

**DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER TECNOLOGIA
PLANAR PER A L'ANÀLISI AGROALIMENTÀRIA**

MEMORIA PRESENTADA PER

Miquel Albareda i Sirvent

PER A OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN CIÈNCIES QUÍMIQUES



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Química

Bellaterra, setembre de 2002

Miquel Albareda i Sirvent

**Desenvolupament de biosensors per tecnologia
planar per a l'anàlisi agroalimentària**

Aquesta tesi doctoral, que porta per títol "Desenvolupament de biosensors per tecnologia planar per a l'anàlisi agroalimentària", ha estat realitzada als laboratoris del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, per en Miquel Albareda i Sirvent, sota la direcció del professor Salvador Alegret i amb la codirecció del Dr. Arben Merkoçi.

Bellaterra, setembre de 2002

Salvador Alegret,
Catedràtic de Química Analítica

Grup de Sensors & Biosensors
Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici Cn. 08193 Bellaterra
Telf: +34 93 581 21 18. Fax: +34 93 581 23 79

La ignorancia afirma o nega rotundament; la ciència dubta

Voltaire (s. XVIII)

ABREVIATURES

§	apartat
AC	acetat de cel·lulosa
ATChCl	clorur de <i>S</i> -acetiltiocolina
AChE	enzim acetilcolinesterasa
BTChCl	clorur de <i>S</i> -butiriltiocolina
BChE	enzim butirilcolinesterasa
Bios.	biosensor
BSA	albúmina de sèrum boví
C	carboni (grafit)
CMC	carboximetilcel·lulosa
CoPC	ftalocianur de cobalt
C/Pt	carboni platinitzat
CTC	complexes orgànics de transferència de càrrega
DSR (o RSD)	desviació estàndard relativa
E	enzim
EI	complex enzim-inhibidor
ES	complex enzim-substrat
et al	i altres
Fc	ferrocè
FIA	flow injection analysis (anàlisi per injecció en flux)
GDH	enzim glucosa deshidrogenasa
GOD	enzim glucosa oxidasa
HEC	hidroxietilcel·lulosa
HRP	enzim peroxidasa
I	intensitat amperòmetrica
I _{ee}	Intensitat d'estat estacionari
I _{gG}	immunglobulina G
I _p	Intensitat d'estat estacionari en presència d'inhibidor (pesticida)
K	constant de velocitat
K _m	constant de Michaelis-Menten
K _{mapp}	constant aparent de Michaelis-Menten
I.d.	límit de detecció
LDH	enzim lactat deshidrogenasa

LOD	enzim lactat oxidasa
m	pendent
MB	meldola blue (o blau de meldola)
MDH	enzim malat deshidrogenasa
n	nombre d'experiències
NAD ⁺ /NADH	nicotin adenin dinucleòtid (espècies oxidada i reduïda respectivament)
P	producte
PE	poli(etilè)
Pt	platí
PTFE	politetrafluoroetilè
PVB	polivinilpirrolidina
PVC	clorur de polivinil
PVP	polivinilbutiral
r	coeficient de regressió
S	substrat
SG	sol-gel (matriu de sílice)
sp	<i>screen-printing</i>
TCNQ	tetracianoquinodimetà
TEOS	tetraetil ortosilicat
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometà
TTF	tetratiofulvalè
U	unitats enzimàtiques (1U hidrolitza 1.0 μmol/min)
UV	ultraviolat
V _{max}	velocitat màxima de reacció
XO	xantina oxidasa

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ: SENSORS I BIOSENSORS

1.1	Conceptes generals	1
1.2	Transductors amperòmètrics	8
1.3	Biosensors amperòmètrics	9
1.4	Tecnologia de capes gruixudes (<i>thick film</i>)	14
1.4.1	Biosensors fabricats mitjançant tècniques serigràfiques (<i>screen printing</i>)	17
1.4.1.1	Membrana de biosensors <i>thick film</i>	18
1.4.2	Configuració i tècniques d'immobilització del material biològic en biosensors <i>thick film</i>	20
1.4.2.1	Configuracions basades en deposicions de capa múltiple	22
1.4.2.1.1	Immobilització enzimàtica per adsorció	22
1.4.2.1.2	Immobilització enzimàtica mitjançant crosslinking amb glutaraldehyd	25
1.4.2.1.3	Immobilització enzimàtica per atrapament	28
1.4.2.1.4	Immobilització enzimàtica mitjançant electropolimerització	29
1.4.2.2	Configuració de capa múltiple screen-printed: Impressió de pastes enzimàtiques mitjançant tècniques serigràfiques	31
1.4.2.3	Configuracions basades en la deposició d'una sola capa. Estratègia de biocomposit	33
1.4.2.4	Perspectives	36
1.5	Objectius	38
	Bibliografia	40

PART I**Desenvolupament de biosensors planars basats en inhibició enzimàtica
per a l'anàlisi de pesticides****CAPÍTOL 2. DISSENY I CONSTRUCCIÓ D'UN BIOSENSOR PLANAR PER A LA DETERMINACIÓ D'INHIBIDORS****ENZIMÀTICS EN L'ANÀLISI DE PESTICIDES**

2.1	Introducció	45
2.2	Disseny i construcció d'un biosensor planar	46
2.2.1	Disseny i construcció dels suports	46
2.2.1.1	Materials, aparells i reactius	46
2.2.1.2	Preparació de les pistes conductores sobre el suport mitjançant tècniques fotolitogràfiques	47
2.2.2	Disseny i construcció del transductor	49
2.2.2.1	Materials i reactius	49
2.2.2.2	Preparació de la pasta conductora	50
2.2.2.3	Preparació del transductor mitjançant tècniques <i>thick-film</i>	50
2.2.3	Disseny i construcció del biosensor	52
2.2.3.1	Configuració manual	52
2.2.3.2	Configuració de múltiple capa	54
2.2.3.3	Biosensors basats en biocompòsits	55
2.3	Mesurament Amperomètric	55
	Bibliografia	55

CAPÍTOL 3. CARACTERITZACIÓ ELECTROQUÍMICA DEL TRANSDUCTOR GRAFIT-EPOXI

3.1	Introducció	57
3.2	Determinació dels paràmetres característics d'un transductor mitjançant voltamperometries cícliques	58
3.3	Aparells i reactius	61

3.4 Activació del transductor	61
3.5 Efecte del contingut de grafit en l'activació i resposta del transductor	63
3.5.1 Variació dels potencials de pic d'oxidació i reducció en funció del contingut de grafit en el transductor	64
3.5.1.1 Activació per ciclat de potencial	64
3.5.1.2 Activació potencioestàtica	66
3.5.2 Efecte del contingut de grafit sobre les corbes de calibració	70
3.6 Característiques de resposta del transductor en solucions de $K_4[Fe(CN)_6]$	71
3.6.1 Potencial òptim de treball	72
3.6.2 Dinàmica de resposta	72
3.6.3 Paràmetres de calibració	73
3.6.4 Reproductibilitat	73
3.6.4.1 Per a diferents transductors	74
3.6.4.2 Per un mateix transductor	76
3.6.5 Temps de vida	76
3.7 Conclusions	77
Bibliografia	78

CAPITOL 4. CARACTERITZACIÓ ELECTROQUÍMICA D'UN BIOSENSOR PLANAR DE COLINESTERASES CONSTRUÏT EN DIFERENTS CONFIGURACIONS

4.1 Introducció	79
4.2 Biosensors planars de ChE	81
4.3 Experimental	81
4.3.1 Aparells i reactius	81
4.3.2 Procediment de mesurament	82
4.4 Configuració manual	83
4.4.1 Efecte del contingut de grafit en la resposta del biosensor	83
4.4.2 Efecte del pH en el pendent de la corba de calibració del substrat	84
4.4.3 Immobilització enzimàtica	85
4.4.3.1 Optimització de la càrrega enzimàtica	86
4.4.3.2 Control de la qualitat de la immobilització	89

4.4.4 Influència del contingut de glutaraldehid en la resposta del biosensor	91
4.4.4.1 Biosensor de BchE	92
4.4.4.2 Biosensor de AChE	93
4.4.5 Reproductibilitat dels biosensors	94
4.4.5.1 Reproductibilitat dels biosensors d'un mateix lot	95
4.4.5.2 Reproductibilitat dels biosensors en lots diferents	96
4.4.5.3 Resposta d'un mateix biosensor al llarg del temps	98
4.4.6 Dinàmica de resposta	101
4.4.7 Límit de detecció	101
4.4.8 Determinació de la Km aparent de l'enzim	102
4.4.9 Emmagatzematge del biosensor. Condicions generals i temps de vida	105
4.5 Configuració de múltiple capa	106
4.6 Biosensors basats en biocompòsits	108
4.6.1 Activació del biosensor	108
4.6.2 Potencial òptim de treball	108
4.6.3 Contingut d'enzim en el biocompòsit	109
4.6.4 Conclusions	112
Bibliografia	114

CAPÍTOL 5. DETERMINACIÓ DE PESTICIDES MITJANÇANT BIOSENSORS PLANARS BASATS EN LA INHIBICIÓ DE COLINESTERASES

5.1 Introducció Introducció: Inhibició enzimàtica	115
5.1.1 Inhibidors reversibles	116
5.1.2 Inhibidors irreversibles. Pesticides	118
5.1.2.1 Pesticides organofosforats i carbamats	122
5.2 Determinació de pesticides	123
5.2.1 Velocitat d'inhibició relativa	124
5.2.2 Percentatge d'inhibició	125
5.3 Detecció de pesticides mitjançant biosensors amb configuració de deposició manual	126
5.3.1 Efecte de la càrrega enzimàtica en el biosensor per a la detecció de pesticides	126
5.3.1.1 Determinació de paraoxon	126

Biosensor de BChE	127
Biosensor de AChE	132
5.3.1.2 Determinació de Carbofuran	133
5.4 Detecció de pesticides en configuracions de múltiple capa i biocompòsit	135
5.5 Anàlisi de pesticides en mostres real	137
5.5.1 Determinació de pesticides en aigua de xarxa	137
5.5.1.1 Determinació de paraoxon en aigua de subministrament	137
5.5.1.2 Determinació de carbofuran en aigua de subministrament	141
5.5.2 Determinació de pesticides en suc de taronja	142
5.5.3 Paràmetres de calibració	144
5.5.4 Recuperació	145
5.5.5 Conclusions	147
Bibliografia	148

PART II

Desenvolupament de biosensors en matrius sol-gel per a l'anàlisi de lactat i malat en vins

CAPÍTOL 6. DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ DE BIOSENSORS PLANARS DE GOD EN MATRIUS SOLGEL

6.1 Introducció	155
6.1.1 Modificació química de sensors electroquímics	156
6.1.1.1 Objectius de les modificacions químiques	156
Preconcentració	157
Permeabilitat selectiva	158
Electrocatalisi	159
6.1.2 Catalitzadors	160
6.1.2.1 Mediadors d'oxidació-reducció	160

6.1.2.1.1 Estratègies d'incorporació de modificadors a la configuració d'un sensor	162
6.1.3 La tècnica sol-gel	165
6.1.3.1 Matrius de sílice conductores: composts ceràmics de carboni	167
6.1.3.2 Immobilització de biomolècules en matrius sol-gel	168
6.2 Biosensors planars basats en GOD	170
6.2.1 Aparells i reactius	170
6.3 Formació de gel de sílice	171
6.3.1 Preparació i caracterització del sol-gel	173
6.3.1.1 Protocol de preparació	173
6.3.2 Immobilització del material biològic	173
6.3.3 Estimació de l'activitat enzimàtica en una matriu de sílice	174
6.4 Construcció de biosensors sol-gel	175
6.4.1 Impressió de la pista conductora i del transductor	175
6.4.2 Preparació i impressió de les matrius de gel de sílice	176
6.5 Caracterització de biosensors sol-gel de GOD	177
6.5.1 Procediment d'anàlisi	177
6.5.2 Optimització de la glucosa oxidasa	178
6.5.3 Avaluació amperomètrica de biosensors de grafit i carboni platinitzat	180
6.5.4 Avaluació amperomètrica de biosensors amb hidroxietilcel·lulosa o carboximetilcel·lulosa	181
6.6 Comparació de biosensors sol-gel amb biosensors d'immobilització enzimàtica d'atrapament	182
6.7 Conclusions	183
Bibliografia	184

CAPÍTOL 7. DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ DE BIOSENSORS SOL-GEL DE LACTAT OXIDASA I LACTAT DES-HIDROGENASA BASATS EN TECNOLOGIA *THICK FILM* PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT EN VINS

7.1 Introducció	189
7.2 L'anàlisi de vins: Àcids del vi i mètodes d'anàlisi	191

7.2.1	Determinació de l'acidesa total d'un vi	192
7.3	Biosensors basat en LOD	193
7.3.1	Construcció del biosensor	193
7.3.2	Caracterització de biosensors sol-gel de LOD	195
7.3.2.1	Procediment d'anàlisi	195
7.3.2.2	Optimització del contingut d'enzim	195
7.3.2.3	Efecte del pH sobre la resposta del biosensor	197
7.3.2.4	Reproductibilitat dels biosensors	199
7.3.2.5	Condicions d'emmagatzematge	200
7.3.2.5.1	Temps de vida dels biosensors LOD	200
7.3.2.6	Efecte de l'addició de vi en un calibrat amperomètric	202
7.3.2.7	Determinació de lactat en vi mitjançant la tècnica de l'addició estàndard	203
7.3.2.8	Resposta del biosensor per diferents concentracions de vi	205
7.3.2.9	Resposta del biosensor en tres vins diferents	206
7.3.2.10	Reproductibilitat del biosensors LOD en mostres reals	208
7.4	Biosensor basat en LDH	209
7.4.1	Construcció i caracterització del transductor grafit-MB	210
7.4.1.1	Procediments analítics: Calibració amperomètrica	211
7.4.1.2	Estudi del potencial de treball	212
7.4.1.3	Reproductibilitat de la resposta	213
7.4.1.4	Estabilitat de la resposta en el temps	214
7.4.1.5	Protocol de neteja dels elèctrodes	215
7.4.2	Construcció i caracterització del biosensor sol-gel/LDH/NAD/grafit/MB	216
7.4.3	Optimització del potencial de treball	217
7.4.4	Optimització del contingut d'enzim	220
7.4.5	Reproductibilitat dels biosensors	221
7.4.6	Determinació de lactat en mostres reals mitjançant la tècnica de l'addició estàndard	223
7.5	Conclusions	225
	Bibliografia	228

CAPITOL 8. DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ DE BIOSENSORS SOL-GEL DE MALAT DESHIDROGENASA BASATS
EN TECNOLOGIA PLANAR: ANÀLISI D'ÀCID MÀLIC EN VI

8.1	Introducció. L'anàlisi de lactat en vins	233
8.1.1	Sistema NADH/NAD ⁺	234
8.2	Construcció i caracterització del transductor	236
8.2.1	Estudi del potencial de treball	236
8.2.2	Avaluació del transductor	237
8.2.2.1	Procediment d'anàlisi	237
8.2.2.2	Efecte de l'activació electroquímica en la resposta del transductor	238
8.2.3	Estudi de l'enzim en solució	239
8.3	Construcció i caracterització del biosensor	241
8.3.1	Estimació de la activitat enzimàtica de MDH en la matriu de sílice	242
8.3.1.1	Assaig espectrofotomètric	242
8.3.1.2	Calibració amperomètrica	242
8.3.2	Optimització de MDH i NAD ⁺	244
8.3.3	Estudi del potencial de treball	245
8.3.4	Estabilitat de la resposta en el temps	246
8.3.5	Efecte de l'addició de estabilitzants biològics en la resposta del biosensor trealosa-NAD-MDH sobre transductor de grafit/MB	247
8.3.5.1	Optimització del contingut de trealosa	248
8.3.6	Efecte de la incorporació del mediador en la matriu de sílice gel en la resposta del biosensor MB-trealosa-NAD-MDH	249
8.3.7	Paràmetres de resposta. Interval lineal, pendent, reproductibilitat i límit de detecció	250
8.4	Efecte de l'addició de vi en un calibrat amperomètric	253
8.5	Anàlisi d'àcid màlic per mètodes espectrofotomètrics	253
8.6	Determinació de malat en vins mitjançant la tècnica de l'addició estàndard	256
8.6.1	Anàlisi d'àcid màlic en vi Chardonnay	256
8.6.1.1	Resposta del biosensor per a diferents concentracions de vi	256
8.6.1.2	Anàlisi d'àcid màlic mitjançant biosensors de lots diferents	257
8.6.2	Anàlisi d'àcid màlic en vi Sauvignon	258
8.6.3	Anàlisi d'àcid màlic en vi Muller Thurgau	260
8.7	Reproductibilitat dels biosensors desenvolupats en mostres reals	262

8.8	Optimització del contingut de trealosa en sensors aplicats a mostres reals	264
8.9	Comparació de la resposta de biosensors basats en transductors de grafit vs biosensors basats en transductors de grafit-Meldola Blue	265
8.10	Efecte de l'addició de una membrana d'acetat de cel·lulosa (AC) en la resposta del biosensor	266
8.11	Conclusions	268
	Bibliografia	272
 CAPITOL 9. RESUM I CONCLUSIONS FINALS		 275
 ANNEXES		
A.	PROGRAMA DE REGISTRAMENT DE DADES	283
B.	PROTOCOL DE MESURA ESPECTROFOTOMÈTRICA DELS ÀCIDS LÀCTIC I MÀLIC	285
C.	PUBLICACIONS DE LA PRESENT TESI	
	The strategy of renewing biosensor surface: past, present and future. A review	293
	Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review	305
	Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology	317
	Thick-film biosensors for pesticides produced by screen-printing of graphite-epoxy composite and biocomposite pastes	327
	Preliminary estimates of lactic and malic acid in wine using electrodes printed from inks containing sol-gel precursors	335

CAPÍTOL 1

Introducció: Sensors i Biosensors

1.1 CONCEPTES GENERALS

L'home i la biosfera

L'acció de l'home sobre l'ecosistema global, la biosfera, està produint canvis sense precedents sobre l'equilibri ecològic de la Terra. L'obtenció d'energia, l'agricultura i la indústria són, amb tota certesa, l'origen d'aquests canvis inusitats i les principals responsables del canvi global.

Des de l'inici del segle XVIII, el planeta ha perdut sis milions de quilòmetres quadrats de bosc¹, una superfície major que la d'Europa. Aquestes terres han estat transformades en terres de conreu i de pasturatge que han permès l'alimentació d'una població en constant creixement. Durant els darrers 250 anys, el desenvolupament agrícola i industrial ha provocat un augment de més d'un 30% en la concentració de diòxid de carboni a l'atmosfera².

Aquests canvis han afectat òbviament a la resta d'ésser vius que conviuen amb nosaltres. Les estimacions més recents suggereixen que les velocitats d'extinció d'algunes espècies són, en l'actualitat, entre cent i mil vegades majors que les de fa cinquanta mil anys³. La pèrdua de biodiversitat, l'augment de les concentracions de productes tòxics en el medi ambient, tant orgànics com inorgànics, l'erosió del sòl, la disminució de la capa d'ozó de l'estratosfera, l'augment de l'acidesa de les precipitacions (pluja àcida), el canvi climàtic...Tots aquests fenòmens són símptomes d'una malaltia, provocada per l'apropiació de la biosfera per la nostra espècie.

El gran repte que la humanitat té plantejat al segle XXI és el de fer possible un desenvolupament econòmic i social solidari amb les generacions futures. Per assolir aquest objectiu, caldrà comprendre com afecten l'entorn les nostres activitats i, per tant, recollir el màxim possible d'informació en els diferents àmbits ambientals; només així podrem planificar

les accions necessàries per avançar cap a una societat en la qual l'impacte de les activitats humanes sobre el medi ambient no el degradi fins a límits insostenibles.

Al llarg dels últims trenta anys, hem anat conscienciant-nos de la intensa degradació ambiental a què està sotmès el nostre planeta. Al principi, només percebíem els problemes locals: rius contaminats pels abocaments industrials, boires tòxiques en moltes ciutats produïdes per les emissions dels cotxes, abocaments incontrolats de residus perillosos... Als països desenvolupats es van prendre mesures que ràpidament alleugerien -però no eradicaven- aquests problemes, però el pas del temps ens ha ajudat a comprendre que els problemes mediambientals no són només locals, sinó també globals. El canvi climàtic, la pèrdua de biodiversitat i la degradació del sòl, l'aigua i l'aire són fenòmens que es produeixen en tots els racons del nostre planeta.

La degradació mediambiental, però, no és obra dels darrers anys i, tot i que és ara quan la seva intensitat és major, ja fa milers d'anys que l'home canvia de forma irrecuperable el seu entorn, quasi bé des de la seva pròpia aparició.

En un principi, l'impacte de les societats de caçadors-recol·lectors sobre el medi ambient va ser limitat; d'una banda, la població aleshores era escassa i, de l'altra, com que les comunitats havien d'estar desplaçant-se contínuament, les seves possessions eren limitades i, en conseqüència, utilitzaven pocs recursos. El desenvolupament de l'agricultura i la ramaderia va marcar la fi del sistema de vida que havia caracteritzat els nostres avantpassats durant dos milions d'anys.

L'agricultura implicava la transformació de les terres amb l'objectiu de crear un hàbitat artificial en el qual es poguessin conrear plantes. Els nostres avantpassats passaren de tenir una vegetació variada que cobria el sòl durant tot l'any, a tenir uns pocs cultius que cobrien la terra només durant les èpoques de l'any en què creixien les collites. El sòl va quedar, així, exposat als vents i a la pluja i va erosionar molt més de pressa que el sòl dels ecosistemes naturals. La implantació de l'agricultura va implicar, alhora, la interrupció del reciclatge intern dels nutrients que es produeix als ecosistemes naturals. Aquests elements es van extraure de l'ecosistema juntament amb les collites i els agricultors, amb la finalitat de mantenir la fertilitat del sòl, van haver de tancar el cicle dels nutrients mitjançant l'aportació de fem o de residus humans, animals i vegetals. Per una altra part, la implantació del reg va crear un entorn encara més artificial, que va substituir els cultius de secà, que depenien de l'aigua ploguda. L'aportació de grans quantitats d'aigua al sòl va permetre als agricultors cultivar les plantes més productives, però va tenir uns efectes catastròfics a llarg termini. Per exemple, a Sumer es va desenvolupar, fa 5.500 anys, una civilització basada en el reg, que cultivava blat i ordi.

Amb el pas del temps, l'evaporació de les aigües de reg, causada per les altes temperatures estivals, va provocar una acumulació progressiva de sals en el sòl; a poc a poc, el rendiment de la terra va anar minvant i el blat, molt sensible a la presència de sals, va ser substituït per l'ordi. Els sumeris van desenvolupar l'escriptura fa 5.000 anys i, en textos de fa un 4.000 anys, descriuen com la terra anava tornant-se blanca per l'acumulació de sals en la superfície. La degradació dels sòls de Grècia, deguda a l'erosió, foren també exemples d'un problema que ja reflectiren Plató i Aristòtil en els seus escrits⁴.

Alhora, la tecnologia va facilitar un augment de la quantitat d'aliments disponibles i això va provocar el creixement de la població; les comunitats van anar fent-se sedentàries hi van aparèixer la propietat privada i l'acumulació de béns, de manera que va augmentar també la utilització dels recursos naturals.

No hi ha dubte que la utilització de terres artigades per a obtenir béns i serveis és l'alteració més important de l'ecosistema global causada per l'activitat humana. Avui en dia, aproximadament un 44% de les terres han estat transformades pels éssers humans⁵. L'efecte global, però, es molt superior a allò que ens podria fer pensar aquesta xifra: sovint, les terres no alterades s'han fragmentat per la intervenció humana en les àrees dels voltants i aquesta fragmentació ha afectat tant la composició de les terres com el funcionament d'aquests ecosistemes dispersos, aparentment verges.

És evident que aquesta alteració en l'entorn no tan sols afecta a la terra de per si, sinó que de retruc a la resta d'éssers vius que hi depenen. L'home, però, no s'ha limitat a una intervenció indirecta; les societats i els ecosistemes hem evolucionats junts des del mateix moment en que els primers humans vam aparèixer sobre la Terra. La nostra capacitat per a actuar en grup i el nostre ventall d'armes diverses ens han convertit en els caçadors més eficients de la història i això ens ha portat a provocar l'extinció de la megafauna. Un dels casos més flagrants és sens dubte el dodo i el moa, dues espècies de grans ocells sense ales (la darrera, una de les més grans que mai ha habitat la Terra) que habitaven Nova Zelanda i l'illa de Maurici i que es varen extingir totalment fa uns pocs centenars d'anys, en arribar els primers colons, després de milions d'anys de domini en les terres que els havien vist néixer. El bisó americà mereix també una menció especial en aquest apartat, després de la seva pràcticament desaparició en arribar l'home blanc a les grans planes d'Amèrica del Nord i reduir-ne els més de seixanta milions a uns pocs exemplars. L'extinció es va poder evitar gràcies a diverses entitats privades que van promoure la creació de reserves protegides a finals del segle XIX⁶.

El canvi global es va accelerar amb la Revolució Industrial. L'ús de combustibles fòssils com a fonts d'energia i l'extensió de la industrialització ens han permès disposar de molts més aliments i béns que mai. En aquests darrers 250 anys s'ha produït un creixement extraordinari de la població mundial i un augment espectacular dels recursos necessaris per a mantenir-la; però aquest procés ha provocat l'aparició de problemes mediambientals molt més complexos, interrelacionats i que cada vegada es posen de manifest més ràpidament.

No obstant això, l'home ha estat també l'única espècie animal capaç de reflexionar sobre la natura. Des de les pintures d'Altamira fins a les modernes revistes especialitzades, des d'Aristòtil fins a la societat actual basada en gran mesura en la ciència i la tecnologia, l'home ha observat i descrit el món que l'envolta en un intent i fins i tot en una necessitat de comprendre'l.

Darrerament, hom té un interès -podríem dir egoista- dels efectes antropogènics que realitzem sobre la natura, fruit de la creixent contaminació que s'estén a nivell mundial i, per tant, una exigència d'informació a pràcticament qualsevol nivell.

La informació química

Mai com fins ara, la societat en general no havia estat tan conscient de la necessitat d'informació química, ja que moltes de les decisions que li cal prendre corresponen a aquest àmbit.

Cada vegada més, en els més diversos camps biomèdics, ambientals i industrials, hi ha una demanda social d'informació analítica, més estricta i en condicions més extremes. Ens cal informació per a actuar d'una manera ràpida en activitats molt variades.

Cada dia apareixen nous objectes d'anàlisi, la quantitat de mostra disponible és cada vegada més petita, les concentracions són cada cop més baixes; es necessita una millor exactitud i precisió en els resultats, i aquests es volen en un temps cada vegada més breu i a un cost més baix.

La química analítica actual ha de donar resposta a aquesta demanda social, és a dir, cal disposar d'instrumentació que ens permeti dur a terme mesures *in situ*, que elimini els efectes de matriu, que aconseguixi una elevada selectivitat, que faciliti la manipulació, que es pugui aplicar a més d'un tipus de mostra i que permeti la modificació i adaptació dels mètodes i els instruments. En resum, cal l'obtenció de més i millor informació (qualitativa, quantitativa i estructural) sobre les substàncies o els sistemes materials, tot emprant el mínim possible de temps i recursos.

L'examen de les parts constituents d'un tot, separadament o relacionades entre si, és una de les formes bàsiques d'adquisició d'informació científica o tècnica. És la via analítica del coneixement científic⁷. En general, aquest **procés analític** consta de dos passos independents; en el primer la informació sobre la composició d'una mostra és creada i codificada en forma de senyal (generalment del domini elèctric o òptic) i en el segon, el senyal és descodificat i convertit en un resultat analític. La seva complexitat depèn del sistema de treball, tot i això es distingeixen un conjunt d'etapes preestablertes: mostreig, transport, conservació de la mostra, tractament, separació, reacció, detecció, processament del senyal i interpretació dels resultats.

Per aconseguir això, es disposa de reaccions analítiques clàssiques generadores d'informació, quantitativa i/o qualitativa, amb una limitada selectivitat.

Per tal de poder efectuar una determinació lliure d'interferències, s'han hagut de desenvolupar uns procediments analítics més complexos, sovint passant per processos previs de separació. Les tècniques instrumentals d'anàlisi (bàsicament, espectroscòpiques o electroquímiques) orientades, en principi, cap a l'etapa final de detecció o mesurament, han augmentat llur selectivitat a costa de mesurar propietats físiques d'interès analític més selectives que comporten un disseny instrumental sofisticat i costós.

Els sensors químics

Aquests equips d'anàlisi, malgrat el gran nombre d'avantatges que presenten, comporten un seguit de limitacions: són cars, requereixen un elevat manteniment i mà d'obra especialitzada, consumeixen una gran quantitat de reactius, generen una gran quantitat de residus i, el més important, han de treballar, necessàriament, confinats en ambients controlats.

En oposició a aquests grans equips d'anàlisi, i sovint en complementarietat, sorgeixen els *sensors químics*. Es tracta d'una nova classe d'instrumentació analítica, caracteritzada per unes dimensions petites, un baix cost, una utilització fàcil i una generació d'informació fiable en temps realⁱ.

ⁱ El terme "sensor", en general, es podria associar a aquells dispositius que són capaços de subministrar de forma contínua informació del món exterior a les unitats de processament de dades (ordinadors). Aquests veritables cervells electrònics, a partir del coneixement adquirit, poden intervenir en un sistema exterior de forma immediata i eficient gràcies als "sentits" proporcionats pels sensors, tot dotant-los d'anàlegs de la vista, l'oïda, el tacte, el gust o l'olfacte. De sensors hi ha de molts tipus; de temperatura, pressió, acceleració, radioactivitat, llum, so, etc. (sensors físics) o aquells que aporten informació d'alguns dels components que pertanyen a l'àmbit biomèdic, ambiental o industrial (sensors químics).

Un sensor químic és un dispositiu analític constituït bàsicament per un element químic o biològic capaç de reconèixer selectivament un determinat analit⁸. La informació química és originada a partir de reaccions químiques o d'algun canvi en les propietats físiques^{9,10} entre l'analit i l'element de reconeixement, transformant-se en un senyal primari (elèctric, òptic, tèrmic o màssic). Aquest element de reconeixement (receptor) es troba en contacte amb un transductor físic que converteix el senyal primari en un senyal secundari (generalment del domini elèctric), i aporta informació analítica qualitativa i quantitativa sobre la mostra, el procés o el sistema material que s'està investigant (figura 1.1).

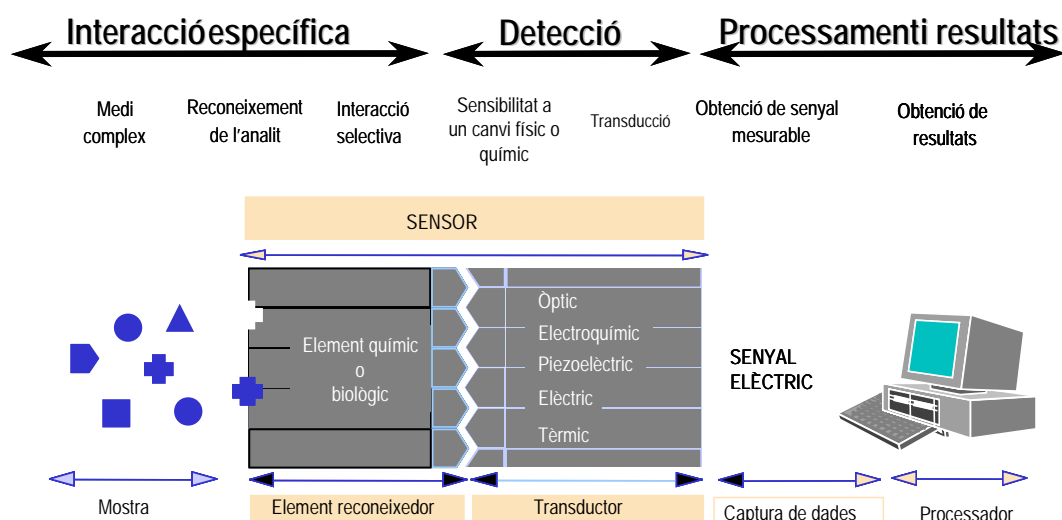


Figura 1.1 Principi general d'un sensor. L'analit és reconegut de forma selectiva pel receptor químic, generant un estímul que és captat per un transductor apropiat, de manera que s'obté un senyal proporcional a la seva concentració.

Els sensors sorgeixen, doncs, de la necessitat creixent d'instrumentació analítica que pugui generar informació fora de les parets del laboratori. Així, amb els sensors químics, disposem d'uns dispositius d'unes dimensions reduïdes, robusts, portàtils, fàcils d'utilitzar, i capaços de subministrar informació analítica de manera contínua. A més, simplifiquen, compacten, confinen, redueixen i en definitiva, integren, les etapes experimentals del procés analític¹¹.

Tal com ha succeït amb alguna de les noves tecnologies, el mercat potencial de dispositius analítics d'aquestes característiques és probable que sigui el dels productes de consum i d'utilització personal, tant per al confort i la seguretat domèstics (control de productes alimentaris, de fums, de fuites de gas, etc.), com per al control d'alguns paràmetres clínics

(glucosa en sang, proves d'embaràs, etc.). Fins i tot es podrien realitzar deteccions simultànies de diversos analits per mitjà d'una matriu de sensors, on cada element és el més selectiu possible per a un analit determinat (anàlisi de lactat i malat en vins per exemple). La indústria de l'alimentació demana mètodes ràpids per a l'estimació de la caducitat, el deteriorament o la contaminació dels productes. El control ambiental, cada cop més, genera unes necessitats específiques de detecció simple d'una manera fiable en medis molt complexos.

La recerca i el desenvolupament en el camp dels sensors químics estan, per una banda, dirigits a l'obtenció de sistemes de transducció més sensibles i, per altra banda, al desenvolupament de receptors d'ions i, especialment, de molècules, cada vegada més selectius (l·ligands macrocíclics, ionòfors, polímers conductors, polímers gravats molecularment -MIPs-, ceràmiques, compòsits, etc.).

Aquests receptors cal immobilitzarlos sobre els transductors més adients, sense que uns i altres perdin llurs característiques de funcionament. Hi ha tot un ventall de possibilitats d'immobilització, des de simples procediments per adsorció, atrapament dins d'un gel o matriu polimèrica, o per entrecruament dels receptors entre si per mitjà d'agents bifuncionals, fins a immobilitzacions complexes per unió covalent directa entre el receptor i el transductor. La immobilització dels reactius o de les espècies en general permet la reutilització d'aquests, un estalvi dels reactius i en alguns casos possibilita una millora de llurs característiques fisicoquímiques i de llur estabilitat. Tot i que la millora aconseguida en el procediment analític és evident, generalment resulta la etapa més costosa en el fabricació i optimització del sensor, pel que assolir immobilitzacions eficients i duradores esdevé un objectiu complicat. Per una altra banda, però, en el cas dels sensors d'un sol ús, fabricats a partir de tècniques de fabricació massiva i de baix preu, aquesta immobilització no cal que resulti tan eficient ja que n'hi ha prou en que mantingui la seva funcionalitat en el breu temps que dura una sola mesura.

Malgrat que cada vegada més hom aconsegueix materials més selectius per al desenvolupament de sensors per a aplicacions concretes, fins ara, en general, els receptors sintètics, presenten un grau de reconeixement limitat. Aquesta limitada selectivitat feu que, l'any 1962, Clark i Lions¹² i d'altres investigadors^{13,14} consideressin la possibilitat d'implementar sobre els transductors, materials de reconeixement molecular d'origen biològic molt més selectius que els de tipus sintètic amb la formació d'espècies que es complementen en geometria (forma i dimensions) i en energia (grups enllaçants).

Aquests sensors químics que incorporen material biològic en llur construcció són coneguts com a *biosensors*. Els dispositius desenvolupats en la present tesi pertanyen a aquests darrers i es basen en un transducció de tipus amperomètric.

1.2 TRANSDUCTORS AMPEROMÈTRICS

La interacció de reconeixement que s'estableix entre el receptor i l'analit es manifesta generalment per un canvi de calor, de massa, de propietats òptiques o elèctriques a la interfície d'un elèctrode amb la solució. Els transductors amperomètrics, que seran els emprats en el present treball, són transductors electroquímics, és a dir, transdueixen la informació electroquímica produïda en l'esdeveniment de reconeixement, en un senyal del domini elèctric.

El mesurament amperomètric es basa en l'oxidació o reducció d'una espècie electroactiva a la superfície d'un elèctrode (elèctrode de treball) al que s'aplica un potencial constant. El corrent resultant es mesura amb l'ajut d'un segon elèctrode (elèctrode auxiliar) que tanca el circuit. Per tal de fixar el potencial de l'elèctrode de treball s'utilitza un tercer elèctrode (elèctrode de referència). Amb un aparell anomenat potenciostat es mesura la intensitat (I) del sistema electroquímic alhora que és manté constant el potencial entre els elèctrodes de treball i el de referència. El corrent que s'obté (I) és una mesura directa de la velocitat de reacció electroquímica (velocitat d'oxidació o reducció de l'analit a l'elèctrode), que ve descrita per la llei de Faraday:

$$I = nF (dc/dt)$$

On dc/dt és la velocitat d'oxidació o reducció (mol/s), F la constant de Faraday i n el nombre d'electrons per molècula involucrats en l'oxidació o reducció de l'espècie electroactiva. La velocitat de reacció depèn de la velocitat de transferència dels electrons a la superfície de l'elèctrode i del transport de massa de l'analit a la superfície. Aquest darrer paràmetre depèn de la concentració d'analit a la solució, de l'àrea de l'elèctrode i de les condicions de difusió i convecció¹⁵. Si la resposta dels elèctrodes es mesura en una solució estàtica, el corrent (I) decreix amb el temps (t) seguint l'equació descrita per Cottrell:

$$I = nFA (D/t)^{1/2} C$$

On C és la concentració del compost electroactiu, A l'àrea de l'elèctrode i D el coeficient de difusió del compost electroactiu a la solució. En aquestes condicions el corrent esdevé zero

després d'un període de temps llarg. Si bé la pròpia convecció aleatòria fa que s'obtinguin baixes intensitats de corrent al cap de llargs períodes¹⁵. A la pràctica hom força la convecció agitant la solució o movent l'elèctrode respecte el líquid. D'aquesta manera es forma una capa estàtica a la superfície de l'elèctrode d'un gruix (L) que depèn de la velocitat d'agitació del líquid o del moviment relatiu de l'elèctrode¹⁶. Per tant el transport de massa a la superfície de l'elèctrode ve determinat solament per la difusió en aquesta capa.

D'aquesta forma s'obté un estat estacionari en un temps relativament breu, i el valor final de la intensitat depèn de la concentració d'analit. Aquesta relació pot expressar-se mitjançant la següent equació:

$$I = nFACs D/L$$

On C_s és la concentració d'analit en la solució. Aquesta equació pot simplificar-se en la següent:

$$I = KCs$$

On K és una constant que inclou la constant de Faraday, l'àrea de l'elèctrode, el coeficient de difusió, etc. Per a la utilització d'aquesta equació s'assumeix que la distribució de l'analit en la solució és uniforme fins a la capa de difusió, i que a la superfície de l'elèctrode la concentració d'analit és zero.

