

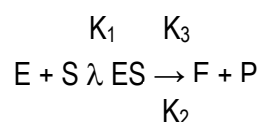
Determinació de pesticides mitjançant biosensors planars basats en la inhibició de colinesterases

En els capítols anteriors, hem vist el disseny i construcció del biosensor, així com l'estudi del seu comportament electroquímic en front la butiril o acetiltiocolina (substrat específic de l'enzim emprat). Per a conèixer i comprendre el funcionament d'un biosensor per a l'anàlisi de pesticides i, sobre tot, el mètode emprat en la seva determinació, es va trobar oportú, fer una breu descripció del mecanisme d'interacció enzim-inhibidor en primer lloc. A continuació es detallaren mètodes per a la determinació de pesticides per inhibició enzimàtica i es descriviren els resultats aconseguits pels biosensors desenvolupats tant en mostres de laboratori com reals.

5.1 INTRODUCCIÓ: INHIBICIÓ ENZIMÀTICA

Els enzims s'enllacen de forma específica als corresponents substrats a través d'interaccions energètiques i físicament complementàries. Això permet als enzims ser absolutament estereoespecífics, ja sigui en la unió al substrat o en la catàlisi de reaccions.

La reacció que catalitzen els enzims per a un sol substrat pot expressar-se de forma general de la següent manera:



On E és l'enzim, S el substrat, ES el complex enzim-substrat, P el producte i K les constants de velocitat.

En un biosensor la resposta selectiva a un substrat determinat ve condicionada pel component biològic. Ara bé, per algunes substàncies d'interès analític, per a les quals el desenvolupament d'un biosensor seria molt útil i indicada, no es coneix el component biològic que proporcioni una resposta directa i específica.

D'altra banda, moltes substàncies alteren l'activitat d'un enzim al combinar-se amb ell de tal forma que afecta la fixació del substrat. Les substàncies que redueixen l'activitat de l'enzim d'aquesta forma s'anomenen inhibidors. Així doncs, si l'analit que interessa mesurar té capacitat d'inhibir algun enzim pot desenvolupar-se un biosensor amb aquest enzim i detectar la presència de l'analit quantificant la pèrdua d'activitat catalítica.

Per tant, emprant un biosensor poden mesurar-se indirectament determinades substàncies seguint la inhibició enzimàtica que són capaces de provocar^{1,2}.

Els inhibidors enzimàtics es divideixen en dues grans classes: reversible i irreversible

5.1.1 Inhibidors reversibles

Trobem tres tipus d'inhibició reversible:

Inhibició competitiva.

L'inhibidor competeix amb el substrat pel seti actiu de l'enzim. Mentre l'inhibidor competitiu ocupi el seti actiu, el substrat no podrà unir-s'hi. Aquests inhibidors sovint són compostos que s'assemblen al substrat, ja que s'uneixen específicament al seti actiu, però es diferencien pel fet de no ser reactius. Es combinen amb l'enzim per a formar un complex EI. Degut a que la inhibició és reversible, la reacció pot desplaçar-se cap a la formació de producte afegint més substrat. Quan la concentració de substrat és elevada la probabilitat de què una molècula inhibidora s'uneixi a l'enzim és mínima, i la reacció mostra una V_{max} normal, tot i que la K_m augmenta.

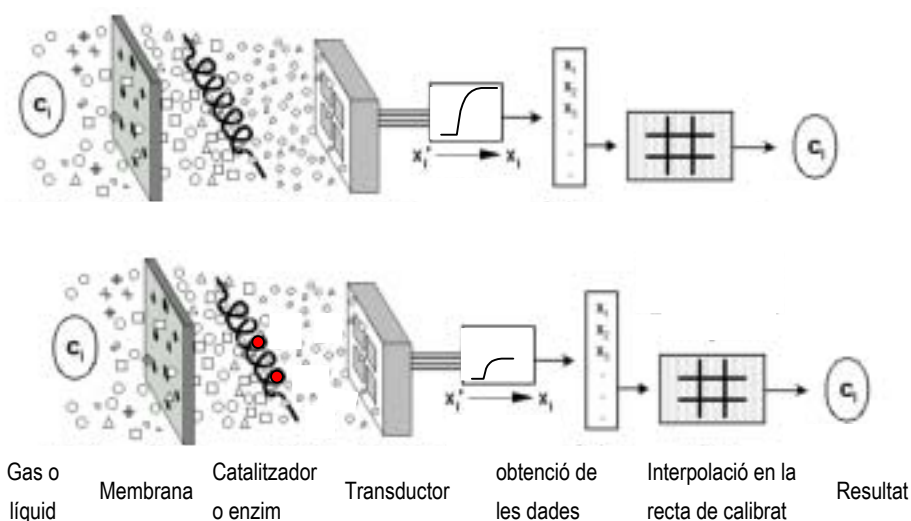
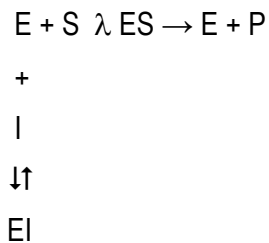


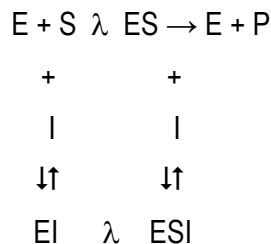
Figura 2.1 Principi general d'un biosensor. En presència de pesticida, l'enzim es bloqueja parcialment, s'origina menys producte electroactiu, i s'obté un senyal menor.

Aquest efecte en la K_m i l'absència d'efecte en la V_{max} és el diagnòstic inequívoc d'una inhibició competitiva.



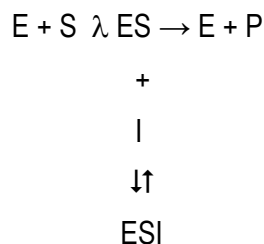
Inhibició no competitiva

Aquest tipus d'inhibició es defineix per a un únic substrat, però a la pràctica només s'ha observat en enzims que tenen dos més substrats. Un inhibidor no competitiu és aquell que s'uneix en un seti diferent al que s'uneix el substrat. L'enzim s'inactiva quan l'inhibidor s'uneix a l'enzim independentment de la presència de substrat. L'inhibidor disminueix la concentració d'enzim actiu i, per tant, la V_{max} disminueix, mentre que l'efecte sobre la K_m és molt petit o inexistent.



Inhibició acompetitiva

Aquest tipus d'inhibició també s'ha observat només en enzims amb dos o més substrats. L'inhibidor també s'uneix en un seti diferent del substrat, però només ho fa si el substrat ja s'ha unit al centre actiu, és a dir, sols s'uneix al complex ES. En la inhibició no competitiva ho feia tant en l'enzim lliure com en el complex ES.



5.1.2 Inhibidors irreversibles. Pesticides

Els inhibidors irreversibles són els que es combinen amb un grup essencial de l'enzim per a la seva activitat o fins i tot el destrueixen. Sovint es forma un enllaç covalent entre un inhibidor i l'enzim. Els inhibidors irreversibles resulten de gran utilitat en l'estudi dels mecanismes de reacció i un exemple en són els pesticides.

Pesticides

En diferents èpoques de la història, s'han produït grans calamitats biològiques que han afectat greument l'activitat agrícola i que en molts països constituïa la font principal de recursos de la població. Aquest fet provocava efectes econòmics i socials devastadors, alhora que augmentava i afavoria el creixement de malalties tant humanes com animals. També es podien originar espècies de plantes o animals indesitjats i que podien causar danys durant la producció, processament, emmagatzament, transport o comercialització dels aliments, de la fusta i els seus derivats. Des de l'antiguetat es coneixien les propietats d'alguns productes per repelir les plagues i les malalties de les plantes.

A partir de la segona meitat del segle passat, la introducció de compostos químics artificials per combatre l'acció de les plagues naturals, va revolucionar l'agricultura. Des d'aleshores, es preparen i s'utilitzen un gran nombre de pesticides, alguns d'ells molt complexos, que permeten augmentar considerablement la productivitat agrícola.

Avui dia s'utilitzen a l'agricultura i per a molts altres propòsits, com la protecció de la salut humana i d'animals, el control de plagues en el medi forestal i aquàtic, la protecció d'edificis i d'altres estructures, etc.

Els pesticides són productes (o mescla d'ells), generalment en forma de formulacions, sintetitzats per a la destrucció, prevenció o control de plagues en les que s'inclouen fongs, insectes, males herbes i en general, les plantes, els animals o els microorganismes que podrien afectar el desenvolupament, el rendiment o la conservació dels productes alimentaris que es conreen. El terme pesticides pot també incloure substàncies usades com a reguladors en el creixement de plantes, defolians, agents per prevenir la caiguda prematura de la fruita i aplicacions químiques als cereals, fins i tot abans o després de la collita per inhibir el deteriorament durant l'emmagatzament o el transport.

Un ampli rang d'insecticides, fungicides, bactericides, i herbicides incloent-hi els fumigants, han esdevingut d'importància en l'agricultura, sobretot en els països desenvolupats, tot i que darrerament comencen a emprar-se àmpliament en els països en vies de desenvolupament. Les pèrdues de cereals a causa de plagues es troben entre el 40 i el 70%³, i es calcula que les pèrdues en les collites es doblarien si els pesticides actuals deixessin d'utilitzar-se.

Taula 5.1

Consum mundial de pesticides		
Àrea	Cost de la producció en milions d'€	%
Amèrica del Nord	4.524	26
Europa Occidental	4.350	25
Àsia	3.828	22
Europa Oriental	1.740	10
Amèrica del Sud	1.566	9
Altres regions	1.392	8
Total	17.400	100

Encara que el paper dels pesticides a l'economia mundial és important (taula 5.1), el seu ús requereix molt de control, ja que només un percentatge molt baix del compost compleix el seu objectiu. Així doncs, és fonamental el coneixement dels mecanismes d'aplicació, transport, degradació, acumulació i persistència dels pesticides a l'ambient.

Els pesticides per si sols poden causar danys en el medi ambient i la salut humana, a banda dels beneficis esmentats. Molts són tòxics i, tenint en compte la utilització a nivell mundial de quantitats cada cop més grans d'aquests compostos, si no es prenen prou precaucions, poden ser perillosos. A més, l'acumulació d'aquests compostos, i l'augment de la seva concentració local, poden provocar interaccions químiques amb altres compostos del medi, cosa que té com a resultat la formació de subproductes que a vegades poden ser més tòxics que els compostos de partida. La interacció del pesticida amb el medi aquàtic té especial consideració ja que és força complexa, i depèn d'una combinació de processos físics, químics i biològics. Pot dissoldre's en aigua, mantenir-se en suspensió, adsorbir-se o acumular-se en organismes vius.

Els pesticides són tòxics per als éssers humans per via oral, per inhalació i per contacte amb la pell. El grau de toxicitat depèn de les característiques, la quantitat i la durada de l'exposició o temps de contacte de cada pesticida.

Els seus efectes poden ser cancerígens, citogènics, desordres en la medul·la òssia, infertilitat, malalties neuronals, i problemes immunològics i respiratoris³. En els darrers anys ha crescut l'interès sobre l'anàlisi de residus de pesticides en els aliments i sobre la contaminació d'aigües que causen les pràctiques de les granges; depenent del tipus de pesticida, el màxim nivell permès per aigües aptes pel consum varia des de 0.3 a 400 $\mu\text{g l}^{-1}$ ⁴. El catàleg de pesticides emprats és molt ampli: com exemple, més de 3000 pesticides tenen una aprovació oficial al Regne Unit. L'ús de organofosforats i carbamats ha augmentat en els darrers 20 anys; en canvi el d'organoclorats ha disminuït enormement en el mateix període.

En general els pesticides es poden classificar en tres grans grups, segons la plaga sobre la qual actuen: insecticides, fungicides i herbicides, tot i que n'hi ha d'altres com els acaricides, raticides, etc.

-Insecticides: substàncies que actuen sobre el sistema respiratori, digestiu o per contacte amb la cutícula i provoquen l'enverinament dels insectes. També s'utilitzen com repelents o atraients d'insectes.

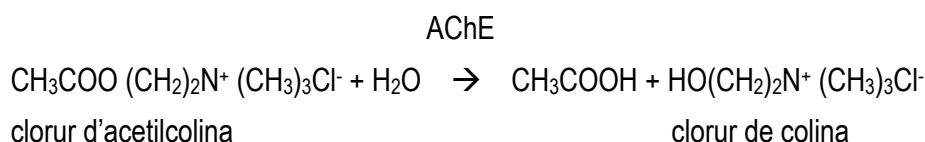
-Fungicides: productes químics utilitzats per lluitar contra les diferents espècies de fongs que ataquen els conreus. També són utilitzats per conservar pells, teixits, paper, productes cosmètics i qualsevol producte que pugui ser atacat pels fongs.

-Herbicides: substàncies químiques capaces de matar les males herbes que redueixen el rendiment dels conreus competint amb elles per la llum solar, l'aigua i els nutrients del sòl.

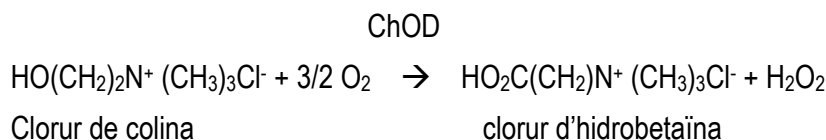
La quantitat de pesticida existent en diverses matrius pot ser determinat per diversos mètodes⁵. La cromatografia de gasos és indubtablement la més usada, i acoblada a un FTIR o a un espectròmetre de masses, en resulta una eina analítica de gran potència. En canvi, degut a la seva labilitat tèrmica, baixa volatilitat i alta polaritat, alguns pesticides es poden perdre, tot i que aquests problemes es poden resoldre mitjançant una cromatografia líquida o electroforesi capilar. En els darrers 15 anys tècniques analítiques immunoquímiques s'han aplicat àmpliament per a la determinació de pesticides, i un dels nous conceptes introduïts per

a l'anàlisi de pesticides ha estat el disseny de biosensors electroquímics, basats principalment en la inhibició de l'activitat d'alguns enzims específics com les colinesterases. Aquesta inhibició s'ha investigat extensament per processos biològics^{6,7}, però la utilitat dels biosensors es pot veure restringida degut al seu temps de vida i a llur sensibilitat.

Les colinesterases actuen en els teixits nerviosos i les cèl·lules sanguínies i juguen un important paper fisiològic com a responsables de la hidròlisi de l'acetilcolina, que és un neurotransmissor en la sinapsi colinèrgica. Llur concentració en el plasma sanguini és un important indicador de les malalties del fetge. La hidròlisi enzimàtica de l'acetilcolina en presència d'acetilcolinesterasa es dona de la següent forma:



Es produeix colina i àcid acètic, i la reacció és inhibida per nombroses espècies com fluorofosfats, carbamats i sals d'arilamoni⁷. Els pesticides organofosforats imiten la forma molecular del substrat d'acetilcolina i poden enllaçar-se irreversiblement als setis actius de l'enzim i inhibir llur activitat⁸. Aquest fet fou emprat per primer cop a finals dels anys 80 per a la determinació electroquímica d'alguns pesticides emprant butirilcolinesterasa⁹. Recentment s'ha posat més atenció en el disseny de biosensors electroquímics implementats per a la detecció de compostos inhibidors de l'activitat de les colinesterases. La detecció electroquímica es pot basar en la mesura del canvi de concentració de l'àcid format en la reacció catalitzada per l'esterasa, anàloga a la reacció mostrada anteriorment per l'AChE. És més sovint, però, la detecció de la colina formada mitjançant una segona reacció enzimàtica en presència de colina oxidasa (ChOD):



en aquest cas, la espècie electroactiva és l'oxigen o el peròxid d'hidrogen, la concentració de la qual és mesurada electroquímicament.

Un altra via per a la determinació d'inhibidors és la substitució del clorur d'acetilcolina, pel clorur d'acetiltiocolina. D'aquesta forma obtenim una espècie electroactiva: la tiocolina, que es mesurada també electroquímicament.

AChE

Acetiltiocolina + H₂O → tiocolina + acetat

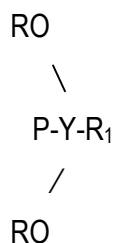
Així mateix, la determinació d'inhibidors també es pot aconseguir en sistemes de flux automatitzat mitjançant detecció espectrofotomètrica¹⁰.

Aplicacions

Els estudis realitzats han demostrat la viabilitat de l'ús dels biosensors per a l'anàlisi de pesticides. L'àmplia aplicació d'aquests dispositius en anàlisis clíniques i mediambientals per a controls de camp suggereixen que podrien adaptar-se de forma anàloga per la determinació i monitorització de pesticides. Aquests sensors podrien servir com alternativa als mètodes cromatogràfics, ja que, tot i que els darrers resulten més versàtils aportant informació sobre nombroses espècies, són molt més cars, requereixen personal molt qualificat i no es poden fer servir en anàlisis de camp. De totes formes, existeixen obstacles que cal superar abans de que els biosensors tinguin un fort impacte en les aplicacions ambientals. Dos dels majors problemes són la falta de robustesa física i química dels biosensors. Els elèctrodes de vidre, però, tot i que no són particularment robustos i requereixen comprovacions regulars i calibracions, són àmpliament usades en una àmplia varietat d'aplicacions ambientals i industrials.

5.1.2.1 Pesticides organofosforats i carbamats

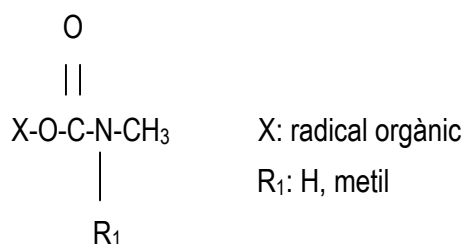
Els pesticides organofosforats i carbamats són inhibidors irreversibles de les colinesterases (acetilcolinesterasa i butirilcolinesterasa). Els organofosforats són derivats de l'àcid fosfòric i els carbamats de l'àcid carbàmic. A continuació es mostra la fórmula general d'aquests pesticides. En els organofosfats l'oxigen lligat al fòsfor amb un doble enllaç pot ser substituït per un sofre obtenint-se un organotionofosfat. L'efecte inhibidor d'aquests tipus de pesticides sobre les colinesterases només es produirà si el S es reemplaçat per un O.

Organofosfats:

Y: O (fosfats), S (tiofosfats)

R: radical orgànic (metil, etil, propil, isopropil, butil)

R₁: radical orgànic que determina el pesticida

Carbamats:

La inhibició de l'enzim es produeix en el centre actiu per una competitivitat entre el substrat i el pesticida. En la reacció d'inhibició es forma en primer lloc un complex enzim-inhibidor a través de l'hidroxil de la serina compresa en el seti actiu, que tot seguit es converteix en una forma fosforilada o carbamilada de l'enzim. Una vegada l'enzim és fosforilat la reacció és irreversible, i l'enzim perd la seva activitat catalítica. La forma carbamilada de l'enzim és reversible pels N-metilcarbamats^{11,12} tanmateix la recuperació de la forma activa pot ser molt lenta.

5.2 DETERMINACIÓ DE PESTICIDES

L'objectiu del present treball és desenvolupar biosensors que puguin determinar inhibidors enzimàtics de forma simple i econòmica. Alguns inhibidors actuen sobre l'enzim acetilcolinesterasa, que es troba en insectes i vertebrats i és responsable d'hidrolitzar el neurotransmissor acetilcolina. La inhibició enzimàtica comporta la ruptura de l'impuls nerviós i la mort del organisme viu. És evident, doncs, la importància de detectar aquests inhibidors entre els que es troben els pesticides organofosforats i carbamats, tal com el paraoxon i el carbofuran, objectius de la nostra anàlisi. Donat el caràcter irreversible de la inhibició, encara resulta més interessant el fet de dissenyar elèctrodes d'un sol ús, i és en aquest sentit cap on es varen encaminar els nostres esforços.

Mitjançant el biosensor desenvolupat (capítol 4) es poden detectar inhibidors de les colinesterases, tal com pesticides. La inhibició de l'enzim es produeix en el seu centre actiu per competitivitat entre el substrat i el pesticida, i fa que el senyal disminueixi. Aquesta disminució es pot associar a la quantitat d'inhibidor present en el medi.

Per a la determinació d'inhibidors de les colinesterases es poden seguir dues metodologies: una de directa i una altra d'indirecta. La primera es produeix en presència de substrat i la segona sense (§§ 5.2.1 i 5.2.2). En el mètode directe, s'usa la inhibició relativa d'acord amb el procediment desenvolupat per Skladal^{13,14}.

Per a la determinació dels pesticides estudiats (paraoxon i carbofuran) emprarem la determinació indirecta. El mètode més habitual és el càlcul del percentatge d'inhibició^{15,16}, tot i que es pot calcular la concentració de pesticida per ambdós mètodes; percentatge d'inhibició i inhibició relativa.

5.2.1 Velocitat d'inhibició relativa

Per a la determinació de pesticides seguint aquest mètode, es submergeix el biosensor en la solució de treball. Quan el corrent de fons és estable s'addiciona una quantitat coneguda de substrat. La intensitat augmenta ràpidament i un cop s'assoleix l'estat estacionari (I_{ee}), s'afegeixen les mostres de pesticida i, atès que pot trigar molt temps en assolir de nou l'estat estacionari, es mesura la velocitat de disminució de la intensitat (dI/dt). D'aquesta forma hom mesura la inhibició relativa (RI) emprant la següent equació:

$$RI = dI/dt / I_{ee}$$

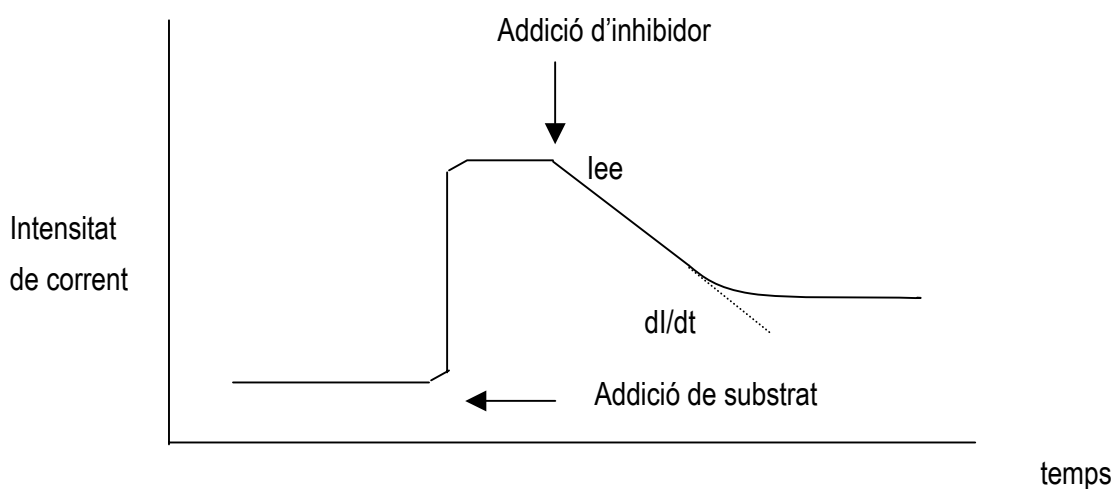


Figura 5.1 Esquema de la determinació directa d'inhibidor en presència de substrat mitjançant la determinació de la velocitat d'inhibició relativa (RI).

5.2.2 Percentatge d'inhibició

Per a la determinació de pesticides seguint aquest mètode, cal fer dues determinacions consecutives d'activitat enzimàtica, la primera sense cap contacte previ per part del biosensor amb el pesticida, i la segona amb una incubació de l'elèctrode, submergint-lo en una solució que contingui el pesticida per inhibir l'enzim.

Es segueix el procediment habitual per a determinar l'activitat enzimàtica: i) es submergeix el biosensor en una solució tamponada en agitació, i quan s'obté una intensitat residual estable s'addiciona un volum d'una solució d'una concentració perfectament coneguda de substrat. La intensitat de corrent assolida ens dóna l'estat estacionari (I_{ee}) corresponent a l'activitat enzimàtica (sensibilitat) del biosensor sense presència d'inhibidor. ii) Posteriorment, en una experiència a part, s'afegeix una determinada quantitat de pesticida sobre el biosensor, de forma que es dipositi exactament sobre la zona on hem immobilitzat l'enzim. Un alternativa és col·locar el biosensor en una solució tampó que conté pesticida, i que es mantingui submergit un temps determinat (temps d'incubació). Ambdós mètodes es van provar. iii) es procedeix de nou com en i) i s'obté un estat estacionari a una intensitat inferior (I_p) per efecte de la inhibició figura 5.2 Això ens permet calcular el percentatge d'inhibició expressat de la següent manera:

$$I \% = (I_{ee} - I_p) \times 100 / I_{ee}$$

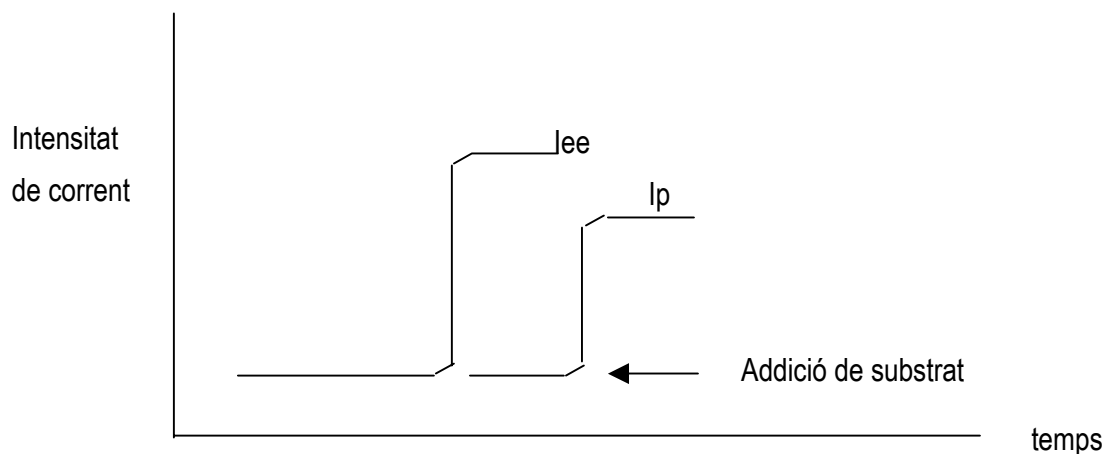


Figura 5.2 Esquema de la determinació indirecta d'inhibidor. S'efectuen dues mesures de l'activitat, en la segona (I_p) hi ha una incubació prèvia en presència de l'inhibidor

5.3 DETECCIÓ DE PESTICIDES MITJANÇANT BIOSENSORS AMB CONFIGURACIÓ DE DEPOSICIÓ MANUAL

Els estudis preliminars per a la determinació de pesticides foren realitzats emprant el biosensor de configuració manual, es a dir, aquells dispositius on el transductor havia estat imprès de forma serigràfica i l'enzim mitjançant tècniques manuals. El procediment seguit per aquest biosensor fou seguit posteriorment i de forma totalment anàloga pels dispositius de les altres dues configuracions (capa múltiple per screen printing i biocompòsit) en les determinacions d'inhibidor (§ 5.4).

5.3.1 Efecte de la càrrega enzimàtica en el biosensor per a la detecció de pesticides

5.3.1.1 Determinació de paraoxon

Es van realitzar diverses experiències seguint el mètode de la determinació pel percentatge d'inhibició en les que es va determinar la resposta de biosensors amb diferents continguts d'enzim. Inicialment es va suposar que amb càrregues enzimàtiques menors s'obtidria una major sensibilitat en la determinació de pesticides, ja que per la mateixa quantitat d'inhibidor un major % de centres actius es veurien afectats.

Quan seguim la reacció d'hidròlisi de la butiriltiocolina, l'enzim transforma aquesta espècie a tiocolina. Aquest producte és electroactiu i s'oxida a 700 mV sobre la superfície del sensor (§ 4.3.2). El senyal mesurat és proporcional a la quantitat de espècie electroactiva. En presència de pesticides l'enzim s'inhibeix i per tant la resposta decreix. Si la quantitat d'enzim és menor, per la mateixa concentració de substrat, la diferència entre ambdues respostes (amb inhibidor i sense) augmentarà.

Pel pesticide paraoxon es provaren tres composicions: 0.28 mg, 0.22 mg i 0.112 mg d'enzim BChE (8.7 U/mg) per sensor, donat que eren les formulacions que millor resultat havien mostrat en les proves prèvies i 0.008 mg d'enzim AChE (480 U/mg) per sensor (§ 4.4.3.1).

Pel pesticide carbofuran es va avaluar el biosensor de BChE amb una composició de 0.112 mg d'enzim per sensor.

Biosensor de BChE

Pels biosensors amb 0.28 mg de BChE l'interval escollit per la determinació de pesticides es situa entre 1×10^{-5} i 1.5×10^{-8} . Concentracions majors inhibeixen totalment l'enzim, i menors realitzen efectes inapreciables sobre els centres actius de l'enzim.

Es varen realitzar diversos calibrats per concentracions de pesticida diferents (figura 5.3) i s'apreciava clarament l'efecte del paraoxon sobre els biosensors desenvolupats.

Veiem com en augmentar la concentració del pesticida organofosforat, la sensibilitat dels biosensors va disminuint. Aquesta relació ens servirà per obtenir diverses rectes de calibrat del pesticida per a diferents concentracions de substrat afegit (figura 5.5). En la figura 5.4 veiem el resultat de fer la mitjana de tots ells.

És possible, doncs, establir una relació lineal entre el percentatge d'inhibició i el logaritme de la concentració de pesticida, i per tant obtenir una recta de calibrat que ens permetrà determinar concentracions desconegudes de paraoxon en aquest interval (1×10^{-5} - 1×10^{-8}).

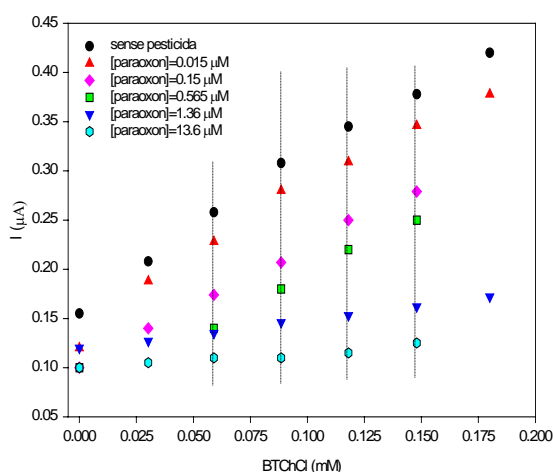


Figura 5.3 Rectes de calibració de biosensors amb un compost de 32 % de grafit, i 0.28 mg de BChE immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor, addicionant BTCh Cl per diverses concentracions de paraoxon, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5).

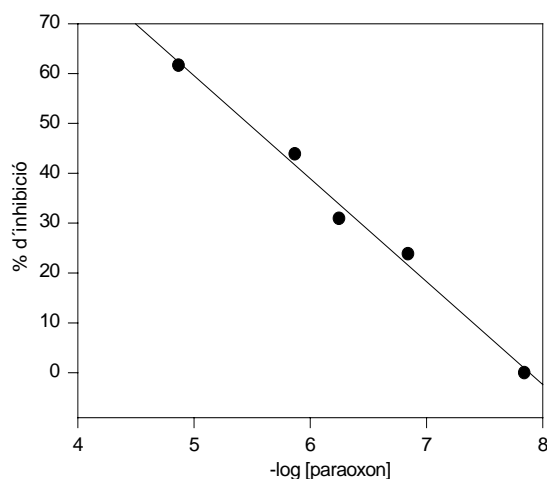


Figura 5.4 Recta de calibració de pesticides. Les dades corresponen a les de la figura 5.3. Cada punt experimental és la mitjana de cinc determinacions. Sensibilitat: -20.66. Coeficient de regressió:0.991

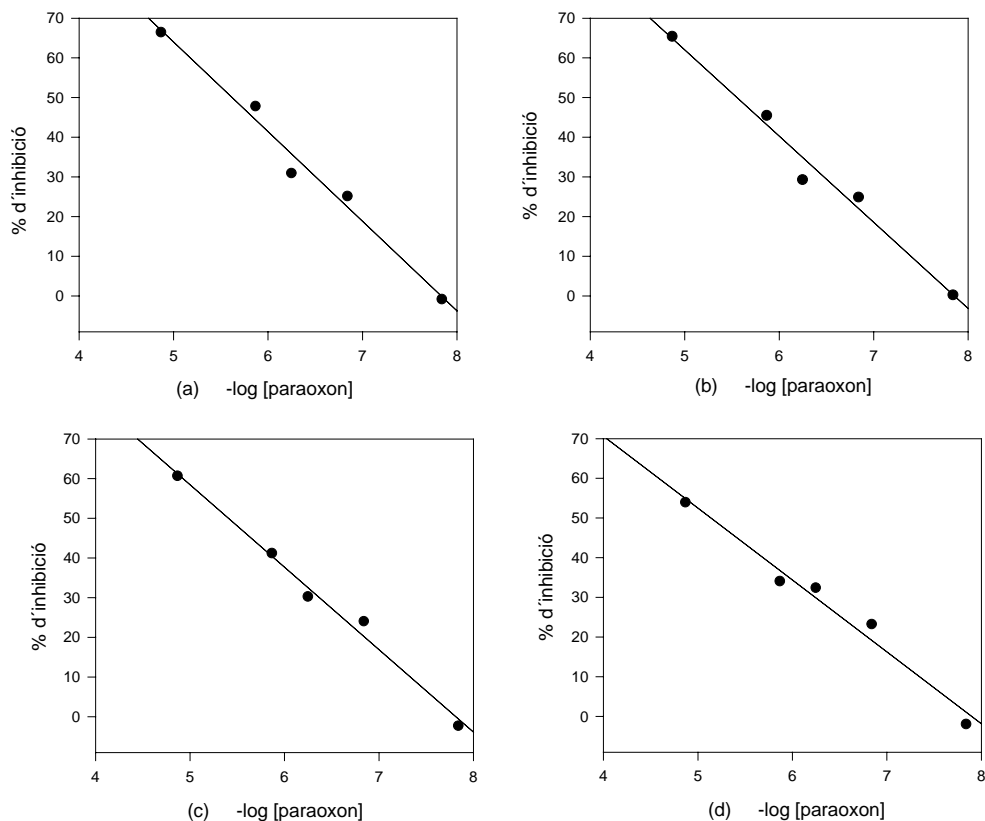


Figura 5.5 Rectes de calibracions de pesticides, utilitzant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.28 mg de BChE immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor, per diferents concentracions de BTChCl: (a) 1.48×10^{-4} M (b) 1.18×10^{-4} M (c) 8.85×10^{-5} M (d) 5.9×10^{-5} M, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5).

En posteriors experiències es varen avaluar biosensors amb la mateixa composició de grafit i glutaraldehid, però variant la càrrega enzimàtica de 0.28 mg de Butiril Colinesterasa a 0.22 mg de BChE.

Les mesures realitzades demostraren que els resultats són força propers; s'observen, però, diferències quan es comparen els percentatges d'inhibició d'ambdós biosensors en veure's sotmès a concentracions de pesticida iguals. El biosensor amb un 0.22 mg d'enzim s'inhibeix més, ja que la relació enzim-pesticida és menor, i per tant es veu més afectat (figura 5.6 i 5.7).

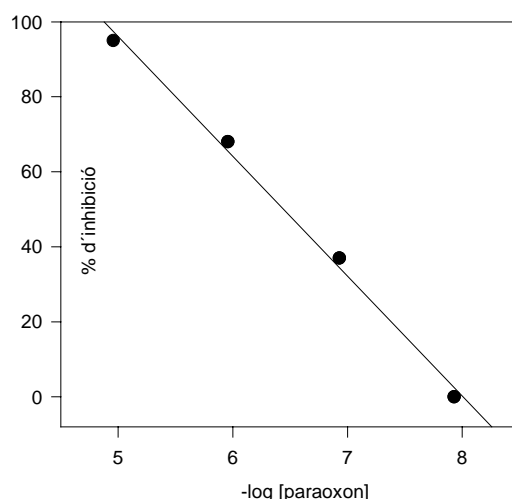
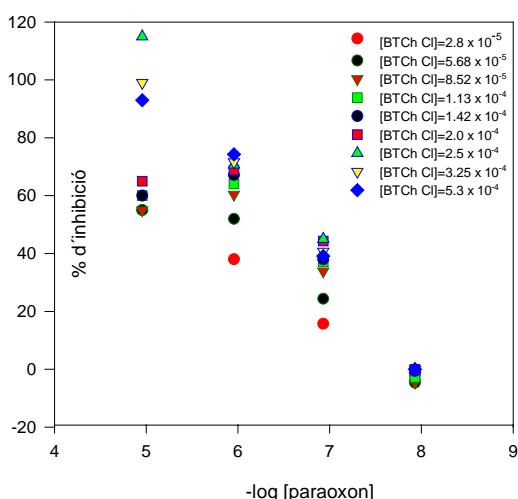
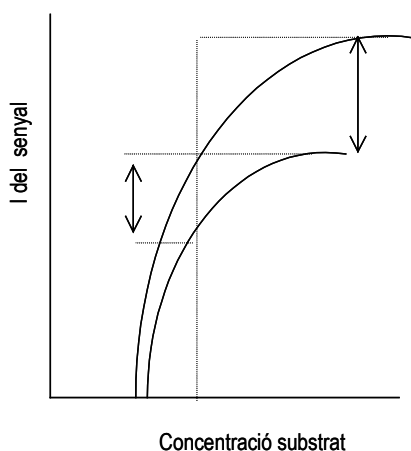


Figura 5.6 Rectes de calibració de paraoxon, emprant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.22 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor, per diverses concentracions (M) de BTChCl, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5).

Figura 5.7 Recta de calibració de paraoxon. Les dades corresponen a les de la figura 5.6. Cada punt experimental és la mitjana de nou determinacions. Sensibilitat: -31.95 % / dec. Coeficient de regressió: 0.995

També s'observa una major dispersió en els punts (sobretot per altes concentracions de pesticida), i per tant, d'un augment de l'error. Aquesta dispersió s'associa, a més, a la concentració de substrat (BTChCl) utilitzada ja que a concentracions majors de BTChCl els pendents semblen ser lleugerament superiors. Aquest fet es podria explicar a partir de les corbes de saturació de l'enzim: sembla lògic pensar que quan treballem en concentracions properes a la zona de saturació, si inhibim (o disminuïm la concentració) de l'enzim, les diferències hauran de ser majors que en les zones més baixes; si les diferències s'incrementen, els percentatges d'inhibició seran superiors, tal i com s'indica en el dibuix.



Per tal de comprovar que la disminució del senyal és degut únicament a l'acció del pesticida, posteriorment al primer calibrat s'han realitzat duplicats (en absència de pesticides). Es va observar que quan no s'afegeixen inhibidors la resposta es manté constant i per tant la pèrdua del senyal s'associa només a la inhibició de l'enzim, i no al *leaking* (pèrdua de l'enzim cap al si de la solució).

Finalment, s'avaluà un biosensor amb la mateixa composició de grafit i glutaraldehyd, però variant la càrrega enzimàtica de 0.22 mg de BChE a 0.112mg de BChE. Els resultats es mostren en la figura 5.8

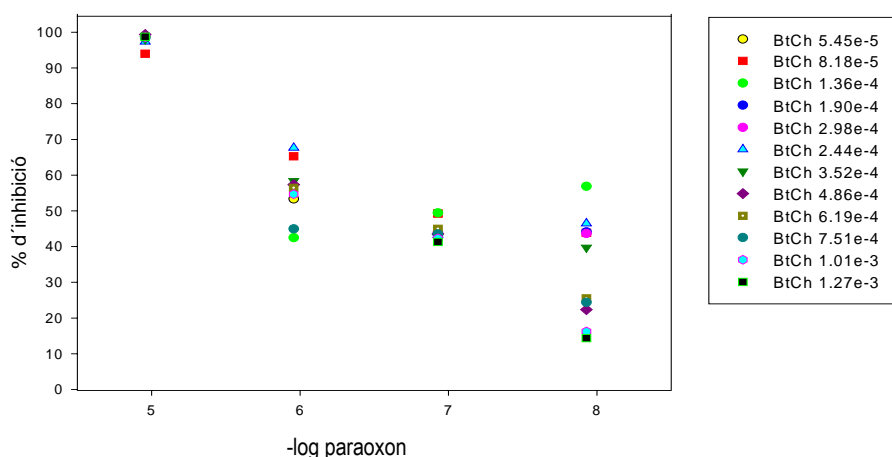


Figura 5.8 Rectes de calibracions de pesticides, utilitzant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehyd al 6.25 % sobre la superfície del sensor, per diverses concentracions de BTCh Cl , en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5).

El fet de disminuir la càrrega enzimàtica s'ha traduït en un augment de la dispersió dels resultats, tal i com havia succeït anteriorment.

Tot i això, s'ha de destacar el fet de que s'han detectat inhibicions majors per la mateixa concentració de pesticida, es a dir, el canvi en el senyal (disminució) entre els dos calibrats ha augmentat. Això pot portar a deteccions de paraoxon menors, i per tant a disminuir el límit de detecció, si aconseguim disminuir aquesta dispersió.

Per la mateixa composició d'enzim, grafit i glutaraldehyd, es va avaluar un altre tipus d'incubació. Fins ara, el contacte enzim-pesticida es produïa en submergir el biosensor en una solució amb una concentració determinada d'inhibidor. En la bibliografia, però, veiem que la majoria d'autors realitzen les seves experiències afegint una gota sobre la superfície del sensor, en comptes de submergir el biosensor.

Es va provar aquest mètode, amb els següents resultats (figura 5.9 i 5.10):

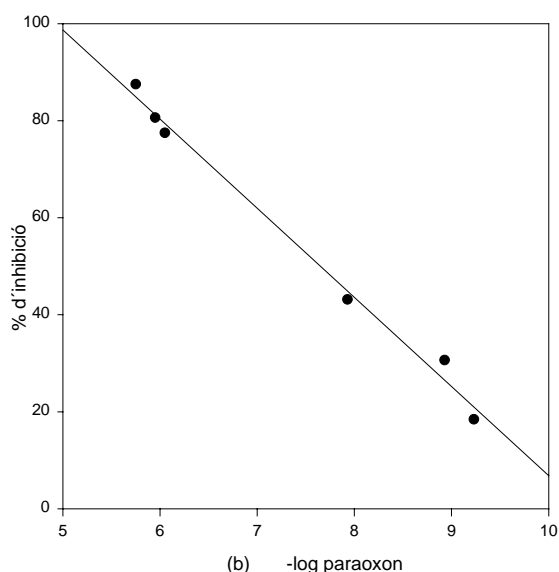
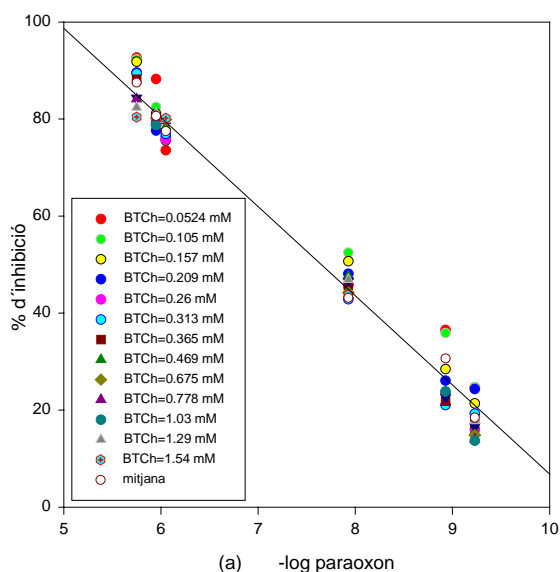


Figura 5.9 Rectes de calibració de paraoxon, emprant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor, per diverses concentracions de BTChCl, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). Es deposita una gota de la mostra amb pesticide sobre el biosensor (incubació mitjançant gota).

Figura 5.10 Recta de calibració de paraoxon. Les dades corresponen a les de la figura 5.9. Cada punt experimental és la mitjana de 13 determinacions. El contacte del biosensor amb la solució de pesticide (incubació), es produeix mitjançant la deposició d'una gota de mostra sobre la superfície del biosensor. Sensibilitat: -18.37 %/dec. Coeficient de regressió: 0.992

S'observa un augment del rang lineal (es detecten inhibicions de fins 6×10^{-10} M de paraoxon, quan anteriorment el límit es trobava en 10^{-8} M) i els resultats mostren desviacions menors.

Es posa de manifest, doncs, la importància en la forma d'incubar, ja que els resultats han millorat considerablement. Sembla ser, doncs, que l'acció del pesticide disminueix si la interacció amb l'enzim es produeix en un volum gran de solució agitada, ja que per les mateixa concentració de paraoxon, el biosensor s'inhibeix més al incubar-se per gota.

La disminució en la dispersió dels resultats, podria ser originada pel *leaking* que es produeix en submergir el biosensor en el tampó. Una petita quantitat d'enzim podria desprendre's cap al si de la solució, fet que no es produeix si realitzem l'incubació mitjançant la deposició d'una gota sobre la superfície del sensor.

Els resultats es presenten en la taula 5.2.

Taula 5.2 Dades obtingudes a partir dels calibrats de paraoxon realitzats. Les condicions experimentals són les descrites en les gràfiques 5.2 – 5.10.

BChE (8.7 U/mg) (mg per biosensor)	Nombre de determinacions	Sensibilitat (% d'inhibició/ dècada)	Interval lineal (-log C)	Coefficient de regressió lineal
0.28	5	-20.66	5 – 8	0.991
0.22	9	-31.95	5 – 8	0.995
0.112 *	13	-18.37	5.5 – 9.2	0.992

* : incubació mitjançant deposició per gota

Biosensor de AChE

Pels biosensors d'AChE s'avaluà la resposta en front la inhibició per una única composició: 32% de grafit, 0.008 mg d'enzim i 6.25 % de glutaraldehid (figures 5.11 i 5.12).

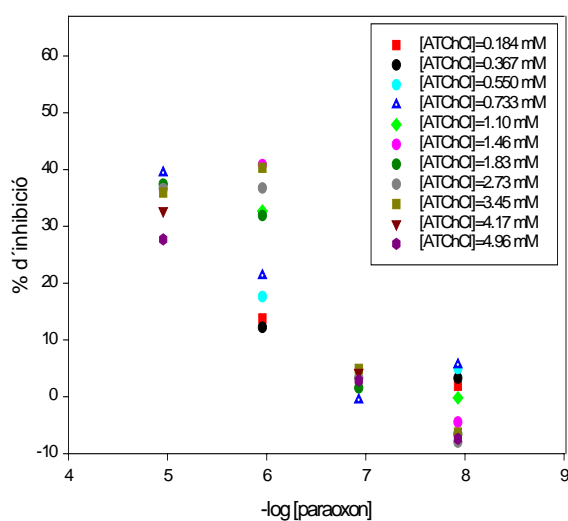


Figura 5.11 Rectes de calibració de paraoxon, emprant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.008 mg d'AChE (480 U/mg) immobilitzada amb 4 μ l d'una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor, per diverses concentracions de ATChCl, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5).

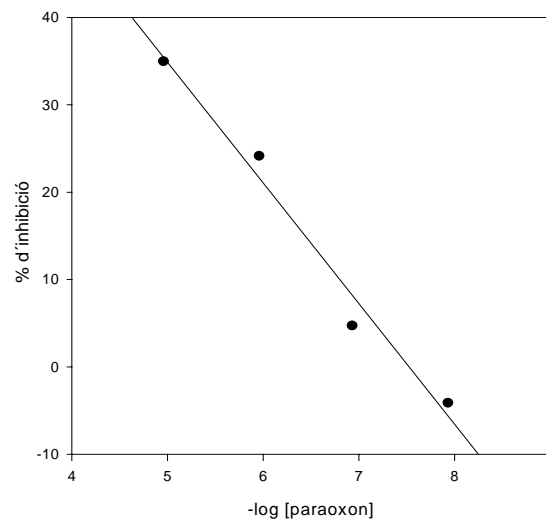


Figura 5.12 Recta de calibració de paraoxon. Les dades corresponen a les de la figura 5.4.9. Cada punt experimental és la mitjana de 11 determinacions. Sensibilitat: -13.81 % / dec. Coeficient de regressió: 0.990

Veiem com la dispersió dels resultats augmenta considerablement quan treballem amb càrregues enzimàtiques cada cop més petites. A més a més, no s'ha aconseguit baixar el límit de detecció del paraoxon, i per tant no s'han obtingut cap tipus d'avantatge amb aquesta nova formulació. Tot sembla indicar, que l'enzim AChE en aquest tipus de configuració, es veu poc inhibit en presència del inhibidor esmentat.

En la taula següent (5.3) s'adjunten les dades extretes de les gràfiques, en la que es pot veure com disminueix la sensibilitat del biosensor de AChE respecte al de BChE, i, per tant, com el pesticida té menor efecte sobre l'enzim, tal i com s'havia comentat anteriorment.

Taula 5.3 Dades obtingudes a partir dels calibrats de paraoxon realitzats. Les condicions experimentals són les descrites en les gràfiques 5.11 i 5.12.

AChE (480 U/mg) (mg per biosensor)	Nombre de determinacions	Sensibilitat (% d'inhibició/ dècada)	Interval lineal (-log C)	Coefficient de regressió lineal
0.008	11	-13.81	5 – 8	0.990

5.3.1.2 Determinació de carbofuran

Per a la determinació de carbofuran, s'han emprat biosensors amb una única formulació: 32% de grafit, 0.112 mg de BChE i 6.25 % de glutaraldehyd, ja que són els que millors resultats han proporcionat.

En les figures 5.13 i 5.14 es mostren les rectes de calibrat obtingudes.

El coeficient de regressió ha millorat, i sobretot el límit de detecció que ja ha baixat fins 2×10^{-10} M. Sembla ser doncs, que per l'enzim BChE, la capacitat inhibidora del carbofuran és superior quan ens trobem en zones de concentració de pesticida molt baixes, es a dir, dins d'un interval de concentració, el biosensor té més sensibilitat pel paraoxon (s'inhibeix més per la mateixa concentració de pesticida), però per sota d'una determinada concentració, el biosensor es veu més afectat pel carbofuran. El fet de baixar el pendent fa estendre l'interval lineal, no tan sols en el límits de detecció inferior sinó que també el superior ha experimentat una millora.

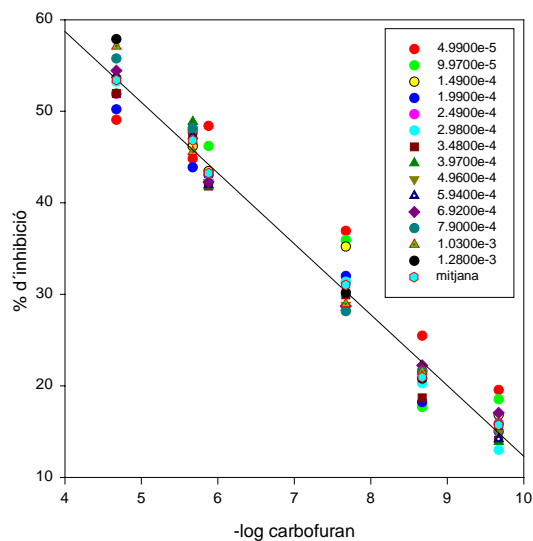


Figura 5.13 Rectes de calibració de carbofuran, emprant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehyd al 6.25 % sobre la superfície del sensor, per diverses concentracions de BTCh Cl, en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5).

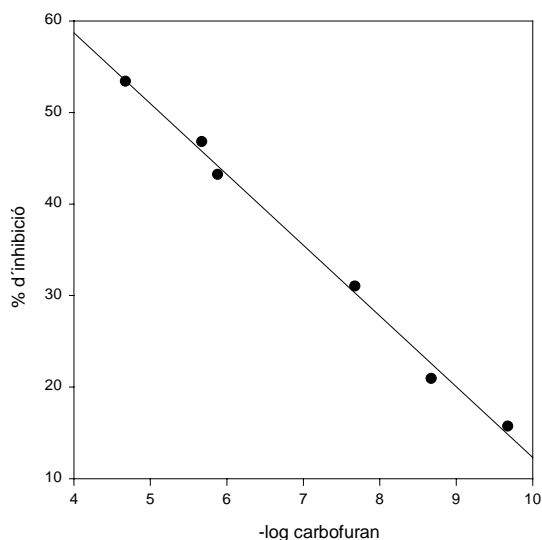


Figura 5.14 Recta de calibració de carbofuran. Les dades corresponen a les de la figura 5.12. Cada punt experimental correspon a la mitjana de 14 determinacions. Sensibilitat: -7.73% / dec. Coeficient de regressió:0.995

Així mateix també s'observa que la concentració de substrat que provoca el senyal mesurable influeix molt poc en els resultats finals. Per concentracions compreses entre 1×10^{-5} i 1×10^{-3} les dades obtingudes són molt semblants, i no s'aprecia cap millora en cap dels paràmetres característics de la recta de calibrat.

En la taula 5.4, es mostren els resultats aconseguits per la calibració de carbofuran. Si comparem la sensibilitat d'aquests biosensors (amb 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE immobilitzada amb una solució de glutaraldehyd al 6.25 % sobre la superfície del sensor) amb uns biosensors amb idèntica composició calibrats amb paraoxó (taula 5.2), observem una disminució del 58 % en el pendent. Es fa evident doncs, com el carbofurà inhibeix menys a l'enzim BChE que el paraoxó, tot i que permet detectar concentracions més baixes.

Taula 5.4 Dades obtingudes a partir dels calibrats de carbofuran realitzats. Les condicions experimentals són les descrites en les gràfiques 5.12 i 5.13.

BChE (8.7 U/mg) (mg per biosensor)	Nombre de determinacions	Sensibilitat (% d'inhibició/ dècada)	Interval lineal (-log C)	Coefficient de regressió lineal
0.112	14	-7.73	4.75 – 9.75	0.995

5.4 DETECCIÓ DE PESTICIDES EN CONFIGURACIONS DE MÚLTIPLE CAPA I BIOCOMPÒSIT

De forma totalment anàloga a la descrita pels biosensors amb configuració manual, es varen realitzar determinacions en les configuracions de múltiple capa i biocompòsit. En la taula 5.5 es poden observar de forma esquematitzada els resultats aconseguits.

Taula 5.5 Paràmetres característics de biosensors BChE o AChE (32% de grafit) desenvolupats mitjançant configuracions manual, 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
Sensibilitat						
Tiocolina (mA/M)	8	2	----	4	0.5	0.05
Carbofuran (%/dec)	----	-8	----	-12	----	----
Paraoxon (%/dec)	-14	-18	----	-23	-8	-5
Càrrega enzim. (mg)	0.008	0.28 ⁱ / 0.12 ⁱⁱ		0.01	0.28	0.28

i: determinació de tiocolina ii: determinació de pesticides

S'observa com els dispositius basats en biocompòsits són els menys sensibles (tant en calibrats de tiocolina com de pesticides), amb pendents del 8% i 5% per dècada per biosensors de AChE i BChE respectivament. Per concentracions de paraoxon per sota de 10^{-9} M l'enzim no s'inhibia.

Una possible explicació d'aquest fet ja s'havia apuntant prèviament: en el biocompòsit el material biològic no es troba tan sols en la superfície, sinó que està dispers en tot el volum de la matriu i això no sols dificulta el pas de l'analit per arribar a l'enzim sinó també als propis inhibidors. En conseqüència, els temps d'incubació aplicats en les altres configuracions, resulten insuficients en aquests dispositius.

Els biosensors BChE fabricats mitjançant múltiple capa mostren sensibilitat superiors, emprant a més una menor càrrega enzimàtica (aquestes diferències es poden apreciar de forma més visual observant la gràfica). Una possible explicació, com ja s'ha comentat, podria estar en el fet de que la immobilització del material biològic es menys agressiva, permetent que un major nombre de centres actius estiguessin disponibles, no tan sols per a la catàlisi de la reacció, sinó per a la inhibició per part dels pesticides. Alhora, però, es va comprovar experimentalment que les pèrdues d'enzim des de la matriu cap al si de la solució foren molt més importants, i que per tant podrien contribuir a un augment en l'error de l'anàlisi si aquest no es produïa en un temps prou reduït. Per una altra banda, el límit de detecció trobat tant per aquesta configuració com pels sensors basats en biocompòsits (1×10^{-9} M i 1.5×10^{-9} M

respectivament) fou inferior als dispositius manuals i s'observà una menor reproductibilitat (taula 5.6).

Taula 5.6 Paràmetres característics de biosensors BChE (contingut de grafit 32%) desenvolupats mitjançant configuracions manual, múltiple capa i biocompòsit a partir de determinacions de paraoxon realitzades en un medi 0.1M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV

	Manual	Múltiple capa	Biocompòsit
Sensibilitat (%/dec)	-18	-23	-5
límit de detecció (M)	6×10^{-10}	1×10^{-9}	1.5×10^{-9}
Reproductibilitat en % (DSR)	5	11	12

Així doncs, i basats en les dades obtingudes, es decidí realitzar un estudi en mostres reals a partir dels biosensors basats en una configuració manual. El inconvenient que suposava treballar amb una sensibilitat lleugerament inferior quedava àmpliament compensada per una major reproductibilitat dels dispositius, un límit de detecció millor i una menor pèrdua de material biològic durant la determinació de l'analít (*leaking*).

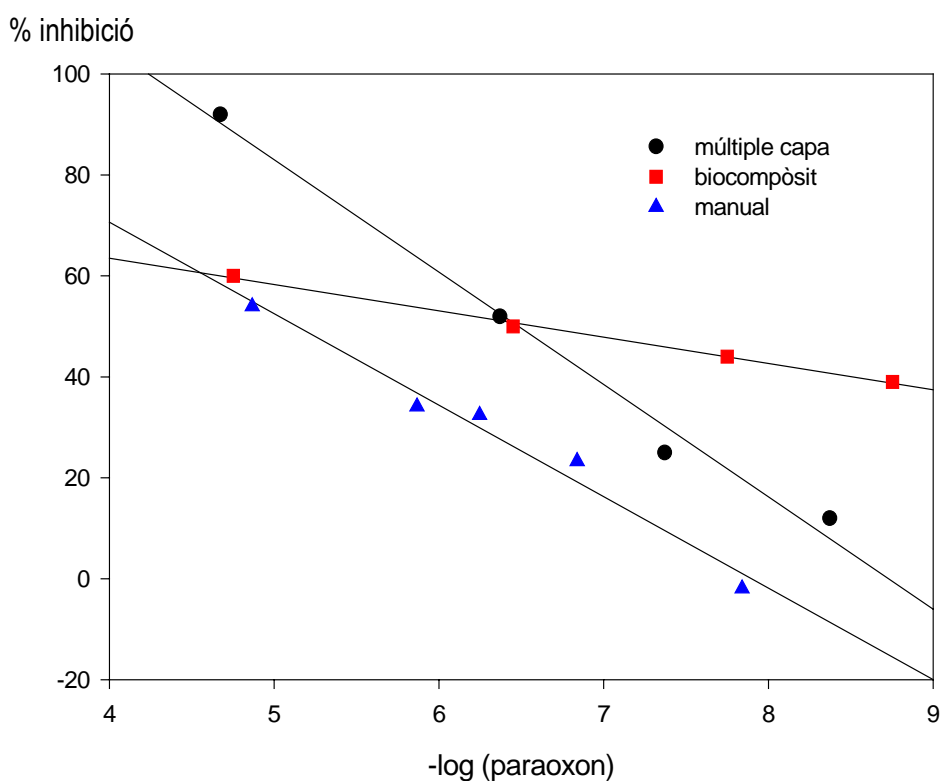


Figura 5.15 Rectes de calibració de paraoxon emprant els biosensors BChE desenvolupats mitjançant les tres configuracions, manual, múltiple capa i biocompòsit a partir de calibracions de tiocolina realitzades en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5). $E_{ap} = 700$ mV

5.5 ANÀLISI DE PESTICIDES EN MOSTRES REALS

Tot seguit, es descriu un estudi preliminar de la determinació de pesticides mitjançant els biosensors desenvolupats sota configuració manual. Cal recordar que aquests dispositius no pretenen competir -i si complementar- amb tècniques tan potents com l'HPLC o la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de massa, tècniques que sens dubte ofereixen una anàlisi quantitativa més acurada que el que podrien oferir els biosensors. L'objectiu és proporcionar informació ràpida i fiable sobre la contaminació de mostres reals, de forma que siguem capaços de detectar l'analit d'interès dins d'una matriu complexa, quan la seva concentració es trobi per sobre d'uns nivells tolerables. D'aquesta forma, fent servir uns dispositius d'un sol ús i de baix cost, es podria evitar el processament de la mostra d'altres tècniques més cares i potents.

Es a dir, aquests dispositius biosensors són especialment indicats per a l'*screening* d'un elevat nombre de mostres, com és el cas de les aplicacions ambientals.

En un primer estudi, s'avaluà la recuperació de pesticides, en afegir concentracions conegudes de paraoxon i carbofuran en aigua de l'aixeta (provenint de la xarxa de subministrament de la UAB) i en suc de taronja (Kas fruit, suc procedent de concentrat en tetra brik). Per a aquestes determinacions s'emprà el mateix procediment que en § 5.3, però substituint la solució tamponada per una altra amb aigua de l'aixeta o amb suc de taronja, també tamponades.

A continuació s'exposa amb més detall el mètode seguit en ambdues recuperacions, i es comenten els resultats obtinguts.

5.5.1 Determinació de pesticides en aigua de xarxa

S'analitzaren dos tipus d'inhibidors enzimàtics en aquesta mostra: paraoxon i carbofuran. Per al primer es provaren biosensors amb dues càrregues enzimàtiques diferents.

5.5.1.1 Determinació de paraoxon en aigua de subministrament

El procediment seguit fou totalment anàleg al realitzat en l'obtenció de les rectes de calibrat de pesticides (§ 5.3). Primerament es diposita sobre el biosensor una gota d'una solució tamponada amb aigua de l'aixeta (1:1) durant 20 minuts. Es renta, i tot seguit es submergeix en una solució tamponada de fosfats i KCl 0.1 M a un valor de pH 7.5, i es realitzen addicions

consecutives d'una solució de concentració coneguda de BTChCl, obtenint una recta de calibrat.

En una experiència a part, s'afegeix sobre el biosensor una gota de la mateixa solució anterior, però contenint ara, una quantitat de paraoxon coneguda. S'incuba durant 20 minuts i es procedeix a realitzar un nou calibrat de BTChCl. Degut a l'acció de l'inhibidor, la intensitat de corrent que obtenim és menor, com a conseqüència d'una disminució en la formació de la substància electroactiva (tiocolina), producte de la reacció enzimàtica. Aquesta disminució en el senyal es pot relacionar amb la concentració de pesticida, a través de l'equació descrita en §5.2.2 ($I\% = (I_{ee} - I_p) \times 100 / I_{ee}$), i per tant obtenir rectes de calibrat del paraoxon.

Es repeteix el mateix procediment, però variant la concentració de pesticida, en cada anàlisi. El biosensor ha d'ésser canviat en cada determinació, ja que la inhibició resulta irreversible.

Així doncs, el procediment de determinació consta de tres etapes:

- a) calibració del biosensor
- b) incubació del biosensor amb el pesticida
- c) calibració de nou del biosensor

Les experiències es provaren en biosensors amb dues càrregues enzimàtiques:

- i) 0.22 mg d'enzim BChE (8.7 U/mg) per biosensor (figura 5.15)
- ii) 0.112 mg d'enzim BChE (8.7 U/mg) per biosensor (figura 5.16)

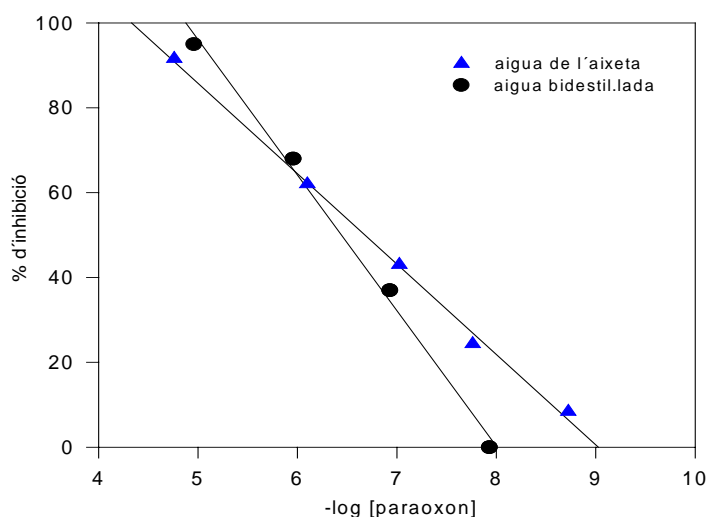


Figura 5.15 Rectes de calibracions de pesticides, utilitzant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.22 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 μ l d'una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor. En un medi tamponat a) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) en aigua bidestil·lada. Sensibilitat: -31.9 (%/dècada); coeficient de regressió: 0.995 b) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) diluït amb aigua de l'aixeta (1:1). Sensibilitat: -21.3 (%/dècada); coeficient de regressió: 0.998 Cada punt és la mitjana de 8 determinacions.

Tant pel primer cas com pel segon, es comparen els resultats obtinguts en el calibrat de pesticides de la mostra, amb la recta de calibració obtinguda a partir de solucions tamponades amb solucions estàndard de pesticida amb aigua bidestil·lada (sense cap tipus de matriu externa).

Observem com segons la zona de concentració en la que ens trobem, les dues rectes estan més o menys properes, i per tant la recuperació de pesticida serà més o menys distant del 100 % (veure §5.5.4).

Recordem que la diferència entre les dues rectes de calibració és la matriu que fem en les mostres. En la primera, el biosensor està submergit en una solució tamponada. Quan s'ha assolit un estat estacionari se li ha afegit una espècie no electroactiva (BTChCl) que l'enzim ha hidrolitzat, originant-se un producte (tiocolina) capaç d'oxidar-se en el potencial de treball, sobre la superfície del transductor. Així, obtenim un senyal proporcional a la BTChCl. A continuació s'incuba el biosensor amb una solució amb una concentració coneguda de pesticida, es a dir, una gota d'aquesta solució es posa en contacte amb el biosensor. L'enzim que està retingut en la superfície es veurà parcialment alterat. Tot seguit es realitza el mateix calibrat de BTChCl, i ara s'obté una sensibilitat menor, com a conseqüència de que disposem de menys quantitat d'enzim actiu (els centres actius estan parcialment bloquejats), i per tant la formació de la tiocolina responsable del senyal, disminueix.

Així doncs el calibrat realitzat relaciona la disminució del senyal amb la concentració de paraoxon afegit a la solució tampó.

En el segon calibrat, el procediment és el mateix, però ara, el biosensor es posa en contacte amb una solució tamponada que conté aigua de l'aixeta. Es realitza d'igual forma el calibrat amb BTChCl, i tot seguit es posa de nou en contacte amb una gota de la mateixa solució tamponada amb aigua de l'aixeta (1:1) a la que se li afegeix una concentració de paraoxon coneguda. Com abans, es calibra de nou amb BTChCl en un medi tamponat, i obtenim un senyal menor. Aquesta disminució del senyal, es provocada pel pesticida afegit a la mostra, i per tant, se'n obté una nova recta de calibrat, amb una matriu composta per aigua de l'aixeta.

Les diferències observades entre ambdues calibracions, venen també provocades per la dilució que fem sobre la solució tamponada de fosfats (afegim aigua de l'aixeta i tampó 1 a 1).

Això provoca una disminució en la força iònica que, quan es registren intensitats de corrent, pot afectar el senyal detectat.

Pel cas del biosensor amb 0.112 mg de BChE de càrrega enzimàtica (figura 5.16) podem observar igualment que, dins d'una zona de la recta, podem mesurar la inhibició, i per tant la concentració de pesticida, amb relatiu poc error, ja que l'efecte de la matriu sobre el mètode emprat resulta poc important.

S'observa, doncs, que el dispositiu es capaç de llegir els increments de pesticida ja sigui en solucions d'aigua bidestil·lada o en aigua de l'aixeta.

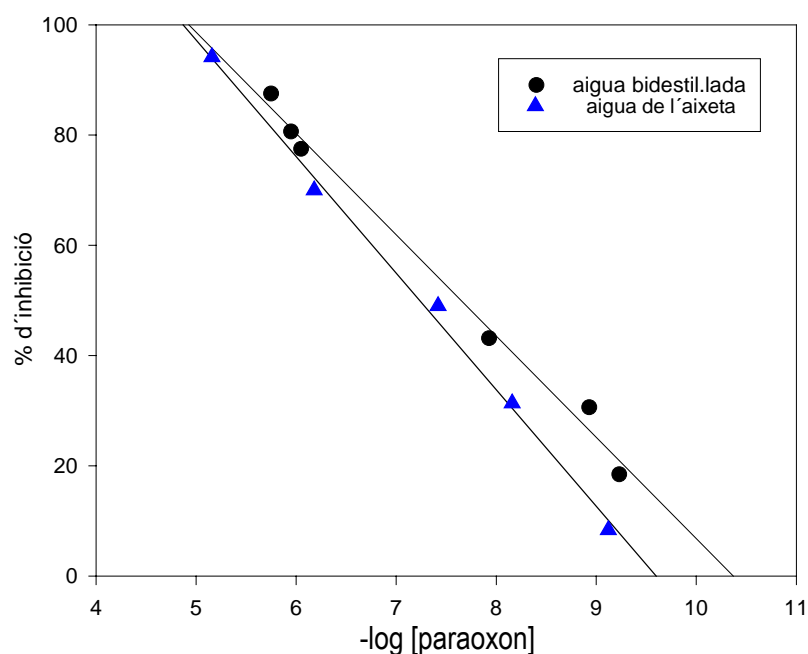


Figura 5.16 Rectes de calibracions de pesticides, utilitzant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 μ l d'una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor. En un medi tamponat a) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) en aigua bidestil·lada. Sensibilitat: -18.4 (%/dècada); coeficient de regressió: 0.992 b) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) diluït amb aigua de l'aixeta (1:1). Sensibilitat: -21.15 (%/dècada); coeficient de regressió: 0.996. Cada punt és la mitjana de 9 determinacions

Tal i com vàrem observar en §5.3.1.1, el fet de disminuir la càrrega enzimàtica provoca deteccions de concentració de pesticida inferiors, i per tant, millora el límit de detecció. Veiem que amb menys enzim, les diferències en la resposta, provocades pel fet de treballar en matriu diferents, són menors. Sembla ser doncs, que els biosensors amb un contingut menor de material biològic es veuen menys afectats pel fet de treballar en diferents medis.

Tot i això, i com en el biosensor amb 0.22 mg de BChE, existeix una zona on les recuperacions mostren millors resultats (ambdues rectes són més properes), encara que les diferències són menors (§5.5.4).

5.5.1.2 Determinació de carbofuran en aigua de subministrament

De forma totalment anàloga a §5.5.1.1, es realitza la calibració del biosensor en front a carbofuran. En la figura 5.17, es comparen els dos calibrats fets en diferents matrius. S'observa un comportament molts semblant en la resposta del biosensor. El límit de detecció, tal i com havíem vist en §5.3.1.2, és inferior al de paraoxon, i per tant, en aigua de l'aixeta, el biosensor continua detectant concentracions encara més petites de carbofuran.

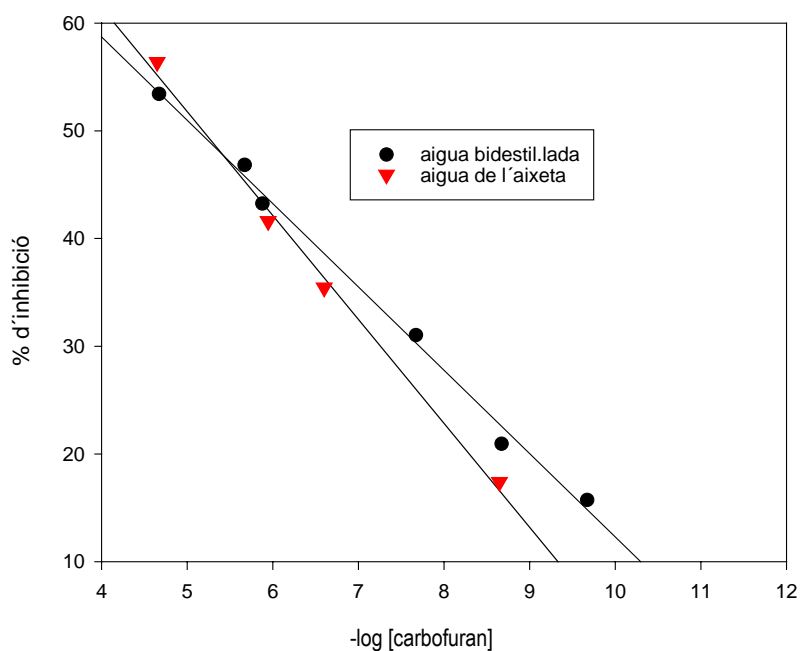


Figura 5.17 Rectes de calibracions de pesticides, utilitzant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 μ l d'una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor. En un medi a) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) en aigua bidestil·lada. Sensibilitat: -7.73 (%/dècada); coeficient de regressió: 0.994 b) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) diluïda amb aigua de l'aixeta (1:1). Sensibilitat: -9.65 (%/dècada); coeficient de regressió: 0.995. Cada punt és la mitjana de 9 determinacions

5.5.2 Determinació de pesticides en suc de taronja

Emprant el mateix procediment anterior, es van dur a terme les corbes de calibració per a determinar el percentatge de recuperació de paraoxon en mostres de suc de taronja de la marca Kas fruit.

El mètode és exactament el mateix, i es substitueix l'aigua de l'aixeta pel suc de taronja (la relació solució tampó: suc de taronja és de 1:1). Es provaren biosensors amb dues càrregues enzimàtiques diferents: 0.22 mg i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzats sobre la superfície del transductor.

Les rectes de calibrat obtingudes pel primer tipus de biosensor es mostren en la figura 5.18. Els resultats es comparen amb les rectes de calibració realitzades en matrius d'aigua bidestil·lada i d'aigua de l'aixeta (figura 5.19).

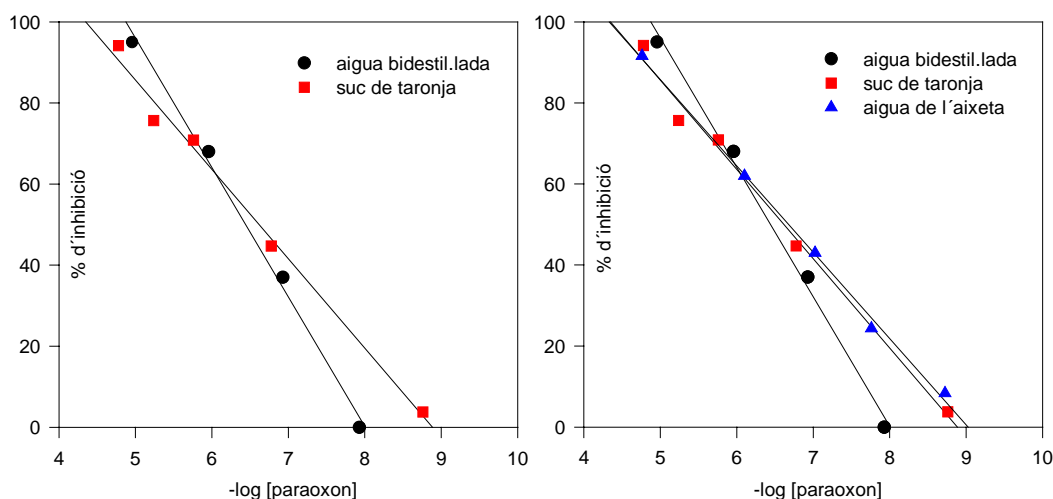


Figura 5.18 Rectes de calibració de paraoxon realitzades mitjançant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.22 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor en un medi a) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) en aigua bidestil·lada i b) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) en suc de taronja. Cada punt experimental és la mitjana de set determinacions. Sensibilitat: -22.05 (%I / dècada). Coeficient de regressió:0.992

Figura 5.19 Les dades experimentals corresponen a les de la figura 5.18. S'inclou la recta de calibració de paraoxon en aigua de l'aixeta (figura 5.15) i solució tampó (1:1) per comparar les respostes.

Sembla ser que l'efecte que realitza la matriu sobre la resposta del biosensor és més semblant en l'aigua de l'aixeta i suc de taronja, que en l'aigua bidestil·lada. Per aquesta darrera, els punts s'allunyen una mica, tot i que, com havíem vist, existeix una zona lineal (per concentracions de paraoxon entre 10 i 0.1 μM), on els resultats s'ajusten força.

Pel cas del biosensor amb 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg), els resultats es mostren en la figura 5.20.

Els resultats es comparen amb les rectes de calibració realitzades en matrius d'aigua bidestil·lada i d'aigua de l'aixeta (figura 5.21).

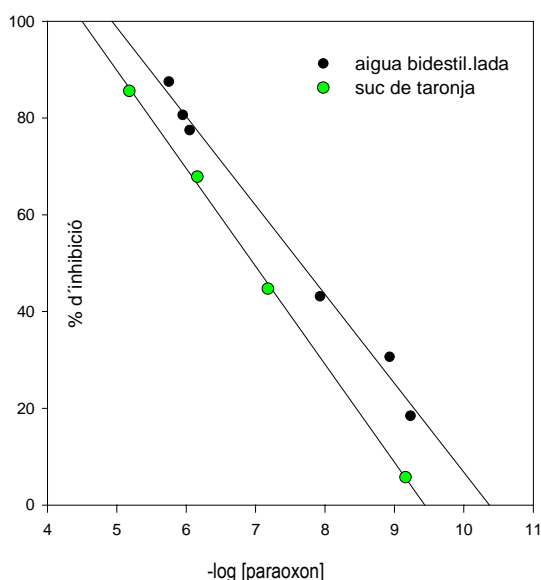


Figura 5.20 Rectes de calibració de paraoxon realitzades mitjançant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor en un medi a) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) en aigua bidestil·lada i b) 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.5) diluït amb suc de taronja (1:1). Cada punt experimental és la mitjana de set determinacions. Sensibilitat: -20.24 (% / dècada). Coeficient de regressió :0.999

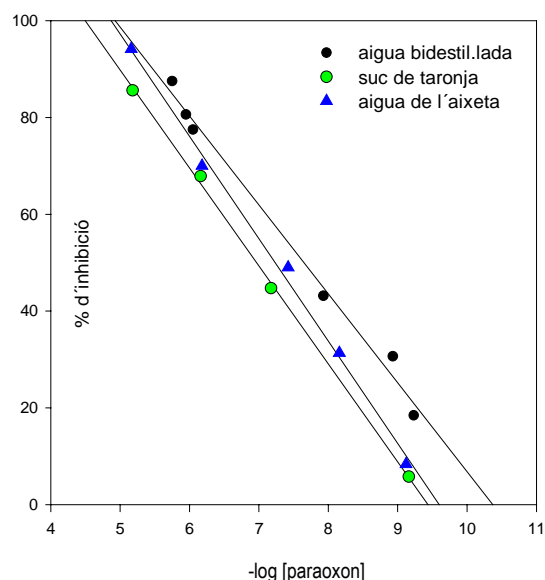


Figura 5.21 Les dades experimentals corresponen a les de la figura 5.20. S'inclou la recta de calibració de paraoxon en aigua de l'aixeta (figura 5.16) i solució tampó (1:1) per comparar les respostes.

Tal i com succeïa amb els biosensors amb major contingut d'enzim, els calibrats realitzats en aigua de l'aixeta i suc de taronja presenten resultats més propers als fets en la solució tamponada d'aigua bidestil·lada. També s'observa una millora del límit de detecció.

5.5.3 Paràmetres de calibració

En les taules següents es donen les dades extretes a partir de les rectes de calibració dels biosensors amb ambdues composicions:

- i) 0.22 mg d'enzim BChE (8.7 U/mg) per biosensor
- ii) 0.112 mg d'enzim BChE (8.7 U/mg) per biosensor

pels dos pesticides provats; paraoxon i carbofuran.

Taula 5.7 Dades corresponents als calibrats de paraoxon mitjançant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.22 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor en un medi tamponat a pH 7.5.

Matriu	Sensibilitat (% I / dècada)	Coefficient de regressió	Límit de quantificació* (-log [paraoxon])
Aigua bidestil·lada	-31.9	0.995	8
Aigua de xarxa	-21.3	0.998	9
Suc de taronja	-22.05	0.992	8.9

* valor de l'abscissa quan %I = 0.

Taula 5.8 Dades corresponents als calibrats de paraoxon mitjançant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor en un medi tamponat a pH 7.5.

Matriu	Sensibilitat (% I / dècada)	Coefficient de regressió	Límit de quantificació* (-log [paraoxon])
Aigua bidestil·lada	-18.4	0.992	10.4
Aigua de xarxa	-21.15	0.996	9.6
Suc de taronja	-20.24	0.999	9.5

* valor de l'abscissa quan %I = 0

Podem veure que com més petita és la càrrega enzimàtica del biosensor, més s'amplia l'interval de detecció. La sensibilitat, però, decreix lleugerament.

El límit de quantificació sembla augmentar (no es detecten concentracions tan petites de pesticida) al posar matrius més complexes en biosensors amb menor quantitat de material biològic. L'efecte que fa l'aigua de la xarxa i el suc de taronja és la d'"emascarar", d'alguna

forma, concentracions molt petites de paraoxon, de forma que l'enzim no s'inhibeix, i per tant no podem mesurar una disminució del senyal.

S'observa el mateix efecte quan el pesticida és el carbofuran (taula 5.9).

Taula 5.9 Dades corresponents als calibrats de carbofuran mitjançant biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor en un medi tamponat a pH 7.5.

Matriu	Sensibilitat (% I / dècada)	Coefficient de regressió	Límit de quantificació* (-log [carbofuran])
Aigua bidestil·lada	-7.73	0.994	10.3
Aigua de xarxa	-9.65	0.995	9.3

* valor de l'abscissa quan %I = 0.

5.5.4 Recuperació

En les taules següents, es presenten els resultats extrets a partir de les rectes de calibració mostrades anteriorment. El percentatge de recuperació del paraoxon, es troba determinant la inhibició del biosensor en la calibració amb l'aigua de l'aixeta (o suc de taronja, segons el cas), i interpolant aquesta dada en la recta de calibrat de la solució tamponada d'aigua bidestil·lada. Aquesta interpolació proporciona una concentració de paraoxon en la gràfica que es compara amb la concentració real d'inhibidor introduïda en la mostra, segons la relació:

$$\% R = 100 (C_1/C_0)$$

On %R és el percentatge de recuperacióⁱ del pesticida, es a dir, el percentatge de pesticida que es detecta respecte al que realment hi ha. C_1 és la concentració de pesticida que determino mitjançant el biosensor i C_0 la que he afegit en la mostra.

En les taules següents (taula 5.10 i 5.11) es mostren els resultats obtinguts:

ⁱ Aquest percentatge de recuperació també podria definir-se com l'error realitzat en l'anàlisi.

Recuperació (en percentatge) de diferents pesticides en mostres reals

Taula 5.10 Recuperació del paraoxon mitjançant biosensors amb un 32 % de grafit, i BChE immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor en un medi tamponat a pH 7.5.

Interval	Aigua de l'aixeta		Suc de taronja	
	<i>Biosensor amb 0.22 mg de BChE</i>	<i>Biosensor amb 0.112 mg de BChE</i>	<i>Biosensor amb 0.22 mg de BChE</i>	<i>Biosensor amb 0.112 mg de BChE</i>
10-0.1 (μM)	100.5	103.8	100.6	109.8
0.1-0.001 (μM)	92.4	106.6	93.3	109.9

Taula 5.11 Recuperació del carbofuran mitjançant biosensors amb un 32 % de grafit, i BChE immobilitzada amb una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del sensor en un medi tamponat a pH 7.5.

Interval	Aigua de l'aixeta
	<i>Biosensor amb 0.112 mg de BChE</i>
10-0.1 (μM)	101.9
0.1-0.001 (μM)	104.2

Tal i com s'havia observat gràficament, la zona de major concentració de pesticida proporciona millors resultats en la recuperació, sobretot per aquells biosensors amb major proporció d'enzim. Veiem doncs, que aquells amb menor càrrega enzimàtica, i per tant més sensibles a l'acció dels pesticides i capaços de detectar concentracions d'inhibidor més petites, presenten comportaments molt propers en tot l'interval lineal, mentre que els biosensors amb major quantitat de material biològic, tenen pitjor resposta en les zones baixes de concentració (en les zones properes al límit de detecció, la recuperació de paraoxon pot baixar fins a un 84 %, mentre que els biosensors amb 0.112 mg d'enzim no sobrepassen el 110 %).

Cal destacar a més a més, que també es compararen calibrats de BTChCl realitzats en solucions tamponades d'aigua bidestil·lada, amb calibrats de BTChCl d'aigua de l'aixeta i posteriorment amb suc de taronja (§5.5.2). Les mesures obtingudes eren totalment comparables, i tot i que el senyal era lleugerament menor pel segon i tercer cas, les diferències observades entraven dins el propi error experimental, pel que es pot suposar que la concentració de pesticida és negligible.

Finalment, senyalar la viabilitat de dispositius anàlegs als desenvolupats en sistemes de flux^{17,18} que permetrien l'anàlisi continu (d'aigües de consum, per exemple) i per tant un control regular i continuat.

5.6 CONCLUSIONS

1- La determinació de pesticides organofosforats (paraoxon) i carbamats (carbofuran) es pot realitzar seguint el percentatge d'inhibició en front del log d'inhibidor.

2- Per un biosensor amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 µl d'una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del transductor es varen obtenir els millors resultats, en comparació a altres formulacions i configuracions (capa múltiple i biocompòsit). Es va assolir un límit inferior i superior de resposta lineal de 2.12×10^{-10} i 2.12×10^{-5} M respectivament pel carbofuran i de 6×10^{-10} i 1.7×10^{-5} M respectivament pel paraoxon, límits de detecció d'un ordre de magnitud superior a les configuracions esmentades prèviament. El fet de treballar amb una sensibilitat lleugerament inferior (comparat amb els sensors de múltiple capa) quedava àmpliament compensada per una major reproductibilitat dels dispositius, un límit de detecció superior i una menor pèrdua de material biològic durant la determinació de l'analit.

S'ha observat una menor sensibilitat del biosensor pel carbofuran, tot i que el límit de detecció és menor (detecta concentracions més baixes de pesticida).

3- Aquests resultats, a més, són significativament millors a determinacions de pesticides mitjançant biosensors *screen-printing* publicades per altres investigadors amb límits de detecció d'una, dues i fins i tot tres unitats inferiors (8×10^{-7} [19], 3.5×10^{-7} [20], 9×10^{-8} [21], 1×10^{-8} [22], , 4×10^{-9} [23]) tot i que altres grups han assolit resultat força propers als nostres (3×10^{-10} amb una recuperació del carbofuran del 91%²⁴).

4- S'ha comprovat que el millor mètode per incubar els biosensors és depositar una gota de la solució inhibidora sobre la seva superfície. La interacció amb l'enzim augmenta, i la dispersió en els resultats decreix.

Així mateix s'ha observat que en disminuir la càrrega enzimàtica, el límit de detecció augmenta, però alhora també l'error. Aquest error es veu corregit mitjançant la incubació per gota.

També s'ha estudiat l'efecte de la concentració de substrat (BTChCl) sobre la inhibició enzimàtica, i s'ha trobat que influeix molt poc o de forma despreciable en els resultats finals.

5- Els biosensors de AChE presentaven pitjors resultats, i semblen veure's menys afectats per l'acció dels pesticides.

6- Finalment, es provaren els biosensors desenvolupats sota configuració manual en mostres reals, i és determinà el percentatge de recuperació dels pesticides en matrius complexes (aigua de xarxa i suc de taronja).

Cal tenir en compte que el fet d'incorporar nous components en la matriu polimèrica, augmenta considerablement la complexitat de la seva preparació, del seu estudi i de la seva optimització i, per tant, i tenint en compte que els millors resultats en la determinació de pesticides s'obtingueren amb biosensors manuals, es va decidir posposar l'aplicació en mostres reals dels biosensors amb les altres configuracions (capa múltiple i biocompòsit), en una etapa posterior de la investigació.

Fins ara només s'han pogut estudiar dues formulacions enzimàtiques, i tot i que ambdues proporcionen bones respostes, el biosensor que conté un 32 % de grafit i 0.112 mg de BTChE immobilitzada sobre la superfície del transductor amb 4 µl d'una solució al 6.25 % de glutaraldehyd, presenta un límit de detecció menor i una recuperació de paraoxon aproximadament constant en tot l'interval de treball, situat al voltant del 105 % en mostres d'aigua de l'aixeta, i del 110 % en mostres de suc de taronja. Tot i això, cal tenir en compte que els biosensors amb major càrrega enzimàtica (0.22 mg BTChE) presenten millors percentatges de recuperació en les zones altes de concentració de paraoxon (fins a 100.5 %), encara que, com ja s'ha comentat, la resposta empitjora per sota dels 0.1 µM d'inhibidor (fins a un 84 % de recuperació en la zona més propera al límit de detecció).

Pel carbofuran, la recuperació millora lleugerament, i es manté el percentatge al voltant del 103 % en tot l'interval, tot i que els resultats empitjoren a mesura que ens acostem al límit de detecció.

Bibliografia

¹ A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, 1993, Cap. 8

² D. Voet, J. G. Voet, *Bioquímica*, Ediciones Omega, Barcelona, 1992

³ *Public health impact of pesticides used in agriculture*, World Health Organization, Geneva, 1990

⁴ H. Kidd, D. Hartley, *UK Pesticides for farmers and growers*, The Royal Society of Chemistry, Nottingham, 1987

- ⁵ J. Sherma (Ed.), *Analytical methods for pesticides and plant growth regulators*, Academic Press, San Diego, CA, 1989
- ⁶ M. K. Jain, *Handbook of enzyme inhibitors*, Wiley, New York, 1982
- ⁷ H. Zollner, *Handbook of enzyme inhibitors*, VCH, Weinheim, 1989
- ⁸ T. Matsumara, *Toxicology of insecticides*, Plenum, New York, 1975
- ⁹ D. N. Gray, M. H. Keyes, B. Watson, *Anal. Chem.*, 49 (1987) 1067 A
- ¹⁰ C. Garcia de Maria, T.M. Muñoz, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 295 (1994) 287
- ¹¹ K. Stein, G. Schwedt, C. Dumschat, H. Müller, *Anal. Chim. Acta*, 252 (1991) 7
- ¹² K. Stein, G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta*, 272 (1993) 73
- ¹³ P. Skládal, M. Mascini, *Biosens Bioelectr.*, 7 (1992) 335
- ¹⁴ P. Skládal, *Anal. Chim. Acta*, 252 (1991) 11
- ¹⁵ J.L. Marty, K. Sode, I. Karube, *Electroanalysis*, 4 (1992) 249
- ¹⁶ G. Palleschi, M. Bernabei, C. Cremisini, M. Mascini, *Sensors Actuators*, B 7 (1992) 513
- ¹⁷ G. Geanty, J.L. Marty, *Biosens Bioelectr.*, 13 (1998) 213
- ¹⁸ S. Solé, Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, 1993, cap 7
- ¹⁹ T. Neufeld, I. Eshkenazi, E. Cohen, J. Rishpon, *Biosens Bioelectr.*, 15 (2000) 323
- ²⁰ E. V. Gogol, G. A. Evtugyn, J. L. Marty, H. C. Budnikov, V. G. Winter, *Talanta*, 53 (2000) 379
- ²¹ A. Mulchandani, W. Chen, P. Mulchandani, J. Wang, K. R. Rogers, *Biosens Bioelectr.*, 16 (2001) 225
- ²² I. Palchetti, A. Cagnini, M. Del Carlo, C. Coppi, M. Mascini, A. P. F. Turner, *Anal. Chim. Acta*, 337 (1997) 315
- ²³ T. Montesinos, S. Pérez-Munguia, F. Valdez, J. L. Marty, *Anal. Chim. Acta*, 431 (2001) 231
- ²⁴ G. S. Nunes, D. Barceló, B. S. Grabaric, J. M. Díaz-Cruz, M. L. Ribeiro, *Anal. Chim. Acta*, 399 (1999) 37

Desenvolupament i caracterització de biosensors planars de glucosa oxidasa en matrius sol-gel

En el present capítol es descriu com la tecnologia sol-gel i les tècniques serigràfiques poden ser utilitzades per a la immobilització d'enzims en matrius de sílice, conservant, alhora, les seves propietats catalítiques un cop impresa la biotinta sobre el transductor. Els elèctrodes produïts mitjançant aquestes tècniques seran capaços de mesurar glucosa i ens permetran realitzar estudis preliminars que ens portaran cap al desenvolupament de biosensors d'àcid làctic i màlic en vins (capítols 7 i 8).

Cal recordar que el principal objectiu és, precisament, la construcció d'aquests darrers biosensors i que per tant el biosensor de GOD tant sols serà un pas inicial en la consecució d'aquesta fita. Per aquesta raó els estudis realitzats no pretenen una optimització completa del dispositiu de glucosa sinó tan sols un pont pels biosensors de LOD, LDH i MDH.

Prèviament, i donat els canvis realitzats en el disseny del sensor i sobretot les modificacions realitzades en la construcció dels dispositius en els capítols posteriors, s'introduirà de forma breu la modificació de sensors (§6.1), i es descriurà la tècnica de gelació (o sol-gel) per a la immobilització del material biològic (§6.1.3) que ens servirà per tenir una major comprensió de les tècniques (tant d'immobilització com de construcció) realitzades (§6.2).

6.1 INTRODUCCIÓ

Tal i com ja havíem vist en capítols anteriors, l'activitat de molècules biològiques, tal com enzims i anticossos, es pot retenir quan són encapsulades en materials apropiats que proporcionen a la biomolècula un medi adequat. L'encapsulació en gels derivats de la hidròlisi d'ortosilcats (matrius de sol-gel)¹, és una de les alternatives utilitzades darrerament per a la immobilització de molècules biològiques en el disseny de biosensors.

Per altra banda, un dels objectius dels investigadors que treballen en el camp dels sensors, és trobar maneres d'immobilitzar els components actius d'una forma econòmica i reproducible. La tecnologia *thick-film* o serigrafia és un dels mètodes utilitzats per aconseguir la fabricació de sensors en sèrie, i és per això que els components que formen el gel (sol-gel) han estat incorporats en les tintes de serigrafia. La gran majoria d'elèctrodes construïts mitjançant aquesta via, no s'han provat en l'anàlisi de mostres reals.

Per tal d'aconseguir millores en els resultats, s'incorpora sovint catalitzadors i/o modificadors al disseny del sensor.

6.1.1 Modificació química de sensors electroquímics

L'elevat grau de sensibilitat i l'ampli interval lineal característics dels sensors amperomètrics ha portat a un ràpid desenvolupament del camp de la recerca d'aquests dispositius, fruit del qual s'ha dissenyat una extensa gamma de sensors amperomètrics amb múltiples aplicacions. No obstant això, el fet que el potencial aplicat fos l'única variable disponible per controlar la selectivitat a la interfície elèctrode-solució, va suposar una important limitació de l'aplicació d'aquests dispositius. Com a conseqüència, es van redirigir els esforços dels investigadors cap a resoldre les mancances que se'n derivaven, fet que va donar lloc a l'aparició dels primers *elèctrodes modificats* a finals de la dècada dels 60.

Les modificacions químiques es basen en alterar químicament la superfície dels elèctrodes. La possibilitat de poder ancorar molècules específiques sobre la superfície d'un elèctrode inert i obtenir així superfícies amb estructures moleculars úniques, cada una adequada a uns interessos analítics concrets, va representar en el seu moment un avenç important en el disseny dels sensors amperomètrics.

Amb els anys, les tècniques utilitzades per modificar la superfície del transductor han evolucionat fins al punt que, actualment, s'aconsegueixen estructures formades per capes amb un gruix controlat constituïdes per intrincats reticles moleculars. Aquestes xarxes atrapen, o bé contenen enllaçades, espècies que permeten un control de la sensibilitat i la selectivitat basat en característiques com les dimensions del porus, la distribució de càrrega o les propietats d'enllaç, a més d'aportar altres beneficis relacionats amb l'afavoriment dels processos de transferència electrònica.

6.1.1.1 Objectius de les modificacions químiques

Com ja s'ha comentat, les modificacions químiques van sorgir com a una estratègia dirigida a resoldre els problemes implícits en l'ús dels sensors amperomètrics². Aquests problemes es poden resumir a grans trets en:

- la passivació gradual de la superfície de l'elèctrode deguda a l'adsorció de molècules orgàniques grans presents al medi de reacció o d'altres espècies que intervenen en la reacció,
- la pèrdua de selectivitat a l'hora de discriminar entre analits que posseeixen característiques redox similars,
- la cinètica de transferència electrònica lenta que presenten algunes espècies en determinats elèctrodes.

Si bé les modificacions químiques es poden realitzar amb la finalitat d'evitar concretament alguna de les limitacions esmentades, sovint incideixen en més d'una, de manera que aconsegueixen millorar alhora diverses característiques del sensor i, en definitiva, optimitzen el seu ús.

Malgrat que, de la mateixa manera, resulta difícil definir amb claredat els objectius marcats per les modificacions químiques, atès que sovint estan interrelacionades, habitualment es planteja la següent classificació:

1. Preconcentració selectiva de l'analit enfront de la resta de components presents a la mostra.
2. Permeabilitat selectiva vers determinades espècies.
3. Electrocatàlisi amb la finalitat d'accelerar les reaccions de transferència electrònica entre l'analit i la superfície de l'elèctrode.

1. Preconcentració

Una de les característiques principals dels sensors és la de simplificar el procés analític, la qual cosa implica que determinats passos, com per exemple, la preconcentració de l'analit enfront d'altres espècies presents a la mostra, s'han de dur a terme directament sobre la superfície de l'elèctrode.

Si bé, tradicionalment, l'anàlisi de traces s'acostuma a fer per redissolució anòdica, la modificació química dels elèctrodes permet preconcentrar l'analit sense necessitat de què hi hagi pas de corrent, atès que l'acumulació d'espècies sobre la superfície de l'elèctrode té el seu fonament en processos físico-químics com el bescanvi iònic, la complexació o la formació de sals insolubles. Aquesta acumulació d'analit prèvia a la mesura permet augmentar la sensibilitat, alhora que pot

representar l'eliminació d'interferències si un cop preconcentrat l'analit es realitza un canvi del medi on està submergit l'elèctrode.

Els modificadors emprats habitualment amb l'objectiu de preconcentrar determinades espècies són³:

Bescanviadors d'ions per preconcentrar cations (p.ex. el Nafion[®], bescanviador catiònic) o anions (p.ex. la polivinilpiridina, bescanviador aniònic),

Lligands específics que formen amb l'analit *compostos de coordinació* (p.ex. la dimetilgloxima) o *quelats* (p.ex. els criptans o èters corona),

Reactius orgànics per formar *sals insolubles* (p.ex. mercaptans) o per formar *enllaços covalents* (p.ex. la formació d'enllaços imina entre un aldehyd i una amina primària, com l'anilina) quan reaccionen amb l'analit.

Aquests modificadors han de formar enllaços selectius, forts i estables amb l'analit. Per tant, l'eficiència del procés de preconcentració ve determinada per l'afinitat i l'especificitat del modificador vers l'espècie a preconcentrar i, per tant, per la constant de formació del producte resultant de la reacció entre el modificador i l'espècie preconcentrada (analit). A més, la cinètica d'aquesta reacció ha d'ésser moderadament ràpida a fi de reduir el temps d'anàlisi i d'evitar la difusió del producte format cap a fora dels límits de la capa de preconcentració.

2. Permeabilitat selectiva

La permeabilitat selectiva a un sensor correspon a un pas de separació previ al mesurament que consisteix en l'alteració de les propietats físiques de la superfície d'un elèctrode com a conseqüència de la incorporació d'una *barrera difusional permselectiva* a determinades espècies presents a la mostra. Aquesta barrera contribueix a l'augment de la selectivitat i a la millora de l'estabilitat dels sensors electroquímics. Això és degut a què aquests recobriments permselectius exclouen de la superfície espècies interferents i actuen com a barreres protectores, alhora que permeten el transport d'analit a través d'ells.

Les propietats en què es fonamenten les membranes permselectives, a fi d'afavorir o dificultar el pas de determinades espècies al seu través, són les *dimensions*, la *càrrega* o la *polaritat* de l'analit².

- **Dimensions:** Es pot dur a terme una exclusió selectiva passiva en base a les dimensions (p.ex. l'acetat de cel·lulosa pot tenir diferents grandàries de porus) que provocarà la disminució de la velocitat de difusió de determinades espècies presents a la solució.

- *Càrrega*: És possible obtenir un grau de permeabilitat diferenciat vers espècies iòniques amb càrregues oposades (p.ex. el Nafion[®] exclou interferències aniòniques, alhora que permet preconcentrar els cations).
- *Polaritat*: En aquest cas el transport selectiu porta a l'exclusió o a la permeabilitat d'espècies segons la seva polaritat (p.ex. els recobriments lipídics permeten la detecció selectiva d'espècies hidrofòbiques per exclusió de les hidrofíliques).

Per tant, les barreres permselectives permeten assolir un alt grau d'especificitat en el transport, de vegades basat en la combinació de més d'una d'aquestes propietats, com per exemple les membranes que exclouen espècies segons les seves dimensions i la seva càrrega, alhora que eviten la passivació de la superfície de l'elèctrode amb la seva actuació com a barreres protectores enfront de l'adsorció de molècules orgàniques d'alt pes molecular presents al medi o de l'acumulació de productes insolubles de la reacció⁴.

No obstant això, i atès que són barreres difusionals, el pas limitant de la velocitat de reacció ve fixat per la difusió de l'analit a través de la membrana permselectiva. Això fa que la concentració d'analit a la superfície de l'elèctrode sigui més petita que la concentració real a la solució, fet que permet controlar l'interval lineal de resposta a fi d'ampliar-lo. Per tant, les membranes permselectives fan viable l'ús de biosensors que incorporen enzims que posseeixen K_M desfavorables, ja que en realitat es treballa amb K_M aparents més favorables, el valor de les quals esdevé fortament afectat per la presència de la membrana.

3. Electrocatàlisi

L'*energia d'activació* necessària per dur a terme una reacció, es a dir, la barrera energètica que cal superar perquè la reacció tingui lloc, resulta ésser molt més elevada quan la reacció succeeix sobre la superfície de l'elèctrode, ja que en aquest cas la cinètica de transferència electrònica és més lenta que quan es tracta d'una reacció homogènia. Per tant, s'ha d'aplicar el potencial resultant de sumar al potencial termodinàmic un *sobrepotencial* d'activació, que depèn del material de què està fet l'elèctrode i de les propietats de la doble capa elèctrica que forma l'elèctrode amb la solució que té en contacte.

En aquest cas l'objectiu de la modificació química es fonamenta en minimitzar aquest sobrepotencial, atès que una disminució del potencial de treball comporta una reducció del nombre d'espècies que poden interferir al reaccionar electroquímicament i, per tant, suposa una millora de la selectivitat. Això s'aconsegueix afavorint la transferència electrònica entre l'analit i l'elèctrode mitjançant l'ús de *catalitzadors* o de *mediadors d'oxidació-reducció*.

Tant els catalitzadors com els mediadors redox, són espècies catalítiques, que afavoreixen la transferència electrònica amb l'elèctrode, i per tant, augmenten la velocitat de reacció. La electrocatàlisi, per tant, es el procés en el qual es veuen implicats, i en el que es produeix una transferència de càrrega a través d'un procés químic i un electroquímic.

6.1.2 Catalitzadors

La funció d'un catalitzador consisteix en facilitar el camí de reacció, és a dir, disminuir l'energia d'activació necessària perquè la reacció tingui lloc. Com a conseqüència, sovint el que s'observa és una acceleració de la velocitat de reacció. És per això que els catalitzadors, ja siguin metàl·lics o d'origen biològic (en aquest cas es parlaria de biocatàlisi, com és el cas dels enzims), s'han aprofitat per intentar assolir una transferència electrònica eficient entre la superfície de l'elèctrode i determinades espècies en solució.

Per la seva part, els catalitzadors metàl·lics s'incorporen com a micropartícules, atès que d'aquesta manera ofereixen una major superfície de contacte sobre la qual té lloc el procés de catàlisi i, per tant, milloren la sensibilitat i la selectivitat del sensor. Els metalls habitualment usats com a catalitzadors són el **platí** (que fou l'escollit en els nostres estudis, §6.4.1 i §7.3.1), el pal·ladi, l'or i l'iridi.

6.1.2.1 Mediadors d'oxidació-reducció

Els mediadors d'oxidació-reducció són molècules sintètiques electroactives de baix pes molecular amb propietats catalítiques, donat que es regeneren en un procés cíclic, i es caracteritzen per tenir una transferència electrònica amb l'elèctrode pràcticament igual que amb les espècies en solució.

El fet de facilitar la transferència de càrrega entre l'elèctrode i l'analit, possibilita l'aplicació d'un potencial molt més baix, la qual cosa redueix el nombre d'interferències possibles i millora, per tant, la selectivitat.

El mediador primer reacciona amb l'analit, via una reacció redox homogènia, i després difon cap a la superfície de l'elèctrode, on té lloc una transferència de càrrega ràpida. Amb aquesta segona reacció redox heterogènia es tanca el cicle catalític que dona lloc a la regeneració del mediador. Per tant, el potencial que correspon a la reacció de transferència electrònica heterogènia coincideix amb el potencial del mediador, essent més baix que el potencial redox de l'analit en fase heterogènia.

Els mediadors redox han de complir les següents característiques:

- s'han de caracteritzar per posseir *cinètiques de transferència electrònica ràpides*, tant amb l'analit (homogènia) com amb l'elèctrode (heterogènia),
- han d'ésser *estables en les dues formes del parell redox*, és a dir, tant en forma oxidada com reduïda,
- han de presentar una *cinètica reversible*,
- han de tenir un *potencial redox més petit* o comparable a l'interval de potencial de treball òptim marcat per la detecció amperomètrica sense mediadors,
- i, en funció de l'aplicació, *no poden ésser tòxics*⁵.

Els mediadors redox es poden classificar en dos grans grups en funció de les seves propietats químiques: complexos metàl·lics i mediadors *orgànics*⁶.

Els **complexos metàl·lics** incorporen un metall de transició a l'estructura orgànica de la molècula. El ferrocè⁷ i els seus derivats destaquen per la seva versatilitat, basada en la possibilitat de tenir compostos amb diferents càrregues i solubilitats segons els substituents, i per les característiques favorables que els hi proporciona la introducció d'alguns grups. Altres mediadors organometàl·lics són les ftalocianines (Co), l'hexacianoferrat (III)⁸, els complexos d'òxid de ruteni i les metal·loporfirines (Mn), entre d'altres.

D'altra banda, els **mediadors orgànics** són molècules orgàniques que posseeixen estructures amb dobles enllaços conjugats, que afavoreixen la deslocalització de càrrega, fet que facilita la transferència electrònica amb l'elèctrode. Els derivats de fenoxazines (tal com la 7-dimetilamino-1,2-benzofenoxazina, conegut com **Meldola Blue** o Blau de Meldola, que fou l'utilitzat en l'estudi dels sensors desenvolupats, §7.4.1 i §8.2), fenatiazines i fenazines^{9,10}, juntament amb la fenilendiamina i la tetrametilfenilendiamina¹¹, s'han utilitzat àmpliament en la detecció del cofactor NADH de certes deshidrogenases. El parell redox quinona-hidroquinona¹², emprat igualment en la detecció de NADH, es caracteritza per ésser útil tant en processos d'oxidació com de reducció. Una de les seves aplicacions habituals es fonamenta en la detecció de la reducció del H₂O₂ mitjançant l'ús de la HRP. Finalment, cal esmentar compostos com el tetratiafulvalè (TTF) i el tetracianoquinodimetà (TCNQ)⁷ que, si bé per si sols actuen com a mediadors redox, també s'empren combinats per formar *sals orgàniques conductores* (p.ex. el TTF⁺TCNQ⁻), útils per construir elèctrodes amb conductivitat elèctrica, atès que es tracta de dues molècules orgàniques planes amb sistemes externs d'electrons π que es solapen i, per tant, afavoreixen la deslocalització de càrrega¹³.

El coneixement de les característiques de cada un dels mediadors és de gran utilitat a l'hora de decidir quin mediador és el més adequat per a una determinada aplicació i en quina forma cal incorporar-lo al sistema.

6.1.2.1.1 Estratègies d'incorporació de modificadors a la configuració d'un sensor

1. *Modificadors en solució.*
2. *Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar monocapes.*
3. *Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar pel·lícules polimèriques o multicapes.*

1. *Modificadors en solució*

Una de les formes possibles d'emprar modificadors és afegir-los a la solució que conté l'analit. Habitualment, els modificadors usats en solució acostumen a ésser electrocatalitzadors.

Si bé aquesta no és una metodologia gaire elegant, permet obtenir resultats de forma ràpida, ja que no requereix cap pas previ d'immobilització. A més, cal afegir l'avantatge que representa la conservació de les seves propietats intactes, com a conseqüència de que no ha d'experimentar cap reacció, amb la finalitat d'ésser retingut sobre la superfície de l'elèctrode. També és important destacar que el fet de què no actua com a reactiu limitant, atès que es troba a la solució en excés, permet obtenir sensibilitats més elevades. Per tant, si més no, és una bona opció per fer un estudi previ del comportament d'un modificador determinat.

Tot i això, hem de pensar que l'objectiu final d'un sensor, en la mesura de lo possible, és l'absència de reactius. Es per això que la configuració final del dispositiu sempre hauria de tendir a la immobilització dels modificadors sobre el transductor, en el que hom anomena configuració *reagentless*.

2. *Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar monocapes*

Una segona estratègia possible, relacionada amb l'ús de modificadors, es basa, doncs, en recobrir la superfície de l'elèctrode amb una monocapa de material electroactiu.

Existeixen principalment dos mètodes per obtenir monocapes de modificador sobre la superfície de l'elèctrode: adsorció i formació d'enllaços covalents.

L'**adsorció**, representa la tècnica més senzilla i antiga per immobilitzar espècies sobre la superfície de l'elèctrode. Es fonamenta en la interacció resultant de compartir la densitat electrònica entre la molècula adsorbida i la superfície del transductor. Permet doncs assolir interaccions molt fortes i efectives entre molècules que tenen sistemes extesos d'electrons π (substàncies olefíniques o compostos aromàtics) i la superfície de l'elèctrode, mitjançant el

solapament resultant de compartir la densitat d'aquests electrons π amb el núvol electrònic del metall que forma l'elèctrode.

Cal tenir en compte que existeixen certs inconvenients associats a aquest tipus d'immobilització. Per una banda, la monocapa formada és vulnerable a l'erosió. I per altra banda, l'adsorció rarament és completament irreversible, ja que es tracta d'un procés d'equilibri, fet que implica una desorció lenta del modificador cap a la solució (*leaking*), que limita com a conseqüència el temps de vida del sensor.

La **formació d'enllaços covalents**, entre la superfície de l'elèctrode i certs grups funcionals del modificador, presenta un avantatge important respecte a l'adsorció, que es basa en què els enllaços formats són forts i irreversibles, de manera que no es produeix cap pèrdua de modificador al si de la solució.

Ara bé, aquesta tècnica requereix pretractaments delicats i, a vegades, també determinats processos d'activació (temperatura, etc), a fi de funcionalitzar la superfície de l'elèctrode. Així, malgrat els avantatges que suposa la formació d'enllaços covalents, el procés requereix un cert consum de temps i, en algunes ocasions, pot comportar una alteració inherent del modificador que dificultarà la seva funció.

Per tant, aquesta tècnica demana una preparació complicada que, en molts casos, no es veu justificada amb els resultats obtinguts.

Un altre mètode que es pot incloure com a una estratègia dirigida cap a l'obtenció de monocapes, i que es situa entre l'adsorció i la formació d'enllaços covalents, consisteix en la incorporació del modificador en una matriu polimèrica, de manera que quedi retingut a l'interior on es troba en contacte amb partícules de grafit. El modificador, a més, ha de ser insoluble o s'ha d'adsorbir fortament als components de la matriu, a fi d'evitar la seva dissolució cap a la mostra.

3. Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar pel·lícules polimèriques

La metodologia d'immobilització basada en la formació de multicapes proporciona major robustesa i estabilitat a l'elèctrode, comparat amb una única monocapa.

El control acurat d'aquesta tècnica permet obtenir gruixos reproduïbles de fins a 10^5 monocapes¹⁴, fet que fa possible l'amplificació del senyal i, per tant, facilita la seva adquisició i tractament.

Les formes més utilitzades per preparar pel·lícules polimèriques són:

L'*entrecruament* del modificador amb algun *agent bifuncional*, com el glutaraldehid.

La *precipitació del polímer* sobre la superfície de l'elèctrode, bé mitjançant la immersió de l'elèctrode en una solució que conté el monòmer o el polímer ja format, o bé mitjançant la deposició d'aquesta solució. En ambdós casos s'ha de deixar evaporar el solvent en què es troben dissolts el monòmer o el polímer. La deposició d'una gota proporciona resultats més acurats, gràcies a la possibilitat de controlar, de forma més reproducible, la quantitat de solució depositada.

L'*electropolimerització del monòmer electroactiu*, que consisteix en la formació del polímer *in situ* com a conseqüència de l'aplicació d'un tractament electroquímic adequat. Aquesta tècnica permet un control molt reproducible del gruix de la capa polimèrica.

Les capes polimèriques es poden classificar segons les seves propietats elèctriques en:

1. *Conductores*, emprades sovint en electrocatàlisi amb la finalitat de millorar les característiques de transferència electrònica.
2. *No conductores*, usades freqüentment com a barreres de difusió, o bé com a matrius d'espècies dirigides a preconcentrar l'analit i, a vegades, d'espècies electrocatalítiques. Per tant, s'incorporen als sensors per eliminar interferències, prevenir la passivació de la superfície de l'elèctrode, immobilitzar altres components (enzims, cofactors, etc.), o atrapar mediadors a fi d'evitar la seva pèrdua per dissolució¹⁵.

Donat la importància de la detecció del NADH, per la seva implicació directa en les reaccions dels enzims del tipus deshidrogenasa, es troben un elevat nombre de referències bibliogràfiques relacionades amb la seva determinació electroquímica i els problemes de passivació que se'n deriven. Els tractaments realitzats pels investigadors per tal de resoldre aquests problemes es poden dividir en tres grups:

- 1 Tractaments dirigits a *prevenir l'adsorció* de les espècies que provoquen la passivació,
- 2 Tècniques de *regeneració*, per ésser aplicades un cop la superfície ja ha estat alterada amb l'adsorció d'espècies no desitjades.
- 3 Sensors d'un sol ús, amb bona reproductibilitat i baix cost de fabricació.

Algunes estratègies ressenyades a les publicacions per tal de prevenir la passivació suggereixen l'ús de determinades tècniques electroanalítiques o l'addició a la solució de treball de certs tensioactius¹⁶, adreçada a dificultar l'adsorció de determinades espècies sobre la superfície de l'elèctrode. Tot i això, l'opció més àmpliament emprada amb aquest objectiu es fonamenta en modificar químicament l'elèctrode, en alguns casos amb catalitzadors que dopen l'elèctrode¹⁷ o, més comunament, amb mediadors d'oxidació-reducció¹⁸. Algunes d'aquestes modificacions¹⁹ han millorat notablement el problema de la passivació.

Ara bé, un cop la superfície de l'elèctrode ha quedat coberta de molècules adsorbides que provoquen una pèrdua de sensibilitat, només resta l'opció de cercar la forma de regenerar aquesta superfície. Les *tècniques de regeneració* habitualment emprades a fi d'eliminar de la superfície electròdica les espècies que s'han adsorbit, es poden incloure en algun dels següents apartats:

- Regeneració *química*
- Regeneració *electroquímica*
- Regeneració *física*

La regeneració de la superfície passivada es pot dur a terme mitjançant un tractament químic basat en la immersió de l'elèctrode de treball en una solució d'àcid (oxidant) concentrat, a fi d'oxidar les espècies adsorbides i provocar així la seva desorció.

Per altra banda, són nombrosos els tractaments de regeneració basats en processos electroquímics. Aquests cobreixen el ventall que va des de tractaments considerats com a *suaus* fins a d'altres molt més *severs*, fent ús tant de corrent continu²⁰ com de corrent altern²¹. Aquests tractaments es poden combinar amb l'addició de certes espècies²² a la solució de treball a fi d'augmentar la seva eficiència.

Una tercera estratègia per regenerar la superfície passivada es basa en un tractament físic que consisteix en un poliment d'aquesta. Aquest últim punt posa de manifest l'avantatge més important que ofereixen els composts de grafit-epoxi, basat en la possibilitat d'obtenir superfícies renovades, totalment reproduïbles, per a cada anàlisi mitjançant un simple poliment físic.

Ara bé, sens dubte el mètode més senzill per evitar la disminució del senyal en calibracions successives de sensors és la utilització d'un elèctrode de treball nou per a cada corba de calibrat. Per això, cal dispositius amb costos de fabricació molt baixos derivats de les tècniques de fabricació massiva.

6.1.3 La tècnica sol-gel

La tècnica sol-gel (SG) és el nom que es dóna a una sèrie de processos en els que una solució (sol) esdevé un gel. El pas a través del qual ha transcorregut el sistema es coneix com transició sol-gel. El gel format presenta una alta porositat i això va constituir, de bon principi, un dels inconvenients a superar, quan en els inicis de la tecnologia sol-gel l'objectiu principal estava encaminat a la obtenció de vidres densos. Ans al contrari, actualment, la porositat es un valor afegit en els materials obtinguts per aquesta via, ja que gràcies al control de les dimensions dels

porus es pot retenir una segona fase, constituint per tant, un material compòsit, idoni per al desenvolupament de biosensors.

Aquesta estratègia d'immobilització resulta especialment atractiva en aquells sensors en els que la capa de reconeixement té un origen biològic, i es pot afegir a la col·lecció de mètodes que mantenen la capa de reconeixement en un estat funcional per un període de temps suficient per dur a terme un anàlisi.

La solució, un cop gelada, forma una estructura entrecreuada de polímer de sílice, caracteritzada per enllaços entre oxigen i silici, que permet l'atrapament de les biomolècules desitjades. Modificacions realitzades en el procés sol-gel han permès en els darrers anys la incorporació de material biològic (enzims, anticossos, cèl·lules vives, proteïnes²³⁻²⁶) i així també la de colorants²⁷, catalitzadors inorgànics²⁸, polímers conductors²⁹ i, més recentment col·loides d'or³⁰. Aquests components romanen en l'interior dels porus de les matrius de sílice preservant llurs propietats estructurals i llur activitat biològica, de forma que poden interaccionar amb un alt grau de selectivitat amb diferents ions i molècules de baix pes molecular difoses a través de la estructura porosa del gel. Aquesta estructura, alhora, preserva l'entrada de molècules de PM elevat. La preparació en condicions no agressives d'aquestes bioceràmiques permet combinar els avantatges de l'elevada sensibilitat i especificitat de certs processos bioquímics amb la robustesa dels compòsits i materials inorgànics. A més, la flexibilitat en el procés que permet el mètode de preparació sol-gel (es poden obtenir gels monolítics, làmines primes, pols granulada o fibres), facilita diverses aplicacions en altres camps com la cromatografia³¹, la fotocatalisi³² i la microfabricació³³. Un altre fet atractiu de les tècniques sol-gel es que pot ser compatible amb processos automatitzats de fabricació en massa d'elèctrodes, tal com la serigrafia^{34,35}.

Tot i això, per tal d'assegurar un alt rendiment en la aplicació escollida, cal adaptar les condicions de preparació a les característiques de la biomolècula a encapsular, buscant una optimització en l'estabilitat i funcionalitat de la mateixa, així com en les prestacions de la matriu de suport (propietats òptiques, porositat, rigidesa, etc.).

Gràcies a aquesta nova tècnica, molècules orgàniques, inorgàniques i bioorgàniques poden restar immobilitzades en gel de sílice a temperatura ambient. Degut a la relativa baixa temperatura necessària per la preparació d'aquestes matrius, quasi bé els 18 milions de molècules orgàniques i bioorgàniques existents, que no podien ser retingudes en gels (s'acostumava a preparar a temperatures elevades properes als 1000°C), poden ara ser immobilitzades en sol-gel. A més, els precursors emprats per a la formació del gel, no afecten la

activitat de les biomolècules i els productes de la transició SG són normalment alcohols volàtils a temperatura ambient. Malauradament, tot i els esforços, s'ha observat que alguns enzims mostren una disminució de llur activitat quan estan immobilitzats en aquest tipus de matriu ³⁶.

6.1.3.1 Matrius de sílice conductores: compòsits ceràmics de carboni

Com a resultat d'aquesta nova tecnologia, s'han desenvolupat uns sensors híbrids basats en compòsits ceràmics de carboni (ceramic carbon composite electrode), constituïts per una dispersió de pols de carboni en matrius de sílice que poden ser modificades orgànicament. Es preparen barrejant una quantitat adequada de pols de carboni amb els precursors sol-gel, que esdevé una matriu porosa de sílice després de la gelació. Aquests elèctrodes es beneficien de les propietats mecàniques de l'estructura de sílice (o sílice modificada), de la conductivitat del carboni dispers i de la capacitat de manipular fàcilment les característiques de la matriu mitjançant la selecció d'un precursor sol-gel o de un modificador adequat. Resulta possible obtenir matrius carboni-sílice en pràcticament qualsevol configuració geomètrica desitjada, i en quasi qualsevol dimensió requerida, fins i tot en forma de microelèctrodes. Donada a més, la seva naturalesa porosa, presenta una gran àrea superficial i, per tant, una elevada superfície activa.

Depenent de les característiques químiques dels precursors del gel, els elèctrodes monolítics de grafit poden presentar propietats hidròfobes. Els dispositius fets a partir de metiltrimetoxilà, per exemple, mostren una superfície hidròfoba (tant abans com després d'un hipotètic poliment), evitant l'entrada d'aigua a través de la estructura porosa. Els elèctrodes poden romandre hidròfobs fins i tot després de períodes prolongats (setmanes) en dissolució aquosa. En aquest tipus de dispositiu, però, tan sols la superfície externa és electroquímicament activa. Tot i això, si la matriu porta incorporat el modificador i és suficientment homogènia es poden construir elèctrodes modificats, químicament o bioquímicament, de superfície renovable, en els que s'obté una nova àrea de treball mitjançant un senzill poliment. L'ús d'un reticle de sílice modificada, permet, a més a més, aprofitar la polaritat de la superfície de la matriu per intercanviar ions o excloure molècules segons les seves dimensions, la polaritat o, com s'ha dit anteriorment, la naturalesa hidròfoba.

6.1.3.2 Immobilització de biomolècules en matrius sol-gel

Els procediments comunament utilitzats per a la immobilització de compostos orgànics són els següents:

1. Impregnació.

Es realitza per exposició del suport porós a una dissolució concentrada del reactiu i evaporació del dissolvent. La immobilització és dèbil, i es produeix per adsorció o unió electrostàtica.

2. Immobilització química per unió covalent a matrius modificades.

Un dels aspectes més interessants de la tecnologia sol-gel, des de el punt de vista de les seves aplicacions en electroanàlisi, és la possibilitat, tal i com s'ha esmentat, de modificar orgànicament les matrius. Això permet la introducció de grups funcionals reactius que poden ser utilitzats per fixar espècies de reconeixement molecular sobre xerogels preparats (nom amb el que es coneix el gel un cop s'ha evaporat el dissolvent). Generalment s'utilitzen organoclorosilans o compostos semblants per enllaçar grups organofuncionals apropiats als grups silanol superficials per reaccions de condensació.

El procediment per obtenir superfícies modificades orgànicament es basa en la incorporació de monòmers alcoxilans que contenen els grups funcionals escollits en la mescla inicial de polimerització. Així doncs, aquells monòmers que contenen enllaços Si-C i radicals, com grups amino, vinil epoxi o mercapto, poden utilitzar-se per preparar xerogels modificats capaços d'enllaçar covalentment agents quelatants específics o mediadors redox.

3. Dopatge químic. La formació de sol-gel a temperatura moderada o fins i tot a temperatura ambient permet la immobilització de compostos poc resistents al calor mitjançant la incorporació dels modificadors en els precursors sol-gel. D'aquesta forma les molècules d'interès resten atrapades en el gel quan aquest es forma. És tracta d'un concepte intermediari entre les tècniques de impregnació i d'enllaç covalent i proporciona una via econòmica i ràpida d'immobilització de reactius. Presenta, però, un desavantatge; el *leaking* o pèrdua del material biològic cap a la solució de treball. Aquest resulta, donada la seva simplicitat, el mètode més utilitzat pels investigadors. La immobilització de l'enzim glucosa oxidasa i el mediador ferrocè en una matriu sol-gel (figura 6.1A)³⁷, n'és un exemple. En investigacions realitzades, es va observar que més del 80% de la GOx va restar activa en el gel i la resposta amperomètrica es corresponia amb les prediccions teòriques. Les característiques elèctriques d'aquestes capes, a més, podien ser millorades incorporant materials conductors, com grafit en pols o partícules metàl·liques (figura 6.1(B)). L'addició d'aquests components metàl·lics per millorar la conductivitat de la matriu sovint es realitza mitjançant partícules de grafit recobertes de metall (com el pal·ladi o el rodi)^{38,39}. Més recentment, s'ha substituït les partícules de grafit per nanopartícules d'or, barrejades juntament amb l'enzim en la matriu porosa de sílice⁴⁰. La fabricació d'aquest tipus de matrius enzimàtiques sol-gel va permetre la detecció amperomètrica de, a banda de glucosa⁴¹, d'analits com el L-lactat⁴².

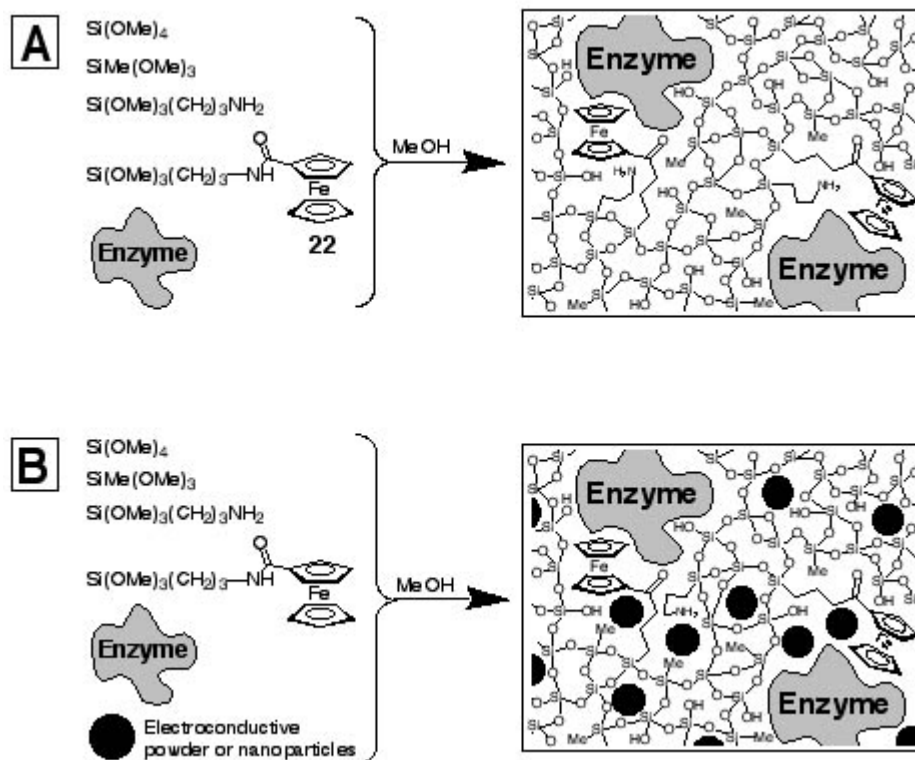


Figura 6.1 Immobilització de molècules d'enzim en una matriu de sol-gel (A) que conté grups mediadors redox; (B) Addició de partícules conductores de grafit (o metall).

4. Copolimerització de reactius modificats.

Implica la síntesi d'un monòmer alcoxilà que conté reactius orgànics enllaçats covalentment i la subseqüent utilització del precursor en el procés sol-gel. Aquest procediment és menys general que el dopatge sol-gel, ja que requereix la síntesi del precursor orgànic, però està exempt de pèrdues del modificador. D'aquesta forma s'han desenvolupat biosensors de glucosa basats en composts sol-gel que contenen GOD i mediadors redox co-immobilitzats⁴³⁻⁴⁷. Aquests mediadors han estat enllaçats en la xarxa de silici (e.g. N-(3-trimetoxisililpropil) ferrocenilacetamida com a co-monòmer funcionalitzat)⁴⁷, tot i que també poden incorporar-se en el gel durant el procés de gelació (atrapament físic en la estructura de sílice)⁴⁴.

En altres experiències, s'ha funcionalitzat la proteïna en un pas previ a la síntesi de la matriu. L'enzim GOD prèviament funcionalitzat, per exemple, ha estat atrapat en una matriu sol-gel de grafit^{46,48}. Així, el pas d'electrons entre els setis actius de l'enzim i les partícules més properes de grafit es veu afavorit.

Les matrius de silici-carboni presenten, a més de les citades, altres característiques favorables importants, com ara són: elevada conductivitat elèctrica, rígides física, ínfim augment de volum en medi aquós i dissolvents orgànics; transparència en el visible i l'ultraviolat (interval més ampli que la majoria dels plàstics comercials, fet que converteix aquesta tecnologia en adequada per processos òptics); inèrcia química, el que implica baixa interacció amb els analits i enverinament molt lent per reaccions laterals irreversibles; estabilitat tèrmica, fotoquímica i biodegradativa elevades, especialment a valors de pH baixos; i excel·lent adhesió a suports plàstics i de vidre.

La immobilització de les molècules biocatalítiques en el SG és monitoritzat a través de la reacció amb el seu substrat específic. Aquestes reaccions s'han estudiat per tècniques òptiques^{49,50}, espectroscòpiques⁵¹, electroquímiques^{52,53} (majoritàriament amperomètriques), elèctrodes selectius d'ions⁵⁴ i termomètriques, mitjançant un termistor⁵⁵.

A banda de les aplicacions esmentades, les matrius de sílice s'han aplicat en altres camps; alguns exemples en són els aerogels (gels assecats sota condicions crítiques en els que l'aire ha quedat retingut en el gel) utilitzats en les naus espacials per recollir pols estel·lar i el desenvolupament de làsers d'elevada potència.

6.2 BIOSENSORS PLANARS BASATS EN GOD

A continuació, es descriu la fabricació i posterior optimització d'un biosensor de glucosa, a partir de la immobilització de glucosa oxidasa (GOD) i es mostra com la tecnologia sol-gel i les tècniques serigràfiques poden ser utilitzades per produir elèctrodes capaços de mesurar analits de forma selectiva.

6.2.1 Aparells i reactius

Per a la preparació i caracterització dels biosensors desenvolupats es varen utilitzar els materials que es detallen a continuació.

Materials:

Làmines de clorur de polivinil de 0.5 mm de gruix o poliester flexible (Melinex, ICI, UK) i pantalles stencil i de serigrafia (teixit monofilament de polimida, Scapa Filtration, Nova Zelanda)

Reactius:

Tinta de grafit (Acheson, Electrodag 423SS,); Tinta de plata (Acheson, Electrodag 427SS); Tinta de grafit 10% platinitzat (E-Tek Inc., Ltd); Tinta dielèctrica (Acheson SS241 12); KCl (Panreac); Hidroxietilcel·lulosa (Fluka); Carboximetilcel·lulosa (Fluka); Albúmina de sèrum de boví (BSA); Isopropan-2-ol (Aldrich); Meldola Blue (Aldrich); NAD⁺, NADH (Boheringer-Manheim); Trealosa (Sigma T5251); Tetraetil ortosilicat (Aldrich); Glucosa oxidasa GOD (Sigma G7016).

Aparells:

DEK 245 screen-printer (DEK Printing Machines Ltd, UK); Airbrush de doble acció (Paasche, Type VL); Elèctrode auxiliar de platí i elèctrode de referència de Ag/AgCl (BAS); Potenciostat CV27 (BAS); University of Newcastle upon Tyne; ADInstruments.

Els corrents es registraren utilitzant software de MacLab i Chart (ADInstruments).

6.3 FORMACIÓ DE GEL DE SÍLICE

Ja hem vist que un procés sol-gel és aquell on una solució (sol) pateix una transició o transformació en gel. Un exemple particular d'un procés sol-gel és la hidròlisi del tetraetil ortosilicat [TEOS, Si(O₂CH₃)₄], en etanol i aigua, en el que una solució d'una sola fase pateix una transició sol-gel, esdevenint una sistema rígid de dues fases de sílice (SiO₂) i solvent.

A la literatura apareixen diverses formes d'aconseguir matrius de gel de sílice. Totes elles es basen en la hidròlisi i polimerització del tetraetil ortosilicat, mitjançant catàlisi àcida o bàsica.

La més emprada pels investigadors és la àcida, i fou en la que es decidí iniciar les investigacions.

En el següent esquema es mostra la hidròlisi del tetraetil ortosilicat (TEOS) (figura 6.2a) i la seva posterior condensació (figura 6.2b) per formar cadenes d'oxigen i silici (gel). Aquesta succeeix quan es barregen TEOS i aigua en un solvent comú, generalment etanol.

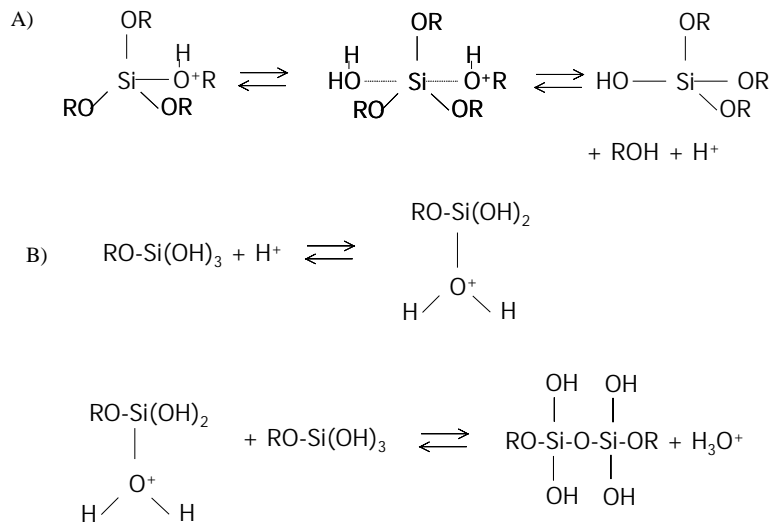


Figura 6.2 Esquema de la reacció d'hidròlisi (A) i condensació (B) del tetraetil ortosilicat (TEOS) per formar cadenes d'oxigen i silici (matriu de gel de sílice) sota catalisi àcida.

L'intermediari que es forma, com a resultat de la hidròlisi parcial del TEOS s'anomena silanol. La completa hidròlisi de $\text{Si}(\text{O}_2\text{CH}_5)_4$ a $\text{Si}(\text{OH})_4$ formaria àcid silícic, però això no succeeix. En comptes d'això hi ha una condensació entre silanols o amb un grup etoxi per formar ponts d'oxigen o un grup siloxà Si-O-Si. Les molècules d'aigua o d'etanol són eliminades. Tant l'hidròlisi com la condensació es poden donar per reaccions de substitució nucleofílica catalitzades per àcid o base. Quan la catalisi es àcida el gel té una major densitat i un menor volum de porus.

A valors de pH baixos, la sílice tendeix a formar molècules lineals que són ocasionalment entrelaçades (cross-linking). Amb el temps els enllaços augmenten formant un reticle tridimensional i esdevenint un objecte sòlid (alcogel) amb la forma del recipient que el conté (figura 6.3). Un cop el solvent és evaporat, la matriu és anomenada xerogel (sota condicions convencionals d'assecat, com l'evaporació) o aerogel (sota condicions crítiques). Aquests darrers presenten densitats molt baixes, i tenen la propietat de ser aïllants tèrmics excel·lents.

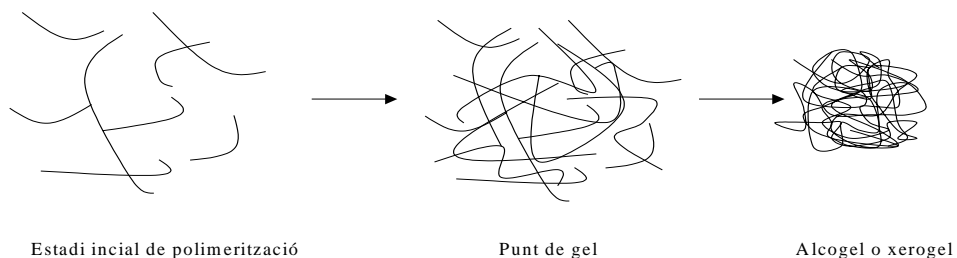


Figura 6.3 Formació de la matriu de sílice (gel) a partir de la polimerització del tetraetil ortosilicat (TEOS) en condicions de catalisi àcida.

6.3.1 Preparació i caracterització del sol-gel

6.3.1.1 Protocol de preparació

El procediment seguit per a la formació del gel consistí en mesclar en un recipient (vas de precipitat, tub Eppendorf...) els diferents reactius necessaris per a la formació del gel. Inicialment es varen realitzar diverses experiències en les que es barrejava, variant les proporcions, els precursors sol-gel. Les proporcions, un cop optimitzades, foren les següents:

60: 13: 13: 1 de TEOS, aigua, etanol i HCl 1.0 M, respectivament.

Es varen barrejar mitjançant un agitador magnètic. Al cap d'aproximadament una hora el gel es formava completament (sovint aquest temps era inferior, i tan sols calien uns 50 minuts per a la completa formació del gel). Un cop format adquiria la forma del recipient en la que es trobava.

Es varen variar diverses condicions experimentals per tal d'observar l'efecte produït en la formació de la matriu de sílice i per aconseguir, per tant, un major **control en la formació del gel**.

Es prepararen gels en presència i absència d'etanol seguint el protocol descrit, es va afegir els reactius en diferent ordre i estadis de la reacció i es va modificar el règim d'agitació. Les observacions dutes a terme foren:

El gel no es forma en absència d'etanol o quan no s'agita la solució. Així mateix, en augmentar la velocitat d'agitació el gel es forma més ràpidament.

L'addició dels reactius (TEOS, etanol, aigua i HCl) en diferent ordre no afecten la reacció. L'addició del material biològic en el primer estadi de la reacció (juntament amb la resta de reactius) retarda considerablement la formació del gel (§6.3.2).

6.3.2 Immobilització del material biològic

La immobilització del material biològic es va realitzar afegint a la solució que contenia els reactius que permetien la formació del gel l'enzim d'interès. Un dels objectius en la immobilització del material biològic és aconseguir l'homogenització en la esmentada solució. D'aquesta forma un cop la solució esdevé gel aquest conté l'enzim en el seu si, conservant, potencialment, la seva activitat biològica.

Es tracta doncs d'immobilitzar la proteïna dins el gel i, per tant, l'addició en la solució s'ha de produir sempre abans que el gel es formi.

Experimentalment es va comprovar que l'addició del material biològic retardava considerablement la formació de la matriu. Aquest retard es veia incrementat si l'enzim era addicionat juntament amb el TEOS. També es va observar que l'increment de viscositat de la solució no es lineal, sinó que la formació del gel transcorre lentament fins la darrera etapa del procés en el que la solució esdevé un gel altament viscos molt ràpidament. Podem concloure, doncs, que durant els 45 minuts inicials de la reacció, la solució es bàsicament líquida i, per tant, qualsevol component afegit en aquesta etapa serà fàcilment homogenitzable. En conseqüència, es va deixar que la reacció de polimerització de les cadenes d'oxigen i silici s'iniciés (sempre sense arribar a formar-se gel) abans d'afegir el material biològic. Aquest s'addicionava a la mescla, en la darrera etapa de la reacció (generalment als 40 minuts d'iniciar-se).

El temps necessari perquè la solució esdevingués gel quan l'enzim es mesclava inicialment amb els precursors de la reacció de polimerització era d'un mínim de 24 hores.

Inicialment s'observà l'aparició d'una pasta insoluble quan es va afegir glucosa oxidasa (dissolta en un medi tamponat) a la solució sol-gel. Aquest precipitat dificultava la homogenització de l'enzim.

Les experiències realitzades demostraren que el que provocava aquest precipitat era la solució de tampó fosfat 0.1 M (pH 7.0). Per tant es va substituir la solució tamponada de GOD per una solució no tamponada.

6.3.3 Estimació de l'activitat enzimàtica en una matriu de sílice

Es va realitzar un assaig espectrofotomètric per comprovar l'activitat enzimàtica dins la matriu de sílice. L'assaig es va fer sobre gel en el qual s'havia immobilitzat enzim glucosa oxidasa. El procediment seguit fou el següent:

Es va afegir 0.023 g de gel que contenia GOD en el seu si en una cubeta, i es mesclà amb 50 μ l d'una solució que contenia 10.35 mg de fenol, 1.5 mg de 4-aminoantipirina, 0.7 mg de glucosa i 1.0 mg de peroxidasa en 10 ml de tampó fosfat 0.1 M de pH 7.0 (kit d'anàlisi Boehringer).

Es realitzaren diverses determinacions i l'absorbància mesurada es va comparar amb assaigs on l'enzim estava lliure en solució. Els resultats demostraren que la proteïna roman activa en el gel. També es realitzaren assaigs espectrofotomètrics en enzims continguts no tan sols en gel sinó en hidroxietilcel·lulosa i carboximetilcel·lulosa (utilitzat posteriorment en el procés d'impressió de la pasta per a la fabricació dels sensors); els resultats aconseguits foren totalment comparables.

6.4 CONSTRUCCIÓ DEL BIOSENSOR SOL-GEL

6.4.1 Impressió de la pista conductora i del transductor

El procés seguit per a la impressió de la pista conductora i del transductor fou totalment anàleg a l'utilitzat en les impressions dels sensors de pesticides (capítol 2). Tot i això, hi hagueren algunes diferències degut a que l'aparell utilitzat, tant en la impressió de les tintes conductores com pel material biològic fou la DEK 245 screen-printer (DEK Printing Machines Ltd, UK), màquina d'impressió més ràpida i automàtica.

S'utilitzaren 3 màscares diferents en la construcció de la pista i el transductor, cada una amb el disseny adient per a cada pas del procés de la fabricació del sensor. El procediment seguit en la fabricació per screen printing del sensor es pot observar en la figura 6.4.

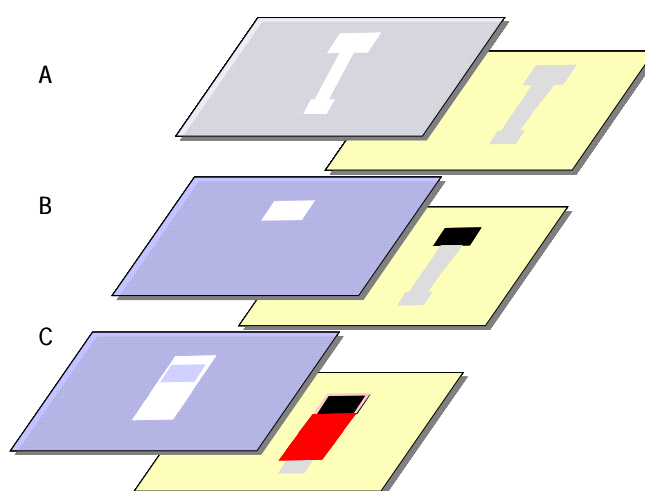


Figura 6.4 Impressió del transductor a partir de tintes comercials de plata (A; pista conductora), grafit (B; transductor) i polímer dielèctric (C; aïllant).

El primer pas fou la construcció de la pista conductora mitjançant la impressió per serigrafia d'una tinta comercial de plata. Aquesta tinta es va aplicar sobre làmines de clorur de polivinil de 0.5 mm de gruix.

Una segona màscara fou necessària per a la impressió del transductor. Aquesta darrera constava de dues parts; impressió de tinta comercial de grafit en un primer pas, i impressió de tinta de carboni platinitzat¹ en un segon pas. Ambdós dissenys eren idèntics i, per tant, només va caldre una mateixa màscara per les dues impressions.

El darrer pas fou la utilització d'una tercera màscara per a la impressió d'un polímer dielèctric que permetia aïllar la pista conductora quan aquesta es trobava en contacte amb la solució de treball.

6.4.2 Preparació i impressió de les matrius de gel de sílice

Un cop s'havia aconseguit la formació del gel i la immobilització del material biològic en el seu si, calia ara dipositar-la sobre el transductor. Per tal de completar el procés de fabricació del biosensors, doncs, s'havia d'adequar aquest biogel (matriu de gel i enzim incorporat) a les característiques necessàries per a una correcta impressió serigràfica.

Recordem que l'enzim era afegit a la solució quan el gel encara no s'havia format, possibilitant així la correcta homogenització de la biomolècula. Passat un cert temps el gel es formarà, immobilitzant l'enzim en l'interior. Així doncs, la impressió del biogel sobre el transductor mitjançant tècniques serigràfiques, es pot realitzar en dues etapes del procés:

- a) Immediatament posterior a l'addició de l'enzim, quan el gel encara no està format (aquest pas implicaria la formació del gel sobre el sensor).
- b) Un cop el gel està format amb el enzim en el seu si, s'imprimeix la pasta resultant de forma que el procés de gelació es produeix anteriorment i no sobre el sensor. L'enzim, d'aquesta forma, queda retingut en la matriu abans de ser imprès..

S'ha comprovat experimentalment que si la impressió de la pasta es realitza prèviament a la formació del gel la activitat enzimàtica es veu menys afectada, es a dir, aquells sensors fabricats a partir d'una impressió tipus a) donaren respostes més altes en els calibrats posteriors. Sembla ser doncs, que quan la matriu de sílice es forma sobre el biosensor, i per tant la immobilització de l'enzim es produeix després del procés d'impressió, aquest resta menys afectat. Aquest fet sembla força lògic ja que les tècniques de *screen printing* impliquen un procés enèrgic, amb fortes pressions i que d'alguna forma poden afectar el gel i provocar fissures amb el conseqüent degoteig de l'enzim en mesures posteriors.

Donada la seva consistència fluida, cal que el sol-gel sigui mesclat i homogeneïtzat en un medi més viscos abans de la impressió serigràfica. Es varen realitzar diverses mescles, amb diverses proporcions del polímer hidroxietilcel·lulosa (HEC), fins adequar la seva viscositat al procés serigràfic.

¹ La tinta de C/Pt s'elabora com es detalla a continuació: 2.5 g d'etilen glicol (12%) i Triton (0.3%) es mesclen amb 0.25 g de C/Pt mitjançant ultrasons durant 20 minuts. Tot seguit s'afegeixen 2.5 g d'HEC (6%) i es barreja mecànicament.

Inicialment, i seguint treballs d'altres investigadors ⁵⁶, es va incorporar carboni platinitzat (tinta comercial E-Tek©) a la pasta d'impressió, per tal de millorar el contacte elèctric amb el transductor. La pasta resultant no resultava adequada per a les tècniques de *screen-printing* i per tant es va substituir per grafit en pols.

Per tal de disminuir el potencial aplicat, es va incorporar la tinta de carboni platinitzat directament sobre el transductor de grafit mitjançant *screen-printing*. (§6.4.1 i §6.5.3).

Es varen utilitzar pantalles de polimida per imprimir la tinta sol-gel-GOD-HEC-grafit sobre el transductor de C/Pt. Es va observar que un cop s'imprimia la pasta sol-gel, la pantalla es bloquejava degut a la formació de gel entre els filaments del teixit de polimida, impossibilitant, per tant, el seu ús. Aquest fet demostrava alhora, que efectivament es formava una matriu de sílice posterior a la impressió de la pasta enzimàtica.

Calia doncs utilitzar una pantalla del tipus *stencil*, basat en una placa metàl·lica amb una única obertura d'un disseny predeterminat. Donada l'estructura d'aquest tipus de pantalla, es necessitava una pasta d'impressió d'una viscositat molt major i per tant es va canviar el polímer utilitzat (HEC) per la carboximetilcel·lulosa (CMC). Les quantitats optimitzades foren de 10 mg de GOD per 0.5 ml de sol-gel, barrejats amb 1.5g de CMC (2%; 0.03g de cel.lulosa). Es varen afegir 0.025 g de grafit amb unes proporcions finals sol-gel-GOD-CMC-grafit de 70:2:300:5 (§6.5.4).

6.5 CARACTERITZACIÓ DE BIOSENSORS SOL-GEL DE GOD

6.5.1 Procediment d'anàlisi

Els biosensors es varen avaluar mitjançant la tècnica de l'addició coneguda (§3.5.2). Es va seguir la variació del senyal electroquímich en funció de la variació en la concentració de la espècie estudiada.

La reacció estudiada fou l'obtenció de peròxid d'hidrogen (espècie electroactiva) a partir de glucosa, seguint l'esquema de la figura 6.5, i es va mesurar la intensitat de corrent produïda en un cert rang de concentració.

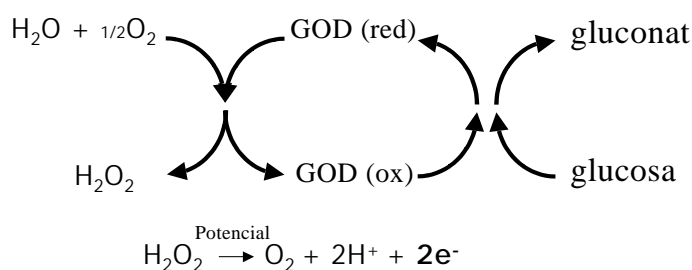


Figura 6.5 Esquema de la catàlisi enzimàtica de la glucosa oxidasa en la formació de gluconat a partir de glucosa

Les mesures es varen realitzar en una cel·la electrolítica envoltada d'una camisa d'aigua (termostatitzada) a 22°C. La solució de treball contenia 20 ml de tampó fosfat 0.1M i KCl 0.1M a pH=7.0 i on hi submergíem tres elèctrodes: un elèctrode de referència de Ag/AgCl, un elèctrode auxiliar de fil de platí i com a elèctrode de treball s'utilitzà el biosensor desenvolupat. Es varen connectar a un potenciostat que fixava el potencial de treball i donava la lectura del senyal. Les dades es recollien en un ordinador que realitzava les tasques de registrador. La solució s'agitava amb una microhèlix que facilitava el transport per convecció des del si de la solució cap a la superfície de l'elèctrode. La solució de treball contenia també una concentració elevada d'electròlit suport que fixava la força iònica del medi, afavoria la conductivitat i reduïa la electromigració.

Per a dur a terme la determinació amperomètrica de la glucosa es va aplicar el corresponent potencial d'oxidació (350 mV respecte un elèctrode Ag/AgCl). Es va observar una disminució molt important del potencial de treball en utilitzar els sensors de grafit platinitzat desenvolupats en el nostre laboratori⁵⁷. En absència de l'electrocatalitzador (platí), el potencial es situava en 1150 mV.

Un cop el senyal de fons era estable, s'addicionava el substrat mentre es feien les corresponents lectures d'intensitat de corrent amb el potenciostat.

Les dades obtingudes ens permetran saber paràmetres que caracteritzaran el sensor, tal com el pendent (sensibilitat), límit superior i inferior de resposta lineal, límit de detecció, reproductibilitat i temps de vida.

6.5.2 Optimització de la glucosa oxidasa

Es varen realitzar calibracions amperomètriques amb biosensors que contenien diferents càrregues enzimàtiques. En la figura 6.6 es pot veure la diferència en la resposta de dispositius amb 1, 5 i 10 mg de GOD. S'aprecia una clara tendència en l'augment de la sensibilitat quan s'addicionen quantitats més grans d'enzim. Els paràmetres de resposta es mostren en la taula 6.1.

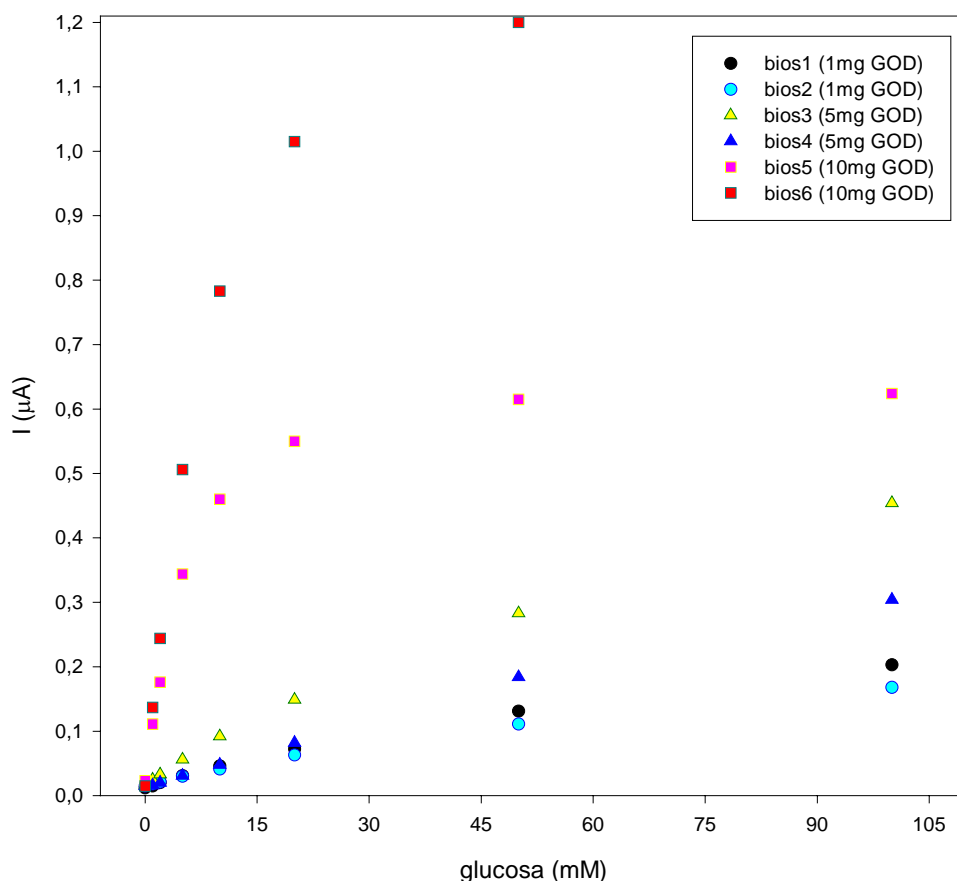


Figura 6.6 Rectes de calibració de biosensors sol-gel-GOD-CMC-grafit, 70: x: 300: 5, (matriu enzimàtica impresa sobre transductors de grafit/Pt), amb diferents continguts d'enzim ($x= 0.2, 1, 2$) en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.0).

Taula 6.1 Paràmetres de resposta corresponents a les calibracions realitzades sobre biosensors sol-gel-GOD-CMC-grafit, 70: x: 300: 5, (matriu enzimàtica impresa sobre transductors de grafit/Pt), amb diferents continguts d'enzim ($x= 0.2, 1, 2, 3$) en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.0).

Càrrega enzimàtica (mg GOD/ml sol-gel)	1	5	10	15
Sensibilitat ($\mu A/M$)	3	8	60	35
Coefficient regressió	.99	.999	.999	.9995
Interval lineal (mM)	0.5-25	0.5-15	0.5-12	0.5-15

Recordem que el nostre objectiu final no era el desenvolupament d'un sensor de GOD, i aquest sols ens era útil com a estudi preliminar per a la futura construcció dels sensors de lactat i malat. Per aquest motiu no es va realitzar un estudi més extens del contingut òptim del material biològic contingut en la matriu.

La cinètica de la reacció enzimàtica s'ajusta al model descrit per Michaelis-Menten, tot i que la K_m^{app} trobada (amb un valor de 5 mM) resulta lleugerament inferior al teòric (enzim en solució $K_m = 7 \text{ mM}^{58}$). Això podria indicar, teòricament, una major afinitat enzim-substrat^{58,59}. Aquest fet alhora fa suposar, que la influència provocada per la barrera difusional, com a conseqüència de la immobilització de l'enzim en el gel, és baixa.

6.5.3 Avaluació amperomètrica de biosensors de grafit i carboni platinitzat

Com s'ha comentat, inicialment es va incorporar carboni platinitzat a la pasta d'impressió. El carboni aportaria un augment del contacte elèctric amb el transductor i l'electrocatalitzador en disminuiria el potencial de treball. Degut a que la pasta resultant no resultava adequada per a la impressió es va substituir per grafit en pols i es va afegir el platí (barrejat amb carboni, tal com s'especifica en §6.4.1) directament sobre el transductor, mitjançant impressió serigràfica.

Es varen realitzar calibrats per comprovar les diferències existents entre biosensors on el C/Pt s'havia addicionat en el sol-gel juntament amb el material biològic i biosensors que contenien grafit sense catalitzador en la matriu i als que se'ls havia imprès una capa addicional de C/Pt per *screen-printing* sobre el transductor de grafit. No es varen detectar diferències significatives en la resposta d'ambdós tipus de biosensors, tot i que s'observà un lleuger increment de la sensibilitat i sobretot una millora en la qualitat de la impressió, així com en la rapidesa del procés serigràfic en el segon tipus de sensors. Els resultats es poden veure en la figura 6.7.

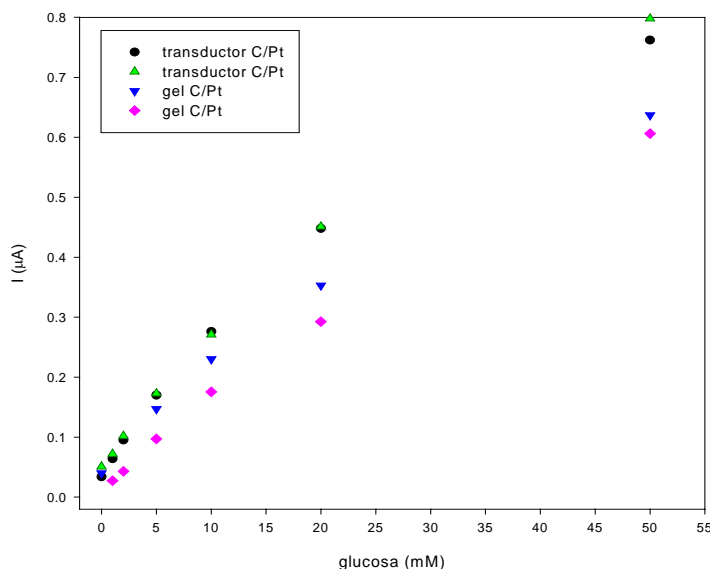


Figura 6.7 Calibració de biosensors sol-gel-GOD-CMC-grafit/C-Pt, 70: 2: 300: 5, (matriu enzimàtica impresa sobre transductors de grafit/Pt), en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.0). Sensors amb catalitzador incorporat en el gel; Pendent: $22 \pm 5 \text{ } (\mu\text{A/M})$, coeficient de regressió lineal: 0.999. Sensors amb catalitzador incorporat sobre el transductor; Pendent: $30 \pm 2 \text{ } (\mu\text{A/M})$, coeficient de regressió lineal: 0.999.

6.5.4 Avaluació amperomètrica de biosensors amb hidroxietilcel·lulosa o carboximetilcel·lulosa

Com ja s'ha comentat, degut a la obturació del teixit de polimida en la impressió del gel sobre el transductor de C/Pt, va ser necessari substituir les pantalles tradicionals per una pantalla tipus *stencil* (placa metàl·lica d'una única obertura amb un disseny predeterminat). Aquest tipus de màscara o plantilla, requereix una pasta d'impressió d'una viscositat elevada. Experimentalment es va comprovar que la CMC és més viscosa que la HEC i, per tant es va substituir aquesta. La qualitat de la impressió realitzada va millorar considerablement, alhora que les respostes entre ambdós dispositius presentaven resultats molts propers. Tot i això es va observar una lleugera pèrdua de l'interval lineal (figura 6.8).

La composició optimitzada per a la producció d'una pasta d'impressió enzimàtica sol-gel fou:

0.35 ml TEOS			
0.077 ml aigua	+ 10 mg GOD	+ 1.5 g CMC (2%)	+ 0.025 g grafit
0.077 ml etanol	(en 300 μ l d'aigua)		
0.058 ml HCl 0.1M			

Aquestes quantitats foren suficients per preparar al voltant de 50 elèctrodes.

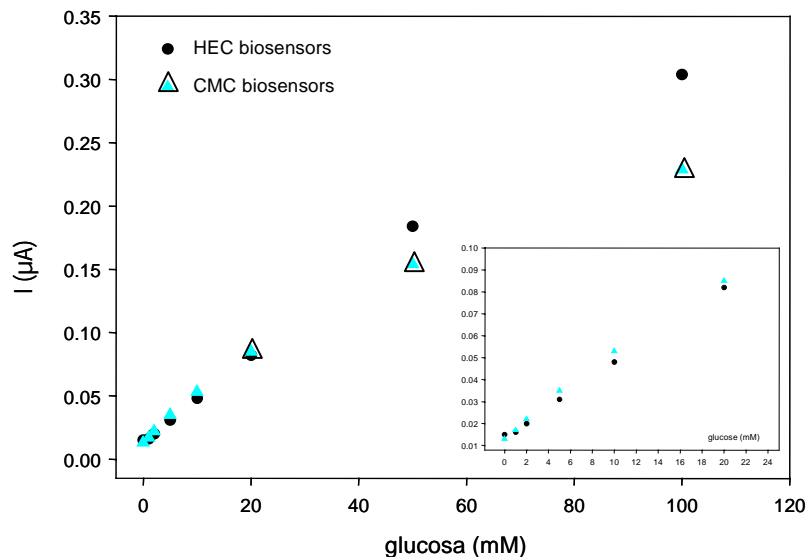


Figura 6.8 Calibració de biosensors sol-gel-GOD-HEC/CMC-grafit, 70: 1: 300: 5, (matriu enzimàtica impresa sobre transductors de grafit/Pt), en un medi 0.1 M fosfat i 0.1 M KCl (pH 7.0). Pendent: $7(\mu\text{A}/\text{M})$, coeficient de regressió lineal: 0.9995. Les impressions dels biosensors HEC han estat realitzades amb pantalles tèxtils, mentre que en els biosensors CMC s'ha emprat pantalles *stencil*.

6.6 COMPARACIÓ DE BIOSENSORS SOL-GEL AMB BIOSENSORS D'IMMOBILITZACIÓ ENZIMÀTICA PER ATRAPAMENT

Per tal de comprovar la efectivitat de la immobilització enzimàtica en matrius de sílice, es van construir biosensors seguint el mateix procediment però en absència de TEOS. D'aquesta forma resultava del tot impossible la formació del gel, i l'enzim quedava senzillament retingut per atrapament en el polímer de CMC.

Es varen comparar ambdós tipus de dispositius, mitjançant observació visual i a través de calibracions amperomètriques.

En primer lloc, quan es va afegir l'enzim al sol-gel es formaren petites bombolles, obtenint per tant una solució heterogènia.

Sota microscopi es podien observar cristallets, que s'associaren a la formació del gel (fig 6.9).

Quan es va afegir el material biològic a una solució lliure de TEOS no es va observar la formació de cap tipus de fase diferent i, per tant, l'aspecte era la d'una solució totalment homogènia. Sota microscopi, no es varen observar la presència de cristalls.

Les calibracions realitzades, tot i que de sensibilitats properes, mostraven altres diferències:

Els biosensors sol-gel presentaven bones estabilitzacions en temps breus, i corrents de línia base molt constants. Els biosensors d'atrapament, presentaven canvis de línia base (sobretot en les zones altes de concentració de substrat) i llargs temps d'estabilització. Per una altra banda, aquests darrers mostraven temps de resposta més ràpids, degut probablement a l'absència de una matriu de sílice, que actuaria com a barrera difusional.

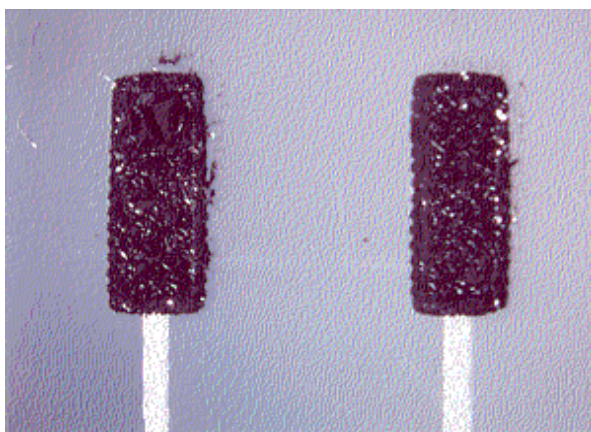


Figura 6.9 Fotografia microscòpica d'una sèrie de sensors fabricats mitjançant tecnologia sol-gel i impressió serigràfica. La tinta emprada ha estat la sol-gel-GOD-HEC/CMC-grafit, 70: 1: 300: 5, dipositada sobre transductors de carboni platinitzat mitjançant la DEK 245.

6.7 CONCLUSIONS

En el present capítol s'han aportat dades que demostren la possibilitat de construir biosensors utilitzant la tècnica sol-gel per a la immobilització de material biològic i la tecnologia d'impressió serigràfica per a la fabricació en sèrie de sensors. Els passos seguits han estat:

- 1- Immobilització de l'enzim GOD en una matriu de sílice preservant la seva activitat enzimàtica.
- 2- Desenvolupament d'una pasta d'impressió a partir de precursors sol-gel en la que el material biològic resta homogeneïtzat i conserva la seva funcionalitat un cop dipositat mitjançant tècniques de *screen-printing* sobre el transductor.
- 3- La presència d'una superfície cristal·lina en els biosensors desenvolupats, així com la obturació de les pantalles de polimida en imprimir la tinta d'impressió sol-gel-GOD-HEC/CMC-grafit/C-Pt (degut probablement a la formació de gel entre els filaments del teixit) demostra que, efectivament, es forma una matriu de sílice sobre el sensor, tot i que la naturalesa opaca dels elèctrodes que contenen grafit impedeixen qualsevol confirmació visual de la presència del gel. Les deposicions cristal·lines resulten visibles en aquells sensors preparats sense grafit.
- 4- Propietats com la formació de monòlits rígids, material opac o resistència a l'acetonitril de compòsits fabricats per altres autors a partir de mesclures que contenen precursors sol-gel, són consistents amb la presència d'un reticle de sílice^{38,60-64}.
- 5- La composició òptima per a la impressió de 50 biosensors és de 0.35 ml de TEOS, 0.077 ml d'aigua i etanol, 0.058 ml d'àcid clorhídric 0.1M, 10 mg GOD (en 300 µl d'aigua), 1.5 g de CMC (2%) i 0.025 g de grafit.
- 6- El potencial d'oxidació del H₂O₂, producte electroactiu derivat de la reacció de la glucosa, emprant el transductor de grafit platinitzat és de 350 mV, i, per tant, ha estat el potencial de treball escollit.
- 7- Les capes enzimàtiques resulten suficientment estables per resistir immersions prolongades en solucions agitadaes i les pèrdues de material biològic al llarg d'un calibrat són mínimes. A més el biosensor es prou estable per a poder ser utilitzat fins a 5 mesos després de la seva construcció conservant pràcticament intactes les seves propietats catalítiques.
- 8- L'avaluació adequada dels biosensors de GOD es va determinar a un valor de pH de 7.0.

9- L'interval lineal aconseguït pel biosensor optimitzat es situa entre 0.5 i 12 ± 0.4 mM, i el pendent en 60 ± 3 $\mu\text{A/M}$.

10- La cinètica de la reacció enzimàtica s'ajusta al model descrit per Michaelis-Menten, tot i que la $K_{m_{app}}$ trobada (amb un valor de 5mM) resulta lleugerament inferior al teòric (enzim en solució $K_m=7\text{mM}^{58}$). Això podria indicar, teòricament, una major afinitat enzim-substrat⁵⁹. Aquest fet fa suposar a l'hora, que la influència provocada per la barrera difusional, com a conseqüència de la immobilització de l'enzim en el gel, és baixa.

Bibliografia

¹ I.Gill, I., J. Ballesteros, *Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8587

² J. Wang. *Electroanalysis*, 3 (1991) 255

³ K. Kalcher. *Electroanalysis*, 2 (1990) 419

⁴ C.A. Groom, J.H.T. Luong. *Analytical Letters*, 26 (1993) 1383

⁵ A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, (eds.) *Biosensors. Fundamentals and Applications*. New York, Oxford University Press, 1989, p. 259-264

⁶ S.A. Wring, J.P. Hart. *Analyst*, 117 (1992) 1215

⁷ P.C. Pandey, S. Upadhyay, H.C. Pathak, C.M. Pandey. *Analytical Letters*, 31 (1998) 2327

⁸ B.G. Milagres, G. de O. Neto, L.T. Kubota, H. Yamanaka. *Anal Chim Acta*, 347 (1997) 35

⁹ A.K. Abass, J.P. Hart, D.C. Cowell, A. Chappell. *Anal Chim Acta*, 373 (1998) 1

¹⁰ L. Mao, K. Yamamoto. *Talanta*, 51 (2000) 187

¹¹ S.L. Álvarez-Crespo, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco. *Biosens Bioelectr*, 12 (1997) 739

¹² P. Domínguez Sánchez, P. Tuñón Blanco, J.M. Fernández Álvarez, M.R. Smith, R. O'Kennedy. *Electroanalysis*, 2 (1990) 303

¹³ J.E. Frew, H.A.O. Hill. *Anal Chem*, 59 (1987) 933A

-
- ¹⁴ E. Barendrecht. *Journal of Applied Electrochemistry*, 20 (1990) 175
- ¹⁵ S.A. Emr, A.M. Yacynych. *Electroanalysis*, 7 (1995) 913
- ¹⁶ C. O. Schmakel, K. S. V. Santhanam, P. J. Elving. *Journal of the American Chemical Society*, 97 (1975) 5083
- ¹⁷ T. N. Rao, I. Yagi, T. Miwa, D. A. Tryk, A. Fujishima. *Anal Chem*, 71 (1999) 2506
- ¹⁸ S. A. Wring, J.P.Hart. *Analyst*, 117 (1992) 1215
- ¹⁹ S. H. Baik, C. Kang, I. C. Jeon, S. E. Yun. *Biotechnology Techniques*, 13 (1999) 1
- ²⁰ C. Gyss, C. Bourdillon. *Anal Chem*, 59 (1987) 2350
- ²¹ J. Wang, M. S. Lin. *Anal Chem*, 60 (1988) 499
- ²² W. B. Nowall, W. G. Kuhr. *Anal Chem*, 67 (1995) 3583
- ²³ S. Braun (Ed.), *Kluwer Academic Publishers*, Amsterdam, 1991, p. 205.
- ²⁴ S. Braun, *Chem. Mater.*, 6 (1994) 1605
- ²⁵ K. Ramanathan, *J. Sol-Gel Sci. Tech.*, 10 (1997) 309
- ²⁶ K. Ramanathan, N. Nomeni, P.O. Carsson, *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 21
- ²⁷ Z. Chen, *Chem. Mater.*, 7 (1995) 1779
- ²⁸ J. Gun, O. Lev, *Anal. Chim. Acta.*, 336(1996) 95
- ²⁹ M.M. Verghese, K. Ramanathan, S. M. Ashraf, M. N. Kamalasanan, B.D. Malhotra, *Chem. Mater.*, 8 (1996) 95
- ³⁰ O. Lev, S. Bharathi, *Chem. Commun*, (1997) 2303
- ³¹ N. Soga, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, A 762 (1997) 135
- ³² K. Ramanathan, *Chem. Mat*, 9 (1997) 2533
- ³³ M. Zhao, *Adv. Mater*, 8 (1996) 822
- ³⁴ J. Wang, V. B. Nascimento, S. A. Kane, K. Rogers, M. R. Smyth, L. Angnes, *Talanta*, 43 (1996) 1903

- ³⁵ J. Wang, P.V.A. Pamidi, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1171
- ³⁶ S. Shtelzer, S. Rasppoport, D. Avnir, M. Ottolenghi, S. Braun, *Biotech. App. Biochem.*, 15 (1992) 227
- ³⁷ P. Audebert, C. Demaille, C. Sanchez, *Chem. Mater.*, 5 (1993) 911
- ³⁸ S. Sampa, O. Lev, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2015
- ³⁹ S. Sampath, O. Lev, *J. Electroanal. Chem.*, 426 (1997) 131
- ⁴⁰ S. Bharathi, S. Rajendran, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 29
- ⁴¹ T.-M. Park, E. I. Iwuoha, M. R. Smith, B. D. MacCraith, *Anal. Commun.*, 33 (1996) 271
- ⁴² T.-M. Park, E. I. Iwuoha, M. R. Smith, R. Freaney, A. J. McShane, *Talanta*, 44 (1997) 973
- ⁴³ M. Tsionsky, G. Gun, V. Glezer, O. Lev, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1747
- ⁴⁴ I. Pankratov, O. Lev, *J. Electroanal. Chem.*, 393 (1995) 35
- ⁴⁵ S. Sampath, O. Lev, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 7 (1996) 123
- ⁴⁶ J. Gun, O. Lev, *Anal. Chim. Acta*, 336 (1996) 95
- ⁴⁷ J. Gun, O. Lev, *Anal. Lett.*, 29 (1996) 1933
- ⁴⁸ S. Sampath, O. Lev, *Electroanalysis*, 8 (1996) 1112
- ⁴⁹ S. A. Yamanaka, J. I. Zink, J.S. Valentine, C. R. Mishida, F. Nishida, L. M. Ellerby, B. Dunn, *Chem Mater* 4 (1992) 495
- ⁵⁰ O. Ben-David, E. Shafin, I. Gililath, Y. Prior, D. Avnir, *Chem. Mater.*, 9 (1997) 2255
- ⁵¹ L. M. Ellerby, C.r. nishida, F. Nishida, S. A. Yamanaka, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink, *Science*, 255 (1992) 1113
- ⁵² Wang, P. V. A. Pamidi *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1171
- ⁵³ O. Lev, Z. Wu, S. Bharathi, S. Glezera, A. Modestov, J. Gun, C. Rabnovich, S. Sampath, *Chem. Mater.*, 9 (1997) 2354
- ⁵⁴ L. Montanaro, A. Negro, C. Pijolat, R. Lalauze, *Ann. Chim. Sci. Mater.*, 20 (1995) 399

-
- ⁵⁵ K. Ramanathan, B. Jönsson, B. Danielsson, *Anal. Chim. Acta*, 427 (2001) 1
- ⁵⁶ J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park, *Anal Chem.*, 68 (1996) 2705
- ⁵⁷ C. A. Galan-Vidal, J. Muñoz, C. Dominguez, S. Alegret, *Sensors Actuators*, B52 (1998) 257
- ⁵⁸ G. Guibault, *Analytical uses of immobilized enzymes*, Marcel Dekker, New York 1984
- ⁵⁹ W. Gopel, J. Hesse, J. N. Zemel (eds.) *Sensors. A comprehensive survey* VCH, Weinheim 1991
- ⁶⁰ J. Wang, P.V.A. Pamidi, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4490
- ⁶¹ S. D. Sprules, J. P. Hart, S. A. Wring, R. Pittson, *Analyst*, 119 (1994) 253
- ⁶² I. Pankratov, O. Lev, *J. Electroanal. Chem.*, 393 (1995) 35
- ⁶³ M. Tsionsky, G. Gun, V. Glezer, O. Lev, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1747
- ⁶⁴ J. Wang, P.V.A. Pamidi, C. Parrado, D.S.Park, J. Pingarron, *Electroanal.*, 9 (1997) 908

CAPÍTOL 7

Desenvolupament i avaluació de biosensors sol-gel de lactat oxidasa i lactat deshidrogenasa basats en tecnologia planar per a la determinació de lactat en vins

« Beber en toda medida, dar alegría al corazón y, sin perder la razón, darle razón a la vida »
José María Pemán

7.1 INTRODUCCIÓ

El vi està lligat a la història de l'home des dels seus orígens. Recentment s'ha conegut el descobriment d'una gerra de fang a les muntanyes de Zagros, Iran, de 5500 anys d'antiguitat, amb restes de vi a l'interior. Fins el moment, és la troballa arqueològica més antiga que es coneix sobre la història del vi.

S'han trobat, a més, escenes d'elaboració del vi en relleus egipcis que daten de 2400 anys a.C., així com en nombrosos versicles de la Bíblia ("Noè, agricultor, va començar a llaurar i va plantar una vinya, va beure del seu vi i es va embriagar", Gen. 9,2-21). Les naus cretones i egípcies transportaven àmfores de vi a través de la Mediterrània i en el Imperi Romà els vins eren part substancial del seu modus vivendi. Així mateix, ja existien mencions de les seves propietats medicinals en l'antiga Grècia, al voltant de l'any 700 a.C¹.

La nostra pròpia cultura, la mediterrània, és la cultura del vi (i de l'oli). El vi, que ens va arribar des de les antigues civilitzacions mediterrànies, a través de fenicis i grecs, és un producte de gran importància per a la nostra economia.

Algunes de les principals diferències entre els vins es deuen a les varietats específiques de ceps cultivades en determinades zones, regions o països, de forma que serveixen com a senya d'identitat i, per tant, constitueixen un veritable patrimoni del país.

Però, què és en realitat el vi? El vi és la beguda resultant de la fermentació alcohòlica completa o parcial del most (suc que s'obté del premsat del raïm). Per la seva banda, la fermentació no és res més que una manifestació del metabolisme d'alguns éssers vius, com les llevadures (fongs unicel·lulars que es troben en el sòl de les vinyes, i que en la època de maduració del raïm s'adhereixen a la seva pell i així arriben al celler) i els bacteris, els quals mitjançant enzims realitzen una llarga sèrie de reaccions de oxidoreducció que els hi proporcionen energia. A la vegada, sintetitzen les seves proteïnes a expenses de les substàncies nitrogenades. Com a resultat d'aquesta fermentació, els sucres del raïm (com la glucosa) desapareixen quasi totalment i es transformen en alcohol etílic, anhídrid carbònic i una sèrie de productes, entre ells, els àcids (làctic, etc.).

Des del principi de la humanitat se sap que el vi, pres amb moderació, es beneficiós per a la salut. Al llarg de la història el vi ha estat utilitzat com estimulants, font d'energia i, fins i tot, en el tractament de diverses malalties. Tractats mèdics antics i llibres sagrats estan farcits de cites elogiant les propietats sanitàries del vi; el propi Sant Pau recomanava: "No prosseguiu en beure aigua sola, sinó utilitzeu una mica de vi per causa de l'estómac i malalties freqüents".

Estudis més recents, assenyalen que el consum moderat i regular de vi modifica favorablement el perfil lipídic de la sang i el seu sistema de coagulació, reduint el risc de trombosi. Alguns dels seus components, a més, actuen com antioxidants naturals davant malalties cardiovasculars. Tot i això, el seu consum ha de moderar-se molt, i fins i tot eradicar-se, en certes situacions fisiològiques, com embaràs, gastritis, úlceres, trastorns hepàtics, i en els nens i adolescents per trobar-se en fase de creixement. Així mateix, la mateixa quantitat de vi consumida de forma irregular i sobre tot durant episodis de embriaguesa, augmenta el risc de mortalitat cardiovascular, produint-se a més un desenvolupament important d'arítmies cardíques (ja ho diu un vell proverbi japonès: "amb la primera copa l'home beu vi; amb la segona el vi beu vi, i amb la tercera, el vi beu a l'home").

Cal destacar a més, que el vi, malgrat que hom ho pugui pensar, no és un aliment, ja que gairebé no proporciona nutrients. La seva aportació nutricional és exclusivament energètica i prové del seu contingut alcohòlic. En canvi, l'aportació de proteïnes, vitamines i minerals és de nul·la importància per a la dieta.

A l'hora de consumir vi, la temperatura resulta molt important, i no pot assolir mai els 20°C. Aquest concepte de temperatura de servei es basa en un principi ambivalent. Per un costat, disminuint la temperatura d'un vi, es poden amagar els seus defectes, però també s'atenuen les aromes i sabors. Per un altre costat, si es calenta un vi, s'accentuen les aromes i sabors però també es maximitzen els seus defectes. Així, el secret rau en l'equilibri, s'ha d'escollir la temperatura adequada.

Segons aquest principi, resulta millor servir un vi blanc el menys fresc possible per no atenuar les seves aromes i els matisos dels sabors que ens haguessin seduït; però servint-ho prop de la temperatura ambient, ens arrisquem a que el vi tingui un tast àcid o amarg.

Per posar un exemple, direm que dos dels tres vins utilitzats en les nostres anàlisis, Chardonnay i Sauvignon, els dos vins blancs més coneguts, es serveixen, entre 10 i 11 °C.

L'art del tast o degustació va començar a ser ciència a partir del segle XVIII, on les transaccions comercials de vi movien importants quantitats de diners.

Degut a això i a que el valor del producte es fonamentava en la impressió del comerciant, que obtenia de les sensacions que el vi li proporcionava, es va començar a instrumentar alguns mètodes que servissin per a estandaritzar el mecanisme d'avaluació dels vins.

Així doncs, a finals del segle XIX es van començar a analitzar científicament els elements que contenien els diferents aliments, descobrint-se ja algunes propietats del vi, fins el punt de que Louis Pasteur va arribar a afirmar que "el vi és la més sana i higiènica de les begudes", gràcies al seu contingut en diversos elements favorables per al organisme. En un moment històric com aquell, en el que el món assistia atemorit al descobriment dels microorganismes, aquesta afirmació tenia un gran valor i demostrava gran valor. En els anys finals del passat segle hem assistit a una ràpida successió d'estudis i descobriments sobre les propietats del vi i els seus components.

7.2 L'ANÀLISI DE VINS: ÀCIDS DEL VI I MÈTODES D'ANÀLISI

El raïm és una fruita àcida i com a conseqüència el vi es en realitat una dissolució àcida diluïda. Sense els àcids tindria un sabor molt insípid, un color molt pobre i la seva estabilitat seria mínima, arribant fins i tot a ser atacat per molts microorganismes que produïrien fermentacions no desitjables.

En el celler s'ha de conèixer en tot moment el grau d'acidesa del vi, per tal de determinar la quantitat adequada de diòxid de sofre que s'ha d'afegir (additiu que inhibeix l'oxidació del vi i el creixement d'alguns bacteris que el deterioren).

Els àcids principals del raïm són²: Tartàric: el típic àcid del raïm (en maduració fins 7 g/Kg).

Màlic: és l'àcid típic de la poma. El raïm verd en conté molt i el madur molt poc. Es pot trobar fins a $4.4 \times 10^{-2} \text{ M}^3$.

En fermentar el most, aquests àcids passen al vi, però a més se'n formen d'altres com:

Làctic: és el que dona el gust àcid del iogurt i resulta molt beneficiós. Es troba amb concentracions entre 1×10^{-3} i $6.7 \times 10^{-2} \text{ M}^4$. Un excés n'origina la *piqûre lactique* i proporciona un gust agre i amarg al vi. Succínic: com l'àcid làctic també resulta beneficiós. Acètic: l'àcid del vinagre i resulta negatiu. Una bona elaboració ha de donar un contingut d'acètic mínim.

L'acidesa del vi no s'expressa com el contingut de cada àcid, sinó com la suma de tots els àcids i referida al més important, que es el tartàric. Així, s'analitza tota la característica àcida del vi i s'engloba expressant-la en àcid tartàric^{5,6}.

Cal recordar que aquesta determinació engloba també l'àcid acètic, que no aporta beneficis al vi. Aquest al ser evaporable, s'anomena acidesa volàtil. Per tant, l'acidesa es troba dividida en acidesa volàtil, que sempre s'ha d'intentar que sigui mínima, i acidesa fixa (que òbviament és la resta de l'acidesa), que contribueix positivament al vi.

L'àcid màlic del raïm aporta al vi un gust aspre desagradable, tolerable en els blancs i rosats fins a cert punt, però no en els negres. Per aquesta raó, la tècnica aprofita un procés natural causat per microbis, anomenat desacidificació malolàctica, que transforma l'àcid màlic del vi en àcid làctic i diòxid de carboni. El vi, llavors, adquireix més suavitat i menor acidesa, resultant molt més agradable al paladar⁷.

És evident, doncs, que l'acidesa determina la qualitat del vi. Com a curiositat es pot assenyalar que en els vins negres joves, si l'acidesa fixa és inferior a 4,5 g/l. han de comercialitzar-se com a vins de l'any. Si tenen entre 4,5 i 5,5 poden ser de criaça, i entre 5,5 i 7 poden ser de llarg envelliment; sempre considerant associat un grau alcohòlic no inferior a 12°⁸.

7.2.1 Determinació de l'acidesa total d'un vi

La determinació de l'acidesa total d'un vi⁹ es realitza a la pràctica en base a una valoració àcid-base, emprant com a reactiu valorant una base forta com és el hidròxid sòdic (NaOH), prenent com a punt d'equivalència el valor de pH= 7,0. i utilitzant l'indicador "blau de bromotimol", (interval de viratge pH 6,0-7,5)

La determinació àcida pot també realitzar-se semiquantitativament per cromatografia sobre paperⁱ.

ⁱMaterial: Paper Whatman n°1 tallat en tires i recipient cromatogràfic.

Reactius: Solvent: Butanol o mescla de 200 ml. de propanol, 200 ml d'aigua i 21,7 ml d'àcid fòrmic al 90%; Solució reveladora: Dissolució aquosa de verde de bromotimol al 15%.

Tècnica: Es col·loca una gota del vi blanc que hem d'analitzar a 1 cm. De la vora inferior del paper, de forma que la taca produïda no excedeixi els 0,5 cm. de diàmetre. S'introdueix la tira de paper en el recipient cromatogràfic prèviament saturat de solvent, de forma que la vora inferior del paper tot just el fregui. Es deixa que el solvent ascendeixi pel paper (aproximadament dues hores), fins que el front assoleixi una altura de 15 cm. Es treu la tira de paper i es deixa assecar en un lloc airejat i que tingui una total absència de vapors àcids. Un cop sec, es polvoritza sobre el paper la solució reveladora, donant lloc a unes taques grogues sobre un fons verd-blavós. Apareixeran tres taques: la inferior corresponent a l'àcid tartàric; al mig l'àcid màlic i en la part superior del paper una taca deguda als àcids làctic i succínic.

També es poden identificar els esmentats àcids a través dels seus valors de Rf, que per a cada àcid són: 0,26-0,30 (àcid tartàric), 0,52-0,56 (àcid màlic) i 0,69-0,76 (àcids làctic i succínic). El mètode es considera semiquantitatiu, ja que la intensitat i el gruix de cada marca són aproximadament proporcionals al contingut de cada àcid en el vi.

Per a la determinació de l'àcid làctic i màlic en concret, s'empra una reacció enzimàtica, en presència de NAD en el cas de l'àcid màlic, (test de Boehringer) i lectura espectrofotomètrica a 340 nm i temperatura constant (veure §7.3.2.7 i annex B).

A banda dels mètodes tradicionals, diversos investigadors han proposat mètodes alternatius mitjançant biosensors¹⁰⁻¹³ basats sobretot en malat deshidrogenasa¹⁴⁻¹⁶, lactat deshidrogenasa^{17,18} i lactat oxidasa^{19,20}.

Algunes recerques han donat bons resultats amb límits de detecció de 0.011 per lactat i 0.015 per malat i intervals lineals fins 1.5 mM²¹, i fins i tot alguns investigadors han assolit límits de detecció molt baixos (1.4 µM)²², però cap d'ells ha aconseguit millorar els resultats dels mètodes ja existents fins ara.

7.3 BIOSENSORS PLANARS BASATS EN LOD

Tal i com es va comentar en el capítol 6, l'objectiu principal en els nostres estudis fou el desenvolupament d'un biosensor capaç d'analitzar àcid làctic i màlic en vins. En aquest capítol es descriu la fabricació i posterior optimització d'un biosensor de lactat, a partir de la immobilització de lactat oxidasa (LOD) i, posteriorment, de lactat deshidrogenasa (LDH) en sol-gel, seguint tècniques anàlogues a les descrites anteriorment (§ 6.4).

L'estudi de dos tipus diferents d'enzims possibilita, per una banda, l'elecció d'aquella biomolècula que permeti una anàlisi més acurada d'àcid làctic en vins i, per una altra, la possibilitat d'emprar enzims que treballin a un pH similar, com la MDH, i que per tant permetria, potencialment, l'anàlisi simultani de diversos analits.

7.3.1 Construcció del biosensor

Els biosensors de lactat oxidasa (LOD) varen seguir els procediments desenvolupats en el disseny i construcció dels biosensors GOD (§6.4). Així doncs, el protocol de preparació del gel enzimàtic, així com la seva impressió i la de les pistes conductores i transductor va ser bàsicament anàleg al descrit anteriorment. Només hi va haver dues modificacions, la primera referent a l'elaboració de la pasta d'impressió i la segona al temps de curat de la capa enzimàtica. Els passos seguits foren:

- Construcció de les pistes conductores mitjançant impressió de tinta de plata (Acheson, Electrodag 427SS) i del transductor (Tinta de grafit, Acheson, Electrodag 423SS i tinta

de grafit 10% platinitzat, E-Tek Inc., Ltd) sobre làmines de poli(clorur de vinil) de 0.5 mm de gruix o poliester flexible (Melinex, ICI, UK) utilitzant pantalles de polimida i tipus *stencil* (§ 6.4.1).

- Formació del gel i immobilització del material biològic en el seu si, substituint ara l'enzim GOD per LOD (36 U/mg, Genzyme, UK) (§ 6.4.2).
- Preparació del biogel (format per la matriu de gel i l'enzim incorporat) a les característiques necessàries per a una correcta impressió serigràfica. Donada la seva consistència fluida, fou necessari que el sol-gel fos barrejat i homogeneïtzat en un medi més viscosos abans de la impressió serigràfica. En el procés de construcció dels biosensors de LOD, a diferència de la GOD on s'emprà hidroxietilcel·lulosa (HEC), es va utilitzar una solució de CMC (2%), tot just preparada, per a cada impressió. La solució polimèrica s'homogeneïtzava mitjançant agitació magnètica, mantenint-lo en tot moment a una elevada temperatura per a una més efectiva convecció, fins que s'afegia al sol-gel. La experiència ens demostrà que no tan sols s'aconseguia una pasta més homogènia sinó que la impressió resultava de major qualitat.
- Posterior deposició sobre el transductor (com en el cas anterior, la impressió es produïa abans de la completa formació del gel i per tant el darrer pas del procés de gelació finalitzava sobre el transductor).
- Protecció dels contactes elèctrics del sensor mitjançant la impressió d'un aïllant (Tinta dielèctrica, Acheson SS241 12) que alhora permetia delimitar de forma més acurada la zona del sensor en contacte amb la solució.

Les quantitats optimitzades foren de 15 mg de LOD per 0.5 ml de sol-gel, mesclats amb 1.5 g de CMC (2%). Es varen afegir 0.025 g de grafit amb unes proporcions finals sol-gel / LOD / CMC / grafit de 70:3:300:5.

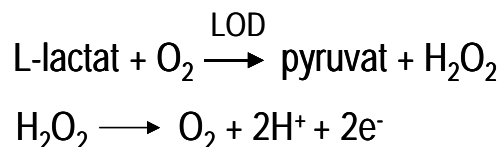
Un cop la capa biològica era impresa sobre el transductor, es deixava a 4°C durant almenys 60 hores, ampliant per tant el temps de curació (24 hores pels sensors de GOD). Aquests canvis feren augmentar la sensibilitat en un 22% pel mateix contingut d'enzim (§7.3.2.5).

Quan els sensors eren observats sota microscopi, la capa sol-gel amb l'enzim immobilitzat en el seu si, es veia transparent, d'aspecte cristal·lí.

7.3.2 Caracterització de biosensors sol-gel de LOD

7.3.2.1 Procediment d'anàlisi

Els biosensors es varen avaluar mitjançant la tècnica de l'addició coneguda (§3.5.2). Es va seguir la variació del senyal electroquímic en funció de la variació en la concentració de lactat.



Tal i com s'havia realitzat anteriorment, les calibracions es varen realitzar en una cel·la electrolítica envoltada d'una camisa d'aigua a 22°C. La solució de treball contenia 20 ml de tampó fosfat 0.1M i KCl 0.1M a pH=7.0 agitada amb una microhèlix. S'hi submergien tres elèctrodes: un elèctrode de referència de Ag/AgCl, un elèctrode auxiliar de fil de platí i com a elèctrode de treball s'utilitzà el biosensor desenvolupat. Es varen connectar a un potenciostat que fixava el potencial de treball i les dades eren recollides en un ordinador.

Per a dur a terme la determinació amperomètrica del lactat es va aplicar un potencial d'oxidació de 350 mV respecte un elèctrode de calomelans saturat. Tal i com succeïa anteriorment, es va observar una disminució molt important del potencial de treball en utilitzar els sensors de grafit platinitzat desenvolupats en el nostre laboratori. En absència de catalitzador (Pt), el potencial es situava en 1150 mV.

Un cop el senyal de fons era estable, s'addicionava el substrat mentre es feien les corresponents lectures d'intensitat de corrent amb el potenciostat.

7.3.2.2 Optimització del contingut d'enzim

Degut a la menor activitat de la lactat oxidasa, es va incrementar la quantitat de material biològic en el gel. Així doncs, es varen realitzar diversos experiments per optimitzar el contingut enzimàtic dels biosensors. Es varen provar les següents càrregues enzimàtiques: 40, 30, 26, 19, 12, 6, 3, 1.5, 1 mg LOD/ml sol-gel. Només aquells biosensors amb continguts superiors a 25 mg de LOD/ml sol-gel respongueren positivament a la presència d'analit en la mostra (figura 7.1). S'observà que els sensors amb càrregues enzimàtiques superiors a 40 mg/ml presentaven errors importants en la seva reproductibilitat. Les proves realitzades ens permeteren concloure que els sensors desenvolupats responien a concentracions de lactat, i de forma lineal en un cert interval de concentració (taula 7.1).

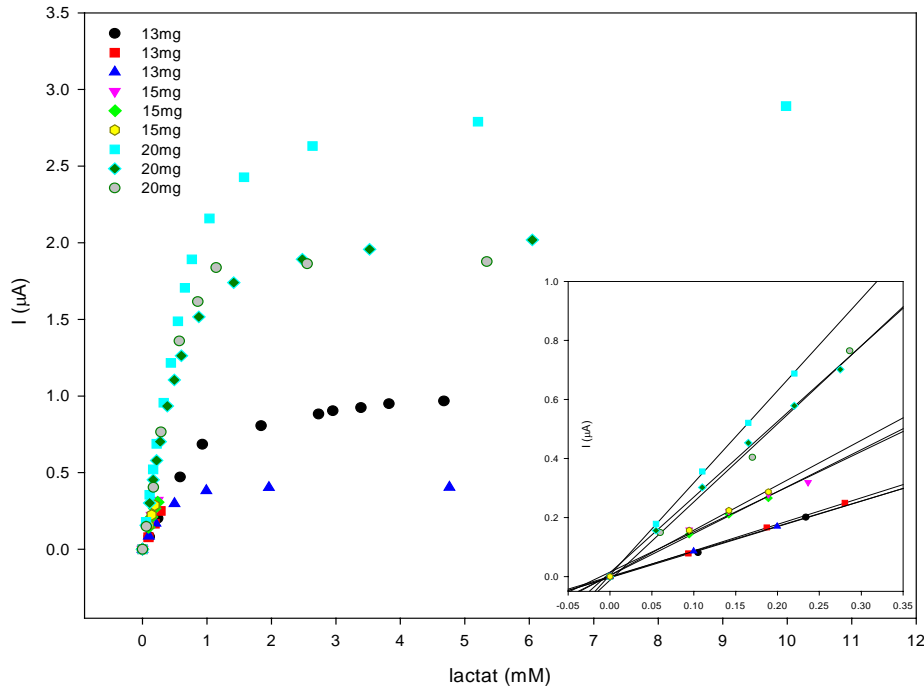


Figura 7.1 Calibracions amperomètriques de 9 biosensors de LOD amb càrregues enzimàtiques diferents (26, 30 i 40 mg LOD/ ml sol-gel) en una solució tampó de fosfat (pH=7.0) i 0.1 M KCl, afegint alíquotes d'àcid làctic. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl. Els sensors han estat preparats a partir de 0.5 ml de sol-gel i per tant els valors que apareixen en la gràfica, són la quantitat d'enzim real afegida a la solució sol-gel.

Taula 7.1 Paràmetres de resposta de calibracions amperomètriques en una solució tampó de fosfats (pH=7.0) i 0.1 M KCl, afegint alíquotes de lactat utilitzant biosensors amb càrregues enzimàtiques diferents (936, 1080 i 1440 U/ml sol-gel). Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl.

Càrrega enzimàtica / ml sol-gel	26 mg LOD (936 U)	30 mg LOD (1080 U)	40 mg LOD (1440 U)
Pendent ($\mu\text{A}/\text{M}$)	$870 \pm 43^*$	$1472 \pm 90^*$	$2800 \pm 500^*$
Interval lineal (mM)	0.05 - 0.4	0.05 - 0.45	0.025 - 0.5
Coefficient regressió lineal	0.999	0.998	0.999
Desviació estàndard relativa	5	6	18

*per un interval de confiança al 95% i n=8

La desviació estàndard relativa (reproductibilitat) trobada per biosensors amb 26 mg i 30 mg de LOD per ml de gel fou de 5 i 6 % respectivament. Si la càrrega s'augmentava fins a 40 mg/ml la DSR arribava a un valor del 18%, triplicant-se per tant la desviació en la sensibilitat presentada pels diferents sensors (n=8). Tot i això, també la pròpia sensibilitat augmentava; i en doblava (factor d'1.9) i triplicava (factor de 3.2) l'aconseguida pels biosensors amb 26 mg i 30 mg de LOD per ml de gel respectivament. L'interval lineal pràcticament no variava, o molt poc, pels diferents sensors.

Es va decidir treballar, finalment, amb sensors de 30 mg de LOD ja que quasi bé doblaven la sensibilitat d'aquells sensors amb 26 mg amb un augment molt petit de càrrega enzimàtica. La reproductibilitat, a més, estava molt per sobre de dispositius amb un contingut enzimàtic major. Finalment, es va comparar la resposta de sensor amb la cinètica de la reacció enzimàtica descrita per Michaelis-Menten. El model s'ajustava amb una $K_{mapp} = 0.5 \text{ mM}$ (Figura 7.2). El valor trobat és molt proper al valor trobat en solució (0.7 mM)²³, fet que indica que la matriu proporciona una mínima barrera difusional i/o una baixa modificació dels centres actius de l'enzim degut a la immobilització i, per tant, una bona afinitat pel substrat.

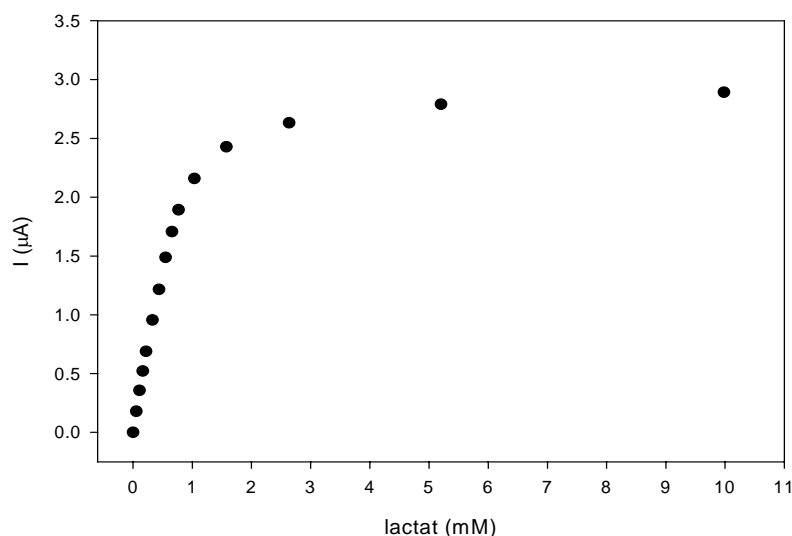


Figura 7.2 Resposta amperomètrica de biosensors de LOD (30 mg/ml sol-gel) en una solució tampó de fosfat pH=7.0, afegint alíquotes d'àcid làctic. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl. $K_{mapp} = 0.5 \text{ mM}$.

Així doncs, la composició enzimàtica òptima per un biosensor sol-gel/LOD/CMC/grafit fou de 30 mg de LOD i la formulació completa utilitzada en la seva construcció la següent: 15 mg de LOD, 1.5 g de CMC (2%) i 0.025 g de grafit afegits sobre una solució que conté els precursors sol-gel (0.35 ml de TEOS, 0.077 ml d'aigua i etanol i 0.058 ml d'àcid clorhídric 0.1M).

7.3.2.3 Efecte del pH sobre la resposta del biosensor

Una de les possibles aplicacions dels dispositius desenvolupats és la fabricació d'un biosensor que permeti la determinació simultània de malat i lactat en vins. Un dels inconvenients és el fet de treballar amb dos enzims, LOD i MDH. Aquests enzims necessiten diferents medis de treball (pH 7 i 8 respectivament) i per tant, si se'n volia fer un ús conjunt, era necessari avaluar la resposta dels biosensors en els dos medis de treball. Tot i això, i degut a que el pH òptim per l'enzim LOD és de 7, era de suposar que el seu comportament empitjorés a un valor de pH 8.

En la gràfica 7.3 es pot observar l'efecte de treballar a pH 7 i 8 en la resposta dels biosensors. Tal i com es preveia, el comportament del dispositiu enzimàtic millorava sensiblement quan les calibracions es realitzaven en un medi de pH 7. Tot i que els sensors encara responien a un valor de pH de 8.0, la sensibilitat, però per sobre de tot la reproductibilitat, patien una disminució considerable en aquest medi.

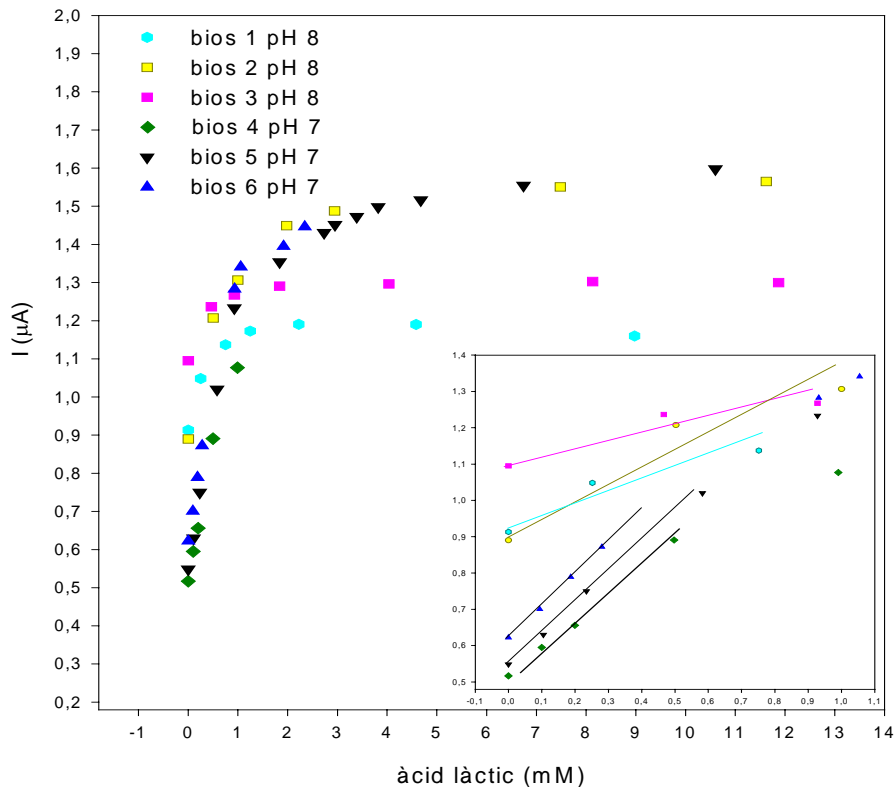


Figura 7.3 Calibracions amperomètriques de biosensors de LOD a diferents valors de pH (solució tampó de fosfat, pH=7.0, i de tris-HCl, pH=8.0) afegint alíquotes d'àcid làctic. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl.

Es va comprovar, doncs, que no era factible un hipotètic anàlisi simultani de lactat i malat a pH 8, o si més no, utilitzant els enzims mencionats. Anàlogament, es va comprovar l'efecte en la resposta d'un biosensor de MDH a pH 7. Els resultats observats varen ser força negatius (capítol 8).

Una de les vies factibles per tal de treballar simultàniament amb els dos biosensors, per tant, semblava ser la utilització d'enzims que treballassin a pH similars, com ho són la MDH i la LDH. Així doncs, i tot i que es continuaren els estudis dels biosensor de LOD, es varen realitzar estudis preliminars en biosensors de lactat deshidrogenasa amb posterioritat (§7.4).

7.3.2.4 Reproductibilitat dels biosensors

Es va estudiar la reproductibilitat en la resposta de biosensors que provenien del mateix lot de fabricació (repetibilitat o qualitat de fabricació) i de biosensors provinents de lots diferents (reproductibilitat de fabricació)

Els primers foren fabricats el mateix dia, s'empraren les mateixes tintes conductores per a la fabricació del transductor i s'utilitzà una mateixa pasta enzimàtica per a la impressió de la capa biològica per a tots ells (figura 7.4).

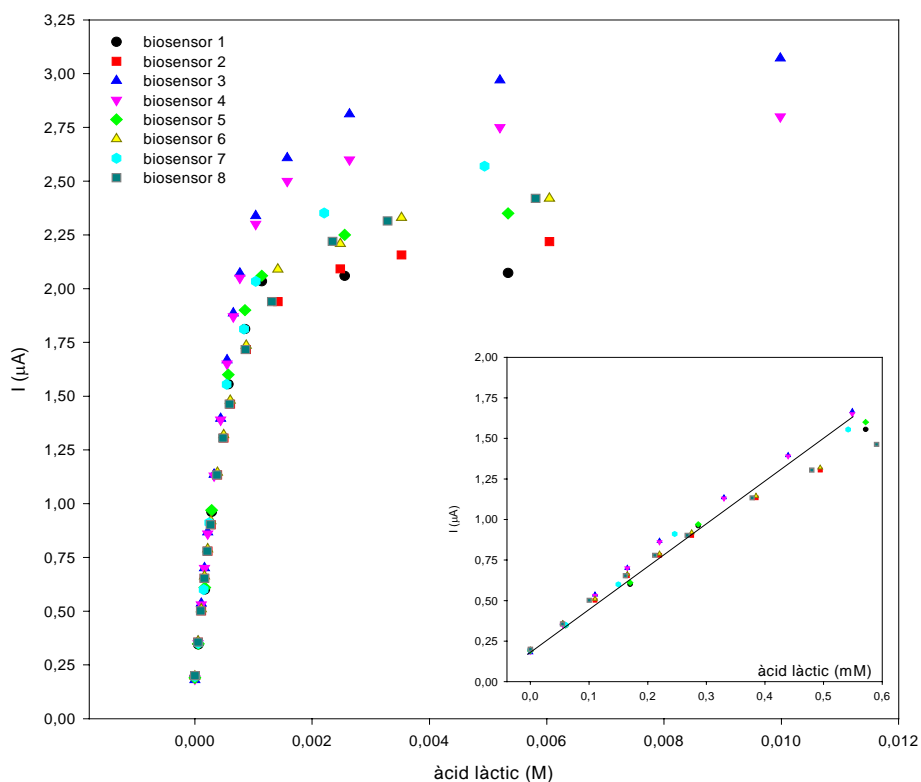


Figura 7.4 Calibracions amperomètriques de 8 biosensors de LOD (30 mg de LOD per ml de sol-gel) diferents en una solució tampó de fosfat (pH=7.0) afegint alíquotes d'àcid làctic. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl. Pendent: $1472 \pm 90(\mu\text{A}/\text{M})$, Interval lineal: 0.05 ± 0.01 - 0.4 ± 0.02 mM (per un interval de confiança al 95% i n=8). Coeficient de regressió: 0.998.

La desviació estàndard relativa (per n=8) trobada per biosensors amb 30 mg de LOD per ml de gel fou del 6 % (la mateixa precisió aconseguida en altres laboratoris amb elèctrodes convencionals)²². Si la càrrega s'augmentava fins a 40 mg/ml la DSR arribava a un valor de 18, triplicant-se per tant l'error, tal i com s'ha vist en §7.3.2.2.

El pendent aconseguït per aquest tipus de dispositiu fou de $1472 \pm 90 \mu\text{A}/\text{M}$. El límit superior de resposta lineal fou de $0.45 (\pm 0.02)$ mM, amb un límit de detecció de $0.04 (\pm 0.01)$ mM.

Aquests resultats, milloraren els aconseguits per altres investigadors amb dispositius planars semblants ($65 \mu\text{A/M}$)¹⁷ i foren propers als elèctrodes convencionals ($1000 \mu\text{A/M}$; I.d.: 0.05 mM ²⁴ $3000 \mu\text{A/M}$; $0.1-0.005 \text{ mM}$)²².

La precisió de la resposta també disminueix quan es compararen biosensors fabricats en dies diferents (i per tant pertanyen a sets diferents). La DSR obtinguda fou del 20% ($n=10$) per biosensors amb $30 \text{ mg d'enzim/ml gel}$. La major variabilitat d'aquests dispositius fou degut a la utilització de pastes enