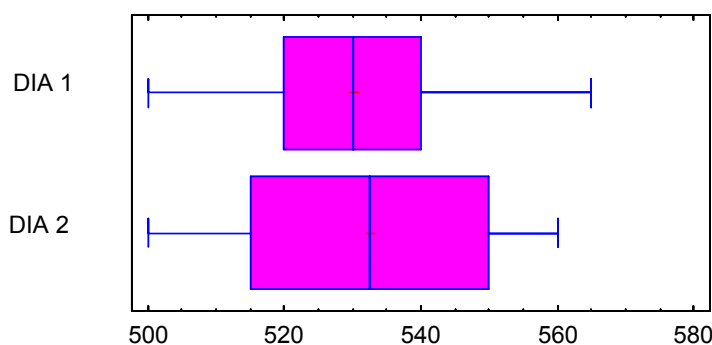


Figura 4.104.- Gráfico de cajas y bigotes

IV.5.7. ESTABILIDAD

Para realizar el estudio, el electrodo se sumergió en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y se guardó a -4°C . Cada 3 días se realizó una curva de calibrado para rutina, y se midió la sensibilidad (Figura 4.105). El biosensor mantiene el 98% de la sensibilidad inicial durante 7 días, a partir de ese día comienza a descender hasta un valor del 17%, transcurridos 12 días.

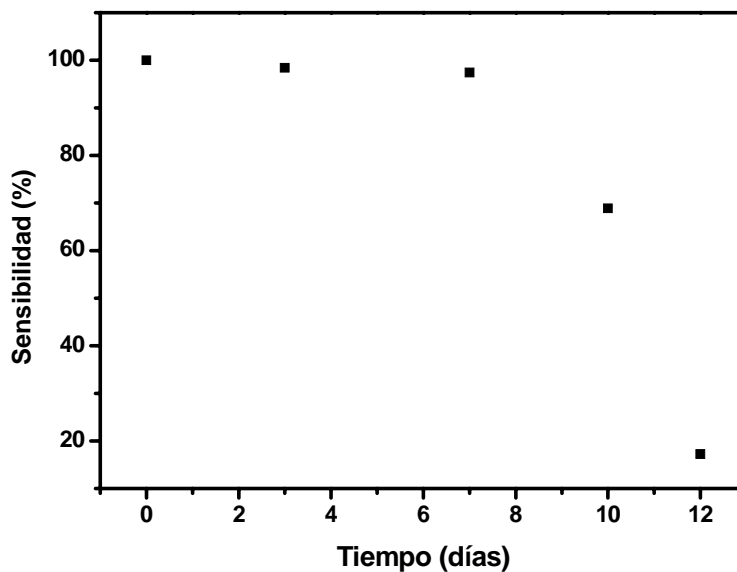
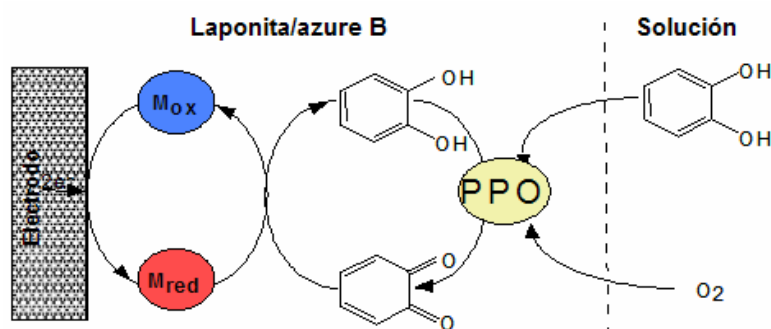


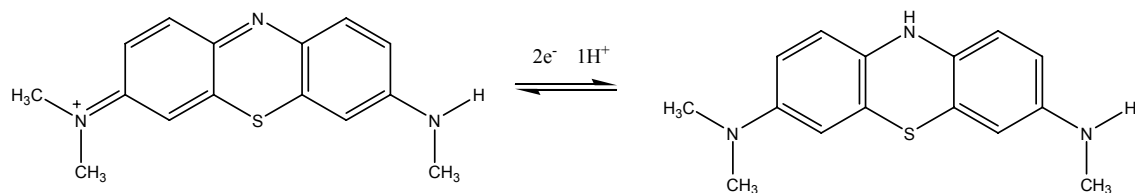
Figura 4.105.- Estabilidad del biosensor de laponita/PPO

IV.5.8. BIOSENSOR DE LAPONITA/AZURE B/PPO

La propiedad de intercambio catiónico de la laponita puede ser utilizada para la incorporación electrostática de un mediador redox (Shan y col., 2003b). Con el fin de conocer el efecto que puede tener la incorporación de un mediador en el espacio interlamilar de la laponita, en las propiedades analíticas del biosensor, se ha utilizado azure B para la fabricación del biosensor. Al utilizar dicho mediador, la quinona producida enzimáticamente se reduce por el mediador redox (M) oxidándose éste. La detección amperométrica se basa en la posterior reducción del mediador a un potencial de $-0,1V$ vs. $Ag/AgCl$ (Esquemas 4.5 y 4.6).



Esquema 4.5.- Proceso electroenzimático PPO/azure B



Esquema 4.6.- Reducción electroquímica del azure B

IV.5.8.1. Preparación del biosensor de laponita/azure B/PPO

Se prepara una suspensión de laponita (2 mg/mL) y una disolución concentrada de azure B (5mg/mL). Se mezclan 0,5 mL de la suspensión de laponita (1 mg) con 24 μ L de la disolución del mediador (120 μ g) y se deja en agitación durante 1 hora. Se prepara una disolución de tirosinasa (2 mg/mL) y se añaden 0,5 mL a la mezcla laponita/PPO. Un volumen definido de la mezcla laponita/azure B/PPO (25 μ L) se deposita en la superficie del electrodo. En concreto, se colocan en el electrodo las siguientes cantidades: 25 μ g de PPO, 25 μ g de laponita y 3 μ g de azure B. dejando secar la película al aire. Se mantiene el electrodo durante 15 minutos en vapor de glutaraldehído para producir la reticulación y después se incuba durante 20-30 minutos en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 con agitación a 500 rpm.

Sabiendo que la laponita presenta una capacidad de intercambio catiónico de 0,73 meq/g, al utilizar 25 μ g de laponita se puede intercambiar como máximo $1,8 \cdot 10^{-8}$ moles de azure B (6 μ g). Así se realizó otro biosensor utilizando la cantidad máxima de azure B que puede ser intercambiada.

IV.5.8.2. Resultados

El primer estudio que se realizó fue la influencia del potencial de trabajo con el fin de saber si la incorporación del mediador produce una disminución de dicho potencial. Como resultado se obtuvo que el potencial óptimo fue de -0,1V, el mismo que el obtenido con el biosensor sin mediador. Posteriormente, y con el fin de saber si se han mejorado las propiedades analíticas del biosensor se realizaron las curvas de calibrado para rutina a un potencial de trabajo de -0,1V en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0. En la Tabla 4.41 se muestran las propiedades analíticas de los biosensores de laponita/PPO y laponita/azure B/PPO en la determinación de rutina.

Tabla 4.41.- Propiedades analíticas de los biosensores de laponita/PPO sin y con mediador

Biosensor	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
laponita/PPO	2,4		7,0 x 10 ⁻⁶ - 1,0 x 10 ⁻⁴	0,9994 (7)	6,2
	7,5	25,8	4,0 x 10 ⁻⁴ - 3,0 x 10 ⁻³	0,9942 (15)	
laponita/PPO/ azure B (3 μg)	8,0	4,5	3,0 x 10 ⁻⁶ - 2,0 x 10 ⁻⁴	0,9980 (13)	2,7
laponita/PPO/ azure B (6 μg)	10,8	5,6	2,0 x 10 ⁻⁶ - 1,0 x 10 ⁻⁴	0,9980 (8)	4,5

J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

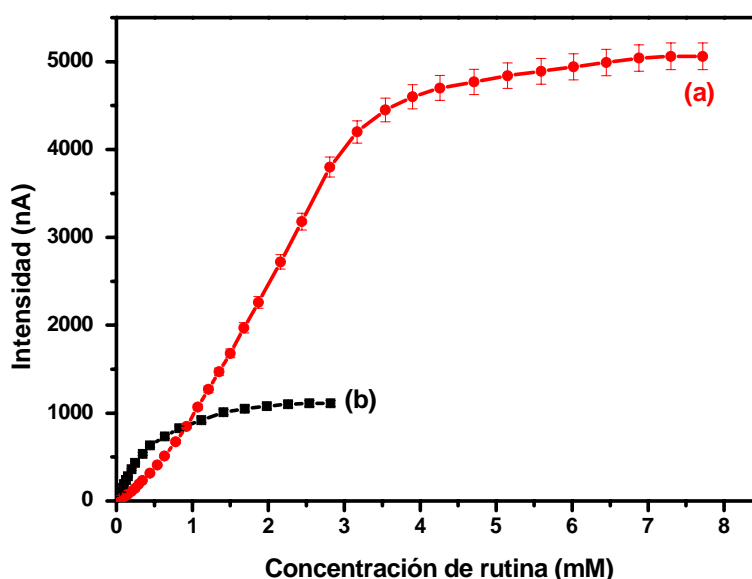


Figura 4.106.- Curvas de calibrado para rutina utilizando un biosensor de (a) laponita/PPO y (b) laponita/PPO/azure B con 3 μg de mediador en el electrodo.

El proceso de detección con mediador produce un descenso del límite de detección en comparación con el biosensor de laponita/PPO. Además se produce un pequeño aumento de la sensibilidad al utilizar laponita/PPO/azure B, mientras que la densidad máxima fue 4 veces inferior que la encontrada para biosensor sin mediador. La incorporación de una cantidad de azure B alta, puede inducir obstáculos estéricos drásticos, debido a interacciones electrostáticas, hacia la permeabilidad de la rutina a través de la capa de la arcilla-PPO. En este caso, solo una pequeña parte de la

enzima inmovilizada en la capa externa puede ser alcanzada por el sustrato. Se observa que las curvas de calibrado registradas para los biosensores formados con mediador presentan sólo una zona lineal con un límite superior máximo de 3×10^{-4} M mientras que los biosensores de laponita/PPO presentan 2 partes lineales con una primera parte de inducción hasta que tiene lugar el proceso de amplificación correctamente (segunda zona), a partir del cual la reacción enzimática se produce normalmente (Figura 4.106). Esta diferencia se puede atribuir a la presencia del azure B que previene la adsorción de la rutina. Aunque los resultados obtenidos no han sido satisfactorios al incorporar azure B en laponita, este estudio abre la posibilidad de incorporación de mediadores en este tipo de matrices.

IV.6. Biosensor amperométrico enzimático fabricado a partir de brushita

IV.6.1. INTRODUCCIÓN

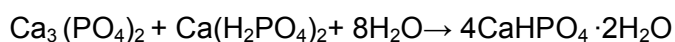
Los buenos resultados obtenidos con el biosensor de laponita, nos animaron a utilizar otra matriz similar para la inmovilización de tirosinasa. En este capítulo proponemos un nuevo medio de inmovilización inorgánico, en el cual la enzima se une mediante un proceso de adsorción en fosfatos cálcicos. Se utiliza la brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ya descrita con detalle en la parte experimental, apartado 3.2.2.

IV.6.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR

La inmovilización de la enzima y preparación del biosensor se realizó con el mismo procedimiento utilizado en el capítulo anterior. Se procedió a la adsorción de la enzima en brushita y posterior entrecruzamiento de las moléculas de enzima con glutaraldehído (Parte experimental, apartado 3.3.2.). Como material para la adsorción de la enzima se utilizan dos variedades, utilización de brushita pura y cemento de brushita.

Se ha probado a diseñar un biosensor directamente utilizando brushita pura, comercial, sal insoluble en agua. En primer lugar se forma una suspensión de brushita en agua desionizada (2 mg/mL). Posteriormente, se mezcla con una disolución de PPO en disolución tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 (2 mg/mL) y se deposita una cantidad exacta de la mezcla en la superficie de un electrodo de carbono vitrificado, produciéndose al cabo de 2 horas el secado de la película.

Otro proceso ensayado ha sido la utilización de cemento de brushita. Estos cementos se obtienen por precipitación, a temperatura ambiente, de una disolución acuosa formada por los precursores de la brushita. Primero se forma una mezcla sólida de β -tricalcio fosfato (1,43 g) con monocalcio fosfato (0,80g). Posteriormente, se prepara una disolución de 2 mg de la mezcla en 1 mL de agua desionizada y se mezcla con una disolución de enzima de 2mg/mL. Se deposita una cantidad exacta de esta mezcla en la superficie electródica, y en el proceso de secado, precipita la brushita, sal insoluble, dando lugar al llamado cemento de brushita.



La diferencia entre ambos métodos es que en el caso de utilizar brushita pura, ésta ya está formada cuando se deposita la mezcla PPO/brushita y se seca en el electrodo. En cambio, en el caso del cemento de brushita, en la superficie electródica

se deposita una mezcla de la enzima junto con los precursores de la brushita y es en el proceso de secado de la película cuando se forma la brushita.

Para la preparación del biosensor en ambos casos se depositó una cantidad enzima:matriz de 25 μL (50 μg), proporción 1:1, en la superficie del electrodo de carbono vitrificado. La película se dejó secar al aire a temperatura ambiente durante 3 horas y posteriormente se produjo una reticulación de las moléculas de enzima, manteniendo al electrodo durante 15 minutos en vapor de glutaraldehído.

IV.6.3. CARACTERIZACIÓN DEL BIOSENSOR

Con el fin de conocer las diferencias entre las dos películas una vez producido el proceso de secado, se realizó un estudio mediante las técnicas de espectroscopia de absorción infrarroja y microscopia electrónica de barrido. Para realizar los espectros en el infrarrojo, se prepararon mezclas PPO-cemento de brushita y PPO-brushita pura en las mismas proporciones que las depositadas en el electrodo (50 μg de mezcla con proporción 1:1), se dejaron secar en la superficie de zirconio y se realizó el espectro de IR entre 500 y 1500 cm^{-1} (Figura 4.107). Una vez alcanzado el secado total, se pueden ver en ambos casos picos a 1130, 1050, 980 y 860 cm^{-1} (P-O) que se asocian al fosfato dicálcico dihidrato (brushita).

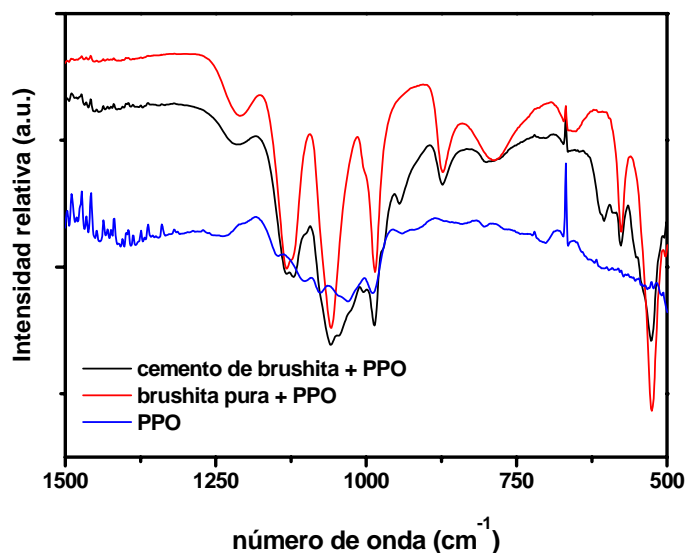


Figura 4.107.- Espectro IR de las muestras de PPO/brushita pura, PPO/cemento de brushita y PPO

Las micrografías obtenidas con la película de cemento de PPO/brushita y brushita pura/PPO depositada en la superficie electródica se muestran en la Figura 4.108. La capa del biosensor está formada por pequeñas partículas, más pequeñas en la muestra de cemento de brushita que en la brushita pura.

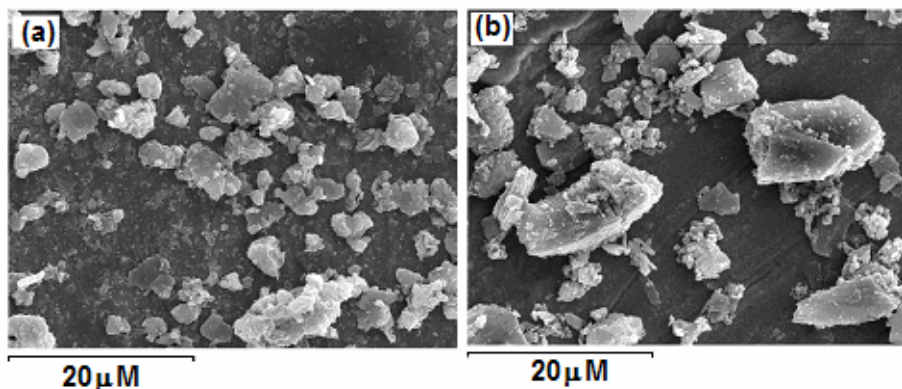


Figura 4.108.- Micrografía de las muestras (a) PPO/cemento de brushita y (b) PPO/brushita pura

IV.6.4. RESPUESTA DEL BIOSENSOR DE BRUSHITA PURA Y CEMENTO DE BRUSHITA A CATECOL

Con el fin de estudiar si de alguna manera se ve afectado el proceso de inmovilización de la enzima al utilizar brushita pura o cemento de brushita y previo a la optimización del biosensor, se realizó un estudio comparativo de las curvas de calibrado obtenidas al utilizar el biosensor de PPO/brushita pura y el de PPO/cemento de brushita. Para la preparación del biosensor se depositó una cantidad de la mezcla enzima:matriz de 25 μL , proporción 1:1, en la superficie del electrodo de carbono vitrificado. La película se dejó secar al aire a temperatura ambiente durante 3 horas y posteriormente se produjo una reticulación de las moléculas de enzima, manteniendo al electrodo durante 15 minutos en vapor de glutaraldehído. Las medidas se realizaron a $-0,1\text{V}$ vs. ECS y 20°C , registrando la corriente generada tras adiciones sucesivas de catecol en 10 mL de una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, hasta llegar a la concentración de sustrato correspondiente a la saturación enzimática (Figura 4.109). El tiempo de respuesta fue en ambos casos de 12 s (Figura 4.110), lo que demuestra la buena accesibilidad del sustrato a la enzima y del producto de la reacción enzimática a la superficie electródica. La intensidad de corriente máxima es prácticamente igual en ambas matrices, pero la sensibilidad del biosensor ($42,56 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) preparado con cemento fue 10 veces mayor que la obtenida con brushita pura ($4,35 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), además de obtenerse límites de detección mucho menores (Tabla

4.42). Las constantes cinéticas no pudieron ser calculadas en ningún caso ya que el coeficiente de Hill fue mayor de 1,2 en las dos matrices. Este aumento de sensibilidad al utilizar el biosensor formado por cemento de brushita se puede deber a que al ser las partículas más pequeñas en el caso del cemento de brushita, pueden facilitar el acceso del sustrato a la enzima y del producto a la superficie electródica. Por ello, se descartó la brushita pura y los siguientes biosensores se prepararon con cemento de brushita.

Con el fin de conocer las posibles mejoras en las propiedades analíticas del biosensor al producirse la adsorción de la enzima en brushita previo a la reticulación de la enzima con glutaraldehído, se desarrolló un biosensor donde solamente se realizó reticulación enzimática (PPO/GA). Se preparó una disolución de 2 mg de enzima en 1 mL de disolución tampón de fosfato, se depositaron 12,5 μL de esta disolución en la superficie del electrodo de carbono vitrificado y posteriormente se realizó el entrecruzamiento de las moléculas de enzima, por exposición del biosensor a vapor de GA durante 15 minutos. En la Tabla 4.42 se muestran las propiedades analíticas obtenidas con los biosensores, y todas ellas mejoraron al producir la adsorción de la enzima en brushita, previa reticulación con glutaraldehído. Además, la estabilidad del biosensor de PPO/GA fue menor (se pierde el 20% de la actividad pasados 4 días y el 60% transcurridos 7 días) que la obtenida con el biosensor de PPO/brushita.

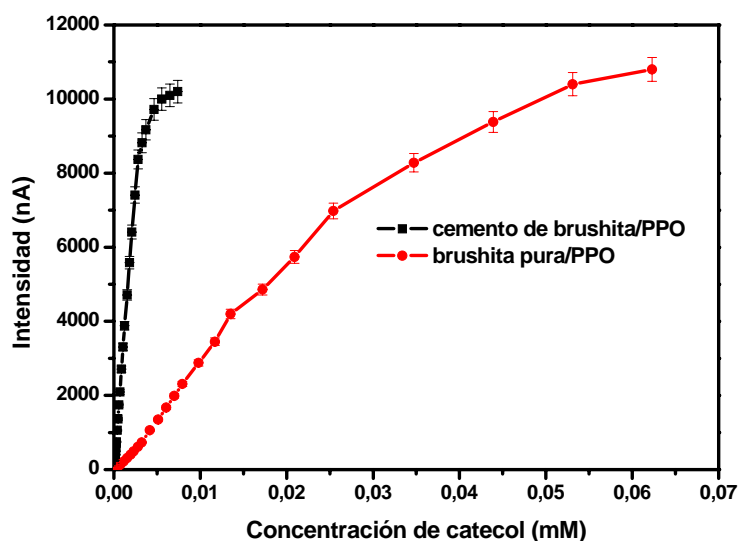


Figura 4.109.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores de brushita pura y cemento de brushita. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, -0,1V vs. ECS y 20°C.

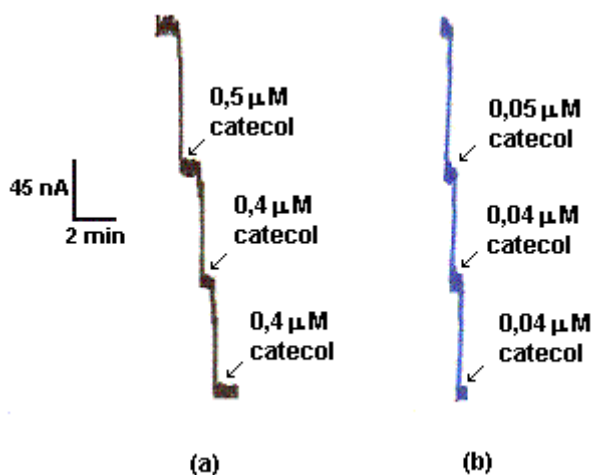


Figura 4.110.- Perfiles intensidad-tiempo originadas por (a) el biosensor de brushita pura/PPO y (b) el biosensor cemento de brushita /PPO al adicionar catecol

Tabla 4.42.- Propiedades analíticas de los biosensores de PPO con brushita pura o cemento de brushita

matriz	n	Sensibilidad ($A M^{-1} cm^{-2}$)	J_{max} ($\mu A cm^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (nM)
brushita pura/PPO	1,25	4,35	162,86	$3,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	0,9975 (19)	100
cemento de brushita/PPO	1,30	42,56	145,71	$3,0 \times 10^{-9} - 3,0 \times 10^{-6}$	0,9989 (25)	3
GA/PPO	1,20	2,49	108,43	$1,5 \times 10^{-7} - 3,0 \times 10^{-5}$	0,9996 (24)	150

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.6.5. OPTIMIZACIÓN DEL BIOSENSOR DE PPO/BRUSHITA

La optimización se ha llevado a cabo con el biosensor preparado con cemento de brushita porque fue el que presentó mejores propiedades analíticas. Se ha realizado un estudio individualizado de los factores experimentales que pueden influir en el sistema de inmovilización y en la respuesta del biosensor, con el fin de conseguir las mejores propiedades analíticas de este dispositivo. A partir de ahora se utilizará el término brushita para referirnos al cemento.

Optimización del sistema de inmovilización enzimática

Se han estudiado los factores que afectan a la composición de la película PPO/brushita que se deposita en la superficie electródica y la reticulación enzimática que se produce posteriormente. Estos parámetros son:

- Relación PPO/brushita
- Cantidad de mezcla PPO/brushita
- Entrecruzamiento con glutaraldehído

Optimización de la respuesta del biosensor

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de inmovilización enzimática, en este apartado se estudiaron las variables analíticas que afectan a la respuesta del biosensor.

- Potencial aplicado
- pH
- Temperatura

IV.6.5.1. Optimización del sistema de inmovilización enzimática

IV.6.5.1.1. Relación enzima/brushita

Con el fin de estudiar la cantidad de brushita necesaria para la inmovilización de una determinada cantidad de enzima, se estudió el efecto que tiene la relación PPO/brushita (p/p) de la mezcla depositada en el electrodo, en las propiedades del biosensor, variando la relación PPO/brushita entre 0,25-1,5 (p:p). La cantidad de enzima se mantuvo constante en todas las experiencias (25 μg) pero la cantidad de brushita fue variando en cada caso siendo de 100 μg para una relación PPO/brushita de 0,25, 50 μg para el biosensor de PPO/brushita 0,5, 25 μg cuando la proporción enzima/brushita es 1 y 16,7 μg de brushita cuando la relación es 1,5. Después de la reticulación enzimática con GA, se mantuvo el biosensor en una disolución tampón de fosfato 0,1 M durante 20 minutos mediante agitación para eliminar la enzima sin inmovilizar, midiéndose la actividad enzimática de esta disolución.

Las curvas de calibrado obtenidas con los distintos biosensores a 20°C, -0,1V vs. ECS en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 se muestran en la Figura 4.111. Como también se observa en la Tabla 4.43, la sensibilidad e intensidad de corriente máxima aumentó a medida que la relación PPO/brushita aumentaba de 0,25 a 1, y a valores superiores se observó un descenso en la sensibilidad. Cuando la

relación enzima/brushita es de 0,25 o 0,5, el descenso en la intensidad de corriente se puede deber a un problema difusional producido por la brushita tan elevada utilizada en la preparación del biosensor, siendo más acentuado el descenso de la corriente al utilizar una cantidad de brushita en la mezcla de 100 μg . El aumento del tiempo de respuesta de 12 s al utilizar una cantidad de brushita de 25 μg a 20 s al utilizar 100 μg de brushita en la preparación del biosensor, confirma esta hipótesis. Al utilizar una relación PPO/brushita de 1,5, también se produce disminución de la corriente probablemente debido a que esa cantidad de brushita no es suficiente para inmovilizar eficientemente todas las moléculas de enzima produciéndose una saturación enzimática en la brushita y perdiéndose parte de la enzima. Esta hipótesis se confirma con la existencia de enzima en la disolución tampón de fosfato inicial. La composición óptima encontrada fue, por tanto, una relación PPO/brushita de 1, ya que además de una mayor sensibilidad, el intervalo lineal fue mayor y menor el límite de detección, utilizándose en las siguientes experiencias.

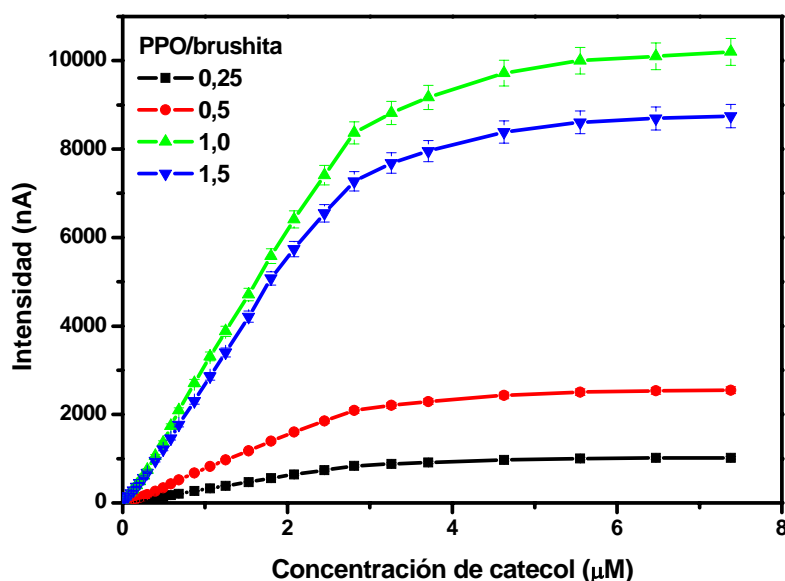


Figura 4.111.- Curvas de calibrado de diferentes biosensores en función de la relación PPO/brushita depositada en la superficie eléctrica. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, -0,1V vs. ECS y 20°C.

Tabla 4.43.- Propiedades analíticas del biosensor en función de la relación PPO/brushita utilizada

Relación PPO/brushita	n	Sensibilidad ($A M^{-1} cm^{-2}$)	J_{max} ($\mu A cm^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (nM)
0,25	1,27	3,55	14,50	$1,5 \times 10^{-8} - 3,0 \times 10^{-7}$	0,9992 (17)	10
0,5	1,24	11,11	36,40	$9,0 \times 10^{-9} - 2,5 \times 10^{-6}$	0,9990 (22)	5
1,0	1,30	42,56	145,71	$3,0 \times 10^{-9} - 3,0 \times 10^{-6}$	0,9989 (25)	3
1,5	1,25	28,57	124,90	$9,0 \times 10^{-9} - 3,0 \times 10^{-7}$	0,9995 (11)	9

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.6.5.1.2. Cantidad de mezcla PPO/brushita depositada en el electrodo

Sabiendo que la relación de PPO/brushita con la que se obtuvo una mayor respuesta fue 1, se estudió la influencia del aumento de la cantidad de mezcla PPO/brushita depositada en la superficie del electrodo, con el fin de llegar a una relación de compromiso ya que por un lado el aumento de enzima provocará un aumento de respuesta en el biosensor pero además, el aumento de brushita puede producir problemas difusionales en el proceso. Para este estudio se prepararon 3 biosensores variando la cantidad de mezcla PPO/brushita depositada en el electrodo, manteniendo la relación de la mezcla en 1 y se midió la respuesta tras las adiciones de catecol hasta llegar a la saturación enzimática, trabajando a $20^{\circ}C$ y $-0,1V$ vs. ECS (Figura 4.112). Al pasar de $30\mu g$ a $50\mu g$ de mezcla PPO/brushita, se produce un aumento en la intensidad de corriente máxima debido al incremento de enzima incorporada en el electrodo. Para películas con $100\mu g$ de mezcla, se obtuvo una respuesta menor probablemente debido a que el aumento de la barrera difusional haga que la oxidación enzimática del catecol ocurra más fácilmente en la superficie del cemento orientada hacia la disolución, se dificulte el acceso de la o-quinona producida enzimáticamente hacia la superficie electródica, favoreciendo su difusión hacia la disolución tampón. Las propiedades analíticas de los correspondientes biosensores se muestran en la Tabla 4.44.

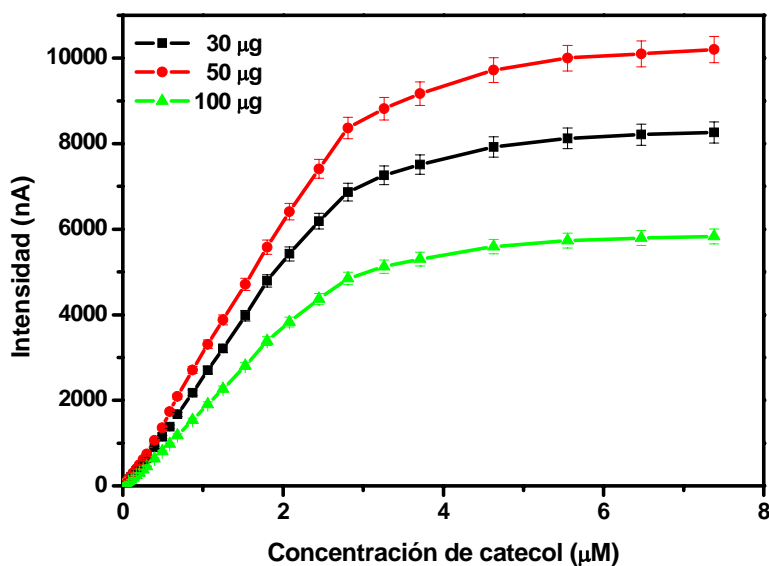


Figura 4.112.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores preparados con PPO/brushita en función de la cantidad de mezcla enzima-brushita depositada en la superficie electrónica. Condiciones experimentales como en la Figura 4.111

Tabla 4.44.- Propiedades analíticas del biosensor de PPO/brushita dependiendo de la cantidad de mezcla depositada en el electrodo

Cantidad de mezcla PPO/brushita (µg)	n	Sensibilidad ($A M^{-1} cm^{-2}$)	J_{max} ($\mu A cm^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (N)	LD (nM)
30	1,27	37,65	118,03	$6,0 \times 10^{-9} - 3,0 \times 10^{-7}$	0,9995 (13)	9
50	1,30	42,56	145,71	$3,0 \times 10^{-9} - 3,0 \times 10^{-6}$	0,9989 (25)	3
100	1,35	28,57	83,34	$1,0 \times 10^{-8} - 3,0 \times 10^{-7}$	0,9995 (11)	9

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.6.5.1.3. Entrecruzamiento con glutaraldehído

La adsorción es un método de inmovilización físico y las uniones entre la matriz y la enzima son débiles. Con el fin de ralentizar la pérdida progresiva de enzima, se lleva a cabo un entrecruzamiento entre las moléculas de enzima mediante la exposición del electrodo modificado a la acción de vapor de glutaraldehído. En este apartado se estudia el tiempo que hay que mantener al electrodo en vapor de

glutaraldehído para obtener el óptimo entrecruzamiento enzimático. Para ello, se prepararon distintos biosensores PPO/brushita manteniéndolos en vapor de glutaraldehído durante diferentes tiempos (0-25 min). En la Figura 4.113 se muestran las curvas de calibrado obtenidas. La sensibilidad fue aumentando a medida que aumentaba el tiempo de exposición y por tanto la reticulación, y se mantuvo constante a partir de 15 minutos. Las propiedades analíticas se muestran en la Tabla 4.45 y fueron prácticamente iguales al producir el entrecruzamiento enzimático durante 15 y 25 minutos, por lo que a partir de 15 minutos ya se ha producido la reticulación necesaria que asegura la inmovilización de toda la enzima añadida. Esto se verifica con la existencia de actividad enzimática en la disolución tampón de fosfato utilizada inicialmente cuando no se produce exposición del electrodo a glutaraldehído y cuando el tiempo de exposición es de 5 minutos, pero no en el resto.

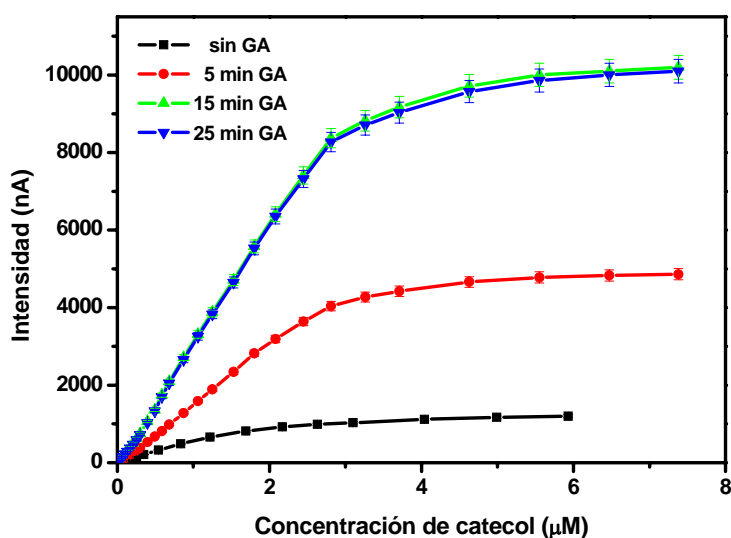


Figure 4.113.- Curvas de calibrado obtenidas con los biosensores preparados con PPO/brushita en función del tiempo de exposición a vapor de glutaraldehído. Condiciones experimentales como en la Figura 4.111

Tabla 4.45.- Propiedades analíticas de los biosensores preparados con diferente tiempo de exposición al vapor de gluraldehído

Tiempo de exposición a GA (min)	n	Sensibilidad ($A M^{-1} cm^{-2}$)	J_{max} ($\mu A cm^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	R^2 (n)	LD (nM)
0	1,29	7,96	17,14	$1,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-6}$	0,9970 (9)	10
5	1,26	28,60	69,43	$2,0 \times 10^{-8} - 2,0 \times 10^{-6}$	0,9986 (19)	9
15	1,30	42,56	145,71	$3,0 \times 10^{-9} - 3,0 \times 10^{-6}$	0,9989 (25)	3
25	1,35	42,56	144,29	$9,0 \times 10^{-9} - 2,5 \times 10^{-6}$	0,9990 (22)	5

n: coeficiente de Hill; J_{max} : densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.6.5.2. Optimización de la respuesta del biosensor

IV.6.5.2.1. Potencial aplicado

La influencia que el potencial aplicado tiene en la respuesta del biosensor se evaluó en el intervalo de -0,2 a 0,0 V vs. ECS (Figura 4.114). Al añadir una concentración de catecol de 0,02 μM , la respuesta aumenta cuando el potencial pasa de 0 a -0,1 V vs. ECS, y se observa un descenso en la intensidad de corriente para potenciales más negativos que puede ser atribuido a la reducción de la concentración de oxígeno o a la contaminación de la superficie electródica como consecuencia de la polimerización de las o-quinonas producidas en la reacción enzimática, como ya se ha indicado en los biosensores de PPO formados de micropartículas poliméricas. Para posteriores estudios se utilizó como potencial de trabajo -0,1V vs. ECS.

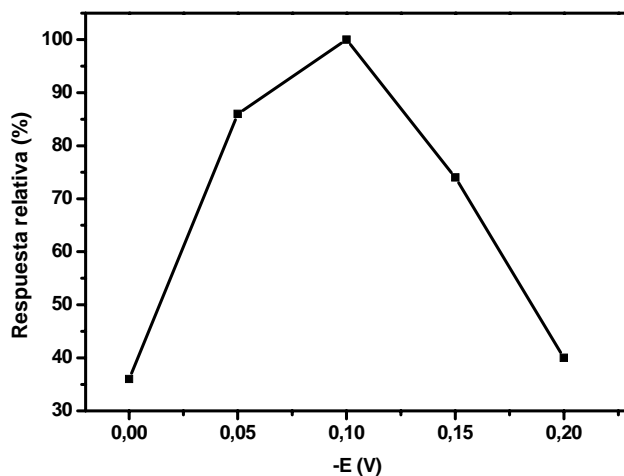


Figura 4.114.- Influencia del potencial del electrodo de trabajo en la respuesta del biosensor al añadir 0,02 μM de catecol. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0 y 20 °C

IV.6.5.2.2. pH

La influencia del pH en la respuesta del biosensor a catecol se examinó a pHs comprendidos entre 5,0 y 8,0, midiendo la intensidad de corriente obtenida al añadir 4 μM de catecol en 10 mL de una disolución tampón 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico. Como era de esperar, la mayor respuesta se obtuvo a pH 6,0 que coincide con el de máxima actividad de la PPO libre (Figura 4.115).

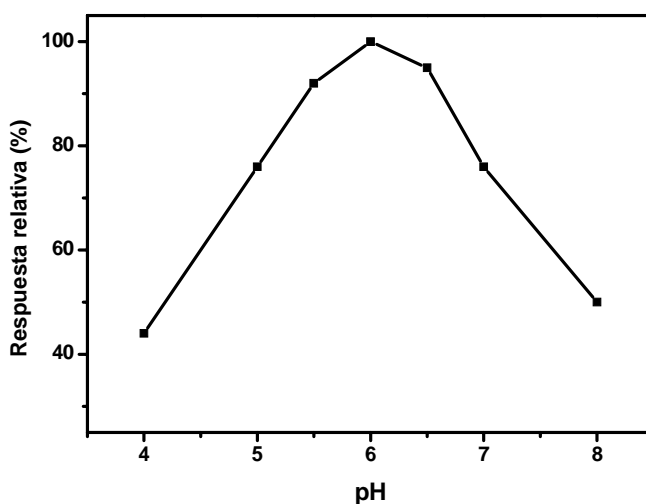


Figura 4.115.- Respuesta del biosensor en función del pH al añadir 4 μM de catecol. Disolución 0,05 M acetato/0,05 M fosfato sódico, 20°C y -0,1V vs. ECS

IV.6.5.2.3. Temperatura

La respuesta del biosensor también se ve afectada por la temperatura, por lo que se estudió la variación de la intensidad de corriente máxima del biosensor en función de la temperatura de trabajo, que en este caso se varió de 0 a 50°C. Las medidas se realizaron en condiciones de saturación de oxígeno, para 4 µM de catecol en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0. La respuesta fue aumentando a medida que se incrementaba la temperatura y en el intervalo entre 20 y 35°C se mantuvo el 85% de la respuesta máxima (Figura 4.116), mientras que el máximo se observó a 25 °C. El estudio de estabilidad térmica de la enzima mostró que el proceso de desnaturalización enzimática a partir de temperaturas iguales o superiores a 25°C. Por el contrario, manteniendo el biosensor durante 1 hora y media a 20°C después de alcanzado el estado estacionario, la señal no varía, por lo que la actividad enzimática también será constante como consecuencia de que no se produce la desnaturalización. Por ello, se seleccionó esta temperatura, 20°C como temperatura de trabajo. En la Figura 4.117 se muestra la representación de Arrhenius realizada únicamente en el intervalo de temperaturas en que no se produce desnaturalización enzimática (0-20°C), observándose un tramo lineal de cuya pendiente se deriva una energía de activación de 44,20 KJ/mol. Este resultado concuerda con el obtenido al inmovilizar PPO en laponita y se diferencia de los observados en los microgeles y puede ser debido a que en este sistema de inmovilización (adsorción) la enzima tiene mayor facilidad de movimiento que en el caso del atrapamiento, por tanto o el medio de inmovilización de la enzima no cambia con la temperatura o si el entorno sufre cambios con la temperatura estos cambios no afectarían de la misma forma a la estructura de la enzima.

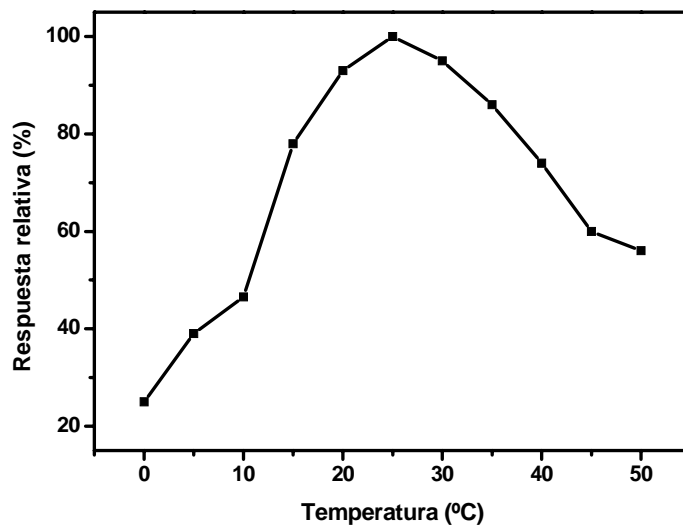


Figura 4.116.- Respuesta relativa del biosensor en función de la temperatura al añadir 4 μM de catecol. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 y -0,1V.

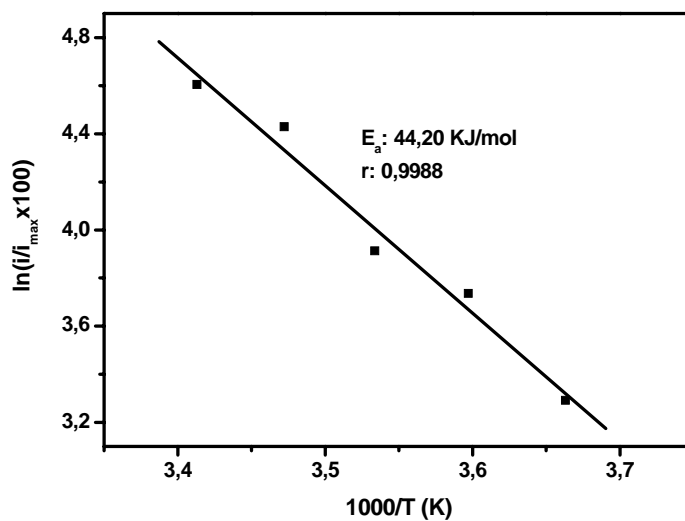


Figura 4.117. Representación de Arrhenius del biosensor de PPO/brushita correspondiente a los resultados expuestos en la Figura 4.116

IV.6.6. RESPUESTA DEL BIOSENSOR EN CONDICIONES EXPERIMENTALES ÓPTIMAS

Una vez optimizados todos los factores que afectan tanto al sistema de inmovilización (proporción PPO/brushita 1, cantidad de mezcla enzima-brushita depositada en la superficie del electrodo de 50 μg y tiempo de entrecruzamiento con GA 15 min) como a la respuesta del biosensor (potencial -0,1 vs. ECS, pH 6,0 y temperatura 20°C), se realizó la curva de calibrado utilizando estas condiciones óptimas y catecol como sustrato (Figura 4.118). Las propiedades analíticas obtenidas con este biosensor fueron las siguientes:

- Sensibilidad 46,57 $\text{A M}^{-1} \text{cm}^{-2}$
- Densidad de corriente máxima 153 $\mu\text{A cm}^{-2}$
- Intervalo lineal $3,0 \times 10^{-9}$ - $3,0 \times 10^{-6}$ M
- Límite de detección 3 nM

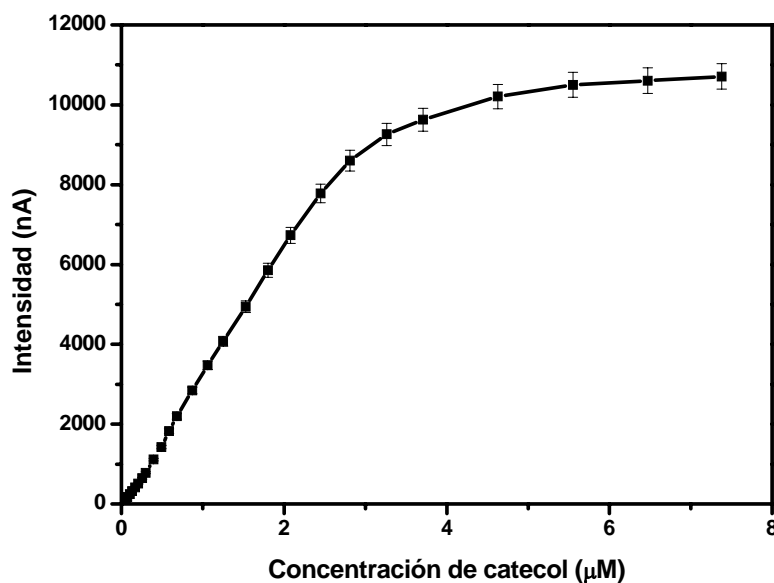


Figura 4.118.- Curva de calibrado en condiciones óptimas

IV.6.7. ESTUDIO DE PRECISIÓN

La precisión del método se evaluó estudiando la repetibilidad y precisión intermedia. Para el estudio de la repetibilidad se realizaron 10 medidas con el mismo biosensor y el mismo día, utilizando 3 disoluciones de catecol de concentraciones siempre dentro del intervalo lineal, 3 nM, 0,5 μM y 2 μM . Los coeficientes de variación obtenidos fueron 8,49, 2,64 y 1,59% respectivamente, CV siempre menores que los

máximos aceptables en función de la concentración de analito según Horwitz (ver Tabla 3.5).

En la Figura 4.119 se muestra el gráfico de cajas y bigotes obtenido con los resultados del estudio de precisión intermedia (10 medidas de una disolución de $0,5 \mu\text{M}$ de catecol durante 2 días sucesivos). La dispersión de las medidas es prácticamente igual en el primer día (CV 2,64%) que en el segundo (CV 2,52%). Al comparar las medias y las varianzas obtenidas en los dos días del estudio mediante el cálculo del valor p, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ya que este valor fue en ambos casos mayor de 0,05 (0,8390 al comparar las medias y 0,8839 para las varianzas). En definitiva, puede decirse que los resultados obtenidos demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con el biosensor PPO/brushita en la determinación de catecol.

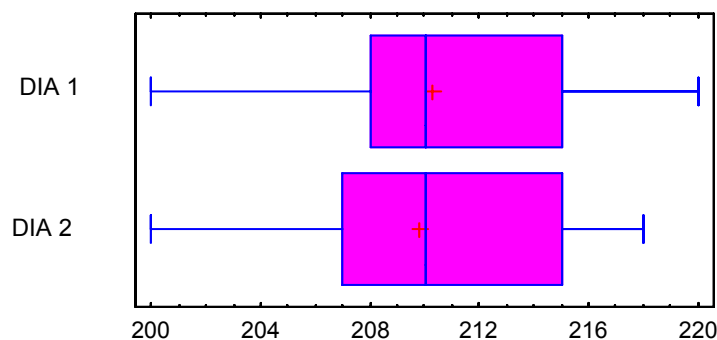


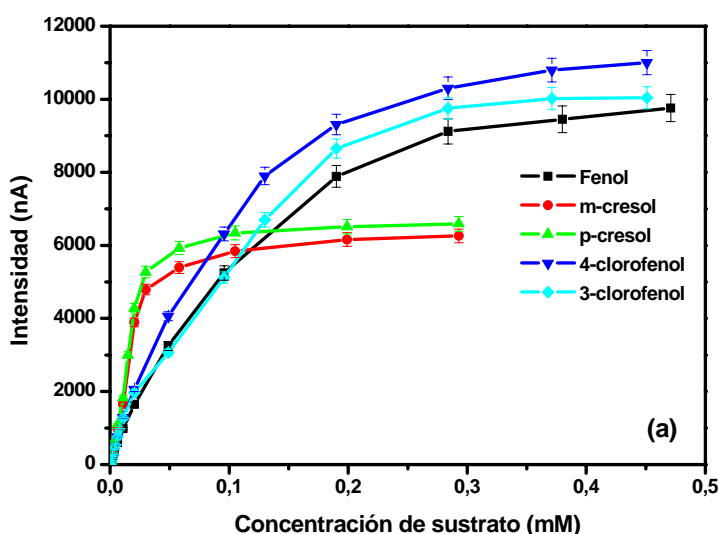
Figura 4.119.- Gráfico de cajas y bigotes

IV.6.8. DETERMINACIÓN DE DISTINTOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN MEDIO ACUOSO

Se estudió la respuesta del biosensor frente a distintos fenoles simples y flavonoides. Se prepararon biosensores de PPO/brushita ($50 \mu\text{g}$) y tiempo de exposición al GA de 15 min; se realizaron las curvas de calibrado para distintos derivados fenólicos a 20°C , $-0,1\text{V}$ vs. ECS y disolución tampón de fosfato sódico $0,1 \text{ M}$ pH 6,0 (Figura 4.120). En la Tabla 4.46 se muestran las propiedades analíticas de los biosensores para los diferentes sustratos. La mayor respuesta se obtuvo al utilizar como sustrato catecol, ya que los difenoles sólo participan en la segunda reacción enzimática. La respuesta del biosensor frente a dopamina fue muy pequeña, al igual que ocurre en el caso de utilizar biosensores de PAA y poli (vinilimidazol), ya que la

quinona que se produce enzimáticamente se puede transformar en otro compuesto diferente. En el caso de los fenoles simples, la respuesta del biosensor aumentó de la siguiente forma: 4-clorofenol > 3-clorofenol > fenol > p-cresol > m-cresol al igual que ocurría al utilizar los anteriores biosensores. Este resultado puede ser debido a que la facilidad de reducción de las quinonas derivadas de esos compuestos fenólicos al potencial de trabajo (-0,1 V) siguen el mismo orden (ver apartado 2.4.6). Si se comparan estos resultados con el obtenido con catecol, se puede observar como la intensidad de corriente máxima es ligeramente superior al utilizar 4-clorofenol, pero con catecol se obtiene un mayor intervalo lineal y un límite de detección muy inferior a los demás compuestos fenólicos.

Además, el biosensor de brushita se utilizó para la determinación de los flavonoides rutina y quercetina. Si se comparan estos resultados con los obtenidos con el biosensor de laponita, en el caso de la rutina la respuesta fue semejante para ambos biosensores, pero la respuesta a quercetina mejoró con el biosensor de brushita. La sensibilidad e intensidad máxima fue de $0,40 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ y $0,90 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ respectivamente para la determinación de quercetina con el biosensor laponita/PPO y $2,69 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ y $8,33 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ al utilizar el biosensor de brushita. Los parámetros cinéticos de la reacción enzimática no pudieron calcularse debido al alto valor de los coeficientes de Hill para todos los sustratos estudiados. El tiempo de respuesta obtenido estuvo entre 12-20 segundos en la determinación de los distintos compuestos fenólicos.



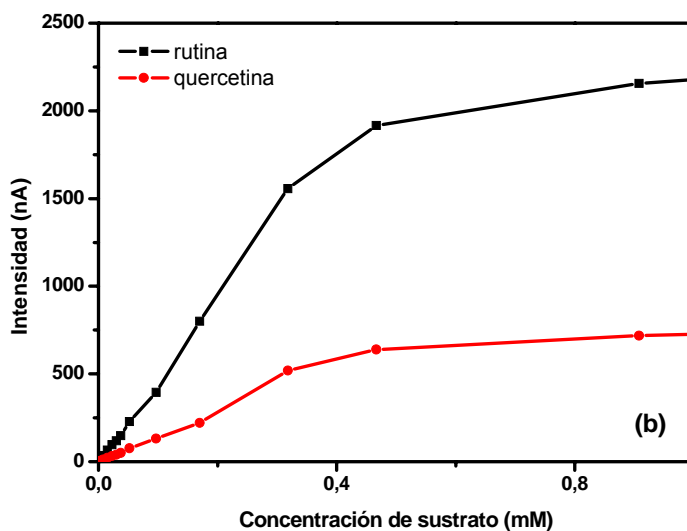


Figura 4.120.- Curvas de calibrado para (a) fenoles simples y (b) flavonoides. Disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0, -0,1 V vs. ECS y 20°C.

Tabla 4.46.- Propiedades analíticas del biosensor de PPO/brushita para diferentes compuestos fenólicos

Sustrato	n	Sensibilidad (A M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (nM)
3-clorofenol	1,25	1,74	143,43	9,0 x 10 ⁻⁸ - 8,0 x 10 ⁻⁶	0,9995 (10)	90
4-clorofenol	1,27	1,70	157,14	1,0 x 10 ⁻⁷ - 1,0 x 10 ⁻⁵	0,9992 (11)	100
Fenol	1,31	1,41	139,43	1,0 x 10 ⁻⁷ - 2,5 x 10 ⁻⁶	0,9996 (7)	50
m-cresol	1,22	2,17	89,43	2,0 x 10 ⁻⁷ - 1,0 x 10 ⁻⁵	0,9983 (9)	100
p-cresol	1,24	2,68	94,14	5,0 x 10 ⁻⁸ - 1,0 x 10 ⁻⁶	0,9990 (6)	50

Sustrato	n	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (μM)
Quercetina	1,36	2,69	8,33	4,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻³	0,9981 (15)	40
Rutina	1,33	6,59	20,08	2,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻³	0,9991 (16)	10

n: coeficiente de Hill; J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.6.9. COMPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES DE PPO/BRUSHITA EN MEDIOS DE DIFERENTE POLARIDAD

En este apartado se estudió la posibilidad de utilización del biosensor de brushita para la determinación de catecol en medios predominantemente orgánicos. Para ello se utilizaron mezclas de disolventes orgánicos con una pequeña cantidad de disolución tampón de fosfato 0,1 M pH 6,0 (98,5:1,5 v:v) necesaria para disolver al catecol. Los disolventes utilizados han sido dioxano, acetonitrilo y etanol (disolventes orgánicos hidrofílicos con $\log P < 2$ en los tres casos) y, como se observa en la Figura 4.121, la intensidad de corriente del biosensor al utilizar dioxano y etanol fue muy baja comparándola con la respuesta obtenida al utilizar acetonitrilo. Al utilizar disolventes hidrofóbicos tales como hexano y cloroformo, no se pudieron realizar las medidas debido a la aparición de sobrepotencial, que puede ser debido a que se produce un vacío entre la disolución orgánica (apolar) y la matriz inorgánica depositada en la superficie electródica, brushita, que impide el contacto eléctrico.

El biosensor es adecuado para la determinación de catecol en mezclas acetonitrilo/disolución tampón ya que se obtuvo un bajo límite de detección (40 nM), con un tiempo de respuesta rápido (12 s) y una sensibilidad ($3,3 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) mucho más elevada que en el caso de los biosensores formados por micropartículas de poli (vinilimidazol) ($0,0125 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$).

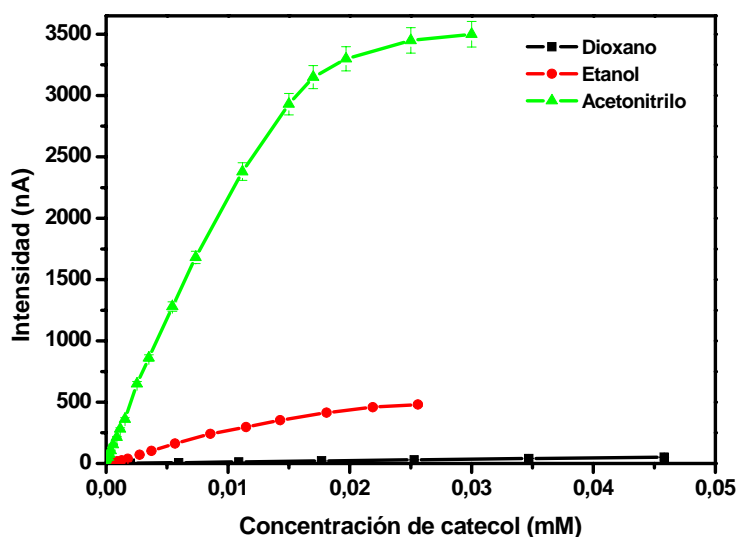


Figura 4.121.- Curvas de calibrado obtenidas con el biosensor de PPO/brushita utilizando como disolvente mezclas de disolvente orgánico/disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M; 98,5:1,5; (v:v), -0,1V vs. ECS y 25°C.

Para completar este estudio, se vió la influencia que tiene en las propiedades del biosensor el contenido de disolución acuosa en la mezcla disolvente orgánico/disolución tampón. Este estudio se realizó utilizando como disolvente acetonitrilo. Para ello, se aumentó la proporción de disolución tampón en la mezcla desde 1,5 % hasta 30% y se realizaron las correspondientes curvas de calibrado (Figura 4.122). Se observa una mejora de las propiedades analíticas a medida que aumenta la cantidad de agua en la mezcla (Tabla 4.47), manteniéndose estas propiedades prácticamente constantes al aumentar el contenido de disolución acuosa desde el 20% al 30%. Esto indica que con un 20% de disolución tampón en la mezcla se llega a la cantidad de agua necesaria para producirse la máxima actividad enzimática en estos medios, al igual que ocurría con el biosensor de PPO con micropartículas de poli (vinilimidazol).

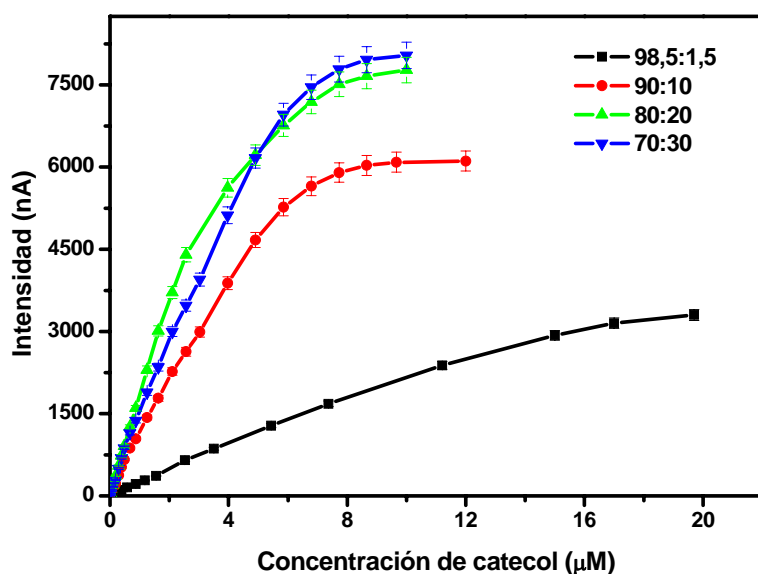


Figura 4.122.- Influencia de la cantidad de disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M (pH 6,0) utilizada en las mezclas acetonitrilo-disolución tampón, en la respuesta del biosensor de brushita. -0,1 V vs. ECS y 20°C.

Tabla 4.47.- Propiedades analíticas del biosensor de PPO/brushita en función de la cantidad de disolución tampón utilizada en la mezcla acetonitrilo/disolución tampón

Acetonitrilo: disolución tampón (v:v)	Sensibilidad (A M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	R ² (N)	LD (nM)
98,5:1,5	3,30	66,57	4,0 10 ⁻⁸ - 7,0 10 ⁻⁶	0,9982 (12)	40
90/10	14,28	86,14	6,0 10 ⁻⁹ - 7,0 10 ⁻⁷	0,9972 (11)	6
80:20	28,57	109,43	7,0 10 ⁻⁹ - 2,0 10 ⁻⁶	0,9993 (15)	2
70:30	28,57	114,84	7,0 10 ⁻⁹ - 2,0 10 ⁻⁶	0,9994 (17)	2

J_{max}: densidad de corriente máxima; R: coeficiente de regresión para el intervalo lineal (N: número de puntos de la recta en el intervalo lineal); LD: límite de detección

IV.6.10. ESTABILIDAD

La estabilidad del biosensor se evaluó mediante el registro periódico de la respuesta obtenida con 0,5 μM de catecol, realizando la medida en los dos medios de trabajo propuestos, disolución tampón de fosfato y mezclas acetonitrilo:disolución tampón 80:20, pero almacenando el biosensor en una disolución tampón de fosfato pH 6,0 a 4°C después de su uso. Al realizar las medidas en medio acuoso mantiene el 90% de la señal inicial durante 6 días, mientras que las medidas llevadas a cabo en mezclas acetonitrilo:disolución tampón (80:20) sólo dio señales superiores al 90 % de la inicial durante 3 días produciéndose a partir de ahí un descenso brusco de la respuesta (Figura 4.123). La estabilidad del biosensor de brushita para la determinación de catecol en medio acuoso fue menor que la obtenida con los biosensores formados con micropartículas de PAA (27 días) y poli (vinilimidazol) (10 días). En medio no acuoso, la estabilidad del biosensor formado por micropartículas de poli (vinilimidazol) fue ligeramente mayor (5 días).

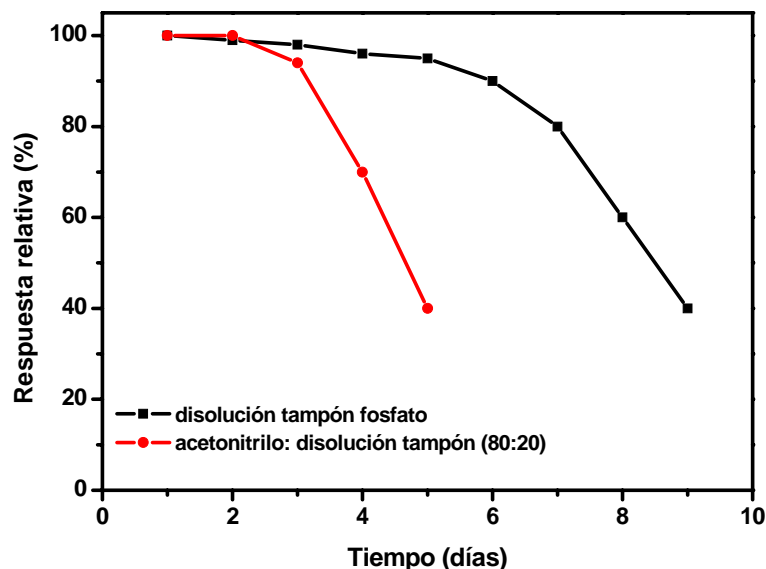


Figura 4.123.- Estabilidad del biosensor de PPO/brushita en disolución tampón de fosfato y mezclas acetonitrilo/disolución tampón 80:20 (v:v)

IV.6.11. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS RESIDUALES

Para comprobar la posible aplicación del biosensor propuesto en la determinación de fenoles en aguas residuales cuyo contenido en estos compuestos se desconocía, se realizó un estudio de recuperación. Para ello se tomaron 5 alicuotas del agua de 6 mL cada una. Con 3 mL se midió la corriente generada por el biosensor, se extrapólo este valor en la curva de calibrado de fenol y se obtuvo una concentración de compuestos fenólicos en aguas de 40 μM expresado en fenol. A los 3 mL de agua restantes se les añadió una cantidad de fenol conocida (40 μM) midiéndose de nuevo la concentración de fenol por extrapolar en la curva de calibrado. La recuperación obtenida se mantuvo entre 92 y 95%. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 4.48.

Tabla 4.48.- Resultados de recuperación del biosensor de brushita

Muestra	Fenol añadido (μM)	Fenol encontrado^a (μM)	Recuperación (%)
1	40,0	38,4	96
2	40,0	38,0	95
3	40,0	36,8	92
4	40,0	38,4	96
5	40,0	37,2	93

IV.7. Estudio comparativo de los biosensores propuestos para la determinación de compuestos fenólicos

El objetivo de este capítulo es esquematizar los resultados obtenidos en este trabajo comparando las propiedades analíticas más importantes a tener en cuenta en el diseño de un biosensor, como son la sensibilidad, tiempo de respuesta, estabilidad y precisión, además de la posibilidad de utilización de estos dispositivos para el análisis de compuestos fenólicos en medios no acuosos.

IV.7.1. CONDICIONES ÓPTIMAS EN LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR

Si tenemos en cuenta el pH y temperatura óptimos de los biosensores se observa como en todos los casos el pH óptimo se mantuvo entre 6 y 6,5, coincidente con el pH de máxima actividad y estabilidad de la tirosinasa. La temperatura a la cual la intensidad de corriente fue máxima (T_1) nunca superó los 30°C. Esta temperatura es mayor que la temperatura máxima de estabilidad térmica de la enzima (T_2), que se mantiene entre 20 y 25°C, debiendo trabajar siempre a esta temperatura para evitar la desnaturalización enzimática.

Al comparar los resultados obtenidos en la representación de Arrhenius con los biosensor de tirosinasa estudiados, se observan diferencias dependiendo del sistema de inmovilización utilizado. Con los biosensores preparados con micropartículas poliméricas se observan 2 tramos lineales y con los biosensores de matriz inorgánica un único tramo lineal.

La aparición de dos rectas en la representación de Arrhenius cuando la PPO se atrapa en microgeles de PAA lo atribuimos a una transición de volumen del microgel (colapsado/hinchado) en el intervalo de temperaturas estudiado ya que se trata de un microgel dependiente de la temperatura. Dada esta afirmación, en el caso de inmovilización de PPO en microgeles de poli (vinilimidazol), no dependiente de la temperatura, esperábamos encontrar un único tramo lineal. Por tanto la aparición de dos tramos lineales nos hace pensar que un aumento de la temperatura puede producir otros cambios en el entorno que rodea a la enzima atrapada, que pueden modificar la conformación de la misma. Las energías de activación obtenidas con los biosensores de micropartículas poliméricas en la zona de altas temperaturas es similar a la obtenida para PPO en disolución, por el contrario en la zona de bajas temperaturas se observa un valor mucho más elevado.

En los dos casos de inmovilización de la PPO mediante adsorción en matriz inorgánica (brushita o laponita) se obtiene un único tramo lineal en la representación

de Arrhenius, lo que parece indicar que en estos sistemas de inmovilización la enzima tiene mayor facilidad de movimiento que en el caso del atrapamiento, y por tanto o el medio de inmovilización no sufre cambios con la temperatura o si los sufre, no afectan de la misma forma a la conformación de la enzima. La energía de activación obtenida con estos biosensores es prácticamente igual en los dos casos, significativamente mayor que la obtenida para tirosinasa en disolución, y del mismo orden que la aportada para PPO inmovilizada en otros sistemas.

Tabla 4.49.- Condiciones óptimas de pH y temperatura para cada biosensor, así como las energías de activación calculadas a partir de la representación de Arrhenius

Biosensor PPO	pH	T ₁	T ₂	E _a
Micropartículas de PAA	6,0	25	20	6,03KJ/mol
				53,78KJ/mol
				T corte 10,1°C
Micropartículas de poli (vinilimidazol)	6,5	23	20	7,20 KJ/mol
				43,30 KJ/mol
				T corte 10,7°C
Brushita	6,0	25	20	44,20 KJ/mol
Laponita	6,5	30	25	44,40 KJ/mol

T₁: temperatura de máxima respuesta; T₂: temperatura de máxima estabilidad térmica de la enzima

IV.7.2. DETERMINACIÓN DE CATECOL EN MEDIO ACUOSO

En la Tabla 4.50 se muestran las propiedades analíticas de los biosensores para la determinación de catecol en disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 6,0. Cuando se utiliza como sistema de inmovilización enzimático la adsorción en matriz inorgánica, estas propiedades mejoran, probablemente debido a que existe una mayor facilidad de acceso del sustrato a la enzima y del producto a la superficie eléctrica que cuando la enzima está atrapada en micropartículas poliméricas. La máxima sensibilidad y el menor límite de detección se obtiene con el biosensor de brushita, aunque la intensidad máxima fue mayor con el biosensor de laponita.

En los dos tipos de micropartículas poliméricas, existe una diferencia de eficacia catalítica de la enzima inmovilizada. El atrapamiento de la tirosinasa en

micropartículas de poliacrilamida supone una pérdida del 26% de la actividad enzimática y en micropartículas de poli (vinilimidazol) de un 35%. Esto se atribuye a que el medio que rodea a la enzima (grupos amida de la acrilamida y grupos vinilo del vinilimidazol) podría producir quelantes con la molécula de enzima, dando lugar a una disminución de la actividad enzimática, que se ve más acentuada en el caso del poli (vinilimidazol) debido a la mayor reactividad del grupo vinilo.

Las propiedades analíticas en la determinación de catecol al utilizar biosensores preparados con micropartículas poliméricas, mejoran con poliacrilamida. Este resultado se atribuye al hecho de que el polímero de acrilamida es dependiente de la temperatura. A diferencia de lo que ocurre con las micropartículas de poli (vinilimidazol), las de PAA están hinchadas a la temperatura de trabajo, facilitando el acceso del sustrato a la enzima y mejorando su actividad catalítica y el acceso del producto al electrodo.

Tabla 4.50.- Comparativa de las propiedades analíticas de distintos biosensores de tirosinasa para la determinación de catecol

Sistema de inmovilización	Sensibilidad ($A M^{-1} cm^{-2}$)	J_{max} ($\mu A cm^{-2}$)	Intervalo lineal (M)	LD (μM)
Micropartículas de poliacrilamida	0,206	24,90	$5,0 \times 10^{-7} - 6,8 \times 10^{-5}$	0,5
Micropartículas de poli (vinilimidazol)	0,043	20,94	$4,0 \times 10^{-6} - 4,4 \times 10^{-4}$	4
Brushita	46,57	153,0	$3,0 \times 10^{-9} - 3,0 \times 10^{-6}$	0,003
Laponita	2,71	321,0	$2,0 \times 10^{-8} - 8,0 \times 10^{-5}$	0,02

IV.7.3. DETERMINACIÓN DE DISTINTOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN MEDIO ACUOSO

Con independencia del medio de inmovilización, el orden de magnitud de la respuesta a los fenoles simples estudiados no varía. Esto se puede deber a que la facilidad de reducción de las quinonas obtenidas en la reacción enzimática de los distintos fenoles estudiados, al potencial de trabajo (-0,1V) sigue el siguiente orden: 4-clorofenol>3-clorofenol>fenol>p-cresol>m-cresol. Las corrientes medidas para cada uno de los compuestos desciende en el mismo orden en todos los biosensores estudiados. Al igual que ocurría en la determinación de catecol, para los fenoles

simples estudiados el biosensor de brushita también produjo la mayor sensibilidad y menor límite de detección.

Si comparamos la respuesta obtenida con los distintos biosensores frente al difenol catecol y a los monofenoles estudiados, en términos de intensidad de corriente máxima, se obtienen los siguientes resultados. Cuando la determinación de estos compuestos se realiza con los biosensores preparados con micropartículas poliméricas, se produce un acusado descenso de la intensidad máxima generada por los monofenoles frente a la obtenida con catecol, siendo esta disminución entre el 90-95%. En cambio, con el biosensor de brushita, la intensidad obtenida con los monofenoles es muy parecida a la conseguida con el catecol en todos los casos, excepto con los cresoles donde sí se observa un descenso aunque nunca mayor del 40% del obtenido con catecol. Este resultado se podría explicar teniendo en cuenta que la PPO, en su estado basal, puede estar en forma E_{met} y E_{oxi} (ver Esquema 2.2) que los difenoles se pueden unir a ambas formas dando lugar a la o-quinona correspondiente pero los monofenoles, sólo evolucionan a quinona cuando se unen a la forma E_{oxi} .

Cuando la enzima está atrapada en micropartículas poliméricas, se podrían producir interacciones de tipo quelante entre el polímero y la enzima, sobre todo con la forma E_{oxi} , más reactiva que la forma E_{met} , y los fenoles se unirían en mayor proporción con esta última forma, por lo que el catecol sí evolucionaría a quinona pero no así el fenol. Si la enzima está adsorbida en matrices inorgánicas, esto no ocurre ya que la PPO tiene libertad de movimiento, y el resultado es similar al obtenido cuando realizamos la experiencia con la enzima libre, donde la señal para catecol y fenol fue semejante. Al comparar los biosensores preparados con micropartículas poliméricas, se observa que la intensidad máxima fue muy semejante en ambos casos, con mayor sensibilidad y menor límite de detección cuando la determinación se lleva a cabo con el biosensor de microgeles de PAA.

La determinación de los flavonoides rutina y quercetina sólo es posible con los biosensores de matriz inorgánica (Tabla 4.51). Que no aparezca respuesta con los biosensores de micropartículas poliméricas se podría deber al elevado peso molecular de estas moléculas, que impide su paso al interior de la micropartícula, imposibilitando su contacto con la enzima. Sin embargo, cuando la tirosinasa está adsorbida en matrices inorgánicas, existe una mayor libertad de movimiento de la enzima y una

mayor facilidad de acceso de los sustratos, facilitándose la reacción enzimática. Las propiedades analíticas mejoran cuando se utiliza como sustrato rutina, ya que se trata de una molécula más hidrófila que la quercetina. En la determinación de rutina, la respuesta es muy parecida al utilizar los biosensores de brushita y laponita, pero la respuesta mejora considerablemente en la determinación de quercetina al utilizar brushita como sistema de inmovilización enzimático. Esto puede ser debido a que laponita adsorbe la rutina y quercetina, adsorción que suponemos es mayor en el caso de la quercetina probablemente debido a su estructura casi plana que favorece la adsorción e incorporación al espacio interlaminar, dando lugar al descenso tan brusco de intensidad.

Tabla 4.51.- Comparativa de las propiedades analíticas de los biosensores de matrices inorgánicas para la determinación de quercetina y rutina

Matriz	Sustrato	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Intervalo lineal (M)	LD (μM)
Laponita	Quercetina	0,40	0,90	4,0 x 10 ⁻⁴ - 2,0 x 10 ⁻³	515
	Rutina	7,50	25,80	4,0 x 10 ⁻⁴ - 3,0 x 10 ⁻³	6,2
Brushita	Quercetina	2,69	8,33	4,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻³	40
	Rutina	6,59	20,08	2,0 x 10 ⁻⁵ - 2,0 x 10 ⁻³	10

IV.7.4. DETERMINACIÓN DE CATECOL EN MEDIOS PREDOMINANTEMENTE ORGÁNICOS

No todos los biosensores propuestos dieron respuesta al catecol en medios no acuosos. En las mezclas estudiadas, sólo se obtiene respuesta con los biosensores de micropartículas de poli (vinilimidazol) y brushita, presentando una mayor sensibilidad y menor límite de detección este último, al igual que ocurría en la determinación de catecol en medio acuoso.

Que se obtenga respuesta al utilizar las micropartículas de poli (vinilimidazol) y no las de poli (acrilamida), se podría deber a la características hinchamiento de este último. En medio acuoso, la acrilamida está hinchada a la temperatura de trabajo, formando puentes de hidrógeno con el agua. Sin embargo, en contacto con medio no acuoso, el polímero, al no disponer de agua, forma puentes de hidrógeno entre el propio polímero por lo que se repliega y colapsa y la enzima se encuentra tan próxima

al polímero que se hace muy difícil el acceso del sustrato. Por el contrario, la estructura del poli (vinilimidazol) no se modifica tanto al cambiar el medio. Cuando se utiliza laponita la ausencia de respuesta en el biosensor se puede deber a que el contacto de la matriz inorgánica con la disolución orgánica puede modificar la hidratación de la misma y sus propiedades.

La respuesta al catecol es peor que la obtenida en medio acuoso, siendo en las mezclas acetonitrilo:disolución tampón donde se obtuvo la mayor respuesta. Al comparar la sensibilidad e intensidad de corriente máxima obtenida en este medio para ambos biosensores, se observa cómo la sensibilidad es casi 265 veces mayor al utilizar brushita ($3,3 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) como sistema de inmovilización enzimático, frente a las micropartículas de poli (vinilimidazol) ($12,5 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$). La intensidad de corriente máxima es 40 veces superior en el biosensor de PPO/brushita ($66,57 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$) que en el biosensor de poli (vinilimidazol) ($1,6 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$). Estos resultados, junto con los obtenidos en medio acuoso, confirman que la accesibilidad de los compuestos fenólicos es mayor cuando la enzima está adsorbida a brushita y no atrapada en micropartículas poliméricas. La utilización de estos biosensores en medios no acuosos posibilitan su uso, sobre todo el de brushita, para la determinación de compuestos fenólicos en muestras hidrofóbicas.

El aumento de agua en las mezclas acetonitrilo:disolución tampón mejora las propiedades analíticas de estos biosensores, manteniéndose prácticamente constantes a partir de un contenido de agua del 20% en la mezcla, lo que indica que con esta proporción se ha alcanzado la cantidad de agua necesaria que permite alcanzar la máxima actividad enzimática. La mejora de las propiedades analíticas es más acentuada en el caso del biosensor de brushita, aumentando la sensibilidad de $3,3 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ a $28,57 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ al aumentar la proporción de agua de 1,5 a 20%. Para el biosensor preparado con micropartículas de poli (vinilimidazol), el aumento de sensibilidad es de $12,5 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ a $31,8 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Para ambos biosensores, el límite de detección obtenido al trabajar con disolución acetonitrilo:tampón (80:20) es similar al obtenido en medio acuoso (2 nM con biosensor de brushita y 5 μM con biosensor de poli (vinilimidazol)).

IV.7.5. TIEMPO DE RESPUESTA

El tiempo de respuesta es un parámetro de gran importancia en el diseño de biosensores ya que se necesitan respuestas rápidas en especial, si el dispositivo forma parte de sistemas de flujo, como detectores en FIA y HPLC. Al comparar los tiempos de respuesta obtenidos con los distintos biosensores en medio acuoso, se puede observar que siempre es menor en los sistemas de inmovilización enzimático por adsorción (12 s) (Figura 4.124). La enzima adsorbida en una matriz y no atrapada en el interior de una micropartícula, se encuentra más accesible al sustrato, viéndose favorecida la reacción enzimática y además, el acceso del producto de la reacción enzimática a la superficie electrodo también es más fácil. En el caso de atrapamiento en micropartículas poliméricas, el tiempo de respuesta en ambos casos fue del mismo orden.

En medios predominantemente orgánicos el biosensor de poli (vinilimidazol) presenta tiempos de respuesta muy elevados mientras que en el biosensor de brushita se mantiene similar al obtenido en medio acuoso, resultado muy interesante ya que posibilita su uso como detector en sistemas de flujo, especialmente HPLC para la determinación de compuestos fenólicos en muestras orgánicas.

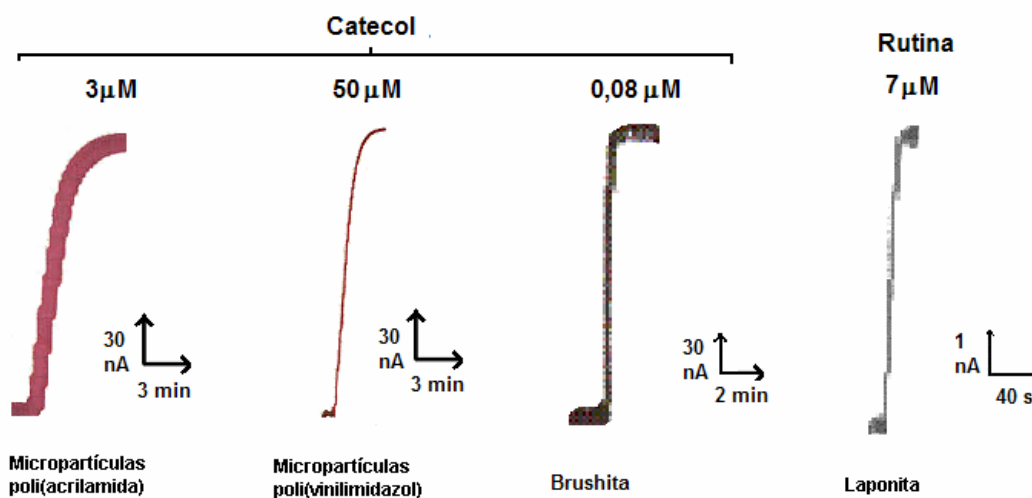


Figura 4.124.- Comparativa de los perfiles intensidad vs. tiempo obtenidas para los distintos biosensores en medio acuoso.

IV.7.6. PRECISIÓN

En todos los biosensores propuestos, el coeficiente de variación disminuye a medida que la concentración de sustrato aumenta, obteniéndose siempre coeficientes de variación menores que los máximos aceptables según Horwitz. La precisión intermedia, realizada en dos días sucesivos, en los biosensores fabricados con micropartículas muestra una dispersión de las medidas mayor el primer día, mientras que los biosensores de matriz inorgánica, presentan una dispersión de las medidas muy semejante los dos días de estudio. Esto se atribuye a la reorganización de la enzima en el medio en el que se encuentra. En el caso de las micropartículas, se reorganizan bajo la acción del campo eléctrico dando una dispersión de datos menor el segundo día de estudio, pero cuando se utilizan matrices inorgánicas, la enzima tiene mayor movimiento y este proceso no ocurre. Se puede concluir que los resultados obtenidos demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con los biosensores propuestos en la determinación de catecol.

IV.7.7. ESTABILIDAD

Las micropartículas poliméricas utilizadas para la inmovilización de la tirosinasa, todas ellas, liofilizadas y conservadas en refrigerador mantienen la actividad enzimática durante al menos 1 año.

La estabilidad del biosensor en medio acuoso varía dependiendo del sistema de inmovilización utilizado como se muestra en la Tabla 4.52.

Tabla 4.52. Estabilidad de los biosensores propuestos

Sistema de inmovilización	Estabilidad
Micropartículas de poliacrilamida	90% de actividad durante 27 días
Micropartículas de poli (vinilimidazol)	90% de actividad durante 10 días
Brushita	90% de actividad durante 6 días
Laponita	90% de actividad durante 7 días

Según estos resultados y como era de esperar, el sistema de inmovilización por atrapamiento en micropartículas poliméricas retiene más tiempo a la enzima que el sistema de adsorción en matriz inorgánica, siendo las micropartículas de PAA el medio

de inmovilización que proporciona una mayor protección de la enzima. Esta diferencia se puede deber a que, dado que el vinilimidazol es más reactivo que la acrilamida, interaccionará en mayor medida con la molécula de enzima, disminuyendo la actividad de la misma. Al realizar las medidas en medio no acuoso (mezclas acetonitrilo:disolución tampón 80:20) la estabilidad es menor, (ya que la actividad de la tirosinasa es menor en este medio), manteniéndose el 90% de actividad durante 5 días para el biosensor con micropartículas de poli (vinilimidazol) y 3 días para el biosensor de brushita.

IV.7.8. APLICACIÓN DE LOS BIOSENSORES DESARROLLADOS AL ANÁLISIS DE AGUAS RESIDUALES

Los biosensores propuestos en este estudio se utilizaron para la determinación de compuestos fenólicos en muestras de aguas residuales industriales de una industria olivera destinada a la obtención de aceite de orujo. La máxima recuperación se obtiene al utilizar el biosensor de brushita, 94%. Con los biosensores fabricados con micropartículas se obtuvo una recuperación en torno al 85%. Aunque un estudio completo requiere la separación de los diferentes compuestos fenólicos mediante otras técnicas analíticas previo a su cuantificación con este dispositivo analítico, los resultados obtenidos indican que estos biosensores pueden ser de gran utilidad en la determinación de compuestos fenólicos.

IV.7.9. APORTACIONES DE LOS BIOSENSORES PROPUESTOS EN ESTE TRABAJO CON OTROS ENCONTRADOS EN LA LITERATURA

En este último apartado se resumen las aportaciones de los biosensores propuestos en este trabajo y se comparan con una muestra representativa de los biosensores de tirosinasa utilizados en medios acuoso y no acuoso, publicados a lo largo de estos 5 últimos años. En la Tabla 4.53 se muestran las características de estos biosensores, mencionando el tipo de electrodo empleado, el sistema de inmovilización utilizado y el medio de trabajo, así como las propiedades analíticas y el tiempo de vida de cada uno.

Cabe destacar la alta sensibilidad obtenida con el biosensor de brushita ($46,57 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), 6 veces mayor que la encontrada hasta ahora en la literatura, con un intervalo de linealidad ($3,0 \times 10^{-9} - 3,0 \times 10^{-6} \text{ M}$) cuyo límite inferior solo lo mejora el biosensor propuesto por Shan y col (2003), siendo el límite de detección de 3 nA y el

tiempo de respuesta de tan sólo 12 segundos. Cuando se utiliza el biosensor de laponita, las propiedades analíticas son parecidas a las obtenidas en la literatura (sensibilidad $2,71 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ y límite de detección $0,02 \text{ }\mu\text{M}$), con un tiempo de respuesta de 12 segundos. La inmovilización de la PPO en micropartículas no aporta mejoras en las propiedades analíticas respecto a los biosensores ya publicados, sin embargo presenta dos ventajas que les hace interesantes y es la gran estabilidad del material biológico (mínima de 1 año), que junto a la fácil preparación del biosensor, de forma que, cuando sea necesario, se puede disponer en muy poco tiempo de un nuevo biosensor.

La utilización del biosensor de brushita para determinación de catecol en medios predominantemente orgánicos, produce una alta sensibilidad ($28,57 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) 4 veces superior a la encontrada en la literatura, un intervalo lineal ($7,0 \times 10^{-9}$ - $2,0 \times 10^{-6}$) mayor y un límite de detección (3 nM) más bajo que el obtenido con otros biosensores. Con el biosensor de poli (vinilimidazol) se obtiene propiedades analíticas (sensibilidad $31,8 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, intervalo lineal de $1,0 \times 10^{-5}$ - $3,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ y límite de detección de $5 \text{ }\mu\text{M}$) semejantes a los biosensores de tirosinasa en la literatura.

Tabla 4.53.- Características de biosensores de tirosinasa propuestos en la literatura

Ref.	Electrodo	Sistema de inmovilización	Medio	Sensibilidad	J_{\max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	LD (μM)	Intervalo lineal (M)	Estabilidad	tr (s)
Carralero y col., 2006	Grafito-teflón	PPO y nanopartículas de oro coloidales por atrapamiento	Disolución tampón de fosfato pH 7,4	746 mA/M	-	0,003	$1,0 \times 10^{-8}$ - $8,0 \times 10^{-6}$	39 días	-
Kim y Lee, 2003	Carbono vitrificado	Sol-gel silicato/Nafion	Disolución tampón de fosfato pH 7,0	$2,8 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	-	0,35	$1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$	74% actividad después de 14 días	15
Rajes y Kaneto, 2005	-	Unión covalente con un derivado de polipirrol	Disolución tampón de fosfato pH 7,2	$0,07 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	-	0,7	$1,3 \times 10^{-6}$ - $1,1 \times 10^{-4}$	3 meses	35
Shan y col., 2003 ^a	Carbono vitrificado	Adsorción en arcilla aniónica (hidróxido de doble capa)	Disolución tampón de fosfato pH 6,5	$7,81 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	492	0,001	$1,7 \times 10^{-9}$ - $1,3 \times 10^{-5}$	89% actividad después de 21 días	12
Mbouguen y col., 2007	Carbono vitrificado	Adsorción en organo-arcilla esmectita con trimetilpropilamonio	Disolución tampón de fosfato pH 6,5	$3,65 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	18	0,009	$2,0 \times 10^{-8}$ - $1,2 \times 10^{-5}$	90% actividad después de 14 días	-
Xue y Shen, 2002	Platino	Atrapamiento en matriz de polianilina-poliacrilonitrilo	Disolución tampón de fosfato pH 6,5	$2,03 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	-	-	$5,0 \times 10^{-8}$ - $7,5 \times 10^{-5}$	3 meses	-
Li y col., 2005	Carbono vitrificado	Atrapamiento en matriz de gelatina entrecruzada con formaldehído	Disolución tampón de fosfato pH 6,0	$0,122 \text{ A M}^{-1}$	-	0,002	$5,0 \times 10^{-8}$ - $1,4 \times 10^{-4}$	77% actividad después de 7 días	10

Ref.	Electrodo	Sistema de inmovilización	Medio	Sensibilidad	J_{\max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	LD (μM)	Intervalo lineal (M)	Estabilidad	tr (s)
Campuzano y col., 2003	Disco de oro	Monocapas autoensambladas de ácido 3-mercaptopropiónico	Disolución tampón fosfato pH 7,0	$0,67 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	-	0,11	$2,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-4}$	87% actividad después de 7 días	-
Mailley y col., 2003	Pasta de carbono	Atrapamiento en polipirrol	Disolución tampón de fosfato pH 7,4	$4,7 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	103	-	-	3 días	< 20
Monteali y col., 2005	Carbono sonogel	Adsorción de enzima en sonogel con Nafion	Disolución tampón de fosfato pH 7,0	$82,5 \text{ mA M}^{-1}$	-	0,06	-	38 días	3,5
Morales y col., 2005	Grafito-teflón	Atrapamiento en granulados de grafito	Acetonitrilo/disolución tampón 80:20 pH 7,4	$6,5 \text{ A M}^{-1}$	-	1,1	$8,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	50 días	-
Cosnier y col., 2004	Carbono vitrificado	Interacción avidin-biotina con polipirrol y alginato	Acetonitrilo/disolución tampón 90:10	$0,001 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	2,3	-	$8,0 \times 10^{-5} - 7,0 \times 10^{-3}$	3 días	60
Cristea y col., 2005	Carbono vitrificado	Atrapamiento en derivado del polipirrol	Cloroformo	$0,016 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	0,73	-	$1,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-6}$	50% de actividad en 5 días	30
Stanca y col., 2004	Platino	Atrapamiento en polipirrol	Cloroformo	$0,002 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	-	0,05	límite superior $2,5 \times 10^{-3}$	3 meses	< 60

IV.8. Bibliografía

Abu Bin Hasan, S., Kaneko, T., Noda, A., Watanabe, M., **2005**. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 4976-4983

Aguilar-Sánchez, R., Áhuatl-García, F., Dávila Jiménez, M.M., Elizalde-Gonzalez, M.P., Guevara-Villa, M.R.G., **2005**. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 239-249

Allan, A.C.; Walker, J.R.I., **1988**. *Phytochemistry*. 27, 3075-3076

Besombes, J. L., Cosnier, S., Labbé, P., **1996**. *Talanta*. 43, 1615-1619

Birch, M.E., Coury, L.a., Heineman, W.R., **1990**. *Anal. Chem.* 62, 1123-1130

Bonhote, P., Dias, A.P., Papageorgiou, N., Kalyanasundaram, K., Gratzel, M., **1996**. *Inorg. Chem.* 35, 1168-1178

Campuzano, S., Serra, B., Pedrero, M., Manuel de Villena, FJ., Pingarrón, JM., **2003**. *Anal. Chim. Acta.* 494, 187-197

Carralero, V., Mena, ML., Gonzalez-Cortés, A., Yañez-Sedeño, P., Pingarrón, JM., **2006**. *Biosens. Bioelectron.* 22, 730-736

Choi, H.N., Kim, M.A., Lee, W-Y., **2005**. *Anal. Chim. Acta.* 537, 179-187

Coche-Guerente, L., Desprez, V., Diard, J. P., Labbé, P. **1999a**. *J. Electroanal. Chem.* 470, 53-60

Coche-Guerente, L., Desprez., V., Labbé, P., Therias, S., **1999b**. *J. Electroanal. Chem.* 470, 61-69

Cosnier, S., Szunerits, S., Mark, R.S., Novoa, A., Puech, L., Perez, E., Rico-Lattes, I., **2001**. *Talanta*. **2001**. 55, 889-897

Cosnier, S., Mousty, C., De Melo, J., Lepellec, A., Novoa, A., Polyak, B., Marks, R.S., **2004**. *Electroanal.* 16, 2022-2029

Cristea, C., Mousty, C., Cosnier, S., Popescuo, IC., **2005**. *Electrochim. Acta.* 50, 3713-3718

Cummings, E.A., Linqette-Mailley, S., Mailley, P., Cosnier, S., Eggins, B.R., McAdams, E.T., **2001**. *Talanta*. 55, 1015-1027

- Dall'Orto, V.C., Vago, J.M., Carballo, R.R., Rezzano, J.N., **2005**. *Anal. Lett.* 38, 19-33
- García-Molina, F., Peñalver, M.J., Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Cánovas, F., Tudela, J., **2005**. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.* 32, 185-192
- Gomes, S.A.S.S., Nogueira, J.M.F., Rebelo, M.J.F., **2004**. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1211-1216
- He, J-L., Yang, Yu., Yang, X., Liu, L-Y., Liu, Z-H., Shen, G-L., Yu, R-Q., **2006**. *Sens. Actuators B.* 114, 94-100
- Herrmann, K., **1976**. *J. Food. Technol.* 11, 433-438
- Hervás Pérez, J.P., Sánchez-Paniagua López, M., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B., **2006**. *Biosens. Bioelectron.* 22, 429-439
- Hervás Pérez, J.P., Sánchez-Paniagua López, M., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B., **2006**. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72, 443-461
- Ishii, K., Furuta, T., Kasuya, Y., **2001**. *J. Chromatogr. B.* 759, 161-168
- Ishii, K., Furuta, T., Kasuya, Y., **2003**. *J. Chromatogr. B.* 794, 49-56
- Kahn, V.; Andrawis, A., **1985**. *Phytochemistry.* 24, 905-908
- Kang, J., Lu, X., Zeng, H., Liu, H., Lu, B, **2002**. *Anal. Lett.* 35, 677-686
- Kato, R., Nakadate, I., Yamamoto, S., Sugicyma, T., **1983**. *Carcinogenesis.* 4, 1301-1305
- Kim y Lee, **2003**. *Anal. Chim. Acta.* 479, 143-150.
- Kubisa, P, **2005**. *J Polym Sci Part A: Polym Chem.* 43, 4675-4683
- Li, N., Xue, MH., Yao, H., Zhu, J-J., **2005**. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 1127-1132
- Lim, S., Wei, J., Lin, J., Li, Q., You, J., **2005**. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2341-2346
- Lin, Xiang-Qin., Hea, Jian-Bo., Zha, Zheng-Gen., **2006**. *Sens. Actuators B.* 119, 608-614
- Liu, F., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., Wang, J., **1994**. *Talanta.* 41, 455-459

- Mailley, P., Cummings, E.A., Mailley, B., Eging, R., McAdams, E., Cosnier, S, **2003**. *Anal. Chem.* **75**, 5422-5428
- Mallakpour, S.; Kowsari, E. **2005**. *J Polym Sci Part A: Polym Chem.* **43**, 6545-6553
- Marcilla, R., Blázquez, J.A., Rodríguez, J., Pomposo, J.A., Mecerreyes, D., **2004**. *J. Polym. Sci.* **42**, 208-212
- Marcilla, R., Blázquez, J.A., Fernandez, R., Grande, H., Pomposo, J.A., Mecerreyes, D., **2005**. *Macromol. Chem. Phys.* **206**, 299-304
- Mbougouen, JK., Ngameni, E., Walcarius, A., **2007**. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 269-275
- Meyer, A.S., Heinonen, M., Frankel, E.N., **1998**. *Food Chem.* **61**, 71-75
- Mohammadi, H., Amine, A., Cosnier, S., Mousty, C., **2005**. *Anal. Chim. Acta.* **543**, 143-149
- Molina, MJ., Gomez-Anton, MR., Pierola, IF., **2004**. *J. Polym. Sci. Part. B: Polym. Phys.* **42**, 2294-2307
- MonteREALI, M., Vastarella, W., Della Seta, L., Pilloton, R., **2005**. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **85**, 795 - 806
- Morales, M.D., Gonzalez, M.C., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., **2005**. *Microchem. J.* **80**, 71-78
- Mousty, C., Cosnier, S., Shan, D., Mu, S., **2001**, *Anal. Chim. Acta.* **443**, 1-8
- Muldoon, M.J, Gordon, C.M., **2004**. *J. Polymer Science Part A: Polym.Chem.* **42**, 3865-3869
- Ohno, H. **2005**. *Electrochemical Aspects of Ionic Liquids*;Wiley: New York
- Ohno, H., Yoshizawa, M., Ogihara, W., **2003**. *Electrochim. Acta.* **48**, 2079-2083
- Ohno, H., Yoshizawa, M., Ogihara, W., **2004**. *Electrochim. Acta.* **50**, 255-261
- Pacios, IE., Pierola, IF., **2006**. *Macromolecules.* **39**, 4120-4127
- Park, S., Kazlauskas, R.J., **2001**. *J. Org. Chem.* **66**, 8395-8401
- Park, S.; Kazlauskas, R. **2003**. *J. Curr Opin Biotechnol.* **14**, 432-437

- Percec, V. Grigoras, C., **2005**. J Polym Sci Part A: Polym Chem. 43, 5609-5619
- Pérez López, J.A., Espigares García, M., **1995**. Universidad de Granada. 32-37
- Poyard, S., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Cosnier, S., Labbe, P., Besombes, J.L., **1996**. Sens. Actuators. B. 33, 44-49
- Rajesh., Kaneto, K., **2005**. Current Applied Physics. 5, 178-183
- Ram, M.K., Adami, M., Paddeu, S., and Nicolini, C., **2000**. Nanotechnology. 11, 112-119
- Robb, D.A., Gutteridge, S., **1981**. Phytochemistry. 20, 1481-1485
- Rogers, R. D.; Seddon, K. R.; Volkov, S. In Green Industrial Applications of Ionic Liquids; NATO Science Series; Kluwer: Boston, **2002**.
- Rubio Retama, B.J., López Cabarcos, E., López Ruiz, B., **2003**. Biomaterials. 24, 2965-2973
- Rubio Retama, B.J., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B., **2005**. Talanta. 68, 99-107
- Sánchez-Paniagua López, M., Hervás Pérez, J.P., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B., **2007**. Electroanalysis. 19, 370-378
- Schöfer, S.H., Kaftzik, N., Wasserscheid, P., Kragl, U., **2001**. Chem. Commun. 5, 425-426
- Shan, D., Cosnier, S., Mousty, C., **2003a**. Anal. Chem. 75, 3872-3879
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S., Mu, S., **2003b**. Electroanalysis. 15, 1506-1512
- Shan, D., Zhu, M., Xue, H., Cosnier, S., **2007**. Biosens. Bioelectron. 22, 1612-1617
- Silva, M.E., Dutra, E.R., Mano, V., Machado, J.C., **2000**. Polymer degradation and stability. 67, 491-495
- Snedden, P., Cooper, A.I., Scout, K., Winterton, N., **2003**. Macromolecules. 36, 4549-4556
- Song, Z., Hou, S., **2002**. Talanta. 57, 59-67
- Stanca, S.E., Popescu, I.C., **2004**. Bioelectrochem. 64, 47-52

STATGRAPHICS, 1994–2000, **1992**. Versión 5.0, Statistical Graphics Corp. Statgraphics User Manual. Manugistics Inc., MD, USA.

Van Rantwijk, F.; Lau, R. M.; Sheldon, R. A., **2002**. *Curr Opin Biotechnol.* 13, 565-571

Volikakis, G.J., Efstathiou, C.E., **2000**. *Talanta.* 51, 775-785

Wang, P., Li, Y., **1996**. *J. Electroanal. Chem.* 408, 77-81

Xiao, P., Zhao, F., Zeng, B., **2007**. *Microchem. J.* 85, 244-249

Xu, X., Ye, H., Wang, W., Yu, L., Chen, G., **2006**. *Talanta.* 68, 759-764

Xue, H., Shen, Z., **2002**. *Talanta.* 57, 289-295

Ying, L., Kang, E.T., Neoh, K.G., **2002**. *Membrane Sci.* 208, 361-374

Young, D.S., **1990**. *Effects of drug on clinical laboratory test*, third edition, AACC Press, Washington

Yu, J., Ju, H., **2004**. *Electroanal.* 16, 1305-1310

Zeng, B., Wei, S., Xiao, F., Zhao, F., **2006**. *Sens. Actuat. B.* 115, 240-246

Zhou, D., Ju, H., Chen, H., **1997**. *Sens. Actuat. B.* 40, 89-94

Zoulis, N.E., Efstathiou, C.E., **1996**. *Anal. Chim. Acta.* 320, 255-26

V. CONCLUSIONES

1. Los biosensores de tirosinasa diseñados mediante los dos tipos de sistemas de inmovilización enzimáticos considerados, atrapamiento en micropartículas poliméricas y adsorción en matrices inorgánicas, proporcionan respuestas adecuadas y repetibles en la determinación de compuestos fenólicos.

2. Al comparar los resultados obtenidos con los diferentes biosensores en la determinación de fenoles simples, se observa que los formados por matrices inorgánicas presentan mayor sensibilidad e intensidad máxima y menor límite de detección que los preparados con micropartículas poliméricas.

3. Entre los biosensores formados por micropartículas poliméricas, los preparados con poliacrilamida presentan una mayor sensibilidad y menor límite de detección.

4. Entre los biosensores preparados con matrices inorgánicas, el biosensor de brushita presenta, para la determinación de catecol, una mayor sensibilidad y menor límite de detección que el obtenido con laponita, sin embargo, este último presenta una mayor intensidad máxima.

5. Los flavonoides rutina y quercetina sólo dan respuesta con los biosensores de matrices inorgánicas. En ambos casos, la respuesta a quercetina es menor a la obtenida para su derivado glicosilado. Sin embargo para la determinación de quercetina, se obtiene una mayor sensibilidad y un mejor límite de detección con el biosensor de brushita. Con el biosensor de brushita se obtiene una mayor sensibilidad y menor límite de detección en la determinación de quercetina.

6. Los biosensores que dan respuesta al catecol en medios predominantemente orgánicos son los preparados con micropartículas de poli (vinilimidazol) y brushita, obteniéndose una sensibilidad mayor y menor límite de detección en este último caso. La respuesta al catecol en medio predominantemente orgánico es siempre menor que la obtenida en medio acuoso. El aumento de la proporción de agua en las mezclas acetonitrilo:disolución tampón mejora las propiedades analíticas de estos biosensores, manteniéndose prácticamente constantes a partir de un contenido de agua del 20% en la mezcla. Esta mejora de las propiedades analíticas es más acentuada en el caso del biosensor de brushita.

7. Los tiempos de respuesta de los dispositivos analíticos en la determinación de catecol en medio acuoso son considerablemente menores cuando se utiliza como sistema de inmovilización la adsorción de la enzima en matriz inorgánica. En medios predominantemente orgánicos el biosensor de poli (vinilimidazol) presenta tiempos de respuesta muy elevados mientras que en el biosensor de brushita se mantiene similar al obtenido en medio acuoso.

8. La enzima atrapada en micropartículas poliméricas, una vez liofilizadas éstas y conservadas en refrigerador, mantiene su actividad enzimática durante al menos 1 año.

9. Los biosensores preparados con micropartículas presentan una mayor estabilidad que los preparados con matrices inorgánicas. Al realizar las medidas en medios predominantemente orgánicos, se observó un descenso en la estabilidad independientemente del tipo de matriz utilizada.

10. El biosensor de brushita es el que proporciona mejores resultados en el análisis de compuestos fenólicos en aguas residuales.

V. CONCLUSIONS

1. Les biocapteurs à tyrosinase conçus grâce aux deux types de systèmes d'immobilisation enzymatiques envisagés, l'encapsulation dans des microparticules polymériques et l'adsorption dans des matrices inorganiques, fournissent des réponses adéquates et reproductibles pour la détermination de composés phénoliques.

2. En comparant les résultats obtenus avec les différents biocapteurs pour la détermination de phénols simples, on observe que ceux préparés avec des matrices inorganiques présentent une plus grande sensibilité, une intensité maximale plus importante ainsi qu'une plus petite limite de détection que ceux préparés avec des microparticules polymériques.

3. En ce qui concerne les biocapteurs formés par des microparticules polymériques, ceux préparés avec le polyacrilamide présentent une plus grande sensibilité et une plus petite limite de détection.

4. Pour les biocapteurs préparés avec les matrices inorganiques, le biocapteur à base de brushite présente, pour la détermination du catéchol, une plus grande sensibilité et une plus petite limite de détection que celui obtenu avec la laponite, toutefois ce dernier présente une plus grande intensité maximale.

5. Les flavonoïdes rutine et quercétine répondent seulement avec les biocapteurs à base de matrices inorganiques. Dans les deux cas, la réponse à la quercétine est plus petite que celle obtenue pour son dérivé glycosilé. Cependant pour la détermination de la quercétine, on obtient une plus grande sensibilité et une meilleure limite de détection avec le biocapteur à base de brushite.

6. Les biocapteurs qui répondent au catéchol dans des milieux principalement organiques sont ceux préparés avec des microparticules de poly(vinylimidazole) et la brushite, on obtient une sensibilité plus grande et une plus petite limite de détection dans ce dernier cas. La réponse du catéchol au milieu principalement organique est toujours plus petite que celle obtenue au milieu aqueux. L'augmentation de la proportion d'eau dans les mélanges acétonitrile:solution tampon améliore les propriétés analytiques de ces biocapteurs, en devenant pratiquement constantes à partir d'une teneur en eau de 20% dans le mélange. Cette amélioration des propriétés analytiques est accentuée dans le cas du biocapteur de brushite.

7. Les temps de réponse des dispositifs analytiques pour la détermination de catéchol au milieu aqueux sont considérablement plus petits quand on utilise comme système d'immobilisation l'adsorption de l'enzyme en matrice inorganique. Dans des milieux principalement organiques, le biocapteur à base de poly (vinylimidazole) présente des temps de réponse très élevés tandis qu'avec le biocapteur à base de brushite il reste semblable à celui obtenu au milieu aqueux.

8. L'enzyme encapsulée dans des microparticules polymériques, une fois celles-ci lyophilisées et conservées au réfrigérateur, conserve son activité enzymatique pendant au moins une année.

9. Les biocapteurs préparés avec des microparticules présentent une plus grande stabilité que ceux préparés avec les matrices inorganiques. En effectuant les mesures dans des milieux principalement organiques, on a observé une diminution de la stabilité quelque soit le type de matrice utilisée.

10. Le biocapteur de brushite est celui qui fournit les meilleurs résultats dans l'analyse des composés phénoliques dans des eaux résiduelles.

Anexo: lista de abreviaturas

DSC: Calorimetría diferencial de barrido
CV: coeficiente de variación
E_a: Energía de activación
ECS: Electrodo de calomelanos saturado
GA: Glutaraldehído
GOx: Glucosa oxidasa
IR: Infrarrojos
J_{max}: Densidad de corriente máxima
K_M: Constante de Michaelis-Menten
LD: Límite de detección
LIPs: Líquidos iónicos polimerizados
PAA: Poliacrilamida
PPO: Tirosinasa
PSA: Persulfato de amonio
SEM: Microscopia electrónica de barrido
TGA: Análisis termogravimétrico
T_g: Temperatura de transición vítrea
Tr: Tiempo de respuesta
TEMED: NNN'N'-tetra-metil-etilen-diamina
UI: Unidades internacionales