Habitualment els elèctrodes de treball i auxiliar estan formats per materials conductors i inerts (metalls nobles, grafit, altres modificacions de carboni i polímers conductors) i l'elèctrode de referència és de Ag/AgCl.

1.3 BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS

Podem considerar un biosensor com un dispositiu que conté material biològic com element de reconeixement, el qual, en conjunció amb un transductor transforma la concentració d'un determinat analit (i que no ha de ser, necessàriament, de naturalesa biològica) que es troba en una matriu complexa en un senyal mesurable (elèctric, òptic, etc.) i proporcional, tal i com s'observa en la figura 1.1.

Els biosensors incorporen enzims, anticossos o altres materials biològics de reconeixement en estret contacte amb el transductor. Les capacitats de reconeixement molecular de les substàncies biològiques no es poden emular normalment per materials sintètics.

Per tal de que es pugui determinar la concentració d'una espècie en una mescla complexa (com aigua residual, productes alimentaris, brou de fermentació o mostres clíniques) els biosensors han de tenir una sèrie de característiques: selectivitat, proporcionalitat i mesurabilitat.

(i) **Selectivitat:** la seva afinitat selectiva pel substrat hauria de ser suficient per diferenciar l'analit d'interès de la resta de compostos de la solució. Materials biològics com enzims i anticossos, interaccionen de forma específica amb els substrats. El reconeixement molecular selectiu és la base del nostre sistema immunitari, materialitzat a través de les reaccions d'afinitat dels anticossos; per una altra banda, alguns enzims presenten reaccions biocatalítiques que permeten diferenciar fins i tot compostos estereoisòmers (com per exemple els aminoàcids L i D). Existeixen enzims amb un ampli interval de substrats, però que entre els quals tenen una estructura química comuna, com per exemple les proteases, que són específiques pels enllaços peptídics. Aquestes molècules biològiques presenten una sèrie de desavantatges, però. Sovint són sensibles als canvis tèrmics i químics, i es degraden amb facilitat. Tot i això, mentre no es disposin de materials sintètics amb les selectivitats requerides, haurem d'emprar aquests biopolímers i considerar les seves propietats a l'hora de dissenyar, produir i aplicar els biosensors.

(ii) **Proporcionalitat:** s'ha de produir un canvi estequiomètric en la concentració química o un canvi en algun paràmetre físic, induït per la presència de l'analit a determinar.

La proporcionalitat del senyal pot ser degut tant a la biomolècula com a les propietats del transductor. Així, per exemple, l'enzim s'enllaça a un substrat i catalitza la seva conversió a un producte final. Sovint resulta necessari un cofactor com NADH o ATP. D'aquesta forma, tant l'aparició del producte de la reacció enzimàtica com el consum del cofactor, pot ser usat com una mesura de la concentració de substrat. Els anticossos són l'altre grup important en el disseny de biosensors. Els seus substrats s'anomenen antigens. Després de l'enllaç antigen-anticòs, algunes propietats físiques del complex canvien, com la seva massa, el seu índex de refracció o la seva constant dielèctrica. Aquests canvis poden ser monitoritzats pel transductor. Només alguns ions pels que existeix el compost biològic, mostren la selectivitat necessària. L'exemple més conegut és l'enllaç selectiu entre el K^+ i valinomicina¹⁷. De fet aquest compost forma part dels receptors anomenats ionòfors, emprats en la construcció de sensors químics potenciomètrics¹⁸.

(iii) Mesurabilitat: el canvi resultant ha de poder-se recollir en el transductor, de forma que s'obtingui un senyal mesurable. La capacitat de mesurar els canvis induïts o catalitzats pel compost biomolecular depèn del tipus de transductor. En la taula 1.1 podem veure els diferents principis en que es basen.

Taula 1.1 Típiques combinacions bioreceptor/transductor i el seu respectiu senyal.

Bioreceptor	Senyal transduïda	Tipus de transductor
Enzims	Conversió de substrat	Sensors electroquímics
	-consum del substrat específic	-potenciomètrics
	-generació del producte enzimàtic	-amperòmètrics
	-consum del cofactor	
	-producció de calor en el transcurs de la conversió enzimàtica	-Sensors termomètrics
	-emissió de llum (luciferasa)	-Sensors òptics
Anticossos i material genètic*	Enllaç de l'antigen (o cadena complementària)	
	-canvi de massa	-Sensors SAW, BAW
	-canvi en la constant dielèctrica	-Sensors capacitius
	-canvi de l'índex de refracció	-Sensors SPR
Ionòfors naturals	Complexació selectiva dels ions	Sensors electroquímics
	-canvi del potencial a la interfície	-potenciomètric

*sovint porten associat un marcador (de tipus enzimàtic) pel que el mètode de detecció emprat pot resultar més ampli
 SAW: *surface acoustic wave* (ona acústica de superfície); BAW: *bulk acoustic wave* (ona acústica de volum);
 SPR: *surface plasmon resonance*

Com ja s'ha comentat, la integració del material biològic i el transductor és l'aspecte més important del biosensor, fins i tot hi ha autors que anomenen aquesta interfície com el biosensor en si¹⁹.

Un dels avantatges de comptar amb aquests dos elements és que tan sols canviant la membrana enzimàtica, i donada la baixa selectivitat del transductor, podem construir un ampli ventall de sensors.

Sovint, no només un enzim és immobilitzat en la membrana, sinó dos o més poden cooperar per augmentar les propietats del biosensor; de la mateixa forma altres additius poden complementar la composició de la membrana (com mediadors tals com el ferroccè que disminueixen el potencial a aplicar, disminuint les interferències).

En els biosensors amperomètrics basats en enzims, una de les espècies involucrades en el reconeixement biomolecular ha de ser electroactiva, ja que es mesura la seva desaparició o formació per mitjà d'un transductor electroquímic²⁰. Els enzims més utilitzats en la construcció de biosensors amperomètrics són les oxidoreductases i les hidrolases²¹. Així els substrats de les oxidases (com la glucosa) són detectats a partir dels senyals provinents del H₂O₂ generat o l'O₂ consumit en la reacció enzimàtica de reconeixement, i els substrats de les deshidrogenases (com el cas de l'etanol) a partir del cofactor NADH produït. En altres casos, els biosensors amperomètrics poden estar basats en mediadors que actuen com acceptors artificials d'electrons entre els enzims i els transductors.

En la construcció d'un biosensor, com en qualsevol sensor químic, ens trobem bàsicament amb dues etapes ben diferenciades: la construcció del transductor i la immobilització de l'element reconeixedor. Donat que un biosensor està constituït fonamentalment per dues estructures, el bioreceptor i el transductor, la immobilització del receptor sobre el transductor resulta un dels principals problemes en la construcció del sensor. Quan el dispositiu que intentem desenvolupar és un biosensor, la dificultat augmenta ja que el receptor resulta de naturalesa biològica i per tant presenta una gran quantitat de factors externs que afecten la seva estabilitat.

Bàsicament existeixen dues estratègies per aconseguir aquesta immobilització: formació d'enllaços i atrapament (en ocasions combinacions d'ambdues²²).

En el primer es creen enllaços químics o físics entre el receptor i el transductor (adsorció, enllaç químic o covalent, etc.) o bé entrecreuaments químics amb els receptors per fer-los insolubles en medis aquosos (*cross-linking*).

En l'atrapament, l'element de reconeixement és oclòs en una matriu polimèrica, gel o microcàpsules. Una de les tècniques d'immobilització més simples és incorporar el material

receptor en un compòsit (elèctrode format per un material sensor constituït per una fase conductora de l'electricitat i, per almenys, una fase polimèrica aglutinadora), fet que resulta totalment compatible amb el desenvolupament de sensors químics d'estat sòlid i configuració planar.²³ Aquests sensors presenten una sèrie d'avantatges tal com un funcionament simple, dimensions petites, resistència física i sobretot reduïdes despeses de construcció, ja que es possible emprar tècniques de fabricació massiva que a més incrementaran la reproductibilitat del dispositiu²⁴. Els materials comunament emprats en la preparació de biosensors compòsits són resines epoxi (àmpliament desenvolupades en el nostre grup de recerca)^{25,26,27,28,29}, PTFE (o teflón)^{30,31,32,33} pastes polimeritzables per UV³⁴, silicones³⁵, ceràmiques³⁶, parafines³⁷ i gel de sílice^{38,39,40,41} entre d'altres.

Els biosensors són construïts sovint manualment, i hi ha nombroses publicacions on es descriuen les propietats dels sensors manuals. La construcció manual resulta apropiada en una primera etapa d'investigació, donada la seva versatilitat i la modesta infraestructura necessària per a la seva fabricació, però és difícil aconseguir la reproductibilitat en la producció necessària per aconseguir uns dispositius fiables.

Una altra tecnologia emprada és la de capes primes o *thin film*. Es basa en l'aplicació d'un conjunt de tècniques de deposició i gravat que juntament amb la realització de processos microlitogràfics, permeten la deposició seqüencial de capes amb un gruix de l'ordre de 1 a 10 micres (μm). El material és dipositat sobre un substrat (generalment oblies de silici) mitjançant processos tecnològics microelectrònics, com *sputtering*, deposició química en fase vapor (CVD), etc. Indubtablement, aquesta tecnologia permet dispositius miniaturitzats d'estat sòlid d'una gran reproductibilitat, tot i això la infraestructura necessària per portar-la a terme resulta de cost elevat, i per tant inviable en una primera línia d'investigació.

Un altre problema roman en el fet que les tècniques emprades no es poden aplicar en la deposició de material biològic, ja que es desnaturalitzaria.

Altres mètodes de fabricació són potencialment viables per a la producció massiva de biosensors, però possiblement una de les tècniques majoritàriament emprades en la producció de sensors amb material biològic és la coneguda com de capes gruixudes o *thick film*. En aquesta tècnica una pasta moderadament viscosa és forçada a passar a través d'una malla sobre una superfície conductora per formar una imatge. Aquesta imatge ha estat determinada prèviament mitjançant tècniques fotolitogràfiques. La tècnica s'ha estès en la producció de circuits i sensors de capes gruixudes (*thick film*), entre d'altres, ja que a la pasta

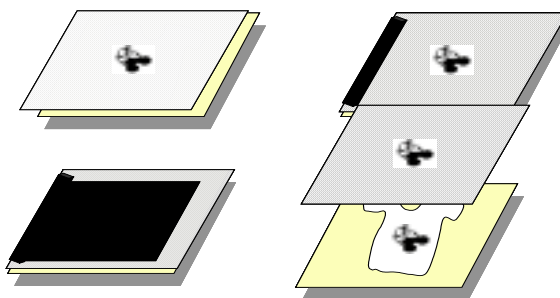
impresa a través de la malla se li pot proporcionar propietats elèctriques i químic/biològiques. Els avantatges que se n'obtenen, no només recauen en la millora de la reproductibilitat i rapidesa respecte a la construcció manual, donat el grau d'automatització del procés, sinó també en la disminució en les despeses de fabricació, molt inferiors a la inversió necessària en la tecnologia de *thin-film*. Per aquestes raons, fou la tecnologia escollida en el present treball, i sobre la que, tot seguit, ens centrarem principalment.

1.4 TECNOLOGIA DE CAPES GRUIXUDES (*THICK FILM*)

« on l'art es troba amb la ciència »

Un dispositiu *thick film* està format per una sèrie de capes de pastes o tintes especials dipositades una sobre l'altra sobre un substrat aïllant. Un dels factors clau que distingeix un sensor fabricat mitjançant tecnologia *thick film* és el mètode que s'utilitza per la deposició de les capes, anomenat *screen printing* (o impressió serigràfica), i que és possiblement una de les més antigues formes de reproducció gràfica. El procés de deposició gràfica i la consegüent obtenció de dispositius de capes gruixudes resulta essencialment el mateix que la impressió tradicional realitzada per als teixits de seda, o l'estampació de dibuixos sobre teixits de cotó, tasses, llapis, etc. (figura 1.2). Les principals diferències provenen dels materials emprats i del grau de sofisticació de la màquina d'impressió.

Figura 1.2. Representació d'una típica impressió serigràfica d'un dibuix sobre un teixit qualsevol (ex: samarreta) conegut també com *screen printing*.



Tot i que s'originà a la Xina fa aproximadament uns 2000 anys, el primer procés modern que utilitzà aquesta tecnologia data del 1850 a Anglaterra i França. Els primers escrits serigrafats aparegueren en 1911, però no fou fins el 1950 on l'aparició de nous materials específics per a la impressió serigràfica i que no es podien utilitzar en altres mètodes tradicionals, impulsà el progrés d'aquesta tècnica⁴².

Una màquina típica d'impressió de capes gruixudes consisteix en una fina pantalla de filaments entreteixits de niló, polièster o d'acer inoxidable, encaixada sota pressió en un marc de metall.

Prèviament, aquesta pantalla ha estat preparada per tal de poder serigrafiar un dibuix determinat. Per fer això la pantalla és cobreix amb una emulsió sensible a la llum ultraviolada (UV) sobre la que podem formar fotolitogràficament el dibuix desitjat. Quan es disminueix la densitat de filaments sobre aquest dibuix, la pasta pot passar a través i dibuixar el disseny preestablert sobre el substrat. La malla es situa a uns 0.5 mm del substrat on s'imprimirà la pasta. Aquesta pasta es col·loca en el revers de la malla i és arrossegada i pressionada per un pinzell o paleta, de forma que recorre la malla dipositant-se sobre el substrat en aquelles zones on la malla està oberta (figura 1.3). D'aquesta forma s'aconsegueix que el mateix disseny que es tenia sobre la malla, es trobi ara sobre el substrat i amb els materials escollits per al biosensor.

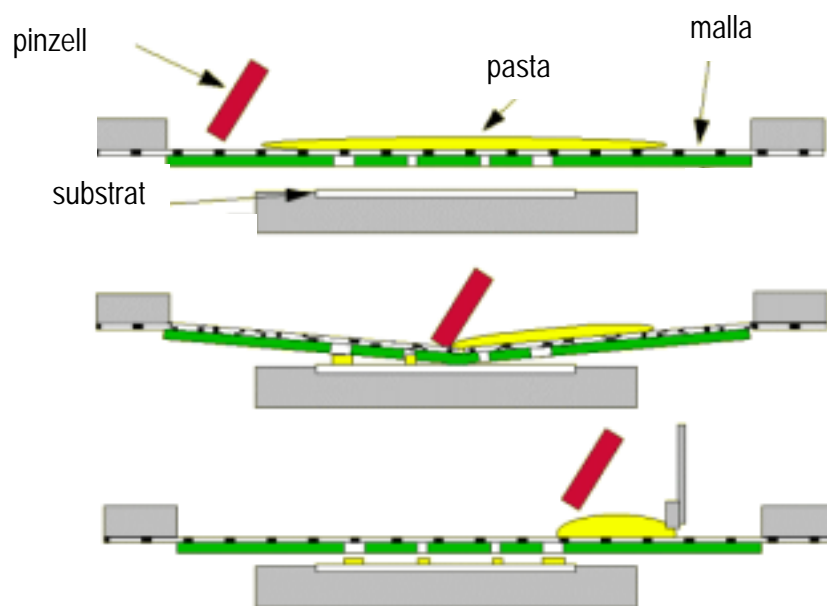


Figura 1.3 Impressió d'una tinta o pasta sobre un substrat a través d'una malla amb obertures d'un disseny determinat mitjançant *screen-printing*.

El següent pas del procés és assecar la capa dipositada per evaporar els dissolvents orgànics que conté i que havíem addicionat per tal de proporcionar a la pasta la viscositat adequada per a la impressió. Algunes composicions que contenen pols molt fina, requereixen temps prolongats o altes temperatures per tal de polimeritzar la pasta i, per tant, perquè assoleixin les condicions adequades per al seu ús, tant en consistència com en adherència al substrat.

Totes aquestes condicions s'han de controlar perfectament, ja que mentre algunes formulacions no presenten pràcticament canvis quan variem aquests paràmetres, altres són molt sensibles. Després d'aquesta etapa, es poden afegir altres capes si hom ho desitja.

Un cop s'ha construït el dispositiu, el pas final és comprovar la seva eficàcia. Algunes composicions requereixen processos d'activació, i cal que passin per un tractament electroquímic previ al seu ús.

Aquest procés que en aparença sembla molt simple, depèn d'algunes variables, tal com duresa, velocitat, angle i pressió del pinzell i separació entre el substrat i la malla que es necessari controlar perfectament per tal d'assegurar una correcta impressió del material desitjat.

Primerament, cal que el pinzell (o paleta) sigui suficientment flexible per adaptar-se a la superfície de la malla, tot forçant la tinta a travessar les àrees obertes. A més el material del que està fet ha de ser resistent als solvent emprats, tant els d'impressió com els de neteja. L'angle que es dona al pinzell resulta també important ja que com més petit sigui, major temps es necessitarà per completar la impressió.

L'augment en la velocitat d'impressió provoca un augment en el gruix de la capa dipositada, mentre que l'augment de la pressió realitza l'efecte contrari, ja que empeny la malla cap al substrat fent que part del material dipositat sigui expulsat, produint una capa més fina. Quan la velocitat augmenta, el pinzell està menys temps en contacte amb les obertures, dificultant que amb el seu moviment part del material pugui ser extret, augmentant-ne, per tant, el gruix. Cal tenir en compte, que si la distància entre el substrat i la malla és massa gran, la majoria de la pressió exercida sobre el pinzell s'utilitzarà per deflectir la pantalla i posar-la en contacte amb el substrat, esdevenint una impressió més prima.

A més, el pinzell ha de presionar de forma uniforme sobre el substrat i això s'aconsegueix ajustant-lo mecànicament o permetent un lleuger moviment de pivotació, de forma que llisqui paral·lelament amb el substrat i assegurant una correcta separació entre el substrat i la malla de forma que aquesta es mantingui constant.

En general les variables d'impressió serigràfica per a una impressió relativament fina han de presentar:

Pressió	velocitat	angle pinzell	duresa pinzell	distancia malla-substrat
Alta	baixa	alta	alta	baixa

La tinta (o pasta), evidentment, també resulta determinant en el procés d'impressió. Una tinta ideal hauria de tenir una viscositat tal que no necessites esforç per tal de passar a través de la malla i alhora presentar un dibuix ben definit un cop dipositat sobre el substrat. A més s'hauria de poder netejar fàcilment (per tal de no malmetre la malla) i no assecar-se durant la impressió. Com més viscositat presenti, més pressió es necessita i menor velocitat. Els termes tinta i pasta s'utilitzen sovint de forma indistinta, tot i que la tinta s'associa a una baixa viscositat mentre que la pasta resulta més viscosa⁴³.

1.4.1 Biosensors fabricats mitjançant tècniques serigràfiques (*screen printing*)

Els biosensors planars electroquímics resulten uns dispositius moderns i eficaços per realitzar anàlisis de solucions de forma econòmica. Els elèctrodes electroquímics macroscòpics són una base ben desenvolupada per a la construcció de sensors miniaturitzats. La idea de que la immobilització dels enzims sobre els elèctrodes els transformava en biosensors, es va posar a la pràctica en elèctrodes modificats amb penicil.linasa, ureasa i glucosa oxidasa, convertint-se en els primers exemples d'aquesta nova tecnologia.

La construcció dels elèctrodes *thick film* és força estàndard un cop s'han escollit els materials del substrat i la pasta. La forma i les dimensions poden variar, així com la flexibilitat, però en el disseny del transductor, i per tant del biosensor posterior, s'han de contemplar els següents punts:

(i) Les dimensions i la forma del transductor s'han de dissenyar en base a la seva futura aplicació, és a dir, el tipus d'anàlisi determinarà el disseny. Per exemple en els sensors anomenats "*strip sensors*"⁴⁴(sensors de tira) o "*drop-on sensors*" (sensors de gota), l'anàlisi de l'anàlit es realitza submergint el sensor en la solució de treball o dipositant una gota sobre l'àrea sensora. Aquests sensors presenten una geometria típica on l'elèctrode es situa a un extrem i el contacte elèctric a l'altre. Els sensors comercials de glucosa per als malalts de diabetis pertany a aquest tipus. La monitorització contínua d'un o més paràmetres necessita un disseny més complicat. Els sensors de flux tenen una geometria rectangular o rodona amb canals de flux, la forma dels quals permet una injecció contínua de les mostres.

(ii) L'interfície pel processament del senyal elèctric ha de ser senzilla, exacta i protegida en les zones de contacte de la solució de treball, per tal d'evitar curtcircuits. Els sensors empren els sistemes electrònics de connexió estàndards.

(iii) Els contactes elèctrics i les pistes conductores del sensor han de estar resguardades i completament aïllades del medi aquós. Tot i això, aquest punt no resulta crític per als sensors d'un sol ús, ja que no es sotmeten a llargs períodes de temps sota l'acció de l'aigua o d'altres substàncies químiques presents. Els sensors multiús, que necessiten temps de vida de mesos, han d'estar perfectament aïllats de l'acció química externa, i els materials exposats han de ser totalment inerts a la solució de treball i als seus components. Hi ha diferents vies d'obtenir-ho; una és la construcció de sensors on l'elèctrode es situa en una cara i les pistes conductores en l'altra. Això s'aconsegueix emprant l'anomenat "*green tape*" (Du Pont)⁴⁵ o taladrant el suport mitjançant làser. Però aquests procediments resulten costosos, i s'han desenvolupat sensors fabricats amb plàstics comercials o materials epoxi que redueixen molt les despeses. L'aïllament s'aconsegueix imprimint una nova capa dielèctrica sobre les zones no sensores. Després del procés de fabricació es sotmeten a altes temperatures. Amb l'addició de circuits integrats i en ocasions de capes fines fetes amb altres tècniques, podem realitzar un dispositiu híbrid amb tecnologies diferents.

Existeixen tres diferents aplicacions típiques dels biosensors fabricats amb la tecnologia *screen-printing*:

La primera és la d'un sensor d'un sol ús per a anàlisis ràpides d'uns paràmetres determinats. Aquests tipus es necessiten especialment per aplicacions mèdiques. El principal problema d'aquests és la calibració.

El segon tipus són els sensors per la monitorització *on-line* en processos químics i biotecnològics. Aquests biosensors haurien de posseir un temps de vida llarg i necessiten una interfície computeritzada per a sistemes de control de processos. Sovint el contacte amb la mostra es realitza mitjançant un sistema d'injecció de flux (FIA).

El tercer tipus és un sensor multiparàmetric. L'objectiu seria la de realitzar anàlisis ràpides de 4 a 12 paràmetres principalment clínics per a disposar d'un diagnòstic quasi immediat.

1.4.1.1 Membrana de biosensors *thick-film*

El punt més crític en la producció dels biosensors *thick-film* és la membrana sensora i la seva adhesió al transductor. Es disposa comercialment de pastes per a capes gruixudes per a elèctrodes de metalls nobles, pistes conductores i capes aïllants, però no de pastes que continguin enzims o d'altres materials biològics, i el seu desenvolupament no ha anat més enllà de la recerca en els laboratoris d'investigació, tot i que alguns autors ja han demostrat la seva aplicabilitat potencial.

Els materials que constitueixen la membrana haurien de ser:

- (i) Aplicables en procediments automàtics, tal com *screen printing*.
- (ii) Efectius per a la immobilització del material biològic i la formació de la membrana sense necessitat de mètodes enèrgics de curat (altes temperatures o en alguns casos de llum UV).
- (iii) Absents de solvents que poguessin degradar o desactivar químicament els enzims, els anticossos (o altres materials biològics) durant la formació de la membrana.

Els procediments més usuals per a l'aplicació i la immobilització dels receptors sobre el transductor en són tres: i) l'adsorció, per exemple en les partícules de carboni que formen la pasta conductora; ii) l'atrapament, mesclant l'enzim en una dispersió que conté un monòmer i formant una matriu polimèrica. Després de l'evaporació del solvent es forma una pel·lícula insoluble que conté l'enzim; i per últim, iii) l'enllaç covalent en la superfície de l'elèctrode. Per a aquesta darrera s'ha utilitzat en nombroses ocasions la deposició electroquímica de polímers conductors com el polipirrole. Aquests polímers poden ser modificats funcionalitzant el monòmer, per emprar-los com molècules que s'enllacen al material biològic i l'immobilitzen. En tots els casos, però, existeix una adhesió física de la capa enzimàtica sobre la superfície de l'elèctrode. Així doncs les propietats mecàniques de la superfície de l'elèctrode resulten també importants.

S'ha trobat que la activitat electrocatalítica dels elèctrodes *thick film* és fins i tot superior als elèctrodes tradicionals, degut a la estructura porosa dels elèctrodes que amplia l'àrea superficial i augmenta l'adhesió de la capa enzimàtica.

Però, tot i la gran quantitat de tècniques d'immobilització descrites en la literatura, només n'hi ha unes quantes que s'adapten al procés de fabricació per capes gruixudes. Encara que la retenció de les biomolècules en membranes inertes, l'adsorció física als elèctrodes o el *crosslinking* dels enzims amb agents bifuncionals en principi és sempre possible, només l'enllaç covalent dels enzims en suports funcionalitzats o, sobretot, l'atrapament del component biològic en matrius polimèriques permeten una fabricació automatitzada de les capes enzimàtiques amb propietats altament reproduïbles, així com rapidesa i simplicitat del procés de fabricació.

La possibilitat de canviar el gruix de la membrana (per exemple si s'imprimeixen dues o més capes) ajuda a incrementar la linealitat de la resposta del sensor. En alguns mètodes les membranes fabricades presenten un gruix de 100 μm o menor, permeten temps de resposta petits.

Les dispersions polimèriques que permeten l'atrapament dels enzims en la matriu haurien de mostrar propietats que mantinguessin el material biològic en la seva forma activa. Primerament, el valor del pH intern de la dispersió no ha de destruir l'estructura de la proteïna. Per aconseguir una alta activitat enzimàtica, el pH intern ha de situar-se al voltant del pH òptim de l'enzim. Seguidament, degut a la inestabilitat de les proteïnes en presència de dissolvents orgànics, la dispersió ha d'estar lliure de solvents. Alhora el contingut d'aigua és essencial, ja que els enzims han d'estar hidratats per trobar-se en la seva conformació activa. A més l'aigua és necessària per la difusió del substrat enzimàtic i del producte de la catàlisi a través de la membrana i fins al transductor. Finalment, l'estructura tridimensional del polímer hauria de prevenir la pèrdua de l'enzim fora de la membrana (*leakage*) cap a la solució de treball, mantenint el sensor estable i minimitzant la contaminació. L'estructura porosa del polímer hauria de permetre la difusió del reactiu juntament amb l'aigua com a solvent, però hauria de mantenir, sempre que sigui possible, les espècies electroactives no desitjades allunyades del transductor, i evitar les interferències en la resposta del biosensor.

En alguns casos, per al control de la transferència de massa que té lloc en els biosensors, cal produir barreres de control difusional (membranes externes) sobre aquests. A més, aquestes ajuden a evitar la pèrdua dels components immobilitzats i el pas de substàncies que podien interferir en la detecció electroquímica o afectar l'enzim. Alhora, poden reduir el soroll atribuït a l'agitació.

La tecnologia associada a la deposició de membranes està limitada pel fet que aquest ha de ser precisament el darrer pas a realitzar, ja que s'ha de col·locar sobre la part superior de la capa enzimàtica. S'han d'evitar, per tant, les temperatures i energies de radiació elevades i/o submergir el biosensor en solucions químicament agressives.

1.4.2 Configuracions i tècniques d'immobilització del material biològic en biosensors thick film

En la bibliografia apareixen nombroses configuracions emprades pels diversos investigadors, però en general les podem dividir en tres grups (figura 1.4):

- i) Configuració de capa múltiple screen-printed/manual
- ii) Configuració de capa múltiple screen-printed
- iii) Configuració d'una sola capa o biocompòsit

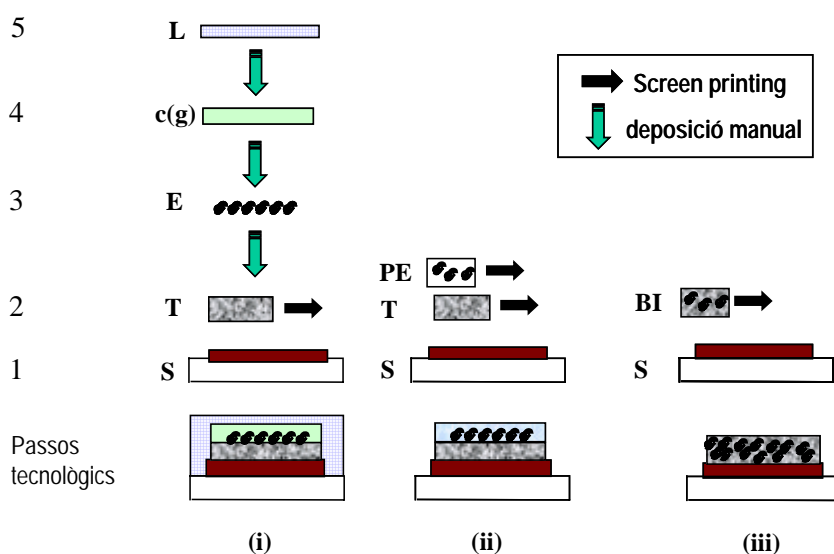


Figura 1.4. Configuracions emprades en la construcció de sensors planars.

1.4 i	1.4 ii	1.4 iii
Múltiple capa amb deposició manual	<i>Screen printing</i> de pastes enzimàtiques mitjançant dues o més impressions	Construcció en un pas: biocomposit

En totes les configuracions s'ha imprès prèviament les pistes conductores mitjançant tecnologia planar.

BI: biocomposit; c: capa de material utilitzada per a la immobilització [g (glutaraldehyd), etc] dipositada manualment; E: capa enzimàtica (deposició manual); PE: pasta o tinta enzimàtica dipositada per *screen printing*; L: membrana o capa protectora externa (AC, Nafion etc.) dipositada manualment; S: substrat (PVC, ceràmica, etc) amb pistes conductores prèviament impreses mitjançant tecnologia planar. T: pasta conductora (transductor) dipositada per *screen printing*. Els mediadors, estabilitzants o additius, depenent del dispositiu, poden ser inclosos en qualsevol tinta o pasta.

Idealment, la configuració d'un biosensor de capes gruixudes es pot desenvolupar a partir d'una pista conductora (que pot actuar alhora com a transductor) T, formada per tintes de grafit, platí o altres pastes de metall que pot contenir un mediador o catalitzador (M) i que s'imprimeix sobre el substrat (S). Tot seguit es diposita l'enzim, que es pot trobar atrapat (m) o entrecruat (c) [normalment amb glutaraldehyd (g)]. Sovint es protegeix amb algun tipus d'estabilitzant o additiu (s). En algunes configuracions, l'enzim es barreja amb el cofactor (F) i en altres s'aplica una membrana externa (L) com l'acetat de cel·lulosa o el nafion⁴⁶, que pot evitar interferències i augmentar l'interval lineal. Generalment aquestes capes es dipositen separadament, esdevenint un biosensor planar de capes múltiples. Un possible exemple d'aquest tipus de configuració, es podria abreviar de la forma S-1TM-2Ecs-3L. Cada número representa una capa impresa en el procés, i per cada pas (o capa) les lletres en majúscula representen els components principals (enzim, mediador, transductor, etc.) i en minúscula qualsevol component específic (entrecruador, matriu polimèrica, estabilitzant, etc). Tots els

components impresos i continguts en una sola capa es delimiten per guions (ex: -1TM-). Entre parèntesis es pot donar informació explícita sobre algun component [ex; c(g), tot i que per simplificar es pot escriure directament (g)]. D'aquesta forma la notació prèvia es pot escriure com S-1TM-2Ec(g)s-3L, que significa que sobre un substrat S s'ha imprès una primera capa (1TM) formada pel transductor i el mediador i posteriorment s'ha dipositat una segona capa -2Ec(g)s-, en la que l'enzim (E) es barreja amb l'agent entrecruador (glutraldehid), c(g), i un estabilitzant o additiu s. Finalment s'aplica una capa protectora (3L).

Aquesta terminologia resultarà molt útil en la descripció que a continuació es realitza de les diferents configuracions trobades en aquests tipus de biosensors, així com dels diferents procediments de fabricació. En la figura 1.4 es pot observar de forma esquematitzada cada una dels dissenys trobats.

1.4.2.1 Configuracions basades en deposicions de capa múltiple *screen-printed*/manual

En aquesta configuració, el material conductor (grafit o qualsevol altre) és imprès mitjançant tècniques serigràfiques i el material biològic (així com altres materials tal com polímers, additius, etc.) són dipositats separadament mitjançant tècniques clàssiques d'immobilització (adsorció, crosslinking o entrecruament, atrapament i electropolimerització). Així doncs, sota aquest disseny, la biomolècula s'immobilitza sobre el transductor de forma manual o electroquímica i no s'imprimeix amb tècniques thick-film. S'obté com a resultat un biosensor planar de capa múltiple screen-printed/manual.

En la taula 1.2 es poden observar característiques tècniques i paràmetres analítics corresponents als dispositius sota aquesta configuració.

Les tècniques d'immobilització de molècules biològiques sobre sensors planars en aquest tipus de configuració es detallen a continuació:

1.4.2.1.1 *Immobilització enzimàtica per adsorció*

L'adsorció física, basada en les forces d'atracció de van der Waals entre l'enzim i la superfície del suport sòlid, és el mètode més antic i simple d'immobilització enzimàtica. L'aplicació més extesa és l'adsorció sobre elèctrodes de grafit⁴⁷. El desavantatge més important és que les forces d'enllaç entre l'enzim i el suport no poden ser controlades fàcilment. Són molt dèbils i l'enzim es pot perdre durant l'assaig, depenent de les condicions experimentals com pH, força iònica, temperatura i tipus de solvent. Per aquesta raó, el mètode s'empra com a test preliminar abans de desenvolupar dissenys més complexos i millorats.

Les configuracions descrites a continuació es poden classificar en les classes següents: I (S-1TM-2E), II' (S-1TM-2EF-3L) i III' (S-1T-2EM-3L). L'apòstrof (') indica una configuració amb una tercera capa afegida (-3L). Això intenta simplificar la classificació dels diferents dispositius ja que en ocasions es troben configuracions idèntiques on la única diferència es una capa externa final.

I) S-1TM-2E

Cagnini et al^{48,49} utilitzen aquesta tècnica simple sota una configuració *S-1T(C)M(Ru)-2E(ChE)* per immobilitzar colina oxidasa sobre l'elèctrode *screen printing* de pasta de grafit barrejat manualment amb ruteni i carboni activat, aplicat prèviament sobre un film flexible de polièster. La deposició és manual, i es realitza mitjançant una pipeta. Aquest biosensor s'aplica en la monitorització de pesticides.

II') S-1TM-2EF-3L

Un biosensor *reagentless* per àcid làctic basat en un elèctrode de carboni *screen-printed*, fou desenvolupat per *Sprules et al*⁵⁰ amb un disseny final: *S-1T(C)M(MB)-2E(LDH)F(NAD)-3L*. Les pastes d'impressió contenen grafit amb 2% Meldola Blue. Lactat deshidrogenasa i NAD⁺ es dissolen en una solució tamponada i es dipositen sobre l'àrea de treball dels elèctrodes gota a gota. Després d'assecar-se a temperatura ambient, es cobreix l'àrea sensora amb un 1% d'una solució d'acetat de cel·lulosa. En altres estudis, i fent servir el mateix procediment, es desenvolupen altres biosensors *screen-printed* per mesurar NADH i lactat⁵¹, així com etanol en begudes alcohòliques⁵².

De forma anàloga i amb molt poques modificacions, han desenvolupat un biosensor Avramescu et al⁵³.

III') S-1T-2EM-3L

L'adsorció enzimàtica i el posterior recobriment d'una membrana externa que protegeixi l'enzim, fou el procediment aplicat per *Zhang et al*⁵⁴. Aquest sistema s'empra per a la determinació de maltosa i glucosa. Els elèctrodes són fabricats mitjançant *screen-printing*, sobre PVC. Les pistes conductores són pastes d'argent i en l'extrem de les quals es diposita grafit. A continuació es cobreix la part sensora amb una solució aquosa d'enzim i 1,1'-ferrocenedimetanol. Una membrana externa preparada mesclant 3.5% (w/v) hidroxietil cel·lulosa (HEC), 0.02% Triton X100 i 3% polietilè glicol en aigua bidestil·lada s'imprimeix finalment, esdevenint una configuració final *S-1T(C)-2E(GOD, AG)M(ferr)-3L(HEC)*.

1.4.2.1.2. Immobilització enzimàtica mitjançant *cross-linking* amb glutaraldehyd

La immobilització enzimàtica es pot obtenir per *cross-linking* inter- i intramolecular de les molècules d'enzim. Aquest mètode es basa en produir unions tridimensionals entre el material biològic mitjançant reactius bi- o multifuncionals. Aquests reactius són completament insolubles en aigua i poden ser adsorbits en una superfície sòlida. El glutaraldehyd ha estat l'agent *cross-linking* més ampliament emprat⁵⁵, tot i que han estat provats altres reactius multifuncionals⁵⁶.

La xarxa 3D que en resulta, influeix en la cinètica enzimàtica i les característiques de difusió. Ha de ser optimitzat, per tant, per cada enzim, amb la finalitat d'aconseguir una bona insolubilitat, conservant l'activitat enzimàtica i les propietats apropiades de difusió. Els factors tals com proteïna / agent *cross-linking*, pH, temperatura i temps de reacció han d'ésser controlats i optimitzats. Aquests paràmetres es troben generalment de forma empírica.

Immobilitzar l'enzim mitjançant *cross-linking* amb glutaraldehyd sobre la superfície del transductor és un dels mètodes actualment més emprats donada la seva simplicitat i eficàcia. Un gran nombre d'autors en fan ús, tot i que l'adapten en funció de l'aplicació per la qual està dissenyada el biosensor. En aquest i els següents epígrafs es veuran els diferents mètodes utilitzats pels investigadors i es farà una breu descripció dels procediments realitzats.

En aquest tipus d'immobilització, la majoria d'autors utilitzen configuracions semblants a les mencionades prèviament, però ara s'utilitza un entrecruador o cross-linker (c) i es canvien alguns components químics. S'agrupen en les classes IV (S-1T-2M-3Ecs), V (S-1TM-2Ecs), VI (S-1T-2Ecs) i VII (S-1T-2EM-3s-4c), amb dues petites variacions, [(V') S-1TM-2Ec-3L i (VI') S-1T-2Ec-3L], respecte les classes V i VI amb la única diferència d'una tercera capa protectora (3L).

IV) S-1T-2TM-3Ecs

Els biosensors tipus classe IV) dissenyats per *P.Skladal et al*^{57,58} es basen en un elèctrode de treball de platí cobert amb una capa (compòsit) de grafit i acetilcel·lulosa (92 i 4% respectivament) que conté CoPC (4%) com a mediador. Un segon elèctrode de plata es cobreix amb una capa de AgI (en presència d'una solució de iodur 1 mM) i s'utilitza com a elèctrode de referència (Ag/AgI/0.5mM iodur). La capa enzimàtica, formada per una mescla (1µl) de colinesterasa (AChE o BChE), BSA (alúmina de sèrum boví) i glutaraldehyd (0.35 i 0.08%, respectivament) es dipositada sobre la superfície de l'elèctrode de treball i es deixa

assecar en un recipient tancat. Per enzims amb activitats molt baixes no s'utilitza BSA. Els dispositius que en resulten s'emmagatzemen secs en el congelador. La configuració resultant final fou $S-1T(Pt)-2T(C)M(CoPC)m(AC)-3E(ChE)c(g)s(BSA)$.

Altres dissenys del mateix autor utilitzen sensors preparats mitjançant *screen-printing* sobre un suport de ceràmica, usant pastes de plata i platí pels elèctrodes de referència i treball respectivament. La immobilització enzimàtica segueix el mateix procediment.

V) S-1TM-2Ecs

*Rippeth et al*⁵⁹ han dissenyat biosensors *screen-printed* tipus V) emprats com a detectors en un sistema d'injecció en flux per la monitorització de pesticides organofosforats. La pasta de carboni que conté CoPC (ftalocianur de cobalt) s'imprimeix sobre una placa de PVC i l'enzim AChE és immobilitzat mitjançant glutaraldehyd en presència d'agents estabilitzants. El mateix disseny s'ha emprat en la detecció de carbamats en mostres vegetals⁶⁰. La configuració resultant fou: $S(PVC)-1T(C)M(CoPC)-2E(ChE)c(g)s$.

V') S-1TM-2Ecs-3L

Per la fabricació de dispositius basats en aquesta tècnica Kulys et al⁶¹ utilitzen tintes d'impressió preparades mitjançant la dissolució de TCNQ (tetracianoquinodimetà) en toluè i mesclant-ho amb grafit en pols. Aquesta capa conductora s'aplica sobre una placa base (o substrat) de PVC. La capa catalítica es prepara recobrint cada elèctrode de treball amb una solució tampó de colinesterasa que conté glutaraldehyd. Finalment s'aplica una capa protectora, obtenint una configuració tipus V'): $S(PVC)-1T(C)M(TCNQ)-2E(ChE)c(g)-3L$.

VI) S-1TM-2E-3cs

El mateix procediment d'immobilització és utilitzat per *Hartley et al*⁶² per a la detecció amperomètrica de pesticides organofosforats mitjançant biosensors *screen-printed*. Sobre una capa d'AChE, que prèviament ha estat dipositada sobre l'elèctrode de treball es diposita una gota d'una solució de glutaraldehyd i s'estén per la seva superfície. S'observa que la configuració del sensor és tipus V) amb la diferència de que l'enzim i el glutaraldehyd foren afegits en passos separats. En treballs posteriors, el nombre de capes va disminuir⁵⁹.

VII) S-1T-2Ecs

*Carsol et al*⁶³ utilitzen una configuració de 3-elèctrodes amb Ag/AgCl com elèctrode de referència i un elèctrode de plata com auxiliar, juntament amb el de treball. Es realitza, anàlogament als processos vistos fins ara, mitjançant diversos passos:

- Deposició d'una primera capa amb tinta de plata per a la construcció de la pista conductora
- Deposició d'una capa de carboni sobre una part de la pista de plata per a l'elèctrode de treball
- Deposició de Ag/AgCl sobre una part de la pista de plata per a l'elèctrode de referència
- Finalment la deposició d'una capa aïllant amb petites obertures per permetre el contacte elèctric

Prèviament a l'etapa d'immobilització enzimàtica, l'elèctrode es sotmet a un potencial de 1.7 V vs Ag/AgCl durant 20 s per oxidar la superfície de carboni. Aquest tractament és imprescindible per aconseguir una bona reproductibilitat en el comportament del biosensor. A continuació es prepara una solució mesclant un tampó fosfat que conté xantina oxidasa (XO), albúmina de sèrum de boví (BSA) i glutaraldehyd i es diposita sobre la superfície de carboni. La membrana s'asseca a l'aire i es renta amb una solució de lisina 0.5 M per extreure l'excés de glutaraldehyd. El biosensor, amb una configuració final S-1T(C)-2E(XO)c(g)s(BSA), s'emmagatzema a 4°C. En estudis posteriors *M. Mascini et al*⁶⁴, immobilitzen fosforilasa nucleotida (NP), fosfatasa alcalina (AIP), i XO sobre partícules de vidre de porus controlat (CPG), amb glutaraldehyd.

Finalment, *Bilitewski et al*⁶⁵ utilitzen una configuració semblant en el disseny de biosensors per a la detecció de glucosa i etanol en suc de fruita i vi i per a la determinació de la qualitat d'aliments tal com el peix, per a una configuració final S-1T(Pt)-2E(GOD)c(g), sense mediador.

VII') S-1T-2Ec-3L

Aquest tipus d'immobilització s'escollí en el disseny de biosensors de glucosa i etanol utilitzant elèctrodes *thick-film* comercials⁶⁶. Per tal d'evitar interferències de substàncies oxidables presents en la mostra, tals com l'àcid ascòrbic, el biosensor es cobreix amb una membrana d'acetat de cel·lulosa submergint-lo en una solució d'aquest polímer amb acetona i ciclohexanona. S'obté, per tant, una configuració final S-1T(Pt)-2E(GOD o AO)c(g)-3L(CA). A més de la immobilització enzimàtica amb glutaraldehyd (sobre un elèctrode de platí modificat prèviament amb 3-aminopropil-trietoxisilà). *Bilitewski et al*⁶⁷ apliquen una membrana

addicional de policarbonat amb diferents gruixos, dimensions i densitat de porus, per a la determinació d'hidrats de carboni en aliments.

*Peter Deman et al*⁸ produeixen biosensors basats en una pasta conductora de RuO₂ comercial de forma anàloga. Per a la construcció de l'elèctrode de referència s'empra una pasta de plata. Una mescla d'enzim glucosa oxidasa (GOD) provinent de *Aspergillus niger*, 150 U/mg (Fluka), BSA i glutaraldehyd són dispersats sobre la superfície d'un elèctrode prèviament silanitzat. Després de 24 hores la membrana enzimàtica s'entrecrua (*cross-linked*) i es submergeix en una solució de *polivinilbutanal*, formant-se una membrana de difusió. En resulta un dispositiu S-1T(RuO₂)-2E(GOD)c(g)s(BSA)-3L amb una estabilitat enzimàtica molt alta.

VIII) S-1T-2EM-3m-4c

*G. Khar*⁹ utilitza xips de ceràmica dissenyats per integrar 3 elèctrodes impresos en un sol xip i desenvolupar així biosensors S-1T(Pt)-2E(GOD)M(TTF-TCNQ)-3m(gel)-4c(g). La superfície es cobreix amb una capa de vidre aïllant excepte en l'extrem de les pistes de platí. Es prepara una pasta de CTC (complexes orgànics de transferència de càrrega) i GOD (prèviament adsorbida en cristalls de TTF-TCNQ, tetratiafulvalè-tetracianoquinodimetà,) mesclant-ho amb un polímer i el respectiu solvent i es diposita manualment. Tot seguit una matriu gelatinosa [m(gel)] s'estén sobre el sensor i finalment, un cop sec, es submergeix en una solució de glutaraldehyd.

1.4.2.1.3 Immobilització enzimàtica per atrapament

L'atrapament en una matriu proporciona una millora en l'estabilitat de l'enzim, i l'immobilització en matrius tals com gels, polímers, pastes o tintes resulta tan simple com l'adsorció física, ja que generalment, el material biològic només necessita ser barrejat amb el material emprat.

Aquesta mescla s'aplica sobre l'elèctrode o el suport com una membrana addicional, on es deixa assecar o polimeritzar.

Algunes matrius utilitzades són gelatines, poliuretans que poden ser *cross-linked* amb la superfície amb isocianats, alcohol polivinil⁷⁰, pasta de carboni^{71,65}, tinta de carboni o polipirrol⁷².

L'avantatge principal d'aquesta tècnica és la seva compatibilitat amb les tècniques de producció massiva, tal com *screen printing* o la fotopolimerització.

Els diferents sensors desenvolupats mitjançant aquest tipus d'immobilització es poden agrupar de forma general en dues configuracions: S-1T-2Em (IX), S-1T-2Em-3L (IX').

IX) S-1T-2Em

Alguns exemples són l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) i malat deshidrogenasa (MDH) que són immobilitzats per atrapament en una matriu polimèrica (m) basada en una dispersió aquosa copolimèrica de poli(vinilacetat)-poli(etilè), (PVP-PE). S'obté així una configuració (S-1T(Au)-2E(LDH or MDH)m(PVP-PE), tipus IX). El biosensor⁷³ dissenyat és utilitzat per la determinació de lactat i malat on el cofactor NAD s'afegeix a la solució.

En estudis posteriors, *N. Hampp et al*⁴ desenvolupen biosensors immobilitzant GDH (glucosa deshidrogenasa) sobre els elèctrodes per atrapament en la mateixa matriu polimèrica. La mescla conté 2 mg de GDH dissolts en 10 µl de solució tampó i 50 mg de dispersió polimèrica. Els transductors són fabricats mitjançant tecnologia thick film. Les pistes conductores s'imprimeixen a partir de pastes d'or i pal·ladi/argent sobre el substrat de ceràmica per una configuració final (S-1T(Au/Pd)-2E(GDH)m(PVP-PE)

Darrerament, T. Neufeld et al han desenvolupat un sensor *thick film* basat en la immobilització de l'enzim en una membrana de nylon per a la determinació de pesticides⁷⁵.

IX') S-1T-2Em-3L

Sota una configuració semblant, però afegint ara un capa protectora, *S. Yang et al*⁶ han desenvolupat un biosensor de glucosa amb una matriu sol-gel.

La solució del gel es prepara per reacció de TEOS (tetraetilortosilicat) amb etanol, H₂O, i HCl a 60°C durant 90 min. Seguidament, s'afegeixen un 10 % de NH₃.H₂O i quantitats variables de glucosa oxidasa. El gel que conté GOD es col·loca en un bany d'ultrasons durant 1 min per ajudar la dispersió, i es diposita sobre el sensor utilitzant tècniques de *dipcoating*. Es deixa assecat a l'aire durant 2 hores abans d'utilitzar-lo.

Una solució de Nafion en 2-propanol es mescla en aigua i s'aplica com a barrera d'espècies interferents resultant un dispositiu final S-1T-2E(GOD)m(sol-gel)-3L(Nafion). La detecció es basa en la mesura de peròxid d'hidrogen.

1.4.2.1.4 Immobilització enzimàtica mitjançant electropolimerització

L'electropolimerització és una tècnica d'immobilització enzimàtica eficient sobre la superfície dels transductors. Polímers conductors tal com poliotiofens, polianilines, polipirrol i els derivats del fenol, poden formar-se electroquímicament en la superfície de l'elèctrode, de forma que

característiques físiques tal com el gruix, poden ser controlades fàcilment, mesurant la quantitat de càrrega elèctrica que passa durant la formació de la membrana. En alguns casos s'ha aplicat, no tan sols com a mètode d'immobilització sinó per a millorar la transferència electrònica entre l'enzim i l'elèctrode a través de la xarxa conductora del polímer. Alguns d'aquests electropolímers poden emprar-se com a mediador, disminuint el potencial aplicat i per tant evitant interferències d'altres espècies.

La principal avantatge de la immobilització del material biològic en polímers conductors és la possibilitat de dipositar l'enzim en un sol pas de forma simple i ràpida, i el control de la distribució espacial de l'enzim retingut.

No obstant això, l'obtenció de membranes amb una pobra adherència i la incompatibilitat amb alguns mètodes d'immobilització d'enzims, fan difícil la seva aplicació.

Les configuracions trobades en els diferents dissenys dels dispositius foren:

X) S-1T-2E ρ_M (ρ_M : electropolímer actuant com a mediador) i XI) S-1TM-2Ep.

Tot i que la electropolímerització no és un procés manual, s'han classificat els biosensors desenvolupats mitjançant aquesta tècnica dins d'aquest apartat degut a que tots ells dipositen el material biològic sobre el transductor emprant metodologies diferents a la impressió serigràfica.

X) S-1T-2E ρ_M

*Silber et al*⁴ immobilitzen l'enzim glucosa deshidrogenasa (GDH) per electro-polimerització del blau de metilè (MB) en presència de GDH en una solució tampó. Els biosensors *thick-film* produïts són emprats en la oxidació electrocatalítica del NADH per la determinació de glucosa. El disseny final resulta *S-1T(Au)-2E(GDH) ρ_M (MB)*.

XI) S-1TM-2Ep

*Wang et al*⁷ reporten aquest tipus d'immobilització per biosensors amperomètrics *screen-printed* de glucosa i alcohol basats en pastes de carboni amb ruteni dispersat. Primerament una pasta de carboni que conté ruteni s'imprimeix sobre un substrat rectangular de ceràmica d'alúmina. Es fa créixer electroquímicament, una fina pel·lícula de GOD/polifenol emprant una solució amortidora de fosfats que conté fenol i glucosa oxidasa, obtenint un disseny final *S-1T(C)M(Ru)-2E(GOD)p(pph)*

*Mascini et al*⁸ atrapen colina oxidasa en una capa polimèrica, el gruix de la qual pot ser controlat per la durada del procés d'electropolimerització. La immobilització té lloc submergint l'elèctrode de treball, juntament amb el de referència i l'auxiliar en una solució de fenol 0.05 M

en un tampó fosfat 0.1 M, pH 7.0 que conté l'enzim durant 20 minuts a +900 mV vs Ag/AgCl. Aquest mateix autor compara els resultats obtinguts utilitzant dispositius construïts mitjançant electropolimerització amb biosensors fabricats per mètodes d'adsorció. La millor resposta s'obtingueren pels darrers, i per tant, els estudis conclouen que els biosensors per adsorció mostren millors resultats que els electropolimeritzables, mitjançant aquesta configuració.

1.4.2.2. Configuració de capa múltiple screen-printed: Impressió de pastes enzimàtiques mitjançant tècniques serigràfiques

Aquesta tecnologia es basa en la impressió mitjançant tècniques serigràfiques de pastes enzimàtiques sobre transductors screen-printed. La diferència respecte l'anterior, es que en aquesta configuració s'elimina qualsevol deposició manual de la capa biològica, i tot el procés es produeix per tecnologia thick-film.

Sota aquesta configuració han aparegut diversos dispositius que es poden classificar en quatre dissenys bàsics: XII) S-1T-2EFm, XIII) S-1TM-2Ecs-3L, XIV) S-1T-2M-3E-4L i XV) S-1T-2M-3E-4s-5c.

La configuració abreujada presentada per exemple com S-1T-2M-3E-4s-5c, representa un biosensor on s'ha aplicat una primera capa conductora [ex de grafit 1T(C)], i una posterior impressió per *screen-printing* de capes successives amb mediador (M), enzim (E), estabilitzants (s) i entrecreadors (c). En altres dissenys podem observar altres components com polímers (m), cofactors (F) i capes externes selectives (L).

En la taula 1.3 es poden observar característiques tècniques i paràmetres analítics corresponents a alguns dispositius sota aquesta configuració (en la taula s'adjunta també la configuració de biocompòsit; §1.4.2.3).

XII) S-1T-2EFm

*Kim et al*⁸ fabrica elèctrodes sobre una base de polièster emprant tècniques convencionals de screen printing, i pastes de plata i grafit pels elèctrodes auxiliar i de treball respectivament. Les pistes conductores es cobreixen amb una pasta aïllant polimeritzable per llum UV. Finalment, la pasta que conté l'enzim (LDH) i el cofactor (NAD⁺) s'imprimeixen sobre l'elèctrode de treball. El disseny final resulta S-1T(C)-2T(C)E(LDH)F(NADH) m(PVP).

XII') S-1TM-2Ecs-3L

Sota aquest disseny, el mediador es mesclat amb el grafit i s'afegeix una capa protectora externa. Totes les capes són impreses serigràficament, excepte la darrera (3L).

Un exemple el proporciona *Hart et al*⁷⁹ els quals imprimeixen sobre PVC una pista conductora de pasta de grafit. En el seu extrem s'imprimeix una segona pasta que conté grafit modificat amb ftalocianur de cobalt. Una capa aïllant de pasta de vinil s'aplica sobre els elèctrodes mitjançant tècniques serigràfiques, excepte en els extrems. La pasta enzimàtica es prepara mesclant en una solució tampó acetil colinesterasa, hidroxietil cel.lulosa (HEC), albúmina de sèrum boví (BSA), glutaraldehid i grafit en pols per augmentar la viscositat. Les pastes enzimàtiques s'imprimeixen sobre la pasta de grafit modificat amb ftalocianur de cobalt del transductor. S'aplica, finalment, un fina capa de poliuretà per evitar les pèrdues de la capa enzimàtica a l'hora de submergir el biosensor en la mostra agitada per realitzar l'anàlisi. Els autors utilitzen aquests biosensors *S-1T(C)M(CoPC)-2E(AChE)c(g)s(BSA)m(HEC,-)3L* per a la determinació de pesticides mitjançant inhibició de la colinesterasa.

En altres treballs, i utilitzant la mateixa tecnologia desenvolupada per altres autors^{80,81}, *Hart i Collier*⁸² han desenvolupat un biosensor per lactat. En aquest cas el mediador no fou el CoPC sinó un electrocatalitzador de Pt i l'enzim (lactat oxidasa) s'imprimeix sense BSA. Finalment s'imprimeix una capa d'acetat de cel.lulosa (AC) o nafion (N) per una configuració final: *S-1T(C)-2M(Pt)-3E(LDH)-4L(AC o N)*.

Configuracions amb dissenys molt propers han estat també desenvolupats per Montesións et al⁸³.

XV) S-1T-2M-3E-4s-5c

Newman et al⁸⁴ varen desenvolupar un biosensor de glucosa a partir de tintes basades en TTF i etanol. En alguns dispositius es va afegir una capa de BSA i glutaraldehid per tal de prevenir possibles pèrdues de material biològic. El sensor resultant fou *S-1T(Ag, C)-2M(TTF)s(TBA)-3E(GOD)-4s(BSA) -5c(g)*.

1.4.2.3 Configuracions basades en la deposició d'una sola capa. Estratègia de biocompòsit

En aquesta configuració, les biomolècules i altres materials com grafit, mediadors, catalitzadors, estabilitzants, polimers, etc. són mesclats conjuntament formant un biocompòsit, que s'imprimeix sobre el substrat (o les pistes conductores) produint biosensors

en un sol pas. En la construcció del biosensor es va considerar tant el transductor com la capa biològica, i no el pas previ d'impressió de les pistes conductores.

De les tècniques presentades, aquesta és, sens dubte, la que ofereix major rapidesa i simplicitat en el procés de fabricació, i la que es pot adaptar més fàcilment a les tècniques automatitzades de producció massiva. Alhora, és la que necessita d'un procés d'optimització més complex ja que cal compatibilitzar materials, de naturalesa i característiques diverses, conservant intactes les seves propietats inicials.

Aquesta configuració es pot descriure com S-1TEMs, sens dubte la més senzilla. Els dispositius principals es troben esquematitzats en la taula 1.3 (conjuntament amb els de capa múltiple *screen-printed* §1.4.2.2).

Rohm et al^{85,86} han desenvolupat una pasta enzimàtica polimeritzable mitjançant llum UV per utilitzar-se en sensors *screen-printed* de L-lactat. Primerament, es fabriquen els transductors *thick-film*, impresos amb pasta conductora de platí sobre ceràmiques d'alumina. Sobre aquesta és diposita una pasta que conté diferents quantitats d'un material porós de SiO₂ grafit i/o solucions de DEAE-dextran i lactitol en una solució tampó de potassi i fosfats. La pasta resultant fou impresa mitjançant tècniques de screen printing sobre la superfície de platí d'un elèctrode. Amb la irradiació de llum UV s'aconsegueix la polimerització.

*Wang et al*⁸⁷ i *Guadalupe et al*⁸⁸ han desenvolupat sensors basats en aquesta estratègia mitjançant tintes modificades barrejant tintes de carboni comercials amb l'enzim tirosinasa. Una preparació estàndard fou 0.6 % enzyme/tinta (w/w). Els biosensors amperomètrics construïts s'apliquen en la detecció de pesticides i herbicides. Aquesta detecció es basa en una disminució del senyal provinent del substrat (catecol), degut a la inhibició de l'enzim en presència de pesticida. Uns compòsits sol-gel de grafit es prepararen pel desenvolupament de biosensors *screen-printed* per surfactants⁸⁸. La mescla del grafit sol-gel es prepara barrejant bis (2-etilhexil) sulfosuccinat (aerosol OT) amb tetrametil ortosilicat, amb una relació molar de: AOT:TMOS:H₂O (1:50:200) amb grafit en pols mesclat prèviament amb Fe(2.5%), GOD (2.5%), i difeniltiocarbazona (DPT) (10%). La pasta s'imprimeix sobre el substrat de PVC pretractat.

*Blitewski et al*⁶⁵ també preparen capes enzimàtiques d'impressió. La pasta s'aconsegueix mesclant 1g de grafit en pols amb 20 ml d'una solució saturada de tetratiofulvalè (TTF) en toluè fins la seva evaporació. Posteriorment, es dissol 12 mg de GOD en 0.9 g d'una solució de polivinilpirrolidina (10% en aigua destil·lada) i s'afegeix 0.5 g del grafit en pols amb TTF.

Després d'una bona homogenització, la pasta s'imprimeix sobre l'elèctrode de treball mitjançant *screen-printing*.

Els mateixos autors, desenvoluparen altres biocompòsits o tintes d'impressió en estudis posteriors⁶⁷ per produir sensors de glucosa, adsorbint GOD en pastes compatibles amb la tecnologia de *screen-printing*. Els constituents principals d'aquestes pastes foren grafit modificat amb un derivat del tetratiafulvalè, polímer i GOD. S'estudià la influència del platí en la pasta, barrejant diverses quantitats amb grafit. Aproximadament 545 mg d'aquesta mescla s'afegeixen a 720 mg d'una solució polimèrica de polivinilpirrolidone o 2% (wt./vol) d'hidroxietilcel·lulosa amb 6% d'etilen glicol en aigua destil·lada que conté 12 mg de GOD.

Un immunosensor sol-gel de capes gruixudes ha estat desenvolupat per *Wang et al*⁸⁹. La solució de sol-gel es prepara mesclant tetraetilortosilicat (TEOS), etanol, aigua i HCl. Posteriorment s'afegeix Hidroxipropil cel·lulosa i RigG al gel i s'homogenitza la mescla. A continuació, s'hi afegeix grafit, es barreja i s'imprimeix sobre el substrat de ceràmica.

*Nagata et al*⁹⁰ fabrica un sensor de glucosa utilitzant tres tipus de GOD modificat amb ferrocè. Per transferir la pasta al suport de poliamida s'utilitza una màscara convencional i una paleta de poliuretà. Les pistes conductores són de coure. El sistema s'aïlla excepte en els extrems que són coberts amb or. Un cop impresa la pasta es deixa assecar durant 20 minuts. El Fc-GOD es liofilitza per obtenir-lo en pols, i tenir la consistència adequada per la preparació de la pasta. Una bona tinta d'impressió ha de ser capaç de preservar l'activitat catalítica de l'enzim, permetre el pas de la glucosa i propietats adequades per al procés d'impressió. S'ha de tenir en compte, a més, la possible desnaturalització de l'enzim. La pasta consta només de 4 components: el GOD modificat, dos tipus diferents de resina polimèrica i un solvent orgànic. S'empren dues resines solubles en aigua, el Polivinilbutiral (PVB) i polivinilpirrolidina (PVP), que han de immobilitzar el ferrocè envoltat de glucosa oxidasa (Fc-GOD) en la pasta, però al mateix temps, han de permetre que les molècules de glucosa presents en la solució arribin fins l'enzim. Així, es probaren mescles de polímers solubles i no solubles per tal de proporcionar un medi d'hidratació òptim a la biomolècula, que mantengui la seva estructura terciària. La proporció òptima trobada fou de 1:1 en PVP : PVB. Els polímers es dissolen en n-pentanol per a la seva impressió.

Darrerament, M. Y. Hong et al⁹¹ han desenvolupat un biosensor per a la determinació de lactat deshidrogenasa. La tinta d'impressió es basa en lactat, NAD⁺, un polímer compost de hidroxietil cel·lulosa amb etilen glicol, 3,4-dihidroxibenzaldeid (com a mediador) i grafit com a material conductor.

Finalment, el nostre grup ha dissenyat un biosensor de glucosa^{92,93} basat en un biocompòsit *reagentless* d'epoxi grafit *screen-printable*. Les pastes de grafit-epoxi i GOD es prepararen dispersant pols de grafit i GOD en una resina epòxica. La viscositat del compòsit s'ajusta amb ciclohexanona. La pasta preparada s'imprimeix sobre un circuit imprès sobre un suport de fibra de vidre, desenvolupat mitjançant processos fotolitogràfics.

En el següent diagrama es pot veure, esquematitzat, un resum de les diferents configuracions de sensors *screen-printing* trobades.

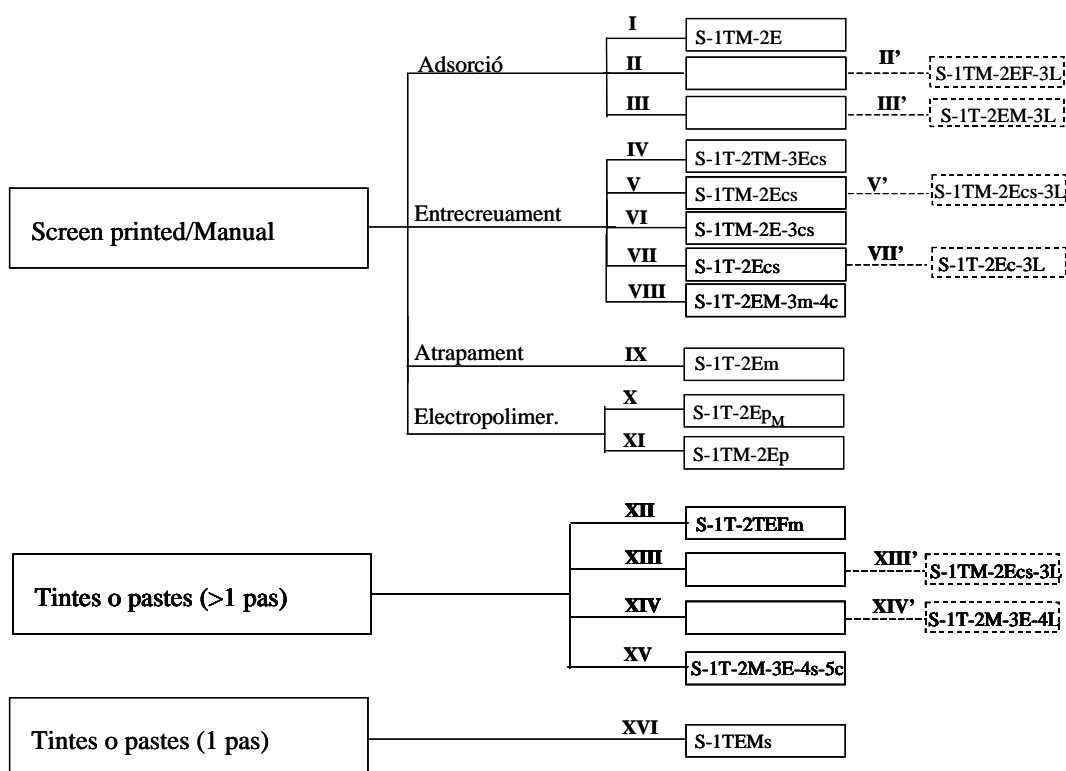


Figura 1.5 La numeració correspon a les diferents capes existents en els dissenys dels biosensors. En cada capa s'especifica els materials que la componen: c: *crosslinker* o entrecreudador; E: enzim; F: cofactor; L: capa protectora; m: polímer o matriu de gel; M: mediador o catalitzador; p: electropolimer; p_M: electropolimer actuant com a mediador; S: substrat; s: estabilitzant; T: transductor.

1.4.2.4 Perspectives

Un dels avantatges principal dels processos *thick film*, com ja s'ha esmentat, és la simplicitat de fabricació (un cop s'ha desenvolupat i optimitzat una tinta d'impressió adequada), que comporta uns abaratiments en els costos finals de producció, aconseguint dispositius d'anàlisi que poden ser aplicats en camps com el mediambient, l'agroalimentari o el clínic a molt baix

preu. El pas limitant per a la seva comercialització és clarament la immobilització tant biològica com d'altres materials com mediadors o additius que, en molts casos, no resulten compatibles amb la producció en massa, costos baixos de producció o reproduïbilitat.

A partir de la recerca feta i observant els treballs duts a terme pels diferents investigadors, és pot concloure que existeix una tendència cap a la configuració de biocompòsit o fabricació en un sol pas, degut a la seva simplicitat i aplicació en la producció en massa de biosensors. Tot i això, la tecnologia de capa múltiple s'utilitza encara en la millora de les característiques analítiques dels dispositius. Alguns autors han iniciat els seus estudis amb configuracions simples i amb posterioritat han continuat els seus treballs amb l'addició de membranes, i per tant, augmentant els passos de fabricació. Ambdues tendències estan dirigides a un mateix fi: configuració simple i anàlisi analític acurat. Actualment, aquests dos factors són difícilment compatibles i això fa que alguns autors adrecin la seva recerca cap a la configuració d'un sol pas mentre d'altres es dirigeixen cap a configuracions més complexes, però amb millors respostes analítiques.

Efectivament, es poden observar resultats superiors en aquells sensors amb immobilitzacions manuals quan es comparen amb sensors que contenen capes d'impressió biològica. Tot i que la immobilització per *crosslinking* és la tècnica més emprada i la que mostra millors resultats, en el darrers dos anys han anat apareixent dispositius que substitueixen cada cop més etapes manuals amb bons resultats analítics. Malauradament, encara existeixen molt pocs dispositius *reagentless* on la fabricació sigui exclusivament per *screen printing*, sobretot en enzims deshidrogenases, on es requereix compatibilitzar en una mateixa tinta diversos components (cofactors, mediadors, etc.).

El desenvolupament de noves pastes d'impressió que incorporin tants bio- o electrocomponents i un menor nombre de passos com sigui possible, és clarament la estratègia més adequada en el disseny de nous biosensors. Les anomenades tintes biològiques, compatibles amb processos automàtics són un nou i interessant camp d'investigació directament relacionat amb la fabricació de sensors per tecnologia *thick-film*.

En aquest treball, s'han desenvolupat biosensors en les tres configuracions presentades [(i) impressió serigràfica del transductor i deposició manual de la biocapa, (ii) impressió serigràfica de totes les capes i (iii) fabricació del biosensor en un sol pas mitjançant impressió del biocompòsit. Es presentaran els paràmetres analítics obtinguts per a cada una d'elles així com els avantatges i inconvenients de les diferents configuracions.

1.5 OBJECTIUS

El Grup de Sensors i Biosensors s'ha involucrat especialment en la recerca aplicada al control alimentari i mediambiental en general, i seguint aquesta línia ha intentat acostar al sector industrial les eines necessàries per aconseguir la informació pertinent de forma fiable, ràpida i barata. És evident que dins la instrumentació analítica, els dispositius que millor s'ajusten a aquestes característiques són els sensors i, dins d'aquests, els basats en compòsits han obtingut una creixent i notòria importància. La possibilitat d'incorporar fàcilment dins els compòsits, enzims, mediadors, cofactors i diversos additius augmentant llurs característiques analítiques i electroquímiques han ampliat l'ús potencial de biosensors basats en aquests materials a diferents àmbits i camps d'anàlisi, entre ells el de l'alimentació.

El fet d'emprar sensors de baix cost possibilita, a més, dispositius d'un sol ús que alliberen a l'usuari del manteniment de l'equip i que permeten realitzar anàlisis esporàdiques sense necessitat de realitzar fortes inversions en instrumentació.

A més, s'escollí transductors amperòmètrics per davant d'altres transduccions com la òptica, per tal de que les mesures puguin realitzar-se de forma satisfactòria amb equipament amperomètric portàtil.

En aquest sentit la fita d'aquesta treball ha estat el desenvolupament de biosensors d'un sol ús per a la determinació d'analits d'interès en l'àmbit agroalimentari.

En una primera part s'han triat els pesticides i la seva anàlisi en diferents tipus de mostres com objecte del nostre estudi. Aquests biosensors es basen en la inhibició d'un enzim (acetil o butirilcolinesterasa) per part dels pesticides i es desenvolupen en una tecnologia molt senzilla i de baix cost, que permet la producció massiva dels sensors. Alhora, la limitació que presenten altres tipus de dispositius en front a la irreversibilitat de l'enllaç enzim-inhibidor, queda resolta amb el disseny proposat.

Comparant-ho amb altres mètodes com els òptics o la cromatografia, aquest treball vol oferir una alternativa tant a nivell de cost de fabricació com de facilitat d'ús (*user-friendly*).

Per aconseguir-ho es varen plantejar els següents objectius:

- 1- Optimització d'un transductor amperomètric per tecnologia de capes gruixudes (*thick-film*), que es basa en la deposició de materials per tècniques serigràfiques (*screen-printing*). Aquesta tecnologia disminueix les despeses de fabricació, sense disminuir la qualitat de la resposta analítica dels dispositius produïts.
 - Optimització de la composició del transductor
 - Millora de la reproductibilitat en la resposta del transductor

- 2- Desenvolupament i caracterització d'un biosensor amperomètric per tecnologia *thick-film* per a l'anàlisi de butiril i acetiltiocolina per a una aplicació posterior en el disseny de biosensors per a l'anàlisi d'inhibidors enzimàtics.
 - Estudi de la immobilització enzimàtica (acetil o butirilcolinesterasa)
 - Estudi dels paràmetres analítics tal com resposta, reproductibilitat, interval de treball i límit de detecció per la butiril i acetiltiocolina.
- 3- Disseny d'un procediment per a l'anàlisi de pesticides mitjançant l'ús del biosensor *screen printed* desenvolupat.
 - Preparació d'un protocol d'anàlisi per a la determinació de pesticides
 - Determinació del límit de detecció per pesticides organofosforats i carbamats
- 4- Aplicació del biosensor en mostres aquoses
 - Determinació de pesticides en aigua de xarxa i en suc natural

En una segona part s'ha triat l'anàlisi dels àcids làctic i màlic en vi blanc. La tecnologia emprada era bàsicament l'aplicada en la primera part de la investigació, tot i que es volia millorar el procés de fabricació emprant una màquina d'impressió més automatitzada.

Els passos a seguir foren els següents:

- 5- Desenvolupament i caracterització de biotintes d'impressió serigràfica basades en matrius de sílice (sol-gel)
- 6- Desenvolupament i caracterització de biosensors amperomètrics per tecnologia *thick-film* per a l'anàlisi d'àcids làctic i màlic basats en LOD, LDH i MDH.
 - Estudi de la immobilització enzimàtica
 - Estudi dels paràmetres analítics tal com resposta, reproductibilitat, interval de treball i límit de detecció.
- 7- Aplicació del biosensor en mostres reals
 - Determinació d'àcid làctic i màlic en vins blancs

Bibliografia

- ¹ B. J. Nebel, R. T. Wright, *Ciencias ambientales: ecología y desarrollo sostenible*, Prentice Hall, Mèxic, 1999
- ² M. Ludevid, *El cambio global en el medio ambiente*, Boixareu, Barcelona, 1977
- ³ P. M. Vitousek, H. A. Mooney, J. Lutzewagen, J. M. Melillo, "Human domination of Earth's ecosystem", *Science* 277 (1997) 494
- ⁴ P. M. Vitousek, "Beyond the global warming: ecology and global exchange", *Ecology*, 75 (1994) 1861
- ⁵ W.C. Clark, "Gestión del planeta Tierra", *Investigación y Ciencia*, 158 (1989) 12
- ⁶ F. Sapiña, *Un futur sostenible?*, U. V. Bromera, València, 2001
- ⁷ S. Alegret, in S. Alegret, J. G. Peretó (ed.), *Fronteres de la Ciència*, Institut d'Estudis Catalans, Barcelona, 1997, p. 31
- ⁸ S. Alegret, *Arxius de les Seccions de Ciències (I.E.C.)*, 100 (1995) 385
- ⁹ J. Janata, *Principles of chemical sensors*, Plenum Press, New York, 1989
- ¹⁰ A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman., *Pure Appl. Chem.*, 63 (1991) 1247
- ¹¹ S. Alegret. *Sobre Senyals, Sensors i Altres Aspectes de l'Anàlisi Química*, Institut d'Estudis Catalans, Barcelona, 1992, p. 7
- ¹² L.C. Clark Jr., C. Lions. *Ann. Acad. Sci.*, 102 (1962) 29
- ¹³ G.G. Guilbault, J.G. Montalvo. *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1897
- ¹⁴ R. Kobos, G.A. Rechnitz. *Anal. Lett.*, 10 (1977) 751
- ¹⁵ M. Alvarez-Icaza, U. Billitewski, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 525 A
- ¹⁶ J. Albery, *Electrode Kinetics*, Oxford University Press, Oxford, 1975

- ¹⁷ B. C. Pressman, *Fed. Proc.*, 27 (1968) 1283
- ¹⁸ E. A. H. Hall, *Biosensors*, Open University Press, Ballmoor, 1990
- ¹⁹ N. Hamm, C. Eppelsheim, A. Silber, in M. Prudenziati (ed). *Handbook of sensors and actuators. Thick film sensors*, Elsevier, Amsterdam, 1994, cap. 5
- ²⁰ G. Bardeletti, F. Séchaud, P.R. Coulet in L.J. Blum, P.R. Coulet (eds.). *Biosensors. Principles and applications*, M. Dekker, New York, 1991
- ²¹ G. S. Wilson, D. R. Thevenot in A. E. G. Cass (ed.), *Biosensors. A practical approach*, Oxford University Press, New York, 1990, cap. 1
- ²² M. A. Arnold, M. E. Meyerhoff, *Anal. Chem.*, 20 (1988) 149
- ²³ D. E. Tallman, S.L. Peterson, *Electroanalysis*, 2 (1990) 499
- ²⁴ M. J. Madou, S. R. Morrison, *Chemical sensing with solid state devices*, Academic Press, San Diego, 1989
- ²⁵ S. Solé, S. Alegret, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1462
- ²⁶ M. Santandreu, S. Solé, S. Alegret, E. Martínez-Fàbregas, *Biosens Bioelect.*, 13 (1998) 7
- ²⁷ F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Trends in Anal. Chem.*, 15 (1996) 296
- ²⁸ D. Martorell, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Sensors Actuators B*, 16 (1993) 448
- ²⁹ D. Martorell, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta.*, 337 (1997) 305
- ³⁰ B. Serra, S. Jiménez, M. L. Mena, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón, *Biosens Bioelect.*, 17 (2002) 217
- ³¹ D. Puig, T. Ruzgas, J. Emnéus, L. Gorton, G. Morko-Varga, D. Barcelo, *Electroanalysis*, 8 (1996) 885
- ³² B. Serra, E. Mateo, M. Pedrero, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón, *Analisis*, 7 (1999) 592
- ³³ B. Serra, B. Benito, L. Agüí, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón, *Electroanalysis*, 6 (1994) 850
- ³⁴ I. Rohm, W. Künnecke, U. Bilitewski, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2304
- ³⁵ J. Wang, Q. Chen, *Electroanalysis*, 6 (1994) 850

- ³⁶ S. Sampath, O. Lev, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2015
- ³⁷ C. Petit, A. Gonzales-Cortes, J. M. Kauffmann, *Talanta*, 42 (1995) 1783
- ³⁸ I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 8587
- ³⁹ J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park, *Anal Chem.*, 68 (1996) 2705
- ⁴⁰ J. Wang, P. V. A. Pamidi, *Anal Chem*, 69 (1997) 4490
- ⁴¹ J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park, *Electroanalysis*, 9 (1997) 52
- ⁴² A. Hobby, *Printing Thick Film Hybrids*, Gwent Electronic Materials Ltd., Newport, 1997.
- ⁴³ A. Hobby, *Screen printing for the industrial user*, Gwent Electronic Materials Ltd., Newport, 1997.
- ⁴⁴ J. Kulys, E. J. D'Costa, *Biosens Bioelectr.*, 6 (1991) 109
- ⁴⁵ F. Bechtold, W. Pfab, P. G. Fenzlein, *Technisches Messen tm*, 56 (1989) 264
- ⁴⁶ E. V. Gogol, G. A. Evtugyn, J. L. Marty, H. C. Budnikov, V. G. Winter, *Talanta*, 53 (2000) 39
- ⁴⁷ G. Palleschi, H.S. Rathore, *Anal. Chim. Acta*, (1988) 209
- ⁴⁸A. Cagnini, I. Palchetti, I. Lioni, M. Mascini, A.P.F. Turner, *Sensors Actuators B*, 24-25 (1995) 85
- ⁴⁹ A. Cagnini, I. Palchetti, M. Mascini, A.P.F. Turner, M. Del Carlo, C. Coppi, *Anal Chim Acta*, 337 (1997) 315
- ⁵⁰ S.D. Sprules, J. P. Hart, S. A. Wring, R. Pittson, *Anal Chim Acta*, 304 (1995) 17
- ⁵¹ S.D. Sprules, J. P. Hart, S. A. Wring, R. Pittson, *Electroanalysis*, 6 (1996) 539
- ⁵² S.D. Sprules, J. P. Hart, Y. C. Hartley, R. Wedge, R. Pittson, *Anal Chim Acta*, 329 (1996) 215
- ⁵³ A. Avramescu, T. Noguier, V. Magearu, J. L. Marty, *Anal Chim Acta*, 433 (2001) 81
- ⁵⁴ F. Ge, X.-E. Zhang, Z.-P. Zhang, X.-M. Zhang, *Biosens Bioelectr*, 13 (1998) 333
- ⁵⁵ Q. Husain, M. Saleemuddin, *Enzyme Microb. Technology*, 8 (1986), 886

- ⁵⁶ K. Hajizadeh, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Talanta*, 38 (1991) 37
- ⁵⁷ P. Skládal, G. S. Nunes, H. Yamanaka, M.L. Ribeiro, *Electroanalysis*, 9 (1997) 1083
- ⁵⁸ P. Skládal, M. Fiala, J. Krejci, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 65 (1997) 139
- ⁵⁹ J.J. Rippeth, T.D. Gibson, J.P. Hart, I.C. Hartley, G. Nelson, *Analyst*, 122 (1997) 1425
- ⁶⁰ G. S. Nunes, D. Barceló, B. S. Grabaric, J. M. Díaz-Cruz, M. L. Ribeiro, *Anal. Chim. Acta*, 399 (1999) 37
- ⁶¹ J. Kulys, E. J. D'Costa, *Biosens Bioelectr.*, 6 (1991) 109
- ⁶² I. C. Hartley, J. P. Hart, *Analytical Proceedings Incl. Anal. Communic.*, 31 (1994) 333
- ⁶³ M-A Carsol, G. Volpe, M. Mascini, *Talanta*, 44 (1997) 2151
- ⁶⁴ M-A Carsol, M. Mascini, *Talanta*, 47 (1998) 335
- ⁶⁵ U. Bilitewski, G. C. Chemmitius, P. Ruger, R. D. Schmid, *Sensors Actuators B*, 7 (1992) 351
- ⁶⁶ P. Rüger, U. Bilitewski, R.D. Schmid, *Sensors Actuators B*, 4 (1991) 267
- ⁶⁷ U. Bilitewski, A. Jäger, P. Rüger, W. Weise, *Sensors Actuators B*, 15-16 (1993) 113
- ⁶⁸ P. Deman, J. Suls, W. Sansen, *Sensors Actuators B*, 44 (1997) 304
- ⁶⁹ G. Faruque-Khan, *Electroanalysis*, 9 (1997) 533
- ⁷⁰ M. Mascini, M. A. Matescu, R. Pilloton, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 16 (1986) 149
- ⁷¹ J. Wang, J. Sánchez, *J. Anal. Chim. Acta*, (1990) 228
- ⁷² N. C. Foulds, C. Loewe, *J. Chem. Soc. Faradays Trans.*, 82 (1986) 1259
- ⁷³ A. Silber, C. Bräuchle, N. Hampp, *Sensors Actuators B*, 18-19 (1994) 239
- ⁷⁴ A. Silber, N. Hampp, *Biosens Bioelectr.*, 11 (1996) 215
- ⁷⁵ T. Neufeld, I. Eshkenazi, E. Cohen, J. Rishpon, *Biosens Bioelectr.*, 15 (2000) 323

- ⁷⁶ S. Yang, Y. Lu, P. Atanossov, E. Wilkins, X. Long, *Talanta*, 47 (1998) 735
- ⁷⁷ J. Wang, Q. Chen, M. Pedrero, J. M. Pingarrón, *Anal Chim Acta*, 300 (1995) 111
- ⁷⁸ H. C. Yoon, H.-S. Kim, *Anal Chim Acta*, 336 (1996) 57
- ⁷⁹ A.L. Hart, W.A. Collier, D. Janssen, *Biosens Bioelectr*, 12 (1997) 645
- ⁸⁰ A. L. Hart, A. P. F. Turner, D. Hopcroft, *Biosens Bioelectr*, 11 (1996) 263
- ⁸¹ A. L. Hart, H. Cox, D. Janssen, *Biosens Bioelectr*, 11 (1996) 833
- ⁸² A.L. Hart, W.A. Collier, *Sensors Actuators*, B 53 (1998) 111
- ⁸³ T. Montesinos, S. Pérez-Munguía, F. Valdez, J. L. Marty *Anal. Chim. Acta*, 431 (2001) 231
- ⁸⁴ J. D. Newman, A. P. F. Turner, *Anal. Chim. Acta*, 262 (1992) 13
- ⁸⁵ J. Rohm, M. Genrich, W. Collier, U. Bilitewski, *Analyst*, 121 (1996) 877
- ⁸⁶ J. T. Scummacher, I. Munch, T. Richter, I. Rohm, U. Bilitewski, *Jnl Mol Catal B-Enzym*, 7 (1999) 67
- ⁸⁷ J. Wang, V. B. Nascimento, S. A. Kane, K. Rogers, M. R. Smyth, L. Angnes, *Talanta*, 43 (1996) 1903
- ⁸⁸ Yizhu Guo, A. R. Guadalupe, *Sensors Actuators*, B 46 (1998) 213
- ⁸⁹ J. Wang, P. V. A. Pamidi, *Anal Chem*, 70 (1998) 1171
- ⁹⁰ R. Nagata, K. Yokohama, S. Anne Clark, I. Karube, *Biosens Bioelectr*, 10 (1995) 261
- ⁹¹ M. Y. Hong, J. Chang, H. Yoon, H. Kim, *Biosens Bioelectr*, 17 (2002) 13
- ⁹² C. A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez & S. Alegret, *Sensors Actuators*, B 45 (1997) 55
- ⁹³ C. A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez & S. Alegret, *Sensors Actuators*, B 52 (1998) 257

Disseny i construcció d'un biosensor planar per a la determinació d'inhibidors enzimàtics en l'anàlisi de pesticides

2.1 INTRODUCCIÓ

Tot i l'evident necessitat d'incorporar petits dispositius d'anàlisi al mercat que aportin informació de forma ràpida i fiable a baix cost, els biosensors han tingut poques aplicacions en el món real. Els principals problemes han sorgit de la interdisciplinarietat d'aquest camp ja que obliga a combinar coneixements de diferents àrees (Biologia, Química, Biotecnologia, Bioquímica, Física, Enginyeria mecànica, Electrònica) i a una manca de mercats amplis i definits. Tot i això hi ha alguns exemples que compten amb molt d'èxit com els sensor de glucosa per a malalts de diabetis entre d'altres.

L'increment, però, de la pressió social per a la preservació del medi ambient i les mesures legals empreses pels governs dels països més industrialitzats obliguen a un control més estricte i continu dels diversos paràmetres i sobretot en la indústria de l'alimentació.

Malauradament, el control de molts dels paràmetres indicadors de la qualitat dels aliments encara implica la presa de mostra i el transport als laboratoris de control, fet que representa una feina feixuga, tediosa i cara. El cost de la recollida de mostres també limita habitualment el seu nombre i diversitat i per tant la fiabilitat de l'estudi.

Seguint, doncs, la tendència actual de la química analítica dirigida a obtenir dispositius cada vegada més versàtils, econòmics, sensibles i selectius en electroanàlisi, s'està duent a terme una intensa investigació dirigida a millorar les limitacions que presenten aquests elèctrodes sòlids quan s'empren com a elèctrodes indicadors.

Un elèctrode de material compost és, de forma general, un elèctrode format per un material sensor constituït per una fase conductora de l'electricitat i, per almenys, una fase polimèrica aglutinadora. Les avantatges que se n'obtenen són diversos, entre els que destaquen un augment de la relació senyal-soroll respecte els elèctrodes conductors purs (i que implica millors límits de detecció), permeten modificar la matriu del compost amb substàncies que

poden millorar les característiques de resposta i, a més, els materials emprats permeten construir sensors de múltiples configuracions i dimensions, amb una superfície fàcilment renovable.

Davant de les, encara, poques aplicacions comercials d'aquests dispositius¹, alguns investigadors van veure en l'ús de la tecnologia serigràfica una possible solució per a l'aplicació comercial a finals dels anys 80, que neix un nou sensor miniaturitzat construït mitjançant aquesta tecnologia.

En el grup de Sensors i Biosensors, els transductors i sensors amperomètrics han tingut un desenvolupament semblant. El primer, d'un gran nombre d'elèctrodes amperomètrics, fou construït en els nostres laboratoris l'any 1991². Posteriorment aquesta matriu s'ha anat modificant amb material biològic (enzims^{3,4}, anticossos⁵, material genètic⁶) i altres modificacions (mediadors redox⁷, catalitzadors⁴, etc.) que milloren la sensibilitat, la selectivitat i, en darrer terme, les característiques de resposta del dispositiu inicial. L'any 1995, es construeix el primer elèctrode amperomètric mitjançant tecnologia serigràfica (sensor planar)⁸. Actualment s'estan estudiant altres polímers amb la finalitat d'ampliar el camp d'aplicació i acostar-nos cada cop més a una més àmplia utilització dels sensor en diverses aplicacions comercials.

2.2 DISSENY I CONSTRUCCIÓ D'UN BIOSENSOR PLANAR

El disseny que s'ha utilitzat al llarg de la primera part d'aquest treball, per a la construcció i fabricació de sensors planars, parteix d'unes plaques de circuit imprès de fibra de vidre amb sensibilitat positiva 80 x 120 mm², que ens serviran de base dels elèctrodes. Sobre aquestes plaques es desenvolupen unes pistes de coure (§ 2.2.1).

La fabricació dels elèctrodes es basa en la impressió sobre aquestes pistes de coure d'unes pastes conductores de grafit amb propietats transductores adients (§ 2.2.2) per incorporar posteriorment els materials que ens permetran la construcció del biosensor (§ 2.2.3).

2.2.1 Disseny i construcció dels suports

2.2.1.1 Materials, aparells i reactius

Per a la construcció dels suports (anomenats també substrats), sobre els quals s'aplicaran els materials transductors i posteriorment els biosensors, es va utilitzar una sèrie de materials que es detallen a continuació:

Materials

Plaques de circuit imprès de fibra de vidre amb sensibilitat positiva 80 x 120 mm Ariston, que ens serviran de base dels elèctrodes, dissolucions reveladores (Ariston) per a plaques positives, fotolit positiu amb el disseny de pistes conductores i joc de pantalles per a serigrafia (teixit monofilament de polimida de 100, 110 i 120 fils/cm Marbay, Barcelona) que faran possible la impressió de la pasta sobre les pistes conductores.

Aparells

Equip de serigrafia Marprint 350 (Marbay, Barcelona) i làmpada de llum U.V. (Blak-Ray UVP, model B 100 AP de 100 W i 360 nm, USA).

Reactius

Els reactius i solucions utilitzades per a la realització de les pistes, són H_2O_2 (Merck), NaOH (Panreac) i HCl (Panreac).

2.2.1.2 Preparació de les pistes conductores sobre el suport mitjançant tècniques fotolitogràfiques

Per tal d'imprimir els material sensors, necessitem un suport amb un contacte elèctric que permeti la transducció del senyal. Així doncs, el primer que cal fer es escollir aquest suport. Es varen provar diversos materials: PVC, baquelita i fibra de vidre⁹⁻¹¹, i s'observà que el que proporcionava les millors propietats per a les tècniques serigràfiques era la fibra de vidre, que a més presentava l'avantatge de poder tenir-hi una capa de coure impresa, simplificant els passos que cal seguir en el procés de construcció del dispositiu.

L'efectivitat del contacte elèctric entre pastes de grafit (anàlogues a les desenvolupades) i el coure ja ha estat demostrada³.

Mitjançant un fotolit amb el disseny idoni, podríem definir la forma de la capa de coure que més ens convingués.

El disseny escollit fou el representat en la figura 2.2:

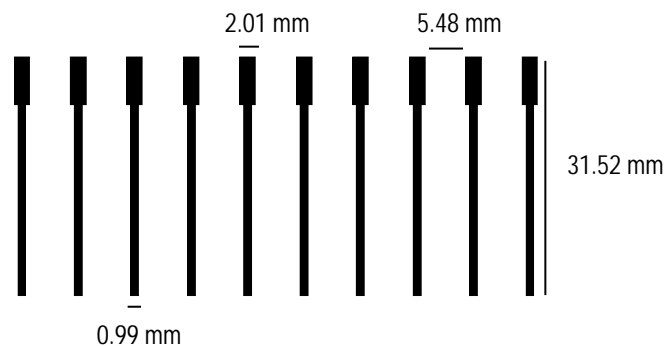


Figura 2.2 Disseny del fotolit, realitzat a través del programa Corel Draw (compatible amb l'aparell que permet la fabricació del fotolit) i que es col·loca mitjançant tècniques fotolitogràfiques en la malla d'impressió.

Es tracta d'un disseny simple que permet fàcilment la posterior impressió de la pasta conductora en un extrem, i alhora aïllar la pista de coure de la solució mitjançant un encapsulant dielèctric.

El procés per realitzar el disseny de les pistes sobre el suport, mitjançant tècniques fotolitogràfiques, fou el mostrat en la figura 2.3:

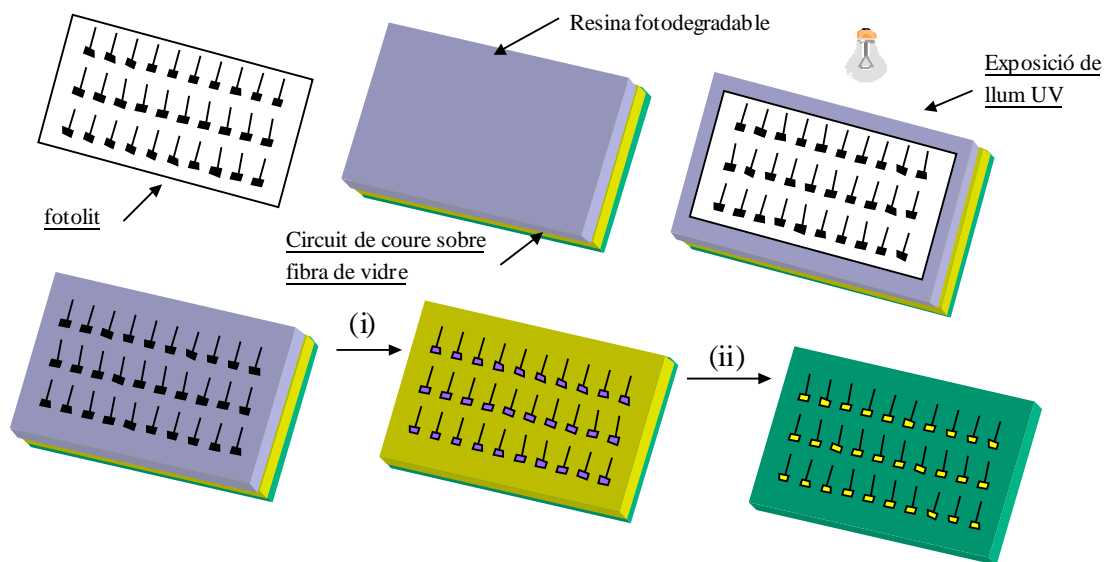


Figura 2.3 Procediment fotolitogràfic d'impressió de les pistes conductores sobre un suport de fibra de vidre.

La construcció de les pistes conductores de coure es duia a terme bàsicament en dues etapes:

1. Procés fotolitogràfic mitjançant el disseny del fotolit predeterminat
2. (i) Eliminació de la resina (ii) dissolució de la capa de coure

1. Es col·loca el fotolitⁱ sobre el suport, que consta d'una resina fotodegradable, una capa de coure i una base de fibra de vidre. En fer incidir la llum UVⁱⁱ sobre el suport, aquesta degrada la resina exposada mentre que el fotolit protegeix aquella part de la resina que cobreix.

2. (i) El segon pas consisteix en introduir la placa en una dissolució de sosa. La resina exposada a la llum es desprendreà, deixant la capa de coure al descobert, però aquella part que ha estat prèviament protegida pel fotolit romandrà intacta.

2. (ii) Per finalitzar, es posa en contacte amb una dissolució de H₂O₂ i HClⁱⁱⁱ que ataca el coure descobert. Aquella zona protegida per la resina quedarà intacte sobre el suport, amb el disseny predefinit pel fotolit. Aquesta resina que cobreix el coure es treu fàcilment amb etanol.

2.2.2 Disseny i construcció del transductor

Un cop les pistes han estat impreses sobre el suport, s'imprimeix el transductor (format bàsicament per una pasta conductora d'Epoxi-grafit) en el seu extrem, tot assegurant un bon contacte entre ambdues superfícies.

2.2.2.1 Materials i reactius

Per la construcció dels transductors es van utilitzar els següents materials i reactius:

Polímer Epotek H77 (Epotek Technology Inc.USA), grafit Aldrich amb tamany de partícula de 1-2 µm, Ebecryl 600 (encapsulant, UCB Chemicals), Ciclohexanona (Merck), paper abrasiu d'alúmina Orion 301044-001 (3µm) per polir la superfície dels elèctrodes

ⁱel fotolit es va dissenyar mitjançant el programa Corel Draw a partir del qual es va realitzar la transparència per tècniques fotogràfiques

ⁱⁱ la potencia de la llum és de 100 W (365 nm) i el temps d'exposició 7 minuts a una distància aproximada de 15 cm.

ⁱⁱⁱ 130 ml d'aigua bidestil·lada + 40 ml H₂O₂ al 30% + 70 ml HCl 37%

2.2.2.2 Preparació de la pasta conductora

La pasta està formada bàsicament per Epo-Tek H77 i grafit. La seva elaboració fou la següent: mesquem el monòmer de l'Epo-Tek H77 i l'enduridor que catalitza la seva polimerització. Un cop ens hem assegurat de que la mescla és prou homogènia s'afegeix el grafit (la composició final de la pasta conductora fou d'un 32% de grafit, tal i com es detalla en §3.5.1 i §3.5.2). Es barreja de nou fins a la seva homogenització. Això és essencial per assegurar una bona reproductibilitat en la resposta dels transductors. En resulta una pasta excessivament viscosa, molt difícil d'utilitzar per a la deposició per *screen printing*. Se li dóna unes condicions més idònies per a la impressió mitjançant l'addició d'un dissolvent orgànic. La ciclohexanona fou el que proporcionà a la pasta unes propietats més adients.

2.2.2.3 Preparació del transductor mitjançant tècniques *thick-film*

Finalment, es procedeix a la etapa d'impressió, en la que la pasta conductora que conté grafit i Epo-Tek H77 ^{8,12-14} es diposita en l'extrem de la pista (figura 2.4) segons el següent procés serigràfic (o *screen printing*):

Immediatament a l'addició del dissolvent, es col·loquen els dispositius a imprimir en l'aparell de *screen-printing*, de forma que coincideixin exactament els extrems de les pistes de coure amb les obertures de que disposa la malla (figura 2.4 A-C). Tot seguit es diposita la pasta sobre la malla amb el disseny preestablert i una paleta de poliuretà li proporciona la pressió adequada per fer-la passar a través de l'esmentada malla i dipositar-la sobre l'extrem de les pistes de coure (figura 2.4 C-F). És important que aquest pas es produeixi amb rapidesa, ja que la ciclohexanona s'evapora i la pasta perd fluidesa.

El coure (la pista conductora) sobre el que es diposita la pasta de grafit i Epo-Tek H77, s'ha de cobrir totalment, ja que si resta al descobert s'oxidarà en contacte amb la solució de treball i la resposta obtinguda tindrà interferències. Sovint cal més d'una impressió per cobrir-lo totalment.

Un cop finalitzada, es comprova cada transductor al microscopi per assegurar-nos de que la pasta cobreix la totalitat del coure.

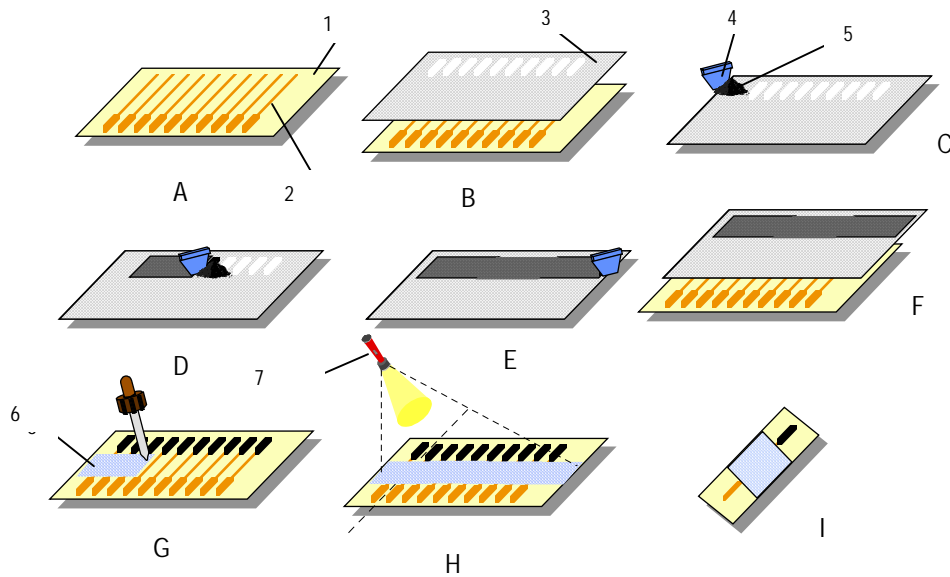


Figura 2.4 Impressió del compost sobre l'extrem de les pistes conductores a través de la malla de la impressora *screen-printing*, i posterior aïllament de les pistes mitjançant un polímer fotocurable.
 1. Substrat; 2. Pistes conductores; 3. Malla d'impressió; 4. Paleta d'impressió; 5. Pasta (compost); 6. Aïllant; 7. Làmpada UV

El polímer ha de passar per un procés de curat, es a dir, polimeritzar per tal d'adquirir l'apropiada consistència i no produir-se pèrdues en contacte amb la solució de treball. Tot just finalitzada la impressió es confina la placa en una estufa. El fabricant del polímer recomana deixar-ho unes hores a 150°C perquè el curat sigui prou efectiu. En el nostre cas, aquesta temperatura afectaria greument a l'enzim (quan eventualment s'incorporés en la fabricació de biosensors), pel que es va optar per abaixar-la fins a 40°C i augmentar el temps de curat (la duració exacta depèn de la quantitat de grafit contingut en el transductor i pot variar des de 5 dies per continguts del 20 %, fins a 25 dies pel 37 %).

Un temps inferior impossibilita que la polimerització sigui la òptima, i fa que la capa aplicada es desprengui en contacte amb la solució de treball. Això faria que el core de les pistes es posés en contacte amb la solució de treball. D'aquesta forma obtindríem un senyal erroni, ja que no provindria de l'anàlit d'interès.

Un cop curat, es fan els talls sobre la placa per obtenir els sensors individualment (figura 2.4 I i figura 2.5) i s'encapsula amb una resina fotocurable Ebecryl 600¹⁵ per tal d'evitar el contacte de la pista de core amb la solució (figura 2.4 G i H). Prèviament al seu ús, cal una etapa d'activació del sensor (§3.4).

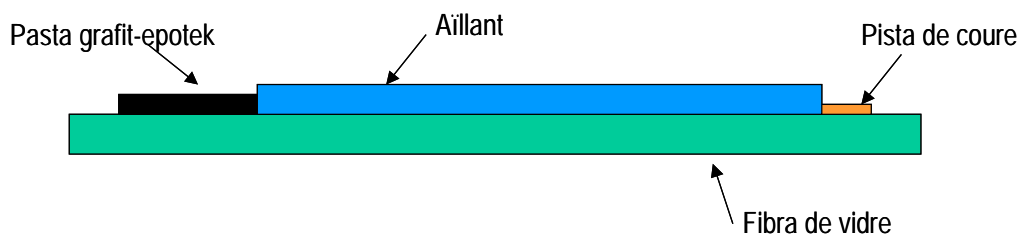


Figura 2.5 Tall transversal del transductor.

2.2.3 Disseny i construcció del biosensor

Per a la fabricació dels biosensors es varen utilitzar els mateixos materials emprats en la construcció dels elèctrodes transductors. S'usaren a més a més diverses quantitats d'enzim butiril colinesterasa 8.7 U/mg sòlid (Sigma) de sèrum de cavall i plasma humà, i d'enzim acetil colinesterasa 480 U/mg sòlid (Sigma) d'anguila elèctrica i d'eritròcit de boví. Així mateix també varen caldre solucions de glutaraldehyd al 2.5, 6.25 i 12.5 %.

Per a la construcció del biosensor es varen desenvolupar tres estratègies; en la primera l'enzim es disposa sobre la superfície del transductor de forma manual (**configuració manual**), en la segona l'enzim s'imprimeix mitjançant tècniques serigràfiques (**capa múltiple per screen-printing**), i en la darrera s'immobilitza l'enzim en la matriu polimèrica amb el grafit (**biocompòsit**), i s'imprimeix la pasta, de forma que tot el procés es du a terme en un sol pas.

2.2.3.1 Configuració manual

La immobilització es produeix sobre el transductor, per tant la primera etapa de fabricació és exactament igual a l'explicada en els anteriors epígrafs (§2.2.2.2 i §2.2.2.3).

Un cop tenim el transductor ja activat (§3.4), es disposa una solució enzimàtica tamponada (0.1 M fosfat i 0.1 M KCl, pH 7.0) sobre la superfície de l'elèctrode i es deixa assecar a temperatura ambient (figura 2.6).

Tot seguit es disposa una solució de glutaraldehyd (4 µl d'una solució al 6.25%), agent bifuncional que immobilitza l'enzim per mitjà d'un entrecruament (*cross-linking*).

Es deixa reposar 48 hores a temperatura ambient i es guarda a 4°C.

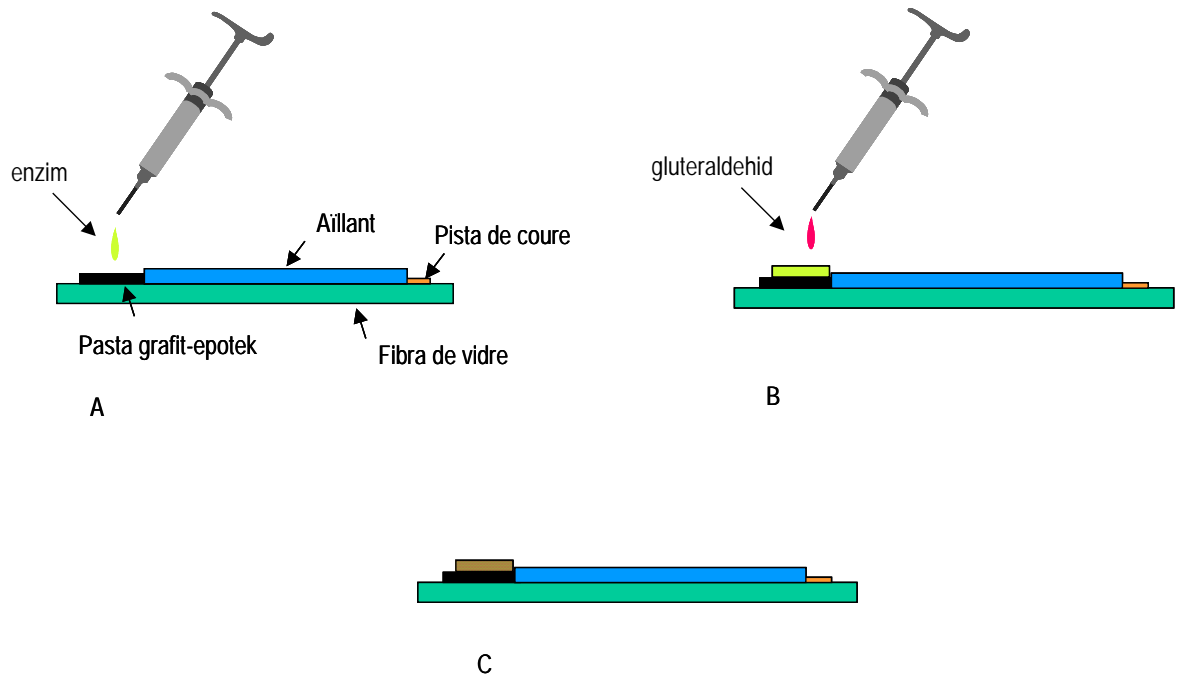
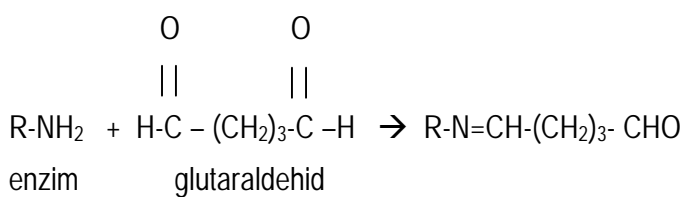
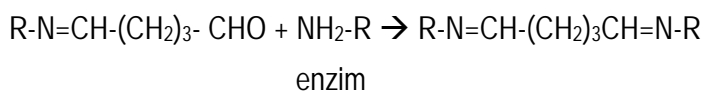


Figura 2.6 Immobilització enzimàtica sobre el transductor. A) addició de l'enzim B) addició del glutaraldehyd C) *cross-linking*

El procés d'immobilització de l'enzim es pot esquematitzar mitjançant les reaccions següents:



Un grup aldehid del glutaraldehyd pot reaccionar amb el grup amino de l'enzim (R-NH₂)



De la mateixa forma, l'altre grup aldehid lliure del glutaraldehyd pot reaccionar amb un grup amino d'un altre molècula d'enzim, entrecreuant la membrana.

2.2.3.2 Configuració de múltiple capa

Sota aquesta configuració, el biosensor desenvolupat es fabrica de forma anàloga a la descrita prèviament, tot i que ara la deposició de la capa biològica es realitza mitjançant *screen-printing*. Així doncs, fou necessari el desenvolupament d'una pasta o tinta d'impressió adequada on l'enzim es trobés retengut i alhora les seves propietats no es veiessin alterades. Aquesta es basà en una solució tamponada d'enzim BChE (0.1 M fosfat i 0.1 M KCl a un valor de pH 7.5) amb glutaraldehyd i es barrejava amb HEC, BSA i grafit. La formulació exacta és descrita en l'epígraf § 4.5.

Aquesta pasta s'imprimia sobre el transductor (de forma totalment anàloga al descrit anteriorment en la impressió de la pasta de grafit per a la construcció del transductor) i es deixava en repòs 48 hores a temperatura ambient abans de ser utilitzat o emmagatzemat a 4°C.

2.2.3.3 Biosensors basats en biocompòsits

Els biosensors amperomètrics de colinesterases desenvolupats sota la configuració de biocompòsit es basen en les mateixes tècniques de construcció descrites anteriorment pels transductors (§2.2.2.2 i §2.2.2.3). Es mesclen polímer Epo-Tek H77 i grafit, es barreja fins que la mescla sigui homogènia. Immediatament s'hi afegeix l'enzim i de nou es procedeix a la seva homogenització. Això és essencial per assegurar una bona reproductibilitat en la resposta dels biosensors, com ja s'ha comentat anteriorment (la composició exacta de la pasta del biocompòsit és descrita més endavant en l'epígraf § 4.6.3).

Per tal d'aconseguir major fluïdesa es procura que el temps emprat entre la preparació de la pasta i el procés d'impressió sigui el mínim possible. Instants abans es mescla amb ciclohexanona¹⁶ per millorar el pas del material a través de la malla, ja que per obtenir una bona impressió la pasta ha de tenir una viscositat moderada. Es col·loca sobre la malla i una paleta de poliuretà pressiona el material a través de la malla, de forma que queda imprès sobre el suport amb el dibuix escollit prèviament i dissenyat sobre la malla.

Com en el cas dels transductors, es deixa curar a 40°C de 5 dies a 3 setmanes depenent de la quantitat de grafit que conté, s'encapsula amb Ebecril 600 (aïllant dielèctric), protegint la zona de la pista conductora que podria entrar en contacte amb la solució de treball en les posteriors mesures, i es deixa al descobert l'altre extrem com a contacte elèctric.

Així mateix es necessària una etapa de preactivació a 1.1 V (§ 4.6.1).

2.3 MESURAMENT AMPEROMÈTRIC

Les mesures es realitzen en una cel·la electrolítica on es disposen els tres elèctrodes: un elèctrode de referència de doble unió Ag/AgCl, un elèctrode auxiliar de fil de platí i com a elèctrode de treball s'utilitza el transductor grafit-epotek amb l'enzim immobilitzat sobre la superfície esmentat prèviament, submergits en 15 ml d'una solució de tampó fosfat 0.1M i KCl 0.1M a pH=7.0. L'agitació s'aconsegueix mitjançant un imant teflonat sota l'acció d'un agitador magnètic que facilita el transport per convecció des del si de la solució cap a la superfície de l'elèctrode. Els tres elèctrodes estan connectats a una unitat amperomètrica, a través de la qual es fixa el potencial de treball, i que dona la lectura del senyal. El sistema es connecta a un ordinador que mitjançant un programa creat específicament per les nostres condicions de treball feia les funcions de registrador (vegeu annex A).

Bibliografia

- ¹ M. Alvarez-Icaza, U. Bilitewski, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 525
- ² F. Céspedes. *Biosensor de glucosa basado en un transductor amperomètrico epoxy-grafito*. Treball de recerca (Máster de Química). Universitat Autònoma de Barcelona, 1991
- ³ F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, J. Bartrolí, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta*, 273 (1993) 409
- ⁴ A. Morales, F. Céspedes, J. Muñoz, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta*, 332 (1996) 131
- ⁵ M. Santandreu, S. Alegret, E. Fàbregas, *Anal. Chim. Acta*, 396 (1999) 181
- ⁶ M. I. Pividori, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 2002
- ⁷ F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta*, 284 (1993) 21
- ⁸ C. A. Galán-Vidal, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1996
- ⁹ C. A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.*, 14 (1995) 225.
- ¹⁰ C. A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret. *Sensors Actuators B* 45 (1997) 55
- ¹¹ C. A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret. *Sensors Actuators B* 52 (1998) 257

¹² F. Céspedes, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1993

¹³ D. Martorell, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1995

¹⁴ M. Santandreu, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1998

¹⁵ A. Bratov, J Muñoz, C. Dominguez, J. Bartrolí, *Sensors Actuators. B*, 24-25 (1995) 823

¹⁶ B. Billis (ed.), *Chemistry and technology of epoxy resins*, Blackie Academic & Professional, Londres, 1993

Caracterització electroquímica del transductor planar grafit-epoxi

Un cop s'ha descrit el disseny i la construcció tant del transductor com del biosensor, es procedeix a comentar la seva avaluació o caracterització electroquímica. El seu comportament electroquímic és detallat tant en el present capítol (transductor) com en el següent (capítol 4: caracterització del biosensor).

3.1 INTRODUCCIÓ

Com és sabut, la intensitat del corrent en un sistema amperomètric és una mesura directa de la velocitat de la reacció electroquímica (velocitat de reducció o oxidació de l'analit a l'elèctrode) descrita per la llei de Faraday com:

$$I = n F dc/dt$$

On dc/dt és la velocitat d'oxidació o de reducció (mol/s), i n és el nombre d'electrons per molècula implicats en la reacció. La intensitat del corrent depèn de la velocitat de transferència dels electrons a la superfície de l'elèctrode i del transport de massa de l'analit a la superfície¹. Aquest darrer paràmetre depèn alhora de la concentració d'analit a la solució, de l'àrea de l'elèctrode i de les condicions de convecció i difusió². Si la resposta dels elèctrodes es mesura en una solució on es força la convecció agitant la solució, de manera que es forma una capa estàtica a la superfície de l'elèctrode d'un gruix L que depèn de la velocitat d'agitació³, s'aconsegueix que el transport de massa a la superfície de l'elèctrode només vingui determinat per la difusió en aquesta capa. S'obté aleshores un estat estacionari en un temps relativament breu en què el valor final d'intensitat depèn de la concentració d'analit de la forma:

$$I = nFA(D/L)C_s$$

On C_s és la concentració d'analit en solució, A l'àrea de l'elèctrode i D el coeficient de difusió de l'espècie electroactiva en la solució.

Aquesta equació es pot simplificar:

$$I = KC_s$$

On K és la constant que inclou la constant de Faraday, l'àrea de l'elèctrode, el coeficient de difusió, etc. per emprar aquesta equació s'assumeix que la solució és homogènia fins a la capa de difusió i que a la superfície de l'elèctrode la concentració d'analit és zero.

Les mesures realitzades es basaran en aquesta equació.

Per realitzar el mesurament del senyal amperomètric s'empren sistemes de 3 elèctrodes, l'elèctrode de treball, el de referència i l'auxiliar.

3.2 DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES CARACTERÍSTICS D'UN TRANSDUCTOR MITJANÇANT VOLTAMPEROMETRIES CÍCLIQUES

La caracterització bàsica de transductors electroquímics i d'espècies redox en general pot realitzar-se mitjançant la tècnica electroquímica anomenada voltamperometria cíclica. Aquesta tècnica permet conèixer de forma ràpida el comportament redox de les espècies químiques en un ampli rang de potencial.

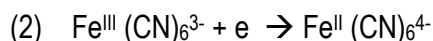
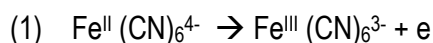
La voltamperometria cíclica consisteix en variar linealment amb el temps el potencial aplicat a l'elèctrode de treball, fent un escombrat des d'un potencial inicial fins a un potencial determinat i seguidament invertint la direcció d'escombrat fins arribar al mateix potencial de partida. D'aquesta forma s'obtenen els voltamperogrames característics per a cada sistema redox, en els que es representa la relació entre la intensitat de corrent mesurada a l'elèctrode de treball i el potencial aplicat. La força reductora o oxidant de l'elèctrode és imposada pel potencial aplicat.

La intensitat del corrent de pic ve relacionada amb la concentració de l'espècie electroactiva segons l'equació de Randles-Sevcik:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2}$$

on n és el nombre d'electrons intercanviats en la reacció, A l'àrea de l'elèctrode, C la concentració de l'espècie electroactiva, D el coeficient de difusió, i ν la velocitat d'escombrat.

En la figura 3.1 es mostra el voltamperograma característic d'un sistema redox reversible:



El potencial inicial (a) figura 3.1, s'aplica per evitar l'electròlisi de l'espècie Fe^{II} quan es connecta l'elèctrode, quan passem a potencials més positius s'arriba a un potencial (b) a partir del qual la seva oxidació (1) es veu afavorida. Entre (b) i (d) la intensitat anòdica va augmentant perquè l'elèctrode és prou oxidant com per provocar la oxidació del Fe^{II} a Fe^{III} . El corrent deixa d'augmentar a (d), moment en el que s'assoleix un pic de corrent degut a que la concentració de Fe^{II} a la superfície de l'elèctrode esdevé pràcticament zero i el procés és governat únicament per la difusió. Si el potencial segueix augmentant, s'observa una disminució de la I (e) degut a que la concentració de Fe^{II} a l'entorn de l'elèctrode ha disminuït de manera molt considerable com a conseqüència de la seva oxidació a Fe^{III} .

En l'instant en què s'assoleix el punt (f) s'inverteix la direcció d'escombrat. El potencial és encara prou positiu com per a que sigui possible la oxidació del Fe^{II} a l'entorn de l'elèctrode i es detecti un corrent anòdic malgrat que el potencial sigui ara escombrat cap a valors negatius.

Quan l'elèctrode esdevé prou reductor (h), el Fe^{III} que s'ha estat acumulant prop de la superfície de l'elèctrode, es pot reduir segons la reacció (2), predominant llavors una intensitat catòdica (i). Aquesta intensitat catòdica augmenta ràpidament fins que la concentració de Fe^{III} a la superfície esdevé nul·la, moment en el que apareix un pic de corrent (j).

El corrent comença a decaure (j,k) a mesura que es va consumint el Fe^{III} al voltant de l'elèctrode. El cicle acaba quan el potencial torna a ser igual al potencial inicial.

Els paràmetres més importants que s'obtenen del voltamperograma cíclic són les magnituds dels corrents de pic anòdic ($I_{p,a}$) i catòdic ($I_{p,c}$) i els potencials de pic anòdic ($E_{p,a}$) i catòdic ($E_{p,c}$).

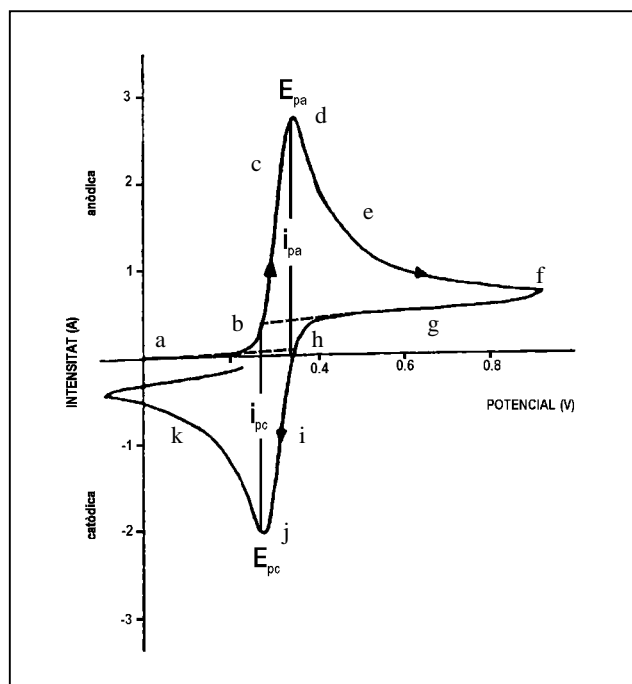


Figura 3.1 Voltamperograma cíclic característic del sistema redox $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$

Un mètode per mesurar la intensitat de pic implica la extrapolació del corrent de la línia base, tal com es mostra en la figura 3.1, però aquesta pot resultar difícil d'establir. En un sistema reversible aquests paràmetres venen relacionats per les següents expressions:

$$(3) \quad E_{pa} - E_{pc} = 0.059/n$$

$$(4) \quad i_{pa}/i_{pc} = 1$$

Equació 3.1

La irreversibilitat electroquímica és causada per l'intercanvi lent d'electrons entre les espècies redox i l'elèctrode de treball. Es caracteritza per una separació dels pics superior a la indicada a (3). En canvi, la relació de corrents (4) pot veure's significativament influenciada per les reaccions químiques que poden anar associades al procés electrolític.

La informació que s'obté a partir d'aquests voltamperogrames, per tant, és de caràcter qualitatiu mostrant els potencials d'oxidació i reducció, els aspectes cinètics de la transferència electrònica sobre la superfície del transductor i l'avaluació de l'evolució d'aquesta respecte un senyal d'excitació, el potencial.

Per avaluar el comportament transductor de l'elèctrode i caracteritzar-lo, vàrem emprar voltamperometries cícliques, per tal d'obtenir paràmetres tals com intensitat dels pics catòdic i anòdic (I_{pc} , I_{pa}), potencial dels pics d'oxidació i reducció (E_{pa} i E_{pc}), i ΔE cat-an (diferència entre els pics de potencial d'oxidació i reducció) que ens marcarà la reversibilitat del sistema. El nombre de cicles emprats fou de 40.

Es varen determinar els paràmetres característics dels elèctrodes, per dues vies:

- a) activació mitjançant la pròpia voltamperometria cíclica
- b) prèvia activació a potencial fix

Ambdós mètodes, la necessitat d'una activació, així com els resultats aconseguits s'exposen en §3.4.

3.3 APARELLS I REACTIUS

Els aparells utilitzats per caracteritzar els elèctrodes desenvolupats foren els següents:

Autolab PGSTAT20 Eco-chemie mitjançant el qual es realitzaren les voltamperometries cícliques; unitat potenciostàtica LC-4C de BAS per a mesurar les respostes dels transductors; registrador Metrohm E586 Labograph; ordinador 386 incorporat amb un programa per a la obtenció i representació gràfica de les dades.; potenciòmetre Crison micro pH 2002; elèctrode de referència de doble unió Ag/AgCl (Orion 900200); elèctrode auxiliar de platí (Ingold)

Els reactius i solucions utilitzades per a la realització de l'estudi descrit en el present capítol són els següents:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck); KCl (Fluka); solució tampó de fosfats (0.1 M) i KCl (0.1M) a pH=7.0 i 7.5; H_2O_2 (Merck); solucions stock de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Merck); NaCl (Merck); NaOH (Panreac); HCl (Panreac); solució de referència interna de l'elèctrode de referència de doble unió Ag/AgCl (Orion 900200) subministrat per la mateixa firma i que permet d'obtenir el potencial de l'elèctrode de calomelans saturat; solució externa KCl 0.1 M.

3.4 ACTIVACIÓ DELS TRANSDUCTORS

Un cop el transductor està curat i les pistes de coure aïllades (§2.2.2), és necessària una etapa d'activació.

En la superfície dels elèctrodes de carboni, així com en qualsevol interfície, poden adsorbir-se un gran nombre de substàncies de forma inespecífica⁴. Per una altra banda, els materials que conformen el transductor poden oxidar-se (química o electroquímicament), donant lloc a grups funcionals que reaccionen amb facilitat amb substàncies procedents de la solució. A aquest fet, hem d'afegir la possible contaminació que es produeix en la construcció i utilització de l'elèctrode i que, per tant, contribueixen a augmentar les dificultats d'obtenir bones i reproduïbles propietats electroquímiques.

Si tenim en compte que les nostres mesures es basen en la reacció electroquímica produïda en la interfície establerta entre la solució de treball i l'elèctrode, es fàcil entendre la importància de tenir una superfície amb unes propietats electroactives reproduïbles.

Per aquest motiu s'han desenvolupat una sèrie de procediments, coneguts com activació de la superfície de l'elèctrode, per aconseguir aquesta reproductibilitat en les mesures electroquímiques. Els processos principalment emprats en el present treball han estat:

- (a) el tractament electroquímic mitjançant voltamperometries cícliques^{5,6} (efectuades en l'Autolab), amb un ciclat de potencial entre -0.25 V i 1.6 V (Ag/AgCl) en tampó de fosfats i $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 2.4 mM.
- (b) sotmetre el transductor a un potencial fix durant un cert temps, procés que s'efectua directament amb el potenciostat, el mateix instrument utilitzat en les mesures posteriors.

En ambdós casos hem emprat un elèctrode Ag/AgCl de referència i un de platí com auxiliar.

En la figura 3.2 s'il·lustra l'efecte de l'activació sobre el transductor quan es realitza la voltamperometria cíclica. Veiem que la cinètica de transferència electrònica s'incrementa de forma considerable. Aquest fet es podria explicar tenint en compte l'augment dels grups funcionals en la superfície de l'elèctrode que poden actuar com a mediadors en la transferència electrònica i a l'increment de la rugositat superficial (augmentant l'àrea efectiva).

Una altra hipòtesi per explicar aquest fet es basaria en el sistema de fabricació dels transductors. Per facilitar el pas de la pasta a través de la malla s'afegeix ciclohexanona que incrementa notablement la fluïdesa del material a imprimir. Donada la diferència de densitats entre el polímer i el grafit, aquest darrer es diposita en els nivells inferiors, i alhora la superfície s'enriqueix en polímer. Quan s'aplica un potencial de 1.6 V s'augmenta la porositat de la superfície, ja que es creen petites fissures que fan de canal de comunicació entre les diferents capes. Així doncs, s'aconsegueix un augment de la conductivitat, perquè les capes internes altament conductores es posen en contacte amb la solució externa.

El mateix efecte es produeix si en lloc d'activar-se electroquímicament hom fes un polímer mecànic. D'aquesta forma disminueix la capa externa enriquida amb el polímer, i per tant la capa més conductora queda al descobert.

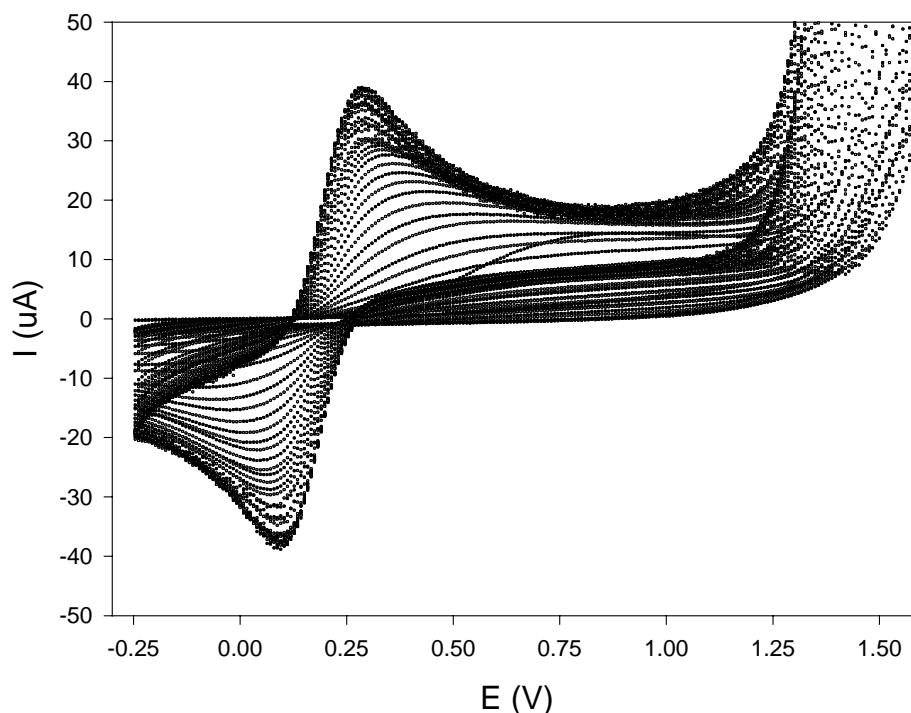


Figura 3.2 50 voltamperogrames consecutius entre -0.25 i 1.6 V per a l'activació d'un transductor en una solució tamponada amb fosfat 0.1 M, KCl 0.1 M i $\text{pH}=7.0$ amb $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

Podem veure com el pic d'oxidació i el de reducció s'apropen (el sistema és més reversible) i augmenta la conductivitat (I_{pa} i I_{pc} creixen) a mesura que s'incrementa el nombre d'escombrats.

3.5 EFECTE DEL CONTINGUT DE GRAFIT EN L'ACTIVACIÓ I RESPOSTA DEL TRANSDUCTOR

El contingut de grafit dins la pasta ens donarà el grau de conductivitat dins d'aquesta (veure figura 3.3). Una major proporció de grafit ens donarà una conductivitat major, però alhora dificultarà la impressió i posterior curació del polímer. Per tant calia trobar la proporció òptima per obtenir la màxima conductivitat i conservar així, les propietats adients de la pasta (adhesió i entorn adequat pel material biològic).

Es varen provar les següents composicions de grafit: 10, 15, 20, 25, 30, 32, 32.5 i 37%. Les seves propietats electroquímiques van ser estudiades mitjançant voltamperometries cícliques, i els resultats obtinguts es comenten en els següents epígrafs.

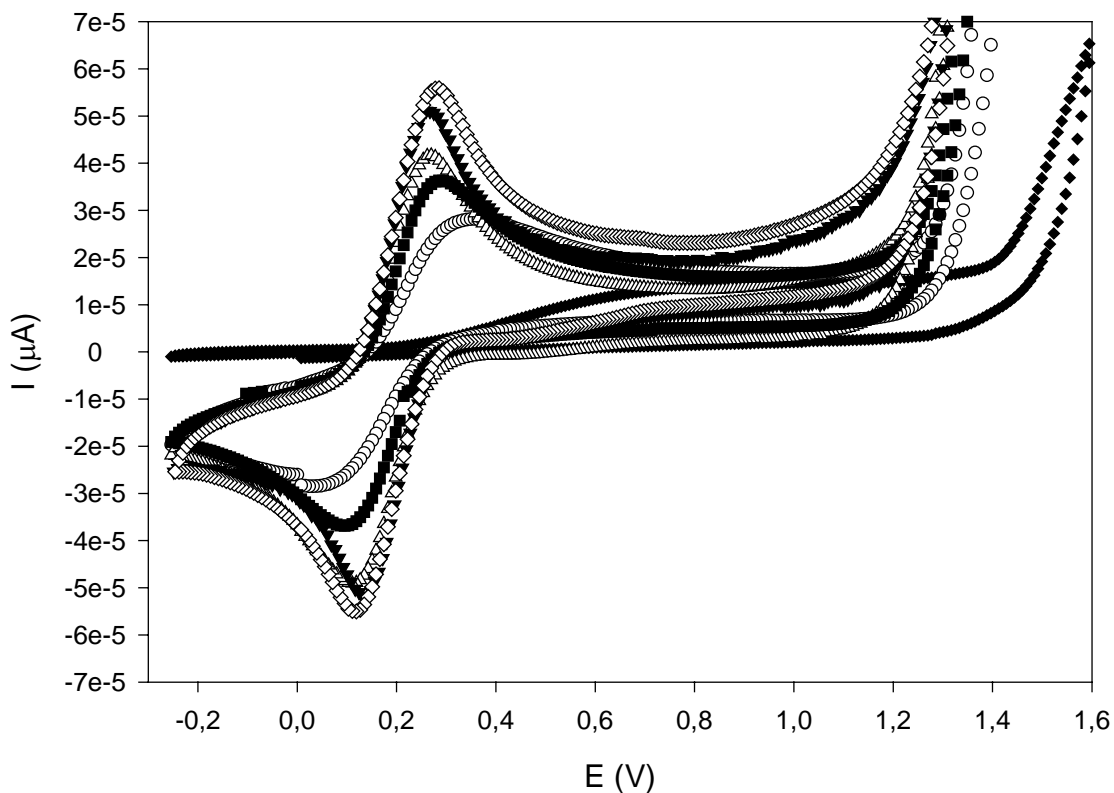


Figura 3.3 Voltamperometries cícliques de diferents transductors en una solució tamponada amb fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0, $v = 50$ mV/s amb els següents continguts de grafit:

10% no presenta pic 5% \blacklozenge 20% \circ 25% \blacksquare 30% \triangle 32% \blacktriangledown 37% (

3.5.1 Variació dels potencials de pic d'oxidació i reducció en funció del contingut de grafit en el transductor

3.5.1.1 Activació per ciclat de potencial

S'avaluà el potencial de pic en el que s'oxidava la espècie electroactiva $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ a mesura que augmentàvem el contingut de grafit en l'elèctrode. Com es pot observar en la figura 3.4, l'augment del material conductor es tradueix en una disminució del potencial necessari per oxidar l'espècie, fet que permetrà una major selectivitat en la detecció de l'anàlit, ja que totes aquelles espècies que s'oxidin, en les noves condicions, a un potencial major no interferiran en el senyal.

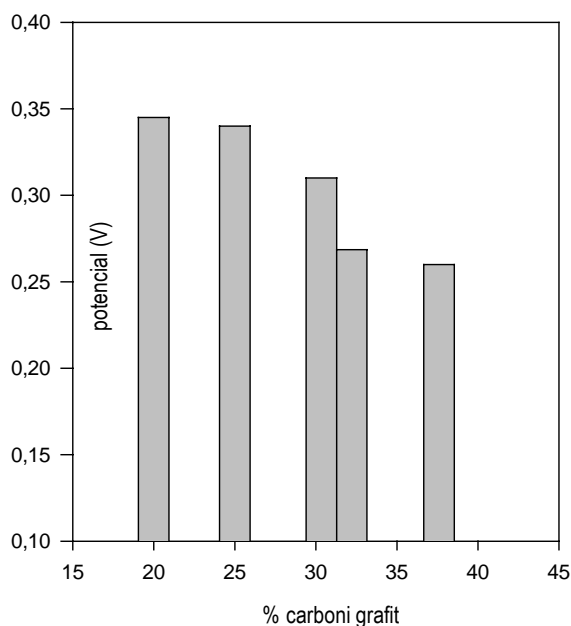


Figura 3.4 Variació del potencial de pic d'oxidació del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (en una concentració 2.4 mM en tampó fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0) en funció del % de grafit en el transductor. Varen caldre 40 cicles per activar els transductors i una velocitat de $v = 50 \text{ mV/s}$.

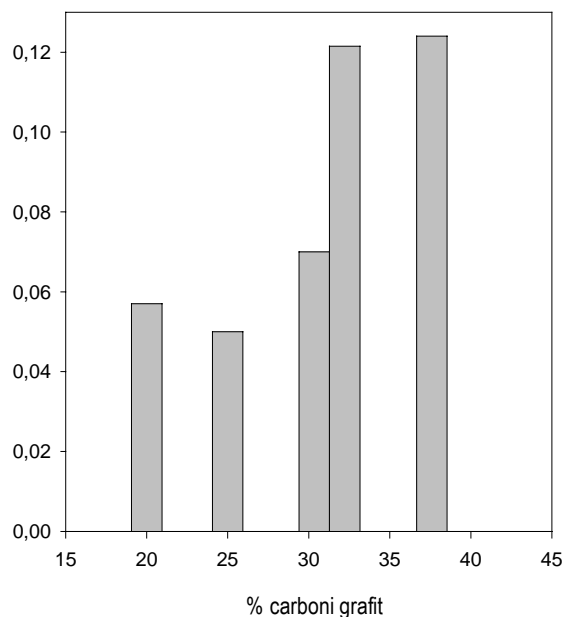
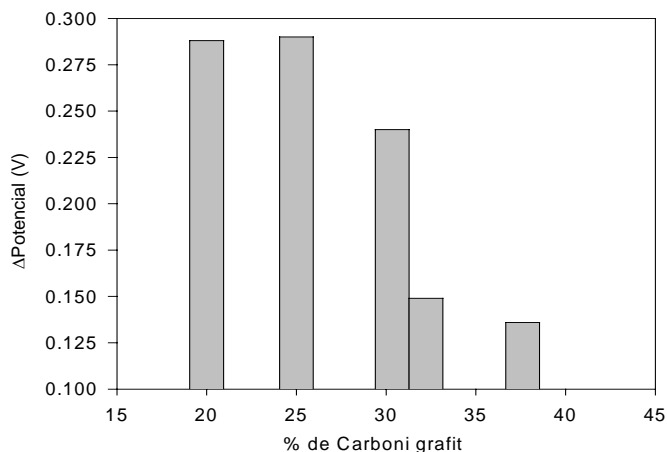


Figura 3.5 Variació del potencial de pic de reducció del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (en una concentració 2.4 mM en tampó fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0) en funció del % de grafit en el transductor (40 cicles i velocitat de $v = 50 \text{ mV/s}$).

De forma anàloga s'ha estudiat la variació del potencial de pic de reducció (figura 3.5), observant-se com es trasllada cap a potencials més positius, fent que la diferència entre ambdós potencials (oxidació i reducció) es redueixi i per tant augmenti la reversibilitat del sistema. Aquest fenomen s'aprecia de forma més clara si representem directament la diferència en front del contingut de grafit (figura 3.6).

Figura 3.6 Variació de la diferència de potencials de pic d'oxidació i reducció del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (en una concentració 2.4 mM en tampó fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0) en funció del % de grafit en el transductor. Varen caldre 40 cicles per activar els transductors i una freqüència de $v = 50 \text{ mV/s}$.



3.5.1.2 Activació potencioestàtica

Els mateixos estudis s'han realitzat activant prèviament el transductor a un potencial fix en un potencioestat.

El fet d'haver d'activar els elèctrodes (§3.4) amb un ciclat de potencial a l'Autolab, suposa una etapa més en el procés i una despesa de temps, i per tant una complicació a l'hora d'idear una futura fabricació massiva de sensors. El procés es simplificaria si l'activació es produís en la mateix cel·la de mesura, aplicant un potencial durant uns minuts i procedint a la determinació analítica acte seguit. Basat en proves prèvies, s'escollí un potencial de 1.6 V. Potencials inferiors no activaven suficientment el transductor, i superiors feien esquerdes en el material, deixant la pista de coure al descobert. El temps emprat fou de 12 minuts.

Els resultats obtinguts ens demostren que efectivament no hi ha pràcticament diferència entre ambdós mètodes. En les figures 3.7, 3.8 i 3.9, observem la variació dels pics de potencial d'oxidació, de reducció i la diferència entre ambdós per una activació a potencial fix respectivament. Veiem doncs que l'ús de la tècnica de la voltamperometria cíclica ens és útil per controlar i caracteritzar en l'etapa prèvia de la investigació cada un dels transductors desenvolupats, però que per activar els elèctrodes no és imprescindible, ja que es pot fer de forma més simple amb una unitat amperomètrica corrent.

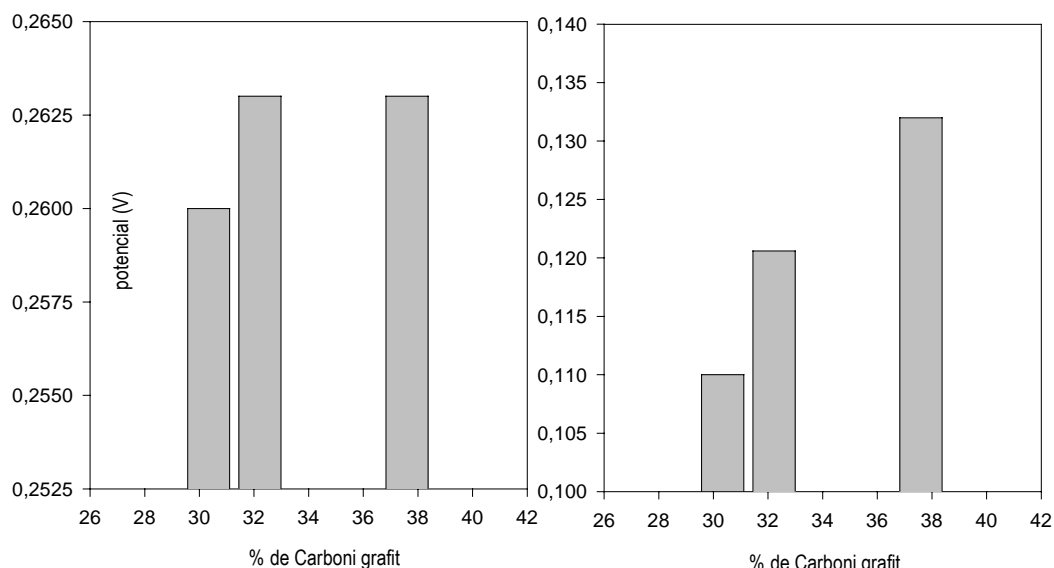
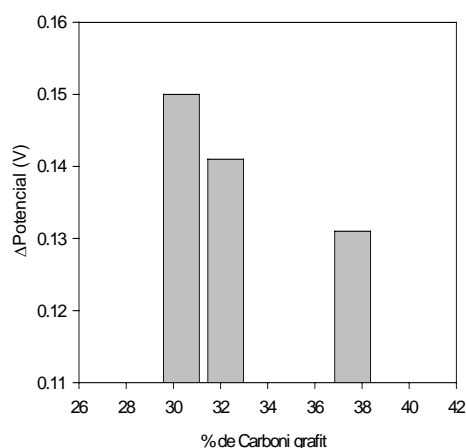


Figura 3.7 Variació del potencials de pic d'oxidació del Fe (CN)₆⁴⁻ (en una concentració 2.4 mM en tampó fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0) en funció del % de grafit en el transductor amb activació prèvia a un potencial fix de 1.6V. temps d'activació dels transductors: 12 minuts.

Figura 3.8 Variació del potencial de pic de reducció del Fe (CN)₆⁴⁻ (en una concentració 2.4 mM en tampó fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0) en funció del % de grafit en el transductor amb activació prèvia a un potencial fix de 1.6 V. Temps d'activació dels transductors: 12 minuts

Figura 3.9 Variació de la diferència de potencial de pics d'oxidació i reducció del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (en una concentració 2.4 mM en tampó fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0) en funció del % de grafit en el transductor amb activació prèvia a un potencial fix de 1.6 V. Temps d'activació dels transductors: 12 minuts.



La figura 3.10 ens mostra de forma ampliada el que ja havíem observat en la figura 3.3; l'augment del corrent al incrementar el contingut de grafit.

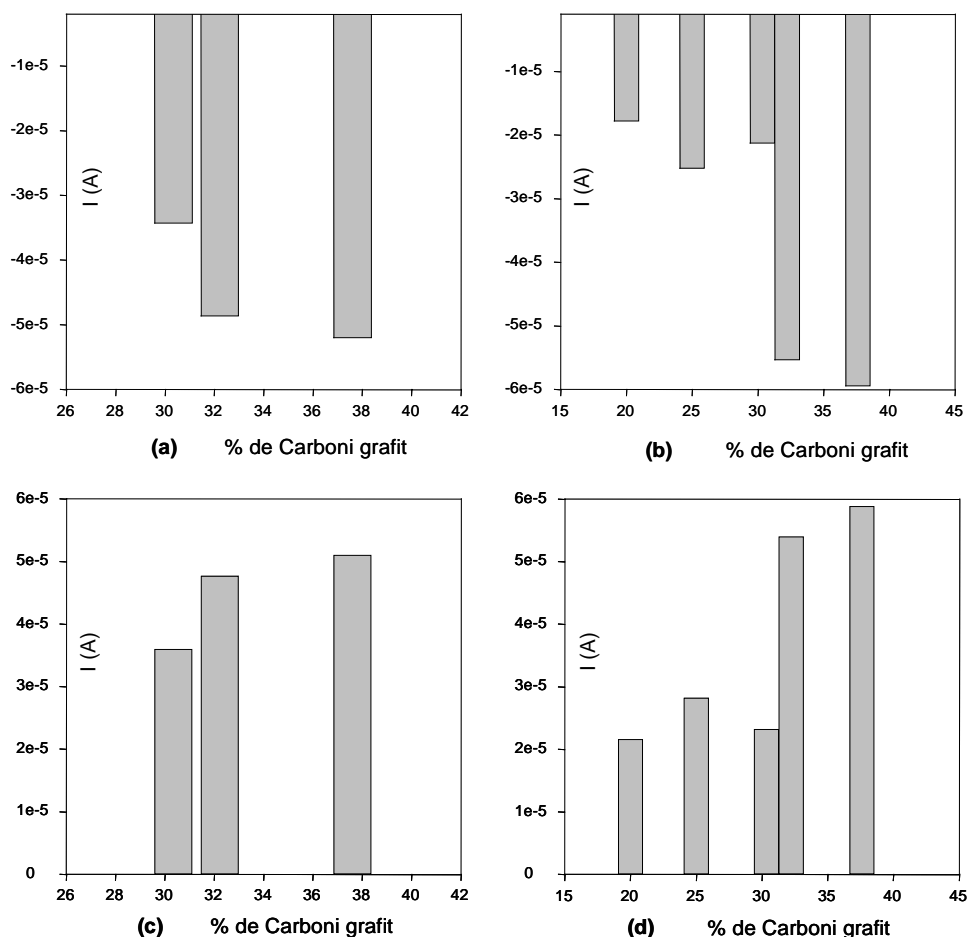


Figura 3.10 Evolució de les intensitats de pic d'oxidació i reducció del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ en funció del contingut de grafit en els transductors. Els voltamperogrames cíclics s'han realitzat en tampó fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0, en una concentració 2.4 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Varen caldre 40 cicles per activar els transductors i una velocitat de $v = 50 \text{ mV/s}$. (a) intensitat pic catòdic amb activació a un potencial constant de $E = 1.6 \text{ V}$ ($t = 12 \text{ min}$). (b) intensitat pic catòdic amb activació mitjançant voltamperometria cíclica. (c) intensitat pic anòdic amb activació a un potencial constant de $E = 1.6 \text{ V}$ ($t = 12 \text{ min}$). (d) intensitat pic anòdic amb activació mitjançant voltamperometria cíclica.

En la taula 3.1 es resumeixen els resultats obtinguts a través de les voltamperometries cícliques, emprant com a elèctrode de treball el transductor desenvolupat.

Taula 3.1 Resultats experimentals dels voltamperogrames realitzats sobre els transductors desenvolupats. Varen caldre 40 cicles per activar els transductors i una velocitat de $v = 50$ mV/s, per l'activació mitjançant ciclat voltamperomètric. L'activació a potencial fix a 1.6 V es realitzà durant 12 min. Cada valor representa la mitjana de 30 transductors. Els valors obtinguts a partir dels transductors mostren desviacions màximes (DER, $n=30$) del 5% en composicions baixes de grafit i 1.5% per continguts de grafit superiors al 30%.

Contingut grafit	Activació voltamperometria cíclica (40 cicles, $v = 50$ mV/s)					Activació a potencial fix (1.6 V, 12 min)				
	E_{pa}	E_{pc}	ΔE_{pa-pc}	I_{pa}	I_{pc}	E_{pa}	E_{pc}	ΔE_{pa-pc}	I_{pa}	I_{pc}
%	V			μA		V			μA	
20	0.345	0.057	0.288	21.6	-17.8					
25	0.340	0.05	0.29	28.2	-25.2					
30.3	0.31	0.07	0.24	23.2	-21.3	0.26	0.11	0.15	36	-34.3
32.0	0.277	0.119	0.162	54	-56	0.263	0.115	0.148	47.7	-48.7
32.5 (E)	0.300	0.093	0.207	18.6	-17.8	0.275	0.116	0.159	23.2	-25.4
32.5	0.26	0.124	0.136	53	-55.3	0.264	0.132	0.128	48.5	-48
37.6	0.26	0.124	0.136	58.85	-59.4	0.263	0.132	0.131	51	-52

32.5 (E): biocompòsit (pasta de grafit-Epo-Tek amb enzim)

Aquells transductors preparats amb continguts en grafit del 37%, resultaven molt porosos, i sovint el coure de la pista sobre el que imprimim la pasta grafit-Epo-Tek, restava al descobert. En fer les voltamperometries cícliques apareixia un segon pic d'oxidació i el corresponent de reducció, ambdós d'intensitats menors a l'associat a l'espècie $K_4[Fe(CN)_6]$, que podrien estar relacionat amb una falta d'homogenització de la pasta.

Aquest segon pic, tot i que d'origen incert, podria originar-se degut a que en incrementar el contingut de grafit de la pasta estem facilitant que puguin quedar zones amb una concentració major de grafit. D'aquesta forma l'elèctrode es comporta com si en tinguéssim dos, amb composicions diferents i per tant amb comportament electroquímics diversos. Podria ser doncs que part de l'espècie electroactiva s'oxidés a un potencial en una zona de l'elèctrode i

a un altre potencial en una altra zona, observant-se la duplicitat de l'esmentat pic. De totes formes això no ha estat contrastat amb altres autors, i per tant l'explicació podria ser diferent.

Inicialment es va pensar que era degut a algun tipus d'impuresa, però es va canviar la solució de treball i es van netejar els elèctrodes i el pic va romandre intacte. De totes formes podria ser que el propi grafit s'hagués contaminat amb alguna espècie electroactiva.

Posteriorment es varen calibrar els 10 transductors d'aquesta composició i s'observà que els pendents de cada transductor variaven considerablement un de l'altre, fet que confirmava la hipòtesi inicial. L'estudi en profunditat d'aquest fenomen es postergà per futures experiències.

Una altra dada d'interès, en l'estudi de la reversibilitat és la relació entre la intensitat de pic anòdic i catòdic (I_{pa}/I_{pc}) en la taula 3.2. Tal com indicàvem en l'equació 3.1, com més propera a 1 sigui, més reversible resulta el sistema⁷.

Taula 3.2 Valors de la relació entre la intensitat de pic anòdic i catòdic (I_{pa}/I_{pc}), per activació a potencial fix i mitjançant voltamperometria cíclica, per transductors amb diferents composicions de grafit. Detalls experimentals en taula 3.1.

Contingut de grafit (en % de grafit)	I_{pa}/I_{pc} activat a potencial fix (1.6V)	I_{pa}/I_{pc} activat amb voltamperometria cíclica
20		1.20
25		1.10
30.3	1.05	1.08
32.0	0.98	0.96
32.5 (E)	0.91	1.04
32.5	1.01	0.96
37.6	0.98	0.99

Es comprova com no hi ha diferències significatives entre ambdós mètodes de treball, i fins i tot, en algunes composicions, els resultats semblen millorar lleugerament sota una activació a potencial fix.

3.5.2 Efecte del contingut de grafit sobre les corbes de calibració

Els transductors amperomètrics també es poden avaluar, mitjançant la tècnica de l'addició coneguda, es a dir, estudiant la variació del senyal electroquímico en funció de la variació en la concentració d'una espècie electroactiva, seguint la relació (tal i com s'havia vist en §3.1):

$$I = a + K C$$

L'espècie electroactiva escollida continua essent el $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ i es mesura la intensitat de corrent produïda en un cert rang de concentració. Les dades obtingudes ens permetran saber paràmetres que caracteritzaran l'elèctrode, tal com el pendent (sensibilitat), límit superior i inferior de resposta lineal, límit de detecció, dinàmica de resposta, reproductibilitat i temps de vida.

La tècnica de la voltamperometria cíclica ens ha permès conèixer el potencial de treball (aquell on el pic de intensitat de corrent era màxim) que en aquest cas l'hem pres a 300 mV (per continguts de grafit inferiors al 25% es troba a 340 mV, i superiors a 30% a 260 mV).

Les mesures es realitzen en una cel·la electrolítica que conté 15 ml d'una solució de tampó fosfat 0.1M i KCl 0.1M a pH=7.0 i on hi submergim tres elèctrodes: un elèctrode de referència de doble unió Ag/AgCl, un elèctrode auxiliar de fil de platí i com a elèctrode de treball s'utilitza el transductor grafit-Epo-Tek esmentat prèviament. Es connecten a un potenciostat que fixa el potencial de treball i dona la lectura del senyal. Les dades es recullen en un ordinador que disposa d'un programa creat específicament pel nostre sistema de treball i que realitza les tasques d'un registrador. S'agita amb l'ajut d'un imant teflonat sota l'acció d'un agitador magnètic que facilita el transport per convecció des del si de la solució cap a la superfície de l'elèctrode.

Per a dur a terme la determinació amperomètrica del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, s'aplica el corresponent potencial d'oxidació (0.3V) respecte un elèctrode de calomelans saturat, a una solució tamponada agitada que contingui alhora una concentració elevada d'electròlit suport per a fixar la força iònica del medi, afavorir la conductivitat i reduir la electromigració.

Un cop el senyal de fons és estable, es va addicionant el substrat mentre es fan les corresponents lectures d'intensitat de corrent amb el potenciostat. Les calibracions es realitzen a temperatura ambient, per transductors amb 20, 25, 30, 32 i 37 % de grafit.

En la taula 3.3 veiem com els diversos paràmetres (sensibilitat, rang lineal i coeficient de regressió) varien en funció del contingut de grafit. S'aprecia clarament com augmenta la sensibilitat amb el contingut de grafit mentre que l'interval lineal s'amplia lleugerament. La

figura 3.11, mostra de forma més visual els resultats, ja que representa les corbes de calibració de transductors amb un contingut de grafit de 20, 25, 30, 32 i 37 % respectivament.

Taula 3.3 Paràmetres de calibració de diferents transductors electroquímics amb diversos continguts de grafit mitjançant activació prèvia a 1.6V.

% de grafit	Pendent (sensibilitat) ($\mu\text{A/M}$)	Interval lineal (μM)	Coefficient de regressió
20	14818	10– 400	0.9994
25	18860	10– 500	0.9995
30	23624	5– 800	0.99990
32	26588	5– 800	0.9997
37	31411	5– 800	0.99990

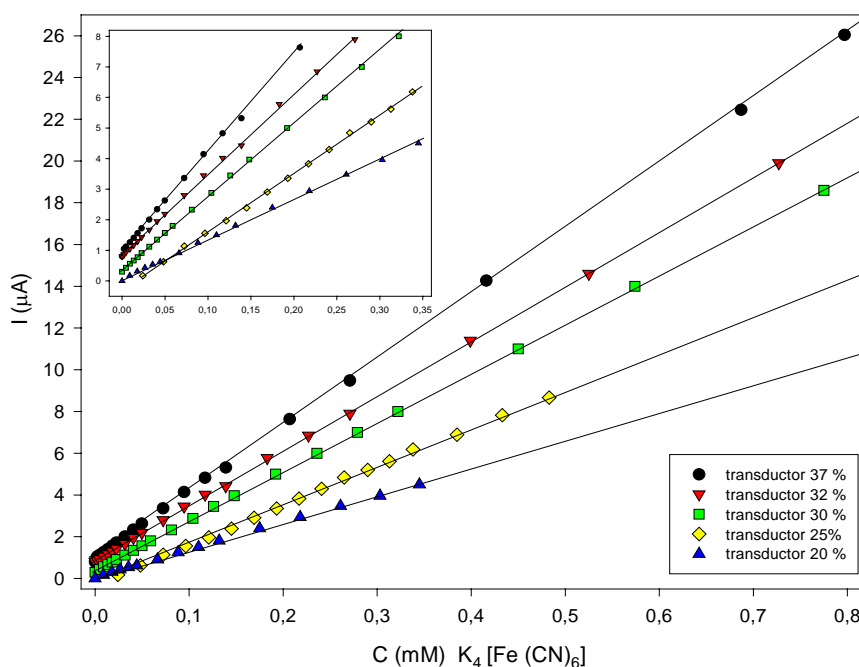


Figura 3.11 Calibrat amperomètric de cinc transductor amb composicions de grafit diferents (37, 32, 30, 25, i 20% respectivament), en una solució tamponada amb fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0). E= 300 mV.

3.6 CARACTERÍSTIQUES DE RESPOSTA DEL TRANSDUCTOR EN SOLUCIONS DE $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

Tenint en compte doncs aquests resultats, el transductor que ha proporcionat millors resultats, ha estat el que conté un 32 % de grafit, i per tant serà aquest en el que ens basarem i sobre el que realitzarem un estudi més intensiu per tal d'adreçar-nos cap al desenvolupament del biosensor. Tot i que els transductors amb un 37% ofereixen una sensibilitat major, l'error absolut augmenta considerablement; d'una DER del 4.5% (§ 3.6.4) per a 32% de grafit es passa a una DER del 12% per transductors amb un 37% de grafit, (a banda dels inconvenients prèviament esmentats).

3.6.1 Potencial òptim de treball

Com hem mostrat anteriorment (taula 3.1), el potencial òptim de treball, determinat mitjançant la tècnica de la voltamperometria cíclica, es situa al voltant del 0.30 V pel $K_4[Fe(CN)_6]$, en el cas de transductors amb un contingut de grafit superior al 32 %.

Si realitzem l'estudi amb una voltamperometria lineal, observem el típic replà o *plateau* que correspon a la corrent límit de difusió. Aquest potencial és equivalent a l'obtingut en estudis previs amb materials i configuracions anàlogues⁸⁻¹¹.

La millor opció hagués estat determinar i avaluar directament la resposta de transductor en front la tiocolina, espècie electroactiva producte de la hidròlisi del clorur de butiriltiocolina (BtChCl), sobre la que haurà d'actuar, la part transductora del biosensor que es desenvoluparà posteriorment (vegeu capítol 4), però presentava moltes dificultats aconseguir-ne, donat que aquesta espècie, no es ven comercialment. Una altra opció era, òbviament, afegir BtChCl en presència d'enzim lliure en la solució, tot i que es va considerar que els estudis corresponents s'emmarcaven dins l'estudi del biosensor i no pas del propi transductor.

3.6.2 Temps de resposta

El temps necessari pel transductor per aconseguir el 95% de la resposta total fou de 10 segons quan la concentració de $K_4[Fe(CN)_6]$ s'incrementà de 0 a 1×10^{-4} M (figura 3.12).

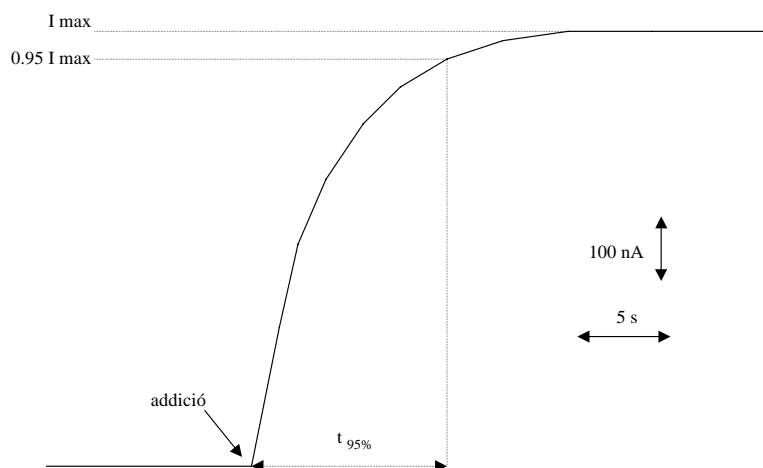


Figura 3.12 Temps de resposta per un transductor de grafit i resina epoxy (32%) en augmentar la concentració de $K_4[Fe(CN)_6]$ de 0 a 1×10^{-4} M en una solució tamponada amb fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0). E= 300 mV. Transductor prèviament activat a 1.6 V.

3.6.3 Paràmetres de calibració

La dinàmica de resposta al canvi d'una concentració coneguda de substrat en una solució tamponada es va estudiar mitjançant les corbes de calibració obtingudes per la tècnica de les addicions conegudes. El potenciostat registra aquest canvi de corrent al variar la concentració de substrat.

Els límits superior e inferior de resposta lineal van ser determinats gràficament a partir de les corbes de calibració (figura 3.13 i 3.14). Aquests corresponen a 5×10^{-6} i 8×10^{-4} M de $K_4[Fe(CN)_6]$ respectivament, i amb un pendent de $24.0 \pm 1.3 \mu A/mM$ ($r^2 > 0.999$) per a transductors amb un 32% de grafit.

Així mateix, es va determinar el límit de detecció. El mínim senyal analític distingible S_m es pren com la suma del senyal mitjà del blanc més un múltiple k de la desviació estàndard d'aquest.

$$S_m = \bar{S}_{bl} + k s_{bl}$$

Experimentalment pot determinar-se S_m realitzant 20 o 30 mesures del blanc, preferiblement en un període de temps extens. Seguidament es tracten les dades per obtenir \bar{S}_{bl} i s_{bl} .

La resposta del nostre sistema segueix l'equació

$$S = mc + S_{bl}$$

on S és el senyal mesurat, c la concentració de l'analít, S_{bl} el senyal instrumental per el blanc i m és el pendent de la línia recta.

Si substituïm S_m en aquesta equació, obtenim c_m que és per definició el límit de detecció:

$$c_m = (S_m - \bar{S}_{bl}) / m$$

El límit de detecció trobat per $k = 3$ és de 2×10^{-6} M.

La linealitat en les zones altes de concentracions ve limitada per la geometria del transductor. En les zones baixes ve limitada pel corrent residual.

3.6.4 Reproductibilitat

La reproductibilitat és sempre un factor important en el desenvolupament d'elèctrodes, però quan parlem de biosensors d'un sol ús esdevé un punt realment clau, encara més si aquests biosensors s'empren en l'anàlisi de pesticides, com en el present cas, ja que, com es veurà

més endavant, es requerirà un biosensor diferent per a cada punt de la recta de calibrat, donat el caràcter irreversible de la inhibició enzimàtica per part dels pesticides.

3.6.4.1 Per a diferents transductors

La reproductibilitat va ser avaluada electroquímicament mitjançant corbes de calibració per a diferents transductors. Es va determinar a partir de la desviació estàndard relativa de la pendent de les rectes de calibració. Els resultats obtinguts (taula 3.4 i 3.5) mostren una reproductibilitat en la sensibilitat del 4 % per transductors amb un 20 % de grafit (figura 3.13) i d'un 4.5 % per aquells transductors amb un 32 % de grafit (figura 3.14). Són comparables, i fins i tot en alguns casos millors, als publicats en la bibliografia per a dispositius fabricats mitjançant tècniques serigràfiques¹²⁻¹⁹.

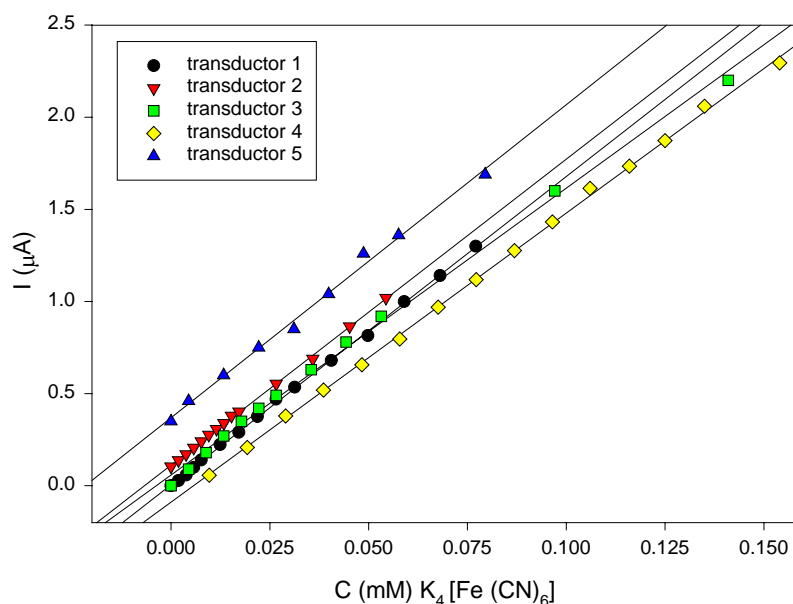


Figura 3.13 Corbes de calibració per cinc transductors grafit-Epo-Tek (20%), procedents de diverses impressions, en una solució tamponada amb fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.0. E= 300 mV. Preactivació a potencial fix (1.6 V) durant 12 minuts.

Els resultats experimentals corresponents als paràmetres característics tal com sensibilitat, ordenada a l'origen, coeficient de regressió i desviació estàndard associada, es mostren en la taula 3.4.

Taula 3.4 Resultats experimentals de la calibració de 5 transductors de diferents lots amb un 20 % de grafit (detalls experimentals com els de la figura 3.13).

Transductor	Pendent ($\mu\text{A}/\text{M}$)	Ordenada a l'origen	Coefficient de regressió
1	15688	0.0047	0.9995
2	16608	0.1121	0.9992
3	16739	0.058	0.9994
4	16992	-0.089	0.995
5	15569	0.3686	0.998
Mitjana	$16300 \pm 6 \times 10^2$	0.1 ± 0.1	
DER	4 %		

Si ho comparem amb la figura 3.14 no observem diferències importants en la reproductibilitat, i per tant l'augment de grafit afecta a la sensibilitat i no té efectes negatius sobre la homogeneïtat de la pasta.

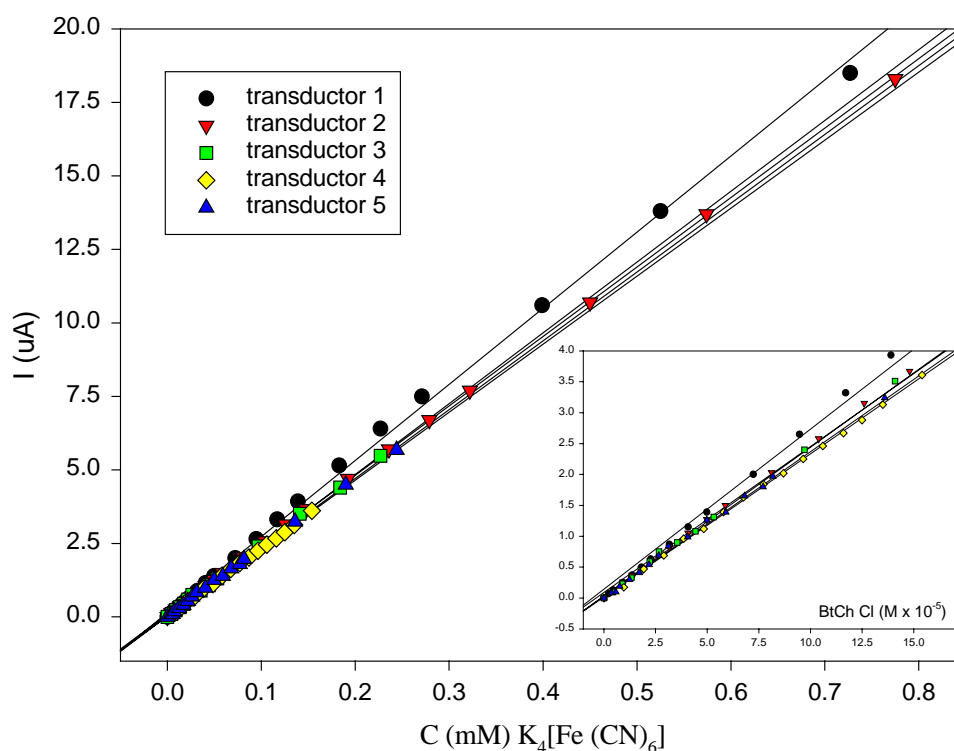


Figura 3.14 Corbes de calibració per a cinc transductors grafit-Epo-Tek (32%), procedents de diverses impressions, en una solució tamponada amb fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i $\text{pH}=7.0$. $E_{\text{aplicat}}=300$ mV. Preactivació a potencial fix (1.6 V) durant 12 minuts.

Taula 3.5 Resultats experimentals de la calibració de 5 transductors de diferents lots amb un 32 % de grafit (detalls experimentals com els de la figura 3.14).

Transductor	Pendent ($\mu\text{A/M}$)	Ordenada a l'origen	Coefficient de regressió
1	25892	0.1440	0.9990
2	23624	0.0890	0.9999
3	24078	0.0323	0.9994
4	23139	0.0194	0.9990
5	23403	0.0290	0.9994
Mitjana	$24000 \pm 1.3 \times 10^3$	0.06 ± 0.06	
DER	4.5 %		

3.6.4.2 Per un mateix transductor

Tot i que en principi aquests transductors es van pensar per desenvolupar biosensors de pesticides d'un sol ús, es va voler avaluar la resposta d'un transductor en una sèrie de calibrats successius.

La precisió és del mateix ordre que en el cas de calibrar diversos transductors (DER: 4%). Podem dir doncs, que els nostres elèctrodes, en les presents condicions experimentals, no semblen patir cap tipus d'absorció inespecífica sobre la superfície, que podrien fer disminuir el senyal mesurat.

Per augmentar l'homogeneïtat de la pasta, es troben reportats en la bibliografia alguns mètodes especials per preparar les pastes d' impressió²⁰, tal com els ultrasons, però no són aplicables en el present treball ja que la resina emprada és termocurable i mitjançant aquests procediments es genera calor.

3.6.5 Temps de vida

L'ús continuat de l'elèctrode en intervals de temps importants (>4 setmanes) provoca una disminució de la seva sensibilitat, que es pot recuperar si l'activem de nou, seguint el mateix procés electroquímico inicial. D'aquesta forma obtenim pendents equivalents, però el soroll de fons augmenta considerablement, fet que impossibilita usos continuats. Això no es contradiu amb la filosofia pensada per aquests sensors: elèctrodes d'un sol ús.

De totes formes, si un transductor no s'activa i es guarda en sec i a temperatura ambient, preserva les seves característiques de resposta més d'un any.

3.7 CONCLUSIONS

1- S'ha procedit a la optimització d'un transductor amperomètric de capes gruixudes constituït per una base de fibra de vidre on es graven les pistes de coure i sobre les que es diposita la pasta de grafit-Epo-Tek i l'encapsulant fotocurable Ebecryl 600. De les diferents formulacions de pastes grafit-Epo-Tek provades, es va trobar que la proporció òptima de grafit era de 32 %. Continguts superiors semblaven presentar problemes d'homogeneïtat en el material compòsit resultant i s'observaven senyals difícilment associables a les espècies presents en la solució de treball. Continguts inferiors presentaven comportaments electroquímics propers, encara que la sensibilitat era menor, i per tant no es varen deixar de banda en els posteriors estudis que es realitzaren per al desenvolupament dels biosensors.

2- S'ha observat que, posteriorment al procés de construcció, es necessari fer una activació de la superfície dels elèctrodes, ja que en cas contrari, presenta una transferència electrònica lenta i una baixa sensibilitat. Els processos d'activació seguits han estat dos: el polit mecànic i el tractament electroquímic, i dins aquest darrer es provaren dues metodologies: l'activació mitjançant voltamperometries cícliques, i l'activació a un potencial fix de 1.6 V. Aquesta darrera ha estat escollida per la seva simplicitat.

3- Quan s'estudien les corbes de calibració per diferents transductors, s'observa una bona reproductibilitat (4.5 %) i per tant una bona homogenització de la pasta, tot i haver-se preparat manualment i el mètode d'impressió ser semiautomàtic

4- Les condicions de treball determinades per a addicions de $K_4[Fe(CN)_6]$ corresponen a un potencial de 300 mV i pH 7.0. L'interval de resposta lineal trobat és de 5×10^{-6} a 8×10^{-4} M, el temps de resposta de 10 segons, una sensibilitat de 24 ± 1.3 ($\mu A/mM$) (sempre per transductors amb un 32 % de grafit) i una bona reproductibilitat de fabricació entre dispositius procedents del mateix lot i fins i tot de lots diferents.

5- El temps de vida del transductor si es guarda en sec i a temperatura ambient, és superior a un any.

Bibliografia

- ¹ A. W. Bott. *Current separations* 14 (1996) 104
- ² M. Alvarez-Icaza, U. Bilitewski, *Anal. Chem.* 65 (1993) 525 A
- ³ J. Albery. *Electrode Kinetics*. Oxford university Press, Oxford 1975
- ⁴ K. Stulik, *Electroanalysis* 4 (1992) 829
- ⁵ M. Lambrechts, W. Sansen, *Biosensors: microelectrochemical devices*, Institute of physics publishing, Nova York, 1992
- ⁶ J. Wang, M. Pedrero, J. M. Pingarrón, H. Sakslund, O. Hammerich, *Analyst* 121 (1996) 345
- ⁷ J. Wang, *Analytical electrochemistry* VCH, Nova York, 1994
- ⁸ C. A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret, *Sensors Actuators B* 45 (1997) 55
- ⁹ C. A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret, *Sensors Actuators B* 52 (1998) 257
- ¹⁰ M. Santandreu, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2080
- ¹¹ M. Santandreu, S. Solé, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Biosens. Bioelectr.* 13 (1998) 7
- ¹² M. Del Carlo, I. Lioni, M. Taccini, A. Cagnini, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* 342 (1997) 189
- ¹³ J. Wang, Q. Chen, M. Pedrero, J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* 300 (1995) 111
- ¹⁴ J. Wang, *Electroanalysis* 7 (1995) 11
- ¹⁵ J. Wang, V. B. Nascimento, S. A. Kane, K. Rogers, M. R. Smyth, L. Angnes, *Talanta* 43 (1996) 1903
- ¹⁶ N. Hampp, *Sensors Actuators A*, 31 (1992) 144
- ¹⁷ U. Bilitewski, *Sensors Actuators B*, 4 (1991) 267
- ¹⁸ G. F. Khan, *Electroanalysis* 9 (1997) 4
- ¹⁹ J. Kulys, E. J. D'Costa, *Biosens. Bioelectr.* 6 (1991) 109
- ²⁰ M. Prudenziati (ed.), *Thick film sensors*. Elsevier, Amsterdam, 1994.

CAPÍTOL 4

Caracterització electroquímica d'un biosensor planar de colinesterases construït en diferents configuracions

Una vegada ha estat construït (capítol 2) i avaluat (capítol 3) el transductor planar de grafit epoxi, en aquest capítol es detalla la caracterització d'aquest transductor modificat amb colinesterases i desenvolupat amb tres configuracions diferents (construcció descrita en § 2.2.3), com a pas previ a la seva aplicació en l'anàlisi de pesticides.

4.1 INTRODUCCIÓ

En la darrera dècada, les anàlisis mitjançant biosensors enzimàtics han començat a ser habituals en els laboratoris de control de qualitat especialment dels aliments. Aquests tipus de biosensors integren enzims i elements instrumentals necessaris per a l'anàlisi concreta, simplificant el mètode analític i, per tant, reduint els costos de cada assaig. A més, la miniaturització dels sensors redueix la quantitat d'enzim i de reactius.

D'aquesta forma, les anàlisis emprant biosensors permeten processar un gran nombre de mostres de forma ràpida i fiable. A més a més, aquests dispositius permeten comprovar la qualitat dels productes fora de l'entorn del laboratori i, fins i tot, per la seva simplicitat de manipulació, permeten al públic en general d'efectuar-ho.

La tecnologia de capes gruixudes (*thick film*) permet la possibilitat de miniaturitzar i fabricar en sèrie els elèctrodes, i així disminuir els seus costos de fabricació. En els darrers anys, s'han desenvolupat biosensors basats en aquesta tecnologia, la majoria dels quals s'han dissenyat per aplicacions mèdiques.

En el present treball s'ha desenvolupat un biosensor per l'anàlisi de pesticides mitjançant aquesta tecnologia.

Els pesticides poden ser introduïts en la cadena alimentària de diverses formes. L'ús d'insecticides i fungicides sobre les collites, produeix sovint residus per sobre del nivell legal de tolerància. El fet de que tant els pesticides com llurs metabòlits persisteixin durant llargs períodes de temps en el medi ambient, obliga un control estricte sobre aquells aliments sotmesos a la seva acció.

Per a la detecció amperomètrica de pesticides poden emprar-se dos sistemes bàsics, segons si s'utilitza un o dos enzims. En el sistema de dos enzims, acetilcolinesterasa (AChE) o butirilcolinesterasa (BChE) i colina oxidasa (ChOD), el transductor intern pot ser un sensor d'oxigen o un de peròxid d'hidrogen. Les reaccions que intervenen són les següents:

ChE

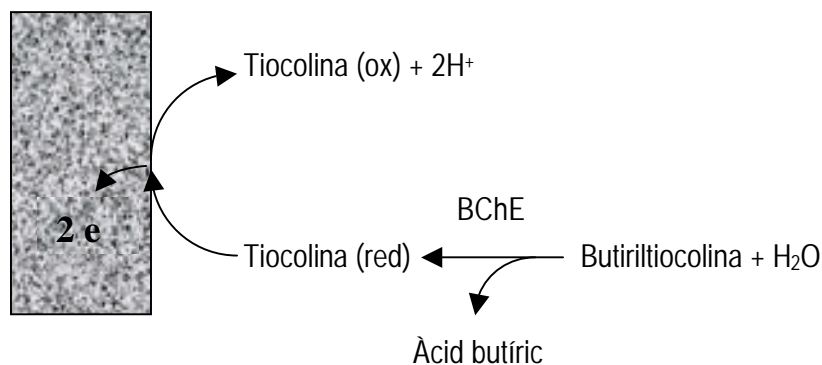
Ésters de la colina \rightarrow Colina + àcid carboxílic

ChOD

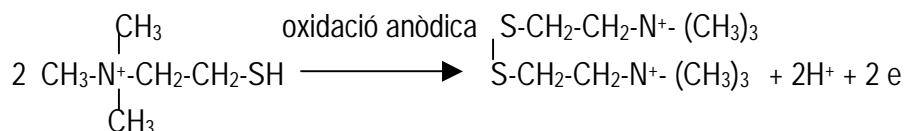
Colina + O₂ + 2 H₂O \rightarrow Betaïna + 2 H₂O₂

Quan només s'utilitza un enzim, el substrat original de l'enzim ha de ser canviat per tal de que un dels productes de la reacció sigui electroactiu. En l'estratègia d'un sol enzim, s'ha utilitzat l'acetiltiocolina (ATCh) i la butiriltiocolina (BTCh) com a substituïts del substrat original dels enzims AChE i BChE. Aquests enzims són molt específics per als ésters de la tiocolina i els hidrolitzen en la mateixa proporció en què ho fan amb el substrat original.

A continuació es mostren les reaccions que tenen lloc a la superfície d'un biosensor de butirilcolinesterasa.



L'oxidació a la superfície de l'elèctrode de la tiocolina, producte de l'activitat enzimàtica, dona un compost disulfur d'acord amb la següent reacció:



La inhibició de les colinesterases pels pesticides organofosforats i carbamats és irreversible. Aquest fet condiciona els biosensors basats en aquest enzims, ja que força a disposar d'una superfície nova per a cada mesura i per cada punt del calibrat. Per solucionar aquest problema, el nostre grup va proposar, en investigacions anteriors, elèctrodes de superfície renovable basats en biocompòsits conductors^{1,9,15} amb els que tan sols amb un polít s'obtenia un biosensor amb la capa sensible renovada.

4.2 BIOSENSORS PLANARS DE CHE

Els biosensors amb tecnologia planar es basen en la idea d'un sol ús, i utilitzen un biosensor nou per a cada mesura. En aquest capítol es descriu la construcció de biosensors amperomètrics planars d'AChE i de BChE, fabricats de forma seriada mitjançant una tècnica serigràfica, per tal de poder disposar biosensors multirepetits per a l'anàlisi de pesticides. El disseny d'aquests biosensors *screen-printing* es basà en tres configuracions diferents:

Manual, basada en la impressió serigràfica del transductor i posterior deposició enzimàtica sobre la superfície transductora de grafit de forma manual.

Múltiple capa, impressió serigràfica tant del transductor com de la capa biològica en dues etapes diferenciades.

Biocompòsit, impressió serigràfica del transductor i el material biològic en un sol pas, continguts en una única capa que conté grafit i enzim (monocapa).

La construcció dels dispositius es troba detallada en §§ 2.2.3.1, 2.2.3.2. i 2.2.3.3.

4.3 EXPERIMENTAL

4.3.1 Aparells i reactius

L'aparell de mesura utilitzat és un detector amperomètric LC-4C (BAS), connectat a un Ordinador 386 incorporat amb un programa per a la obtenció i representació gràfica de les

dades. Es va emprar un elèctrode de referència de doble unió Ag/AgCl (Orion 900200), un elèctrode auxiliar de platí (Ingold) i com elèctrode de treball el biosensor desenvolupat. La solució de referència interna de l'elèctrode de referència de doble unió és subministrada per la mateixa firma i permet d'obtenir un potencial constant corresponent al de l'elèctrode de calomelans. La solució externa és de KCl 0.1 M.

Solucions stock de clorur de *S*-butiriltiocolina (Sigma) i clorur de *S*-acetiltiocolina (Sigma), es varen preparar el mateix dia en aigua bidestil.lada amb 8 ppm de NaCl per donar més estabilitat al substrat i evitar la seva hidròlisi.

Es van utilitzar diverses quantitats d'enzim butirilcolinesterasa 8.7 U/mg sòlid (Sigma) de sèrum de cavall i plasma humà, i d'enzim acetilcolinesterasa 480 U/mg sòlid (Sigma) d'anguila elèctrica i d'eritròcit de boví, així com hidroxietil cel·lulosa (HEC) (Aldrich) i albúmina de sèrum boví (BSA) (Boehringer Mannheim).

El medi de treball fou una solució tampó de fosfats i KCl (0.1M) a pH=7.0 i 7.5.

4.3.2 Procediment de mesurament

Per avaluar la resposta del biosensor, afegirem volums de solucions de concentracions conegudes de BTChCl; l'enzim hidrolitzarà el substrat per donar una espècie electroactiva TCh (tiocolina) que serà oxidada sobre la superfície de l'elèctrode. D'aquesta forma obtindrem un senyal elèctric mesurable, proporcional a la concentració de substrat.

La tècnica de la voltamperometria cíclica ens ha permès conèixer el potencial de treball de la tiocolina que en aquest cas l'hem pres a 700 mV

Per a dur a terme la determinació amperomètrica de la tiocolina, s'aplica el corresponent potencial d'oxidació (0.7 V) respecte un elèctrode de calomelans saturat, a una solució tamponada agitada que contingui alhora una concentració elevada d'electròlit suport per a fixar la força iònica del medi, afavorir la conductivitat i reprimir l'electromigració.

Un cop el senyal de fons és estable, es va addicionant el substrat mentre es fan les corresponents lectures de potencial, que es transformen en mesures d'intensitat de corrent segons l'escala prefixada del potenciostat.

4.4 CONFIGURACIÓ MANUAL

Fins ara, una de les estratègies a seguir en l'anàlisi de pesticides era la integració d'un biosensor amperòmetric biocompòsit amb un. Aquesta metodologia resulta especialment d'interès en el cas d'aquells elèctrodes dissenyats per l'anàlisi d'inhibidors, ja que, donada la irreversibilitat de la inhibició de l'enzim per part dels pesticides, necessitem renovar la superfície per a cada mesura, i aquesta és precisament una dels avantatges intrínsecs dels compòsits.

Tot i això, si ideem una tecnologia que permeti la fabricació de biosensors de forma massiva, ràpida i econòmica, de manera que puguem considerar-los d'un sol ús, el problema de la regeneració de les capes superficials quedarà eliminada.

Inicialment, es varen desenvolupar dispositius d'un sol ús fabricats mitjançant tecnologia *screen-printing (sp)* i deposició manual, ja que aquesta configuració era la que presentava una simplicitat major en la seva construcció (descrita en § 2.2.3.1), en comparació a les altres configuracions (capa múltiple i biocompòsit) on el fet d'integrar diversos components en una mateixa pasta d'impressió en dificultava molt l'optimització (§§ 2.2.3.2 i 2.2.3.3).

A continuació, doncs, s'exposen les mesures realitzades i els resultats obtinguts sota configuració sp-manual.

4.4.1 Efecte del contingut de grafit en la resposta del biosensor

Les calibracions es realitzen a temperatura ambient, per biosensors construïts amb transductors de 20, 25, 30.5, 32, 32.5, 33 i 37.6 % de grafit.

Per obtenir un senyal de fons estable (línia base), cal esperar més temps del que es necessita en l'estudi dels transductors. Es va observar que si abans d'utilitzar el biosensor el deixàvem 48 hores submergit en una solució de tampó de fosfat 0.1M i KCl 0.1M a pH=7.5, el temps d'estabilització es reduïa dràsticament. Sembla ser doncs que l'enzim requereix un condicionament en el medi que l'envolta.

En la taula 4.1 observem com varia el pendent i l'interval lineal a mesura que augmentem el contingut de grafit en el sensor.

Com era d'esperar la sensibilitat augmenta en incrementar la quantitat de material conductor en el biosensor, però la desviació dels resultats, es a dir, la falta de reproductibilitat en els elèctrodes, decreix espectacularment en arribar a la composició de 32 % de grafit. En la taula 4.2 podem apreciar clarament aquesta tendència

Taula 4.1 Evolució del pendent i de l'interval lineal de les corbes de calibració ($I=K [BTChCl]$) en una solució 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.0) a mesura que s'incrementa el contingut de grafit en el biosensor (0.28 mg BchE, 8.7 U/mg). Cada punt és la mitjana d'un mínim de 6 valors experimentals. $E_{ap} = 0.7$ V.

Contingut de grafit (en %)	Pendent ($\mu A/M$)	Límit superior de resposta lineal (mM)
20	365	1
25	1715	0.2
30.5	2379	0.2
32.0	1980	0.1
32.5	2053	0.09
33	2761	0.11
38	3400	0.07

Taula 4.2 Evolució de l'error associat (desviació estàndard relativa) a mesura que s'incrementa el contingut de grafit en la part transductora del biosensor. Detalls experimentals en la Taula 4.1.

Contingut de grafit (en %)	20	25	30.5	32	32.5	33	38
desviació estàndard relativa	40	30	20	5	7	10	15
n (nº valors experimentals)	9	8	6	9	8	8	7

Ens trobem, doncs, de nou amb la mateixa composició trobada en l'estudi del transductor (32%).

4.4.2 Efecte del pH en el pendent de la corba de calibració del substrat

Es prou conegut que l'activitat enzimàtica depèn del pH del medi de treball, i per aquest motiu es va avaluar la sensibilitat del biosensor a diferents valors de pH. En la bibliografia es reporta de forma majoritària que el pH òptim de treball per les colinesterases es situa al voltant de 7.5²⁻⁷(segons l'autor, el pH emprat és de 7.0, 7.5 o 8.0, depenent de la matriu polimèrica emprada, tot i que s'han publicats valors de pH òptims d'entre 8 i 9⁸), i per tant s'estudià el comportament dels biosensors en aquest interval. Per a valors de pH superiors s'observà un deteriorament del compòsit^{9,10}.

En la figura 4.1 s'observa que el medi òptim de treball es troba en un valor de pH de 7.5, per un biosensor amb un 32 % de grafit, i per tant arrel d'aquests resultats totes les mesures realitzades es varen fer en aquest medi tamponat.

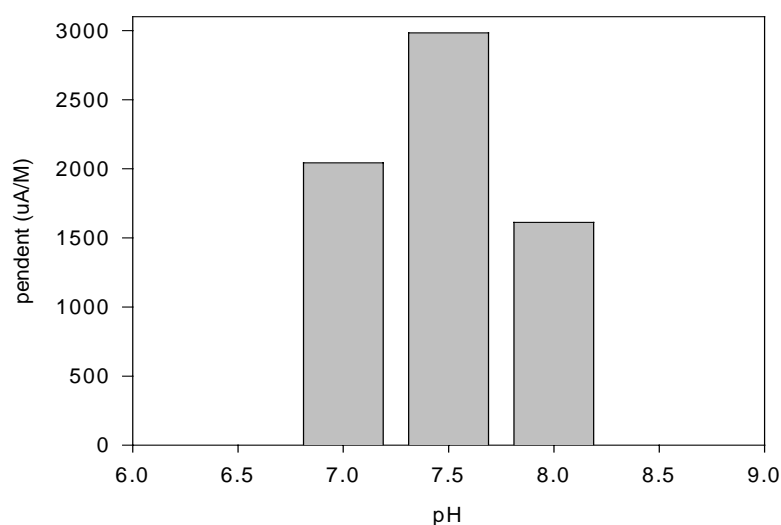


Figura 4.1 Sensibilitat ($\mu\text{A/M}$) a BTChCl del biosensor de 32 % de grafit amb 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) realitzat a diferents valors de pH (KCl 0.1 M, fosfats 0.1 M). $E_{ap} = 700$ mV.

4.4.3 Immobilització enzimàtica

Són molts els avantatges de tenir l'enzim immobilitzat; el primer, evitar la pèrdua d'enzim cap al si de la solució i que impediria una bona reproductibilitat en la resposta, atès que el contingut de material biològic en el biosensor aniria variant en el tempsⁱ. També és important el factor econòmic; aquestes substàncies resulten molt cares (els processos d'obtenció i purificació encareixen molt el producte final), i per tant és necessari retenir l'enzim per a la seva posterior reutilització en successives determinacions analítiques.

Aquest confinament pot ser realitzat sobre suports orgànics i inorgànics i amb diversos tractaments, tal com un senzill atrapament en un espai físic o un enllaç químic feble entre suport i enzim. Depenent del sistema d'immobilització, l'estabilitat de l'enzim serà major o menor, així com la pèrdua d'activitat enzimàtica. Generalment un tractament lleu com una simple adsorció és un procés simple i poc agressiu (no es modifiquen les propietats de la proteïna enzimàtica), però impliquen unes condicions de treball molt suaus per evitar la pèrdua d'activitat per fuites de l'enzim cap al si de la dissolució. En el cas de l'atrapament físic en polímers, els temps de resposta són més elevats, degut a la barrera difusional creada entre el substrat i l'enzim. Pel mètode de l'adsorció física, el principal desavantatge es troba en la poca eficàcia de la immobilització, degut a que els enllaços formats (forces de van der Waals, ponts d'hidrogen, enllaços polars) són molt sensibles a variacions de pH, temperatura, força iònica, etc.

ⁱ Tot i això, en el cas dels biosensors d'un sol ús, la immobilització ha de ser suficient per assegurar un sol calibrat, i per tant l'enzim pot ésser retingut d'una forma menys eficient.

En la immobilització covalent es creen una sèrie d'enllaços d'aquest tipus entre l'enzim i el suport insoluble. El procés d'immobilització requereix reaccions per funcionalitzar el suport i la posterior unió als grups nucleofílics presents en les cadenes laterals dels aminoàcids de les proteïnes enzimàtiques. Un tractament químic mitjançant unió covalent presenta una sèrie de desavantatges pel fet de ser un mètode més agressiu, tals com un possible bloqueig del centre actiu, degut als enllaços que es formen amb el suport. Malgrat això, la immobilització, per la naturalesa de la unió, resulta molt més eficaç i les pèrdues d'enzim són mínimes. Un altre avantatge recau en les condicions de treball, ja que aquestes poden ser més enèrgiques.

En el nostre cas s'ha escollit la immobilització per *cross-linking*. Es basa en realitzar entrecreuaments covalents entre proteïnes mitjançant un agent bifuncional (en el nostre cas glutaraldehid). La capa resultant és adherida sobre un suport sòlid. El principal inconvenient d'aquesta immobilització és que una part de l'enzim romandrà desactivat degut a la seva unió amb l'agent bifuncional per diferents parts de la seva estructura. Per controlar el nivell d'entrecreuament, s'afegeixen altres proteïnes juntament amb l'agent bifuncional i l'enzim, tal com l'albumina de sèrum boví (BSA), tot i que no sempre provoquen l'efecte desitjat, ja que sovint impossibiliten el pas de substrat, creant una barrera difusional d'un gruix excessiu. Es per aquesta raó, que s'ha d'optimitzar acuradament la quantitat afegida.

En el nostre cas, es varen avaluar diverses formulacions de BSA per diversos biosensors, però es trobà que, en aquesta configuració, la barrera difusional era excessiva, ja sigui per l'analit o per l'espècie electroactiva formada (§ 4.4.4.2).

4.4.3.1 Optimització de la càrrega enzimàtica

Es varen provar diferents formulacions per tal d'establir la més adequada pel dispositiu a desenvolupar. Un excés d'enzim disminuiria la sensibilitat en una posterior determinació d'un inhibidor, ja que per la mateixa quantitat d'aquest una menor quantitat d'enzim mostrarà un major canvi en el senyal. Per una altra banda, si la càrrega enzimàtica és massa petita, el senyal que obtenim del substrat resultaria massa dèbil.

Les càrregues enzimàtiques avaluades foren les indicades en la taula 4.3.

Com s'ha comentat (§ 4.4.1), els biosensors amb continguts de grafit inferiors al 30 %, han donat resultats molt pobres, sobretot en el que es refereix a la reproductibilitat entre dispositius del mateix lot, ja que sensors amb composicions iguals donen mesures força disperses.

Taula 4.3. Càrregues enzimàtiques immobilitzades en cada biosensor per diferents composicions de grafit.

% de grafit	Acetilcolinesterasa (480 U/mg) (mg / biosensor)	Butirilcolinesterasa (8.7 U/mg) (mg / biosensor)
20	0.01, 0.06, 0.10, 0.15	0.02, 0.03, 0.036, 0.057, 0.06, 0.066, 0.10, 0.15
25		0.03, 0.078, 0.104, 0.157, 0.2
30		0.07, 0.1575, 0.1925, 0.2, 0.25
32	0.005, 0.008, 0.22, 0.28	0.112, 0.2275, 0.2535, 0.264, 0.28, 0.31, 0.35
37		0.2275, 0.2535, 0.264, 0.28

Es va determinar que la quantitat òptima d'enzim és de 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg sòlid) per biosensor (32% de grafit). Per quantitats superiors la resposta era la mateixa o fins i tot disminuïa. El fet d'augmentar la càrrega enzimàtica, a partir d'aquesta concentració, no provoca un augment d'espècie electroactiva, ja que els setis actius immobilitzats són suficients per la quantitat de substrat que arriba fins la superfície de l'elèctrode. Així, en incrementar la quantitat d'enzim el que fem és dificultar el pas de l'espècie electroactiva, producte de la reacció enzimàtica, fins al transductor, que és on es produeix la oxidació, sense que en resulti cap altre benefici.

Els biosensors que contenen l'enzim AChE (480 U/mg sòlid), requereixen una quantitat superior d'unitats enzimàtiques (1 U hidrolitza 1.0 μ mol de acetil/butiriltiocolina a colina per minut a pH 8.0 i a 37°C, segons l'empresa subministradora) per obtenir rectes de calibrat similars a les aconseguides per la BChE, mantenint la resta de condicions constants. Això és degut, a que per immobilitzar la mateixa quantitat d'unitats enzimàtiques, necessitem una quantitat molt menor d'enzim AChE. Ens trobem, doncs, que el nombre de molècules de glutaraldehyd en relació al d'AChE és molt més gran que en relació a la BChE, i per tant el primer té molts més setis bloquejats. És per aquesta raó que el pendent disminueix tot i tenir les mateixes unitats enzimàtiques. Per aconseguir millorar el pendent dels biosensors d'AChE, doncs, cal disminuir i optimitzar de nou el contingut de glutaraldehyd.

A més a més, el seu temps d'estabilització (temps que cal per assolir un senyal de fons estable) és superior al dels biosensors que contenen BChE, i per tant, retarden l'anàlisi.

Les següents figures (4.2 i 4.3) mostren les diferències en la resposta d'elèctrodes amb diferents càrregues enzimàtiques de AChE:

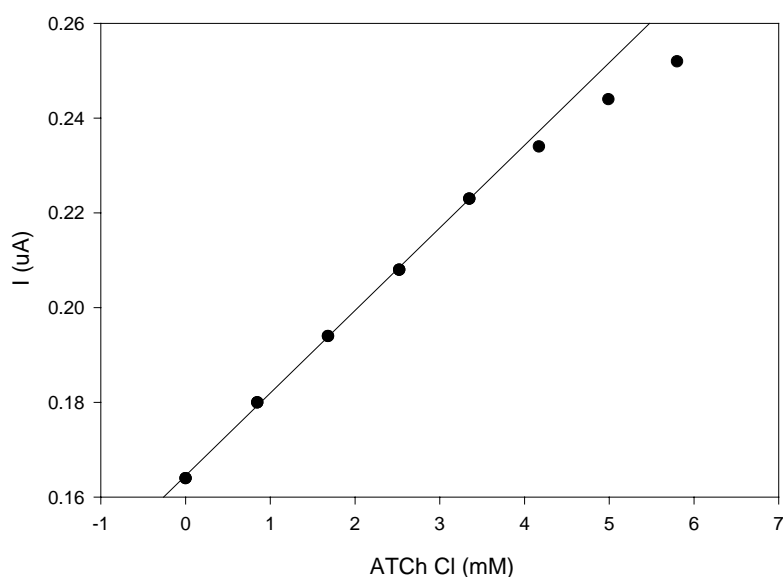


Figura 4.2 Recta de calibració d'un biosensor amb un 32 % de grafit i 0.005 mg de AChE (480 U/mg) immobilitzada amb glutaraldehid (4 μ l d'una solució al 6.25%) sobre la superfície del sensor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). Pendent: 17.5 (uA/M), coeficient de regressió lineal: 0.9995. Eap = 700 mV.

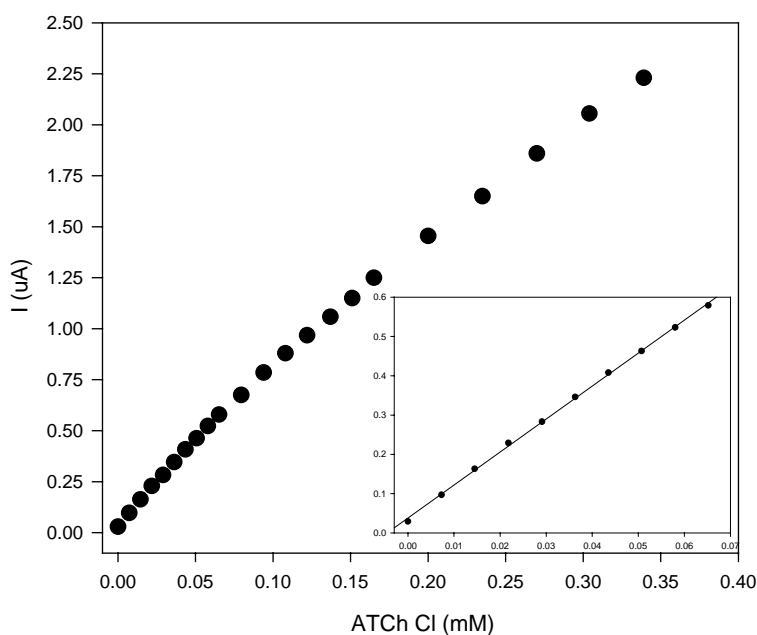


Figura 4.3 Recta de calibració d'un biosensor amb un 32 % de grafit i 0.28 mg de AChE (480 U/mg) immobilitzada amb glutaraldehid (4 μ l d'una solució al 6.25%) sobre la superfície del sensor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). Pendent: 8394 (μ A/M), coeficient de regressió lineal: 0.9992. Eap = 700 mV.

Podem observar l'enorme diferència existent entre les dues sensibilitats, producte d'augmentar la càrrega enzimàtica 50 vegades.

El mateix observem si comparem dos calibrats emprant BChE (figura 4.4). Al augmentar 2.5 cops la quantitat d'enzim, el pendent de la recta es duplica (s'incrementa 2.4 vegades).

Pel que fa als biosensors amb càrregues enzimàtiques compreses entre 0.112 mg i 0.28 mg de BChE donen bones corbes de calibració. La reproductibilitat i l'estabilitat en la resposta es mantenen constants i el pendent va augmentant progressivament a mesura que s'addiciona més enzim. Tot i que el que proporciona millors resultats en les corbes de calibració és el que conté 0.28 mg/biosensor, cap dels dispositius compresos entre aquestes formulacions poden ser rebutjats en un posterior estudi de la determinació de pesticides i, per tant, seran igualment avaluats (recordem que un excés d'enzim podria disminuir la sensibilitat en una posterior determinació d'inhibidors, ja que per una menor quantitat d'enzim i una mateixa quantitat de pesticida, el percentatge d'enzim afectat serà major).

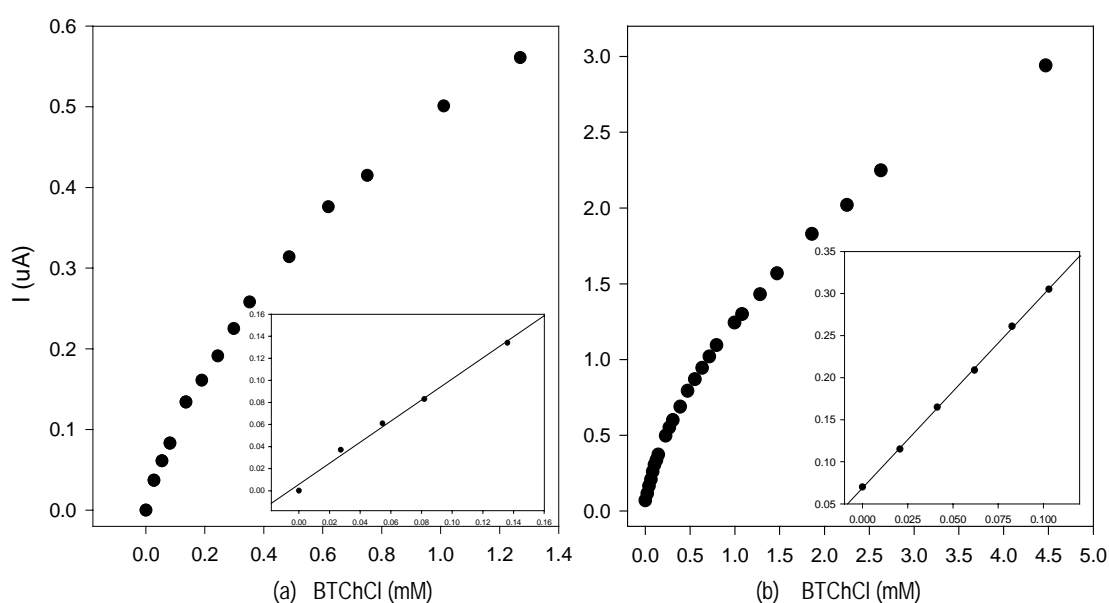


Figura 4.4 Rectes de calibració de biosensors amb un 32 % de grafit i (a) 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) i (b) 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb glutaraldehid (4 μ l d'una solució al 6.25%) sobre la superfície del sensor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5), $E_{ap} = 700$ mV. (a) Pendent: 956 (uA/M), coeficient de regressió lineal: 0.993 (b) Pendent: 2297 (uA/M), coeficient de regressió lineal: 0.9996.

4.4.3.2 Control de la qualitat de la immobilització

Resulta evident la necessitat d'immobilitzar convenientment l'enzim sobre la superfície del transductor. Si durant l'anàlisi el material biològic es despregués (*leaking*) qualsevol variació del senyal portaria associada aquesta pèrdua.

Per comprovar-ho es va calibrar un sensor, i es va deixar en solució durant una setmana. En la figura 4.5 s'observen els resultats. Veiem que hi ha molt poca diferència entre ambdós calibrats, i per tant la quantitat d'enzim despresada és mínima. El pendent es veu disminuït només en un 2.3 %.

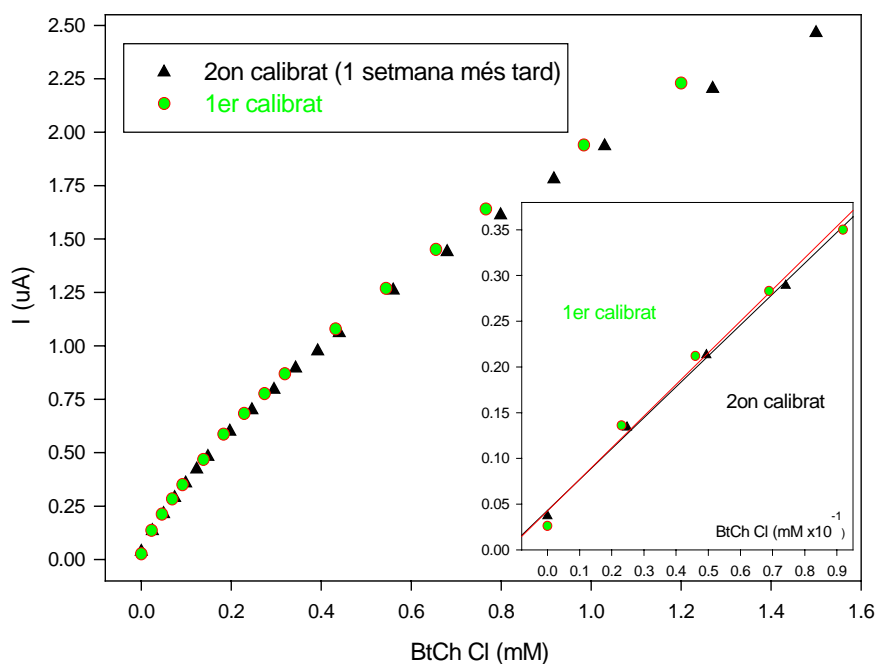


Figura 4.5 Rectes de calibració d'un biosensor amb un 33 % de grafit, i 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb glutaraldehid (4 μl d'una solució al 6.25%) sobre la superfície del sensor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV (a) Pendent: 3461 ($\mu\text{A}/\text{M}$), coeficient de regressió lineal: 0.992 (b) Pendent: 3380 ($\mu\text{A}/\text{M}$), coeficient de regressió lineal: 0.997

Per comprovar que efectivament no es produeixen pèrdues de material biològic, es procedeix a realitzar un calibrat en una solució en la que ha estat submergit un biosensor. L'electrode de treball serà un transductor sense enzim i hi afegim BTChCl. Aquest substrat no és electroactiu, per tant si no hi ha cap espècie que catalitzi la seva hidròlisi cap a la formació de tiocolina (que s'oxida a 700 mV), no obtindrem cap senyal elèctric en anar afegint-hi el substrat. Si, pel contrari, el senyal augmenta en incrementar la concentració de BTChCl, confirmarà la presència d'enzim lliure en solució, enzim que només haurà pogut procedir del *leaking* del biosensor que hi ha estat submergit.

En la figura 4.6 veiem que efectivament el transductor respon al clorur de BTCh (a), i que per tant existeix una petita pèrdua enzimàtica, però si ho comparem amb la resposta d'un biosensor (b), s'observa que la resposta és pràcticament negligible.

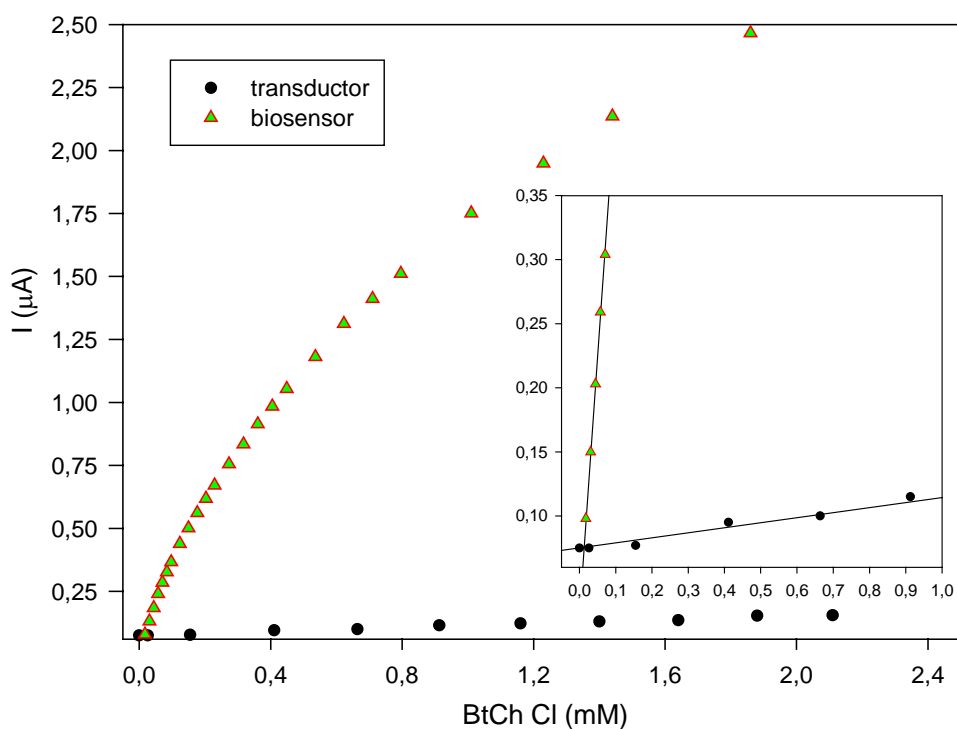


Figura 4.6 Rectes de calibració (i) d'un biosensor amb un 33 % de grafit, i 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb glutaraldehid (4 µl d'una solució al 6.25%), sobre la superfície del sensor en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5), (ii) calibració d'un transductor amb un 33 % de grafit, sense cap tipus de material biològic immobilitzat, afegint BTCh Cl (espècie no electroactiva) en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) on prèviament s'havia submergit un biosensor. $E_{ap} = 700$ mV. (i) Pendent: 4035 (uA/M), coeficient de regresió lineal: 0.999 (ii) Pendent: 39 (uA/M), coeficient de regresió lineal: 0.990.

4.4.4 Influència del contingut de glutaraldehid en la resposta del biosensor

S'han provat diverses composicions del biosensor, variant el volum de glutaraldehid dipositat sobre el sensor, a partir de tres solucions del 2.5, 6.25 i 12.5 % de glutaraldehid respectivament, preparades en una solució tampó 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl amb un valor del pH de 7.5.

A continuació (taula 4.4) es mostren els diversos volums afegits de cada una de les solucions de glutaraldehid (expressada en µl). Els resultats es comenten pel biosensors de BChE i AChE.

Taula 4.4 Composició en glutaraldehid del biosensor, expressada en μl de solucions de 2.5, 6.25, 12.5 % de glutaraldehid respectivament.

% de grafit	Biosensor d'AChE (480 U/mg)			Biosensor de BChE (8.7 U/mg)		
	μl de glutaraldehid / biosensor			μl de glutaraldehid / biosensor		
	2.5 %	6.25 %	12.5 %	2.5 %	6.25 %	12.5 %
20	3	3	3, 1.5	3	3	5, 3, 1.5
25					5, 4, 3	
30					4	
32		4			4	
37					4	

4.4.4.1 Biosensor de BChE

El glutaraldehid és l'agent bifuncional emprat en les nostres experiències. S'observa un doble efecte; per un costat augmentar-ne la concentració produeix una disminució en la sensibilitat degut al augment de la barrera difusional. El substrat té molt més impediment per arribar fins l'enzim, així com el producte format per arribar al transductor i oxidar-se.

Per un altre costat es dona un augment del límit superior de resposta lineal, tal i com veiem en la figura 4.7

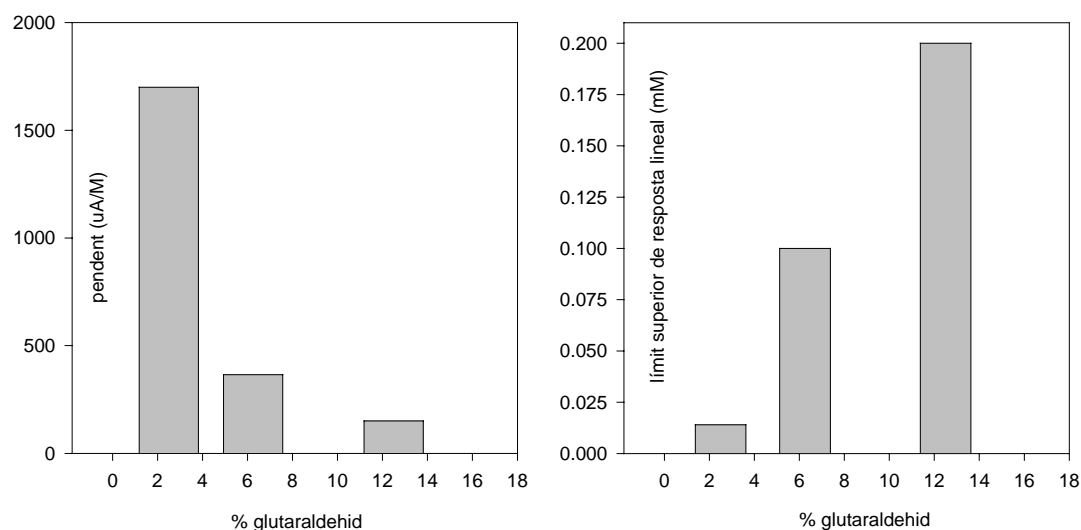


Figura 4.7 Influència del contingut de glutaraldehid sobre els paràmetres de la recta de calibrat d'un biosensor amb un 20 % de grafit i 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 3 μl de glutaraldehid de 2.5, 6.25, 12.5 % respectivament sobre la superfície del sensor. S'afegeixen concentracions conegudes de BTCh Cl en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV.

El fet d'obtenir un pendent superior a baixes concentracions de glutaraldehid es podria explicar sobretot pel fet de que disminueix substancialment la barrera difusional, i per tant, un major nombre de producte pot arribar a la superfície del transductor. Alhora augmenta la presència de setis actius, que poden catalitzar l'hidròlisi del substrat cap a l'espècie electroactiva (tiocolina), degut a que es formen menys enllaços amb l'agent bifuncional.

L'increment del límit superior de resposta lineal, es podria explicar en base precisament a la disminució del pendent. La resposta enzimàtica no respon a una funció lineal en un ampli interval de concentració, sinó que presenta una corba, és a dir, el pendent va disminuint al llarg del calibrat. Quan s'augmenta la barrera difusional, disminueix el nombre de molècules de tiocolina que arriben al transductor, i per tant el senyal decreix. Al mateix temps s'ocupen un major nombre de setis actius, i per tant un nombre més petit de molècules de substrat poden ser hidrolitzades. Com a conseqüència, el senyal i per tant el pendent disminueixen. Així la sensibilitat de la zona on la concentració de substrat és més baixa, decreix fins equiparar-se al de la zona més alta, i fa l'efecte d'ampliar-se el rang lineal.

Així doncs es va escollir un percentatge de glutaraldehid mitjà (6.25%), on s'obtingués una bona sensibilitat i un límit superior de resposta alt.

4.4.4.2 Biosensor de AChE

El que ha estat comentat pel biosensor de BChE (§ 4.4.4.1), és totalment anàleg al que succeeix amb el biosensor de AChE. El seu comportament és exactament el mateix, tal i com s'observa en la figura 4.8.

Així doncs, i en base als resultats obtinguts, la composició òptima de glutaraldehid, pels biosensors de AChE resultà la mateixa que pel de BChE (6.25%).

En les primeres formulacions, es va provar d'incorporar al biosensor BSA (albúmina de sèrum boví). Es varen avaluar diverses composicions, però cap dels biosensors provats va donar resposta. La barrera de difusió creada fou excessiva per l'analit. Tot i això, són relativament nombroses les publicacions on apareixen treballs que utilitzen l'albúmina i per tant no es pot descartar en futures investigacions.

Figura 4.8 Influència del contingut de glutaraldehid sobre els paràmetres de la recta de calibrat d'un biosensor amb un 20 % de grafit i 0.22 mg de AChE (480 U/mg) immobilitzada amb 3 μ l de glutaraldehid de 2.5, 6.25, 12.5 % respectivament sobre la superfície del sensor. S'afegeixen concentracions conegudes de ATChCl en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV.

4.4.5 Reproductibilitat dels biosensors

Tal i com havíem comentat anteriorment, el fet de que aquests sensors estiguin desenvolupats per ser d'un sol ús, obliga a que hi hagin les mínimes diferències possibles entre les respostes dels diferents biosensors. Cal recordar, però, que aquests han estat fabricats amb mètodes parcialment automàtics, molt més propers a tècniques manuals que no pas automàtiques, i que per tant, els resultats aconseguits es podrien millorar sens dubte amb una fabricació automatitzada, on les condicions de construcció de cada elèctrode siguin de màxima reproductibilitat.

Es varen comparar les respostes de biosensors fabricats dins una mateixa sèrie o lot, de lots diferents i finalment la mesura d'un mateix biosensor en el temps.

Es previsible que aquells biosensors fabricats a partir del mateix lot, obtinguin unes respostes més semblants, i en canvi, aquells que provenen de lots diferents (i per tant, en els que les condicions de fabricació son més variables) obtinguin major dispersió en els resultats.

4.4.5.1 Reproductibilitat dels biosensors d'un mateix lot

La reproductibilitat dels biosensors en una mateixa sèrie es pot veure afectada per diversos factors. Primerament, una falta d'homogeneïtat en la pasta grafit-epoxi en el moment de la impressió i possibles variacions en llur activació (aquesta és bàsicament l'avaluada en l'anterior capítol en l'estudi de la reproductibilitat dels transductors), i en segon lloc les variacions que poden produir-se en el procés d'immobilització enzimàtica i addició del glutaraldehyd, sobretot al afegir volums petits (de l'ordre d'unitats de μl) on l'error comès augmenta considerablement.

Es va avaluar la resposta d'un grup de biosensors, procedents de transductors de la mateixa placa base. A tots ells se'ls va afegir simultàniament la mateixa quantitat de solució enzimàtica i de glutaraldehyd. Els resultats de la corresponent calibració amb el substrat es mostren en la figura 4.9.

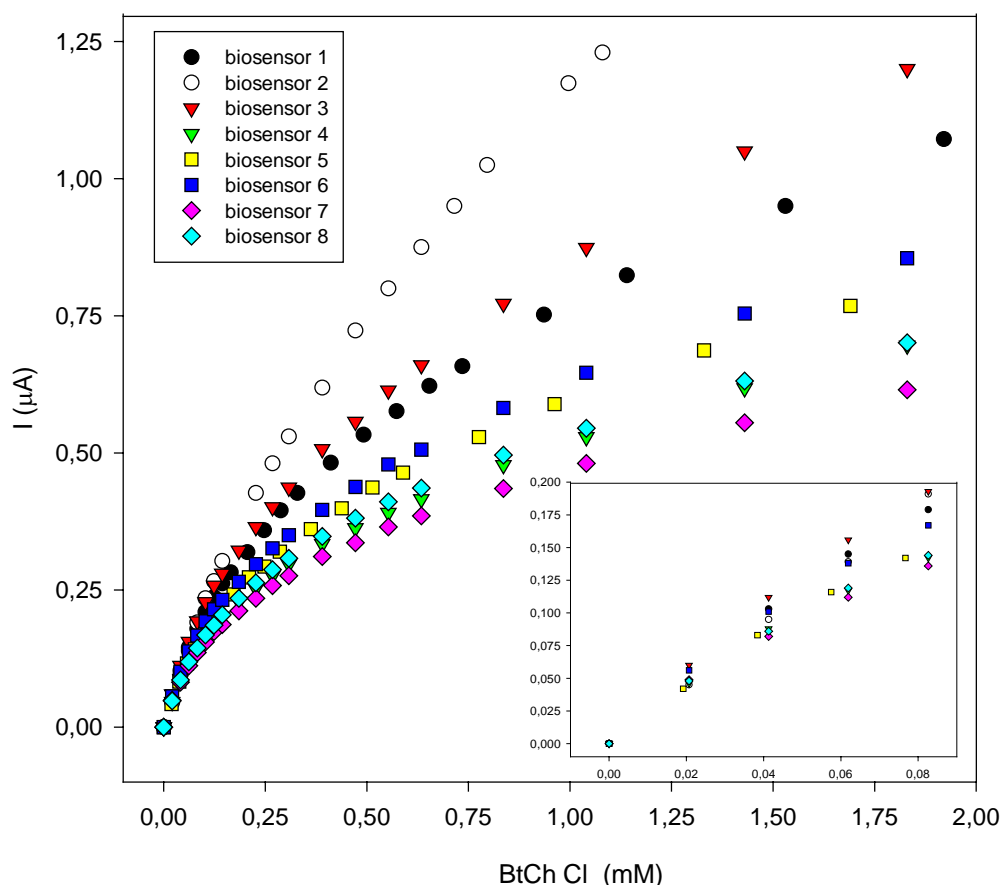


Figura 4.9 Rectes de calibració de vuit biosensors diferents procedents del mateix lot amb un 32 % de grafit, i 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 μl d'una solució de glutaraldehyd al 6.25 % sobre la superfície del sensor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV.

En la taula 4.5 es detallen les pendents, intervals lineal i coeficients de regressió. L'error dels resultats obtinguts en el pendent és del 9% (DER, n=8).

Taula 4.5 Pendent, interval lineal i coeficient de regressió lineal de vuit biosensors procedents de la mateixa placa base, als que s'ha immobilitzat enzim BChE mitjançant glutaraldehid simultàniament. Detalls experimentals com els de la Figura 4.9. Pendent: 1985 ± 160 ($\mu\text{A/M}$); límit inferior de resposta lineal: 6.3 ± 0.6 (μM); límit superior de resposta lineal: 96 ± 9 (μM)

Biosensor	Pendent ($\mu\text{A/M}$)	Interval lineal (μM)	Coficient de regressió lineal
1	2043	6 – 110	0.991
2	2297	5 – 110	0.9997
3	2194	6 – 100	0.991
4	1905	7 – 80	0.992
5	1867	7 – 90	0.992
6	2015	6 – 90	0.990
7	1823	6 – 90	0.990
8	1739	7 – 100	0.991

L'augment en l'error comès, respecte a l'estudi dels transductors, es deu al fet de que ara tenim una doble resposta, la de la reacció enzimàtica en catalitzar el substrat a l'espècie electroactiva i la pròpia del transductor quan s'oxida la tiocolina.

A això s'ha d'afegir la immobilització del material biològic, que suposa una etapa més en el procés de fabricació del biosensor. És de preveure doncs, que si aconseguíssim un mètode més automatitzat, on la deposició no fos manual i els volums fossin rigorosament exactes, la reproductibilitat augmentaria.

4.4.5.2 Reproductibilitat dels biosensors en lots diferents

Es va voler comprovar, si existien diferències significatives entre la reproductibilitat de biosensors construïts en la mateixa sèrie i biosensors fabricats en series diferents. Es a dir, es tractava de comprovar si la reproductibilitat d'electrodes construïts a partir de la mateixa placa base i pasta grafit-epoxi, i immobilitzats en el mateix instant amb les mateixes solucions enzimàtiques i de glutaraldehid, diferien significativament de la de biosensors fabricats partint de pastes diferents, i immobilitzades de forma molt espaiada en el temps.

En la figura 4.10 observem els calibrats de 9 biosensors procedents de tres lots, diferents de la que es feia referència en la figura 4.9. En taula 4.6, es detallen els pendents, intervals lineals i coeficients de regressió. L'error (DSR, n=9) en la sensibilitat, límit inferior i límit superior de la resposta lineal és del 20, 11 i 19 % respectivament.

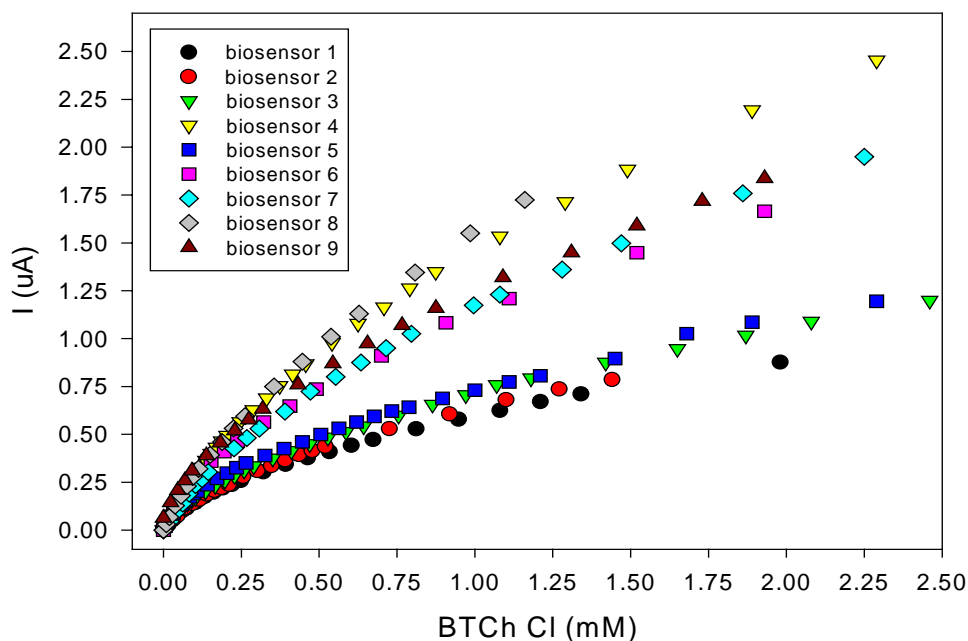


Figura 4.10 Rectes de calibració de nou biosensors procedents de lots diferents amb un 32 % de grafit, i 0.28mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada sobre la superfície del transductor amb 4 μ l d'una solució de glutaraldehid al 6.25 %, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV.

Com era de preveure, l'error ha augmentat considerablement. Al comprovar la reproductibilitat dels transductors, vàrem veure que no hi havia diferències significatives entre dispositius de diferents lots. Així doncs les diferències entre biosensors procedents de lots diferents, són bàsicament degudes a l'etapa d'immobilització de l'enzim i el glutaraldehid.

Taula 4.6 Pendent, interval lineal i coeficient de regressió lineal de nou biosensors procedents de sèries diferents, a els que s'ha immobilitzat enzim BChE mitjançant glutaraldehid. Detalls experimentals en Figura 4.1 Pendent: 2450 ± 400 (μ A/M); límit inferior i superior de resposta lineal: 6.3 ± 0.6 (μ M) - 8.89 ± 1.4 (μ M)

Biosensor	Pendent (μ A/M)	Interval lineal (μ M)	Coefficient de regressió lineal
1 (lot 2)	1698	6 – 80	0.998
2 (lot 2)	1738	6 – 70	0.991
3 (lot 2)	2132	6 – 70	0.998
4 (lot 3)	2814	7 – 110	0.998
5 (lot 3)	2843	7 – 70	0.995
6 (lot 3)	2924	6 – 90	0.996
7 (lot 4)	2297	5 – 110	0.9997
8 (lot 4)	2950	7 – 100	0.997
9 (lot 4)	2647	7 – 100	0.991

Per comprovar si efectivament existien diferències significatives entre biosensors procedents de diversos lots, es va realitzar un anàlisi de varianza (ANOVA):

Anàlisi de varianza d'un factor

Grups	<i>n</i>	Suma	Mitjana	Varianza
Lot 1 (Taula 4.5)	8	15883	1985	36053
Lot 2 (Taula 4.6)	3	5568	1856	57532
Lot 3 (Taula 4.6)	3	8581	2860	3250
Lot 4 (Taula 4.6)	3	7894	2631	106786

Anàlisi de varianza

Origen de les variacions	Graus de llibertat	<i>F</i> (calculada)	Valor crític per <i>F</i>
Entre grups	3	19	3.4
Dins dels grups	13		
Total	16		

L'estudi s'ha fet per una $P = 0.05$. Si la hipòtesi nul·la és correcta, les dues estimacions de σ_0^2 no haurien de diferir significativament. Si és incorrecte, la estimació de σ_0^2 entre lots diferents serà major que dins el mateix lot degut a la variació de les mesures dels biosensors procedents de diferents plaques. La *F* calculada és superior a la tabulada, i per tant difereixen significativament.

És clar, doncs, que per evitar-ho necessitaríem d'un mètode que ens permetés reproduir de forma més efectiva les condicions d'immobilització, per evitar aquestes diferències. En la bibliografia es reporten altres mètodes tals com *casting*, *dipping*, *spinning*, *spray-coating*, *fluidized-bed*, i l'àmpliament comentada *screen-printing*. Inicialment es va optar pel *dropping* o degoteig, per ser la més simple i econòmica, tot i que en posteriors estudis es va realitzar un intent per imprimir la capa biològica serigràficament (§4.5 i 4.6).

4.4.5.3 Resposta d'un mateix biosensor al llarg del temps

Es va comprovar com variava la resposta d'un biosensor al llarg del temps, per diferents enzims i composicions.

Tot i que en principi aquests sensors han estat concebuts per ser d'un sol ús, es va avaluar la seva resposta mitjançant successius calibrats amb el temps.

Per biosensors amb una composició de 32 % de grafit, i 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 μl d'una solució de glutaralhid al 6.25 % sobre la superfície de l'elèctrode, es varen realitzar rectes de calibrat en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). Primerament es va estudiar el comportament de la resposta del sensor amb una setmana de diferència entre ambdós calibrats. Seguidament s'avaluà per un mes i per últim 100 dies després. Així mateix, es realitzà el calibrat d'un biosensor 165 dies després de la seva construcció, sense que prèviament hagués estat sotmès a cap tipus de mesura. Aquesta darrera experiència serà comentada en el darrer punt d'aquest capítol (§4.4.9; temps de vida del biosensor).

En la figura 4.11 (a), observem dos calibrats realitzats pel mateix biosensor distants una setmana entre ells. Després de la primera calibració es va guardar sec a -4°C ; i abans de ser utilitzat de nou es va fer un preconditionament amb tampó fosfat pH 7.5.

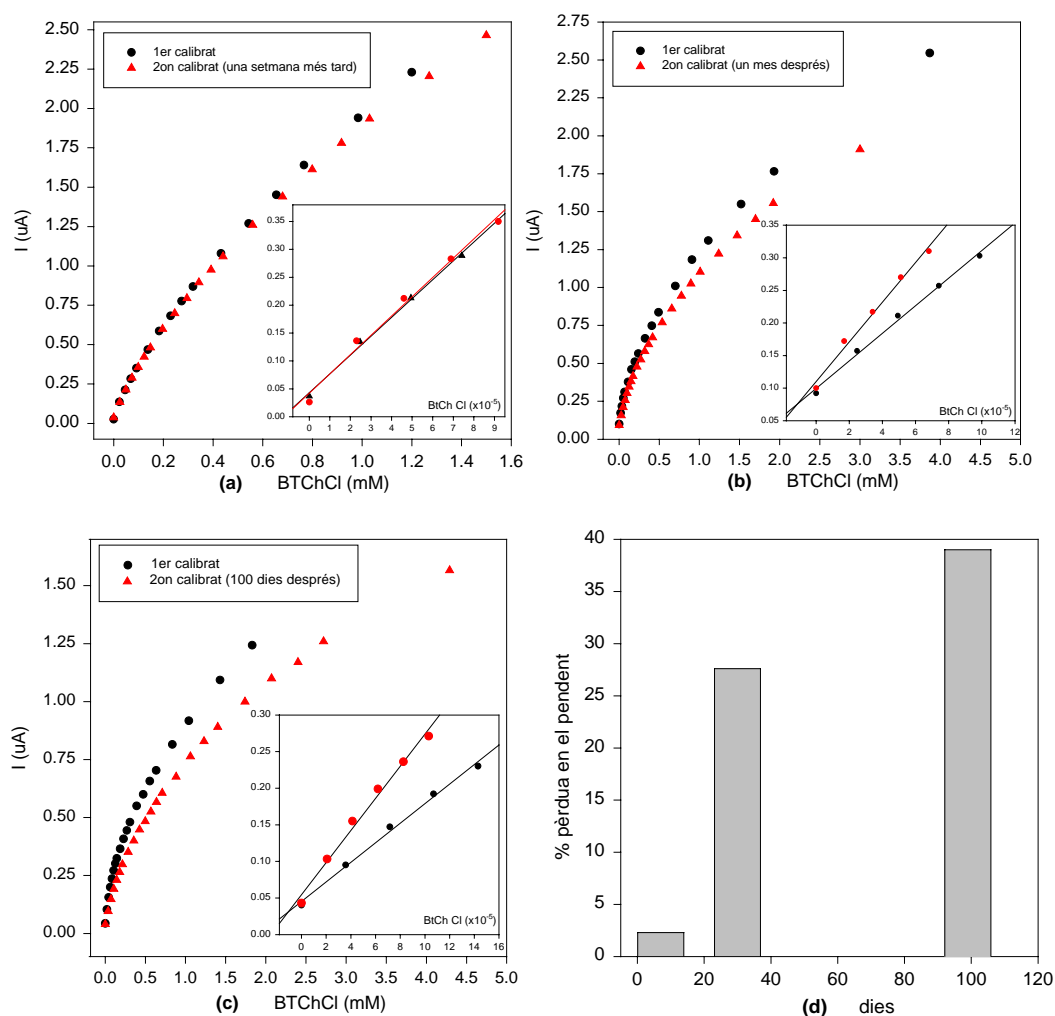


Figura 4.11 Rectes de calibració de biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 μl d'una solució de glutaralhid al 6.25 % sobre la superfície del transductor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{\text{ap}} = 700$ mV. (a) Entre els dos calibrats hi ha una setmana de diferència. (b) Entre els dos calibrats hi ha un mes de diferència. (c) Entre els dos calibrats hi han 100 dies de diferència (d) percentatge de pèrdua en la sensibilitat al llarg del temps en els biosensors esmentats.

En la figura 4.11 (b) i (c) observem les diferències en la mesura dels calibrats d'un biosensor, distant un mes i 100 dies respectivament, entre ambdues mesures. Com l'anterior, després de la primera calibració es va guardar el sensor a -4°C , i només unes hores abans de ser calibrat per segona vegada, es va submergir en la solució de treball.

Els resultats es resumeixen en la taula 4.7 i en la figura 4.11 (d). S'observa com disminueix la sensibilitat amb el temps, fruit de sotmetre a l'enzim a canvis de temperatura i al contacte amb la solució de treball, que fan disminuir l'activitat enzimàtica, ja sigui perquè els centres actius es veuen afectats o per pèrdues per *leaking*.

Taula 4.7 Dades experimentals del percentatge de pèrdua en la sensibilitat al llarg del temps en biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.28 mg de BChE immobilitzada amb una solució de glutaraldehyd al 6.25 % sobre la superfície del sensor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV.

Temps transcorregut entre calibrats (dies)	Pèrdua de la sensibilitat (en %)
7	2.3
30	27.6
100	39.2

Es va comprovar l'efecte del temps sobre biosensors de AChE, per espai de 7 i 30 dies entre calibrats (figura 4.12). El procediment ha estat totalment anàleg als biosensors de BChE

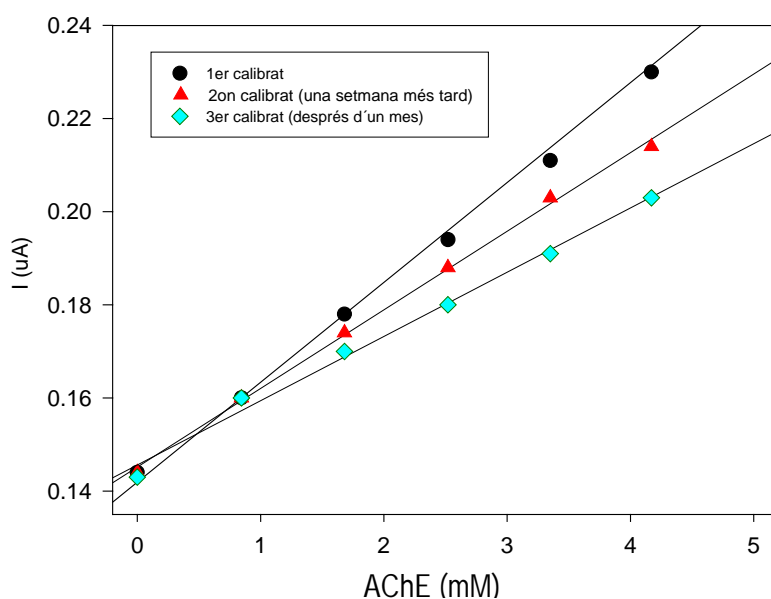


Figura 4.12 Rectes de calibració en temps diferents d'un mateix biosensor amb 32 % de grafit, i 0.008 mg de AChE (480 U/mg) immobilitzada amb 4 μl d'una solució de glutaraldehyd al 6.25 % sobre la superfície del transductor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV.

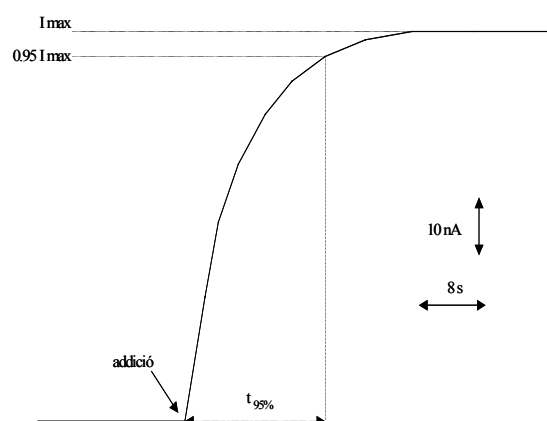
Al cap d'una setmana, la pèrdua del pendent és d'un 15 %, i al cap d'un més d'un 30 %. Per tant a curt termini sembla ser que el biosensor de AChE es desactiva més ràpidament, però amb el temps arriba a valors semblants al de BChE.

4.4.6 Dinàmica de resposta

Com en el cas dels transductors es va estudiar la dinàmica de resposta que presenta el biosensor, es a dir, el canvi en la intensitat de corrent en afegir una concentració coneguda de substrat a una solució tamponada. Aquesta dinàmica es va estudiar mitjançant les corbes de calibració obtingudes per la tècnica de les addicions conegudes. El biosensor utilitzat contenia 0.28 mg de BChE immobilitzat amb 4 μ l d'una solució al 6.25 % de glutaraldehid sobre la superfície d'un transductor amb un 32 % de grafit.

El temps necessari per aconseguir el 95% de la resposta total fou de 16 segons quan la concentració de substrat (clorur de BTCh) s'incrementa de 0 a 5×10^{-5} M

Figura 4.13 Temps de resposta per un biosensor d'epoxy i grafit (32%) amb 0.28 mg de BChE immobilitzat amb 4 μ l d'una solució al 6.25 % de glutaraldehid sobre la superfície del transductor en augmentar la concentració de substrat (clorur de BTCh) de 0 a 5×10^{-5} M en una solució tamponada amb fosfat 0.1 M, KCl 0.1M i pH=7.5. $E_{ap} = 700$ mV.



4.4.7 Límit de detecció

Així mateix, es va determinar el límit de detecció. El mínim senyal analític distingible S_m es pren com la suma del senyal mitjà del blanc (\bar{S}_{bl}) més un múltiple (k) de la desviació estàndard d'aquest (S_{bl}):

$$S_m = \bar{S}_{bl} + kS_{bl}$$

Experimentalment pot determinar-se S_m realitzant 20 o 30 mesures del blanc, preferiblement en un període de temps extens. Seguidament es tracten les dades per obtenir \bar{S}_{bl} i S_{bl} .

La resposta del nostre sistema segueix l'equació:

$$S = mc + S_{bl}$$

on S és el senyal mesurat, c és la concentració de l'analit, S_{bl} és el senyal instrumental per el blanc i m és el pendent de la funció de resposta, i per tant, el mínim senyal analit distingible serà:

$$S_m = mc_m + \bar{S}_{bl}$$

Si substituïm S_m en aquesta equació, obtenim c_m que és per definició el límit de detecció:

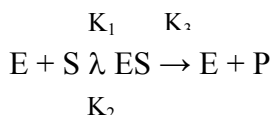
$$c_m = (S_m - \bar{S}_{bl}) / m$$

El límit de detecció trobat per a $k = 3$ és de 3×10^{-6} M.

4.4.8 Determinació de la K_m aparent de l'enzim

Els mètodes analítics que involucren enzims o qualsevol altre tipus de catalitzador, requereixen consideracions cinètiques, tant per desenvolupar-los com per efectuar una interpretació adequada dels resultats. El biosensor amperomètric desenvolupat està constituït per l'enzim BChE (o AChE) immobilitzat per *cross-linking* mitjançant glutaraldehid en la superfície del transductor; per tant, s'ha estudiat de quina forma es veu afectada la cinètica enzimàtica sota aquestes condicions.

Un dels mètodes més senzills i útils per descriure la cinètica de la reacció enzimàtica fou desenvolupat per Michaelis i Menten¹¹. El model proposa la interacció entre el substrat S i l'enzim E per formar un complex enzim-substrat, ES que posteriorment dona lloc als productes P regenerant-se l'enzim:



Considerant la condició d'estat estacionari, on $d[ES]/dt = 0$, $d[E]/dt = 0$ i que la formació del complex ES és el pas limitant, la solució de les equacions cinètiques generades ens permet deduir l'expressió de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

On V es la velocitat inicial de formació dels productes, $[S]$ la concentració inicial de substrat, V_{\max} la velocitat màxima de reacció i K_m la constant de Michaelis-Menten, de tal forma que:

$$V_{\max} = K_3 [E]_0$$

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

$$K_m = \frac{K_1 + K_3}{K_2}$$

On $[E]_0$ és la concentració total del enzim i K_1 , K_2 , i K_3 les constants de velocitat. El valor de K_m està inversament relacionat amb la constant d'afinitat K_A de l'enzim:

$$K_A = \frac{K_1}{K_2}$$

I per tant, per valors menors de K_m , existeix una major afinitat entre l'enzim i el substrat. El procés d'immobilització d'un enzim pot alterar les seves propietats catalítiques, en comparació amb les que presenta en un ambient natural de reacció. Aquests alteracions es manifesten normalment en canvis de K_m , així com del pH i temperatura òptims per desenvolupar una màxima activitat enzimàtica. Aquest fenomen està atribuït a canvis microambientals que succeeixen al voltant dels centres actius¹².

En el nostre cas, el mètode convencional per a determinar la K_m implica un adaptació de la equació vista anteriorment¹³:

$$I = \frac{I_{\max} C_{\text{substrat}}}{K_m^{\text{app}} + C_{\text{substrat}}}$$

On I és el corrent mesurat, C_{substrat} la concentració de substrat i I_{\max} el corrent màxim. Es substitueixen tant V com V_{\max} per I i I_{\max} que no deixen de ser velocitats d'oxidació o reducció de l'espècie que participa en la reacció enzimàtica. Donat que el mecanisme enzimàtic i de detecció estan afectats per fenòmens difusionals, a banda d'altres variables de caràcter físico-químiques, el paràmetre anàleg a la K_m es coneix com la constant aparent de Michaelis-Menten (K_m^{app}).

La K_m^{app} es determina realitzant un ajust matemàtic dels valors experimentals a la cinètica de primer ordre descrita per Michaelis-Menten. En la figura 4.14 i 4.15, es mostren els resultats que proporcionen aquest ajust matemàtic a l'equació de Michaelis-Menten.

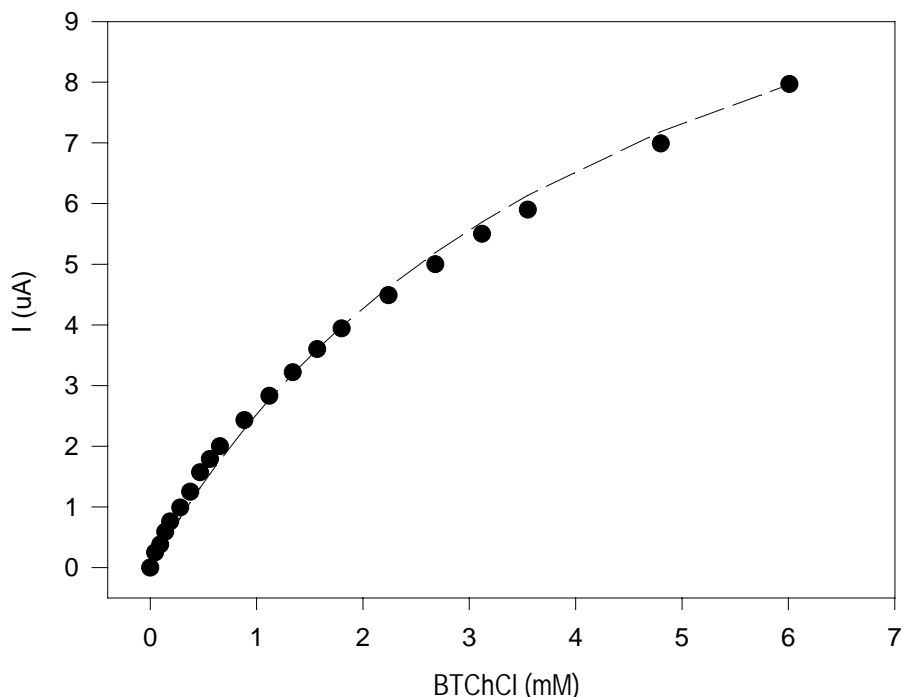


Figura 4.14 Ajust dels valors experimentals a l'equació de Michaelis-Menten pel càlcul de la K_m^{app} i la I_{max} del biosensor de BChE. (---- ajust matemàtic; ●●● punts experimentals)

En la taula 4.8 es mostren els resultats del càlcul per a la determinació de K_m^{app} i I_{max} .

Per l'enzim AChE en solució la K_m per a un substrat d'ATChCl determinada utilitzant sistemes clàssics en la determinació d'activitats enzimàtiques varia entre valors de 0.051 a 0.2 mM¹⁴. Pel que fa a la BChE en solució el valor de la K_m pel substrat BTChCl és de 1.87 mM. Els valors de la K_m^{app} trobats experimentalment en enzim immobilitzat són superiors que els d'enzim lliure, això indica la possible existència de barreres difusionals i/o la modificació de l'afinitat del substrat per l'enzim degut a la immobilització.

Taula 4.8 Càlcul de I_{max} i K_m^{app} mitjançant un mètode iteratiu de regressió no lineal, per biosensors d'ambdós enzims.

	AChE	BChE
I_{max} (µA)	17.5	14.0
K_m^{app} (mM)	1.5	4.5

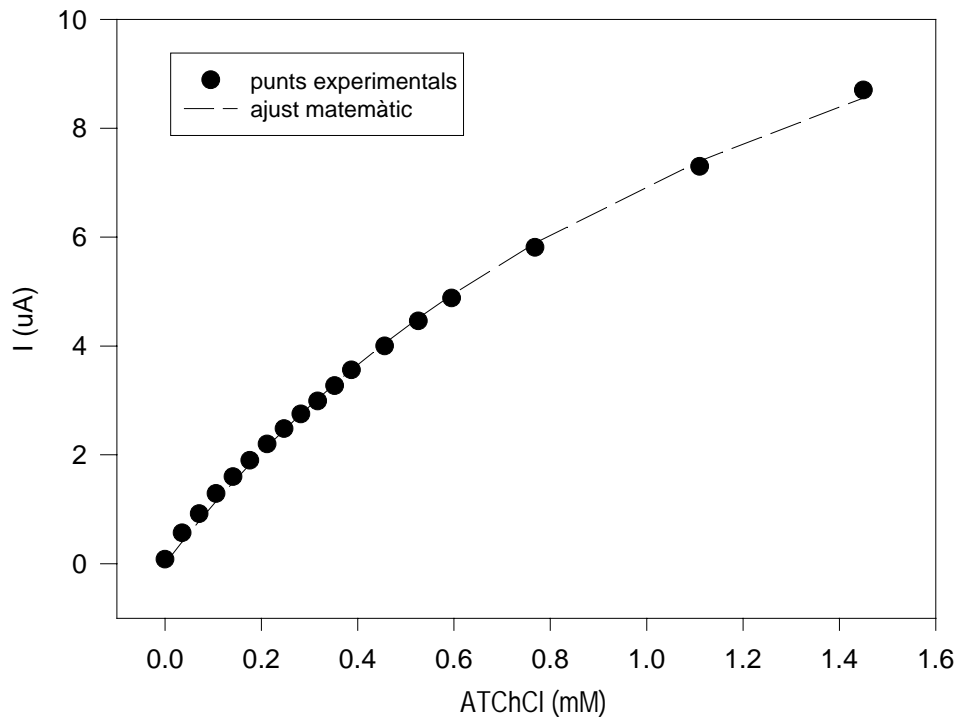


Figura 4.15 Ajust dels valors experimentals a l'equació de Michaelis-Menten pel càlcul de la K_m^{app} i la I_{max} del biosensor de AChE.

4.4.9 Emmagatzematge del biosensor: Condicions generals i temps de vida

El biosensor, en estar format per material biològic, s'ha de preservar en unes condicions idònies per tal d'evitar la desnaturalització de l'enzim. En el present treball, es conservaren a -4°C en una placa de Petri. Prèvia a la seva calibració, es submergia unes hores en el mateix medi de treball (tampó fosfat, KCl i pH 7.5) pel condicionament de l'enzim.

Es comprovà la durada del biosensor sense haver estat calibrat inicialment, és a dir, guardant-lo directament a -4°C sense haver realitzat cap mesura prèvia. Al cap de 5 mesos (165 dies) es va realitzar un calibrat i es va comparar la seva resposta amb la de la resta de biosensors de la mateixa sèrie i que havien estat calibrats immediatament després de la seva construcció. Els resultats eren totalment comparables, i per tant és de suposar que l'enzim en els primers cinc mesos d'emmagatzematge conserva les seves activitats catalítiques tot i la immobilització a la que està sotmès.

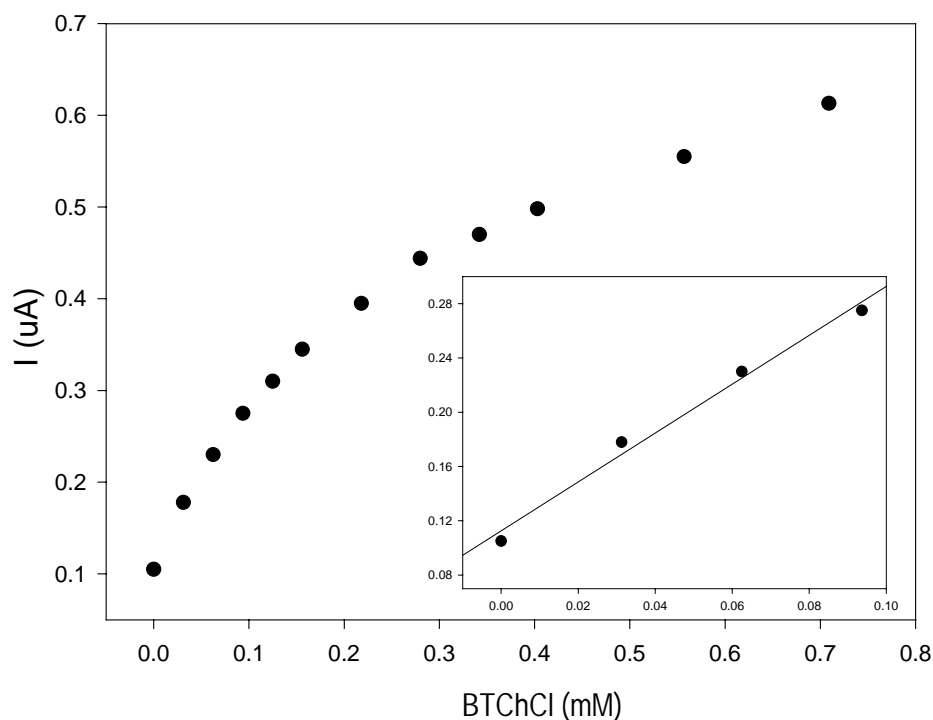


Figura 4.16 Recta de calibració per un biosensor amb un 32 % de grafit, i 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 µl d'una solució de glutaraldehyd al 6.25 % sobre la superfície del sensor, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). El calibrat s'ha realitzat 165 dies després de la construcció del biosensor. Pendent: 1800 µA/M

La sensibilitat obtinguda és de 1800 µA/M; la resta dels 9 biosensors que conformen la sèrie tenen un pendent de 1980 ± 160 µA/M (calibrats 5 mesos abans). Així mateix, els valors de l'interval lineal també es mantenen.

4.5 CONFIGURACIÓ DE MÚLTIPLE CAPA

Fins ara hem vist l'estudi d'un biosensor planar de configuració híbrida *screen-printing* manual. Tot seguit mostrarem els resultats aconseguits mitjançant un biosensor planar de configuració de múltiple capa per *screen-printing*. Aquesta configuració segueix bàsicament el procés seguit anteriorment, però ara la deposició manual de la capa biològica sobre el transductor es substitueix per una impressió serigràfica, de forma que tot el procés és realitzat serigràficament.

Primerament doncs, fou necessari el desenvolupament d'una pasta o tinta que permetés la impressió serigràfica del material biològic. Aquesta pasta d'impressió es va basar en 0.25 ml d'una solució tamponada (0.1 M fosfat i 0.1 M KCl a un valor de pH 7.5) amb 0.37 mg d'enzim BChE i glutaraldehyd (1µl al 6.25%), barrejada amb 0.01 g d'HEC, 5 mg de BSA i 0.1 g de grafit.

Aquesta pasta es va imprimir sobre transductors de grafit (32%). La presència de grafit en la pasta millorava la conductivitat i el contacte amb la superfície del transductor.

L'estudi realitzat pels dispositius que pertanyen a aquesta configuració fou menys exhaustiu que el corresponent als biosensors amb l'anterior configuració (manual). L'objectiu fou comparar els principals paràmetres característics de resposta entre les diferents configuracions, tal com interval lineal i sensibilitat.

De forma, doncs, anàloga al desenvolupament seguit en els biosensors manuals es va optimitzar un dispositiu fabricat tan sols amb tècniques serigràfiques.

Es va observar que tot i que l'interval de treball es situava en una zona molt propera, la sensibilitat obtinguda per aquests dispositius doblava la d'aquells biosensors amb configuració manual, emprant 28 cops menys enzim. Una possible explicació podria estar en el fet de que la immobilització del material biològic es menys efectiva. Això faria que un major nombre de centres actius estiguessin disponibles per a la catàlisi de la reacció, però alhora, les pèrdues d'enzim des de la matriu cap al si de la solució serien molt més importants. Experimentalment es va comprovar que un cop finalitzat el calibrat es detectaven pèrdues de material (*leaking*), pèrdues però, que no eren prou importants com per afectar significativament la determinació de l'analit d'interès en un calibrat. Això impossibilitaria una reutilització dels dispositius d'anàlisi, tot i que, donada les característiques dels biosensors desenvolupats (*disposable* o d'un sol ús), no suposaven cap inconvenient.

El temps de resposta dels biosensors de capes impreses, a més, fou inferior als temps de les dues altres configuracions.

En la taula es representen els paràmetres obtinguts mitjançant ambdues configuracions.

Taula 4.9 Paràmetres característics de biosensors BChE o AChE (32 % de grafit) desenvolupats mitjançant configuracions manual i de múltiple capa, a partir de calibracions de tiocolina realitzades en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV.

Configuració	Manual		Múltiple capa
	Biosensor AChE	Biosensor BChE	Biosensor BChE
Interval lineal	1-80 μ M	6-96 μ M	10-100 μ M
Sensibilitat	8 mA/M	2 mA/M	4 mA/M
DSR*	6	5	8
Càrrega enzimàtica	0.28 mg	0.28 mg	0.01 mg

*DSR (desviació estàndard relativa en % per n=9)

Les desviacions estàndard relatives (DSR), i que podem associar a la reproductibilitat, trobades en els biosensors que pertanyen aquesta darrera configuració eren superiors a les dels dispositius amb configuració manual, contràriament al que podríem pensar, ja que teòricament els processos automàtics porten associat un menor error que els manuals. Malauradament, la impressió serigràfica de biosensors no es troba plenament automatitzada, i encara implica una component manual que fa disminuir la reproductibilitat dels sensors. Tot i això, es va comprovar com era possible la construcció de dispositius utilitzant tècniques de fabricació massiva, i per tant era plausible una futura aplicació en l'anàlisi de pesticides mitjançant aquests dispositius (capítol 5).

4.6 BIOSENSORS BASATS EN BIOCÒMPÒSITS

Recordem que sota aquesta configuració la construcció dels dispositius es realitzava en un sol pas, mitjançant la immobilització de l'enzim en una matriu polimèrica que conté grafit (monocapa biològica conductora).

4.6.1 Activació del biosensor

Anteriorment havíem vist que els transductors requerien una activació electroquímica prèvia a les calibracions. En el cas dels biocòmpòsits, és de suposar que es requerirà un procés semblant, tot i que en aquest cas, l'activació electroquímica es realitza en presència de l'enzim, i per tant, són necessàries unes condicions més suaus, ja que quan es portava el potencial a 1.6 V l'enzim semblava desnaturalitzar-se. Mesures anteriors amb transductors sense enzim ens van fer veure que si disminuïem el potencial al que sotmetíem l'elèctrode fins a 1.1 V, i alhora augmentàvem el temps d'activació, aconseguíem intensitats de corrent de fins a un 80 % del que obtindríem a un potencial d'1.6 V, i per tant una activació de la superfície del transductor acceptable. Així doncs, es va procedir a activar els biosensors a 1.1 V, potencial que no alterava les propietats catalítiques de l'enzim.

4.6.2 Potencial òptim de treball

El mètode més emprat per la determinació del potencial òptim de treball, és la tècnica de la voltamperometria lineal, on s'aplica un escombrat de potencial i s'observa la zona on s'obté l'augment de la intensitat corresponent a l'oxidació de l'espècie electroactiva d'interès.

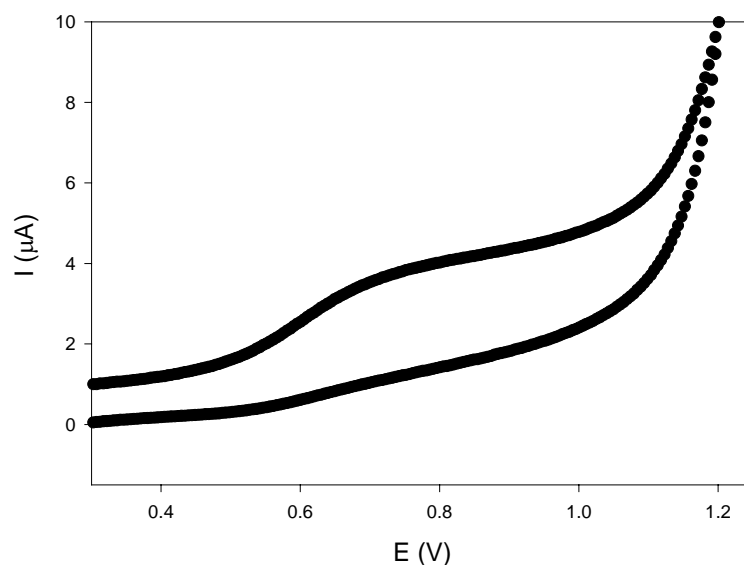


Figura 4.17 Voltamperograma lineal d'un biosensor basat en biocompòsit epoxi-grafit-BChE (77.05, 20 i 2.95 % respectivament). L'electrolit suport, en el primer cas, és una solució 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.0). En el segon, s'afegeix BTChCl a l'electrolit, amb una concentració final de 10^{-3} M. Velocitat d'escombrat 0.05 V/s.

En la figura 4.17, es distingeix el replà (*o plateau*) característic de l'oxidació de BTChCl a 700 mV, que coincideix en els potencials d'oxidació trobats per la tiocolina en configuracions anàlogues per a materials similars^{15,9}. A partir d'aquests resultats s'escull aquest potencial com l'òptim per realitzar les mesures posteriors.

4.6.3 Contingut d'enzim en el biocompòsit

Es varen provar diversos continguts d'enzim dins el biocompòsit (amb un 32% de grafit), i es varen avaluar les seves respostes mitjançant calibracions amperomètriques. Per l'enzim BChE, es prepararen diferents formulacions detallades en la taula 4.10.

Aquells biosensors que contenien un baix nombre d'unitats enzimàtiques (inferior a 50) no mostraven cap tipus de resposta, a diferència d'altres configuracions (§4.4 i §4.5) on tot i que la sensibilitat era relativament baixa, s'obtenia una bona resposta. A més, el pendent obtingut en aquells biocompòsits amb càrregues enzimàtiques superiors fou també inferior a les sensibilitats aconseguides amb altres configuracions. Aquest comportament podria significar que o bé el biocompòsit preparat no era prou conductor, o bé l'enzim quedava parcialment alterat dins la matriu.

Taula 4.10 Composicions d'enzims ChE en el biocompòsit, per a biosensors calibrats en una solució 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.0) afegint volums coneguts d'una solució estàndard de BTChCl. Els valors del pendent expressat es refereixen a les corbes de calibració $I = K [TCh]$. E aplicat = 700mV, preactivació a 1100 mV.

Tipus d'enzim	BChE sèrum de cavall	BChE sèrum de cavall	BChE sèrum de cavall	BChE de plasma humà	AChE d'anguila elèctrica	AChE d'anguila elèctrica
Activitat de l'enzim	8.7 U/mg	8.7 U/mg	8.7 U/mg	100 U/mg	480 U/mg	480 U/mg
% d'enzim en el biocompòsit*	0.4	1	3	0.3	0.1	1
Activitat per g de biocompòsit*	35 U	87 U	261 U	300 U	480 U	4800 U
Pendent (K) ($\mu A/M$)	38	47	50	133	40	500
Limit superior resp.lineal (mM)	2	3	4	6	0.3	0.5

* pasta d'impressió preparada (es podien preparar uns 20 biosensors per cada g de pasta)

Per a verificar-ho, es va avaluar el seu comportament com a transductor, afegint addicions de l'espècie electroactiva $K_4[Fe(CN)_6]$ o BTChCl en presència d'enzim lliure en solució. En ambdós casos el biosensor respongué perfectament i, per tant, sembla ser que l'enzim patia algun tipus d'alteració en el si de la matriu polimèrica. Tot i això, s'observà una disminució en el pendent del 25% respecte els transductors de grafit (32%) fabricats anteriorment (§3.5.2), degut a la presència d'enzim i que d'alguna forma semblen restar conductivitat al dispositiu. A això se li sumava el fet de que la preactivació electroquímica es duia a terme a potencials més baixos, que provocaven una menor intensitat en el senyal de resposta.

Es va observar finalment, que els biosensors preparats amb un percentatge de grafit inferior al 30% mostraren sensibilitats pràcticament negligibles. La RSD trobada (8% per $n=5$, pels dispositius amb 1% de BChE), doblà la dels transductors desenvolupats, posant de manifest que el material biològic no tan sols disminuïa les propietats conductores del dispositiu sinó que, a més, n'empitjorava la reproductibilitat.

Es va escollir com a composició òptima, en el cas de biosensors de BChE, 1% d'enzim (87 U/g de biocompòsit). Continguts més alts tan sols provocaven un lleuger increment en el límit superior de resposta lineal i pràcticament no milloraven la sensibilitat del dispositiu. Tot i que la BChE provenint de plasma humà millorava la resposta del biosensor, alhora l'encaria molt. Tot i això es podria tenir en compte en futures investigacions ja que per un mateix contingut d'unitats enzimàtiques la sensibilitat se'n veia doblada.

Els biosensors de AChE, tot i que amb intervals de treball inferiors, mostraren altes sensibilitats (provocat per l'augment en l'activitat enzimàtica). Observant els percentatges d'enzim afegit (en pes) veiem com el pendent resulta 10 vegades superior al dels sensors de BChE. Si ens fixem, però, en l'activitat enzimàtica que realment conté (55 vegades major),

ens adonem que aquestes diferències haurien de ser més grans. Sembla ser doncs, que un augment considerable en l'activitat es veu només lleugerament reflexada en la sensibilitat. Tot i això aquests sensors resultaran molt útils en el posterior anàlisi de pesticides, donat que per la mateixa quantitat d'enzim els pendents resulten majors i, per tant, l'efecte de l'inhibidor es veurà incrementat.

La composició final del biocompòsit fou de 0.3 g del monòmer Epo-tek H77, 0.045 g d'enduridor, 0.165 g de grafit i 0.005 g de BChE (o AChE). La pasta final (de 0.515 g totals) es mesclà amb ciclohexanona per proporcionar la viscositat adequada en el procés d'impresió. Aquestes quantitats foren suficients per a la fabricació de 10 biosensors.

En la taula 4.11 es representen els paràmetres obtinguts mitjançant les diferents configuracions.

Taula 4.11 paràmetres característics de biosensors BChE o AChE (32 % de grafit) desenvolupats mitjançant configuracions manual, de múltiple capa i biocompòsit a partir de calibracions de tiocolina realitzades en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV

Configuració	Manual		Múltiple capa		Biocompòsit	
	Biosensor AChE	Biosensor BChE	Biosensor AChE	Biosensor BChE	Biosensor AChE	Biosensor BChE
Interval lineal (μ M)	1-80	6-96	----	10-100	10-500	10-3000
Sensibilitat (mA/M)	8	2	----	4	0.5	0.05
Càrrega enzim. (mg)*	0.28	0.28	----	0.01	0.28	0.28
Unitat enzim.*	134	2.5	----	0.09	134	2.5

*per biosensor

S'observa com en els biosensors basats en biocompòsits el límit superior de resposta lineal és més gran, tot i que la sensibilitat disminueix quan es compara amb altres configuracions. Hem de tenir en compte, que en el biocompòsit el material biològic no es troba només en la superfície, sinó que està dispers en tot el volum de la matriu i això dificulta el pas de l'anàlisi per arribar a l'enzim. En conseqüència, es forma una menor quantitat d'espècie electroactiva i per tant una disminució del senyal obtingut. Aquesta decreixement de la sensibilitat, va produir un considerable augment de la desviació, fet que va proporcionar errors importants en l'anàlisi de pesticides, tal i com veurem més endavant (capítol 5).

Els biosensors BChE fabricats mitjançant múltiple capa mostren un interval de treball molt proper als dispositius manuals, tot i que la sensibilitat obtinguda doblava la dels darrers, emprant 28 cops menys enzim (el pendent també augmentà quan es realitzaren determinacions de pesticide, tal i com es veurà en el capítol 5). Una possible explicació, com ja s'ha comentat, podria estar en el fet de que la immobilització del material biològic es menys

efectiva, permetent que un major nombre de centres actius estiguessin disponibles per a la catalisi de la reacció. Alhora, però, les pèrdues d'enzim des de la matriu cap al si de la solució serien molt més importants (tal i com es va comprovar experimentalment, un cop finalitzat el calibrat). Sembla ser doncs, que la immobilització amb glutaraldehyd (sota configuració manual), reté de forma més efectiva l'enzim, però per una altra banda, la matriu de HEC i BSA (configuració de capa múltiple; §4.5) aparentment conserva les propietats catalítiques del material biològic de forma més adequada.

Aquestes característiques foren també observades en els estudis posteriors per a l'anàlisi de vins (PART II).

4.7 CONCLUSIONS

1- S'ha comprovat que a partir de biosensors fabricats mitjançant una tecnologia simple i econòmica es poden fer determinacions de butiriltiocolina i acetiltiocolina, que posteriorment ens permetrà l'anàlisi de pesticides.

2- S'han utilitzat tres metodologies diferents per la fabricació de biosensors; **manual**, que consisteix en la deposició de l'enzim sobre el transductor d'epotek i grafit l'enzim (adsorció física) i posteriorment l'addició manual de glutaraldehyd que immobilitza l'enzim mitjançant *cross-linking*, mitjançant configuració de **múltiple capa** on s'immobilitza l'enzim sobre el transductor mitjançant la impressió serigràfica de la capa biològica i per últim sensors basats en **biocompòsits**, mitjançant la incorporació del material biològic directament a la pasta d'impressió durant el procés de fabricació del transductor.

3- La composició òptima per un biosensor manual és de 0.28 mg de BChE (8.7 U/mg sòlid) procedent de sèrum de cavall, immobilitzat amb 4 µl de glutaraldehyd sobre un transductor amb un 32 % de grafit. Composicions amb continguts menors d'enzim han donat bones respostes (tot i que amb sensibilitats menors), i per tant no poden ser menystingudes en un estudi posterior per a la determinació d'inhibidors.

La pasta d'impressió desenvolupada pels biosensors de múltiple capa es basava en 0.25 ml d'una solució tamponada (0.1 M fosfat i 0.1 M KCl a un valor de pH 7.5) amb 0.37 mg d'enzim BChE i glutaraldehyd (1µl al 6.25%), barrejada amb 0.01 g d'HEC (0.5g de dissolució al 2%), 5 mg de BSA i 0.1 g de grafit. Aquesta pasta es va imprimir sobre transductors de grafit (32%).

La composició final del biocompòsit fou de 0.3 g del monòmer Epo-tek H77, 0.045 g d'enduridor, 0.165 g de grafit i 0.005 g de BChE (o AChE). La pasta final es mescla amb ciclohexanona per proporcionar la viscositat adequada en el procés d'impressió.

4- S'ha trobat que el potencial d'oxidació de la tiocolina pels biosensors desenvolupats és de 700 mV, i, per tant, ha estat el potencial de treball escollit.

5- La part transductora del biosensor, tal i com s'havia vist en l'anterior capítol (§3.4), ha de passar per una etapa d'activació electroquímica, en la que es sotmet el transductor a un potencial fix de 1.6 V durant 12 minuts. El biocompòsit es va sotmetre a un potencial de 1.1 V per no malmetre l'enzim.

6- L'immobilització és suficientment forta, perquè les pèrdues d'enzim al llarg d'un calibrat siguin mínimes, i prou estable perquè un biosensor es pugui utilitzar fins a 5 mesos després de la seva construcció conservant pràcticament intactes les seves propietats catalítiques. En els biosensors de múltiple capa, però, les pèrdues de material biològic són més importants, però tot i això l'enzim queda prou retingut per realitzar-se la determinació de forma eficient.

7- L'avaluació dels biosensors de BChE i AChE cal portar-la a terme a un pH 7.5, on la resposta és més estable i la sensibilitat major.

8- La reproductibilitat i homogeneïtat dels sensors enzimàtics procedents d'una mateixa sèrie presenten valors acceptables en llur sensibilitat (al voltant del 9 % d'error). L'error es duplica al comparar biosensors procedents de diferents impressions.

9- L'interval lineal trobat en els biosensors manuals es situa entre 6.3 (± 0.6) i 96 (± 9) μM , i el pendent en $1980 \pm 160 \mu\text{A/M}$. En els dispositius basats en múltiple capa, l'interval lineal és molt proper (10-100 μM) i la sensibilitat es veu doblada, degut a una menor immobilització de l'enzim. En la configuració de biocompòsit, el pendent disminueix considerablement, i com a conseqüència, l'interval de treball s'amplia fins a concentracions de 3 mM.

10- La cinètica de la reacció enzimàtica s'ajusta al model descrit per Michaelis-Menten, tot i que les K_m^{app} trobades pel biosensor de BChE i AChE (4.5 i 1.5 mM respectivament) són superiors als valors en solució, fet que indica la possible existència de barreres difusionals i/o una modificació dels centres actius de l'enzim degut a la immobilització i una disminució de la seva afinitat pel substrat.

Bibliografia

- ¹D. Martorell, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 305
- ²JJ Rippeth, T.D. Gibson, J.P. Hart, I.C. Hartley, G. Nelson, *Analyst* 122 (1997) 1425
- ³A.L. Hart, W.A. Collier, D. Janssen, *Biosens Bioelectr* 12 (1997) 645
- ⁴A. Cagnini, I. Palchetti, I. Lioni, M. Mascini, A.P.F. Turner, *Sensors Actuators*, 24-25 (1995) 85
- ⁵A. Cagnini, I. Palchetti, M. Mascini, A.P.F. Turner, M. Del Carlo, C. Coppi, *Anal. Chim. Acta*, 337 (1997) 315
- ⁶G.A. Evtugyn, H.C. Budnikov, E. B. Nikolskaya, *Analyst* 121 (1996) 1911
- ⁷J. Kulyš, E. J. D'Costa, *Biosens Bioelectr* 6 (1991) 109
- ⁸D. Schomburg, M. Salzmann, (Eds.) *Enzyme Handbook*, Springer-Verlag, GBF, Alemanya, 1991
- ⁹D. Martorell, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta* 290 (1994) 351
- ¹⁰C. Galan, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1996
- ¹¹M.J. Madou, S.R. Morrison, Chemical sensing with solid state devices, *Academic Press*, San Diego, 1989
- ¹²R. M. Ianniello, A.M. Yacynych, *Anal. Chem.* 53 (1981) 2090
- ¹³F.R. Shu, G. Wilson, *Anal. Chem.* 48 (1976) 1679
- ¹⁴P. Skládal, M. Pavlík, M. Fiala, *Anal. Lett.*, 27 (1994) 29
- ¹⁵D. Martorell, *Tesi Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, 1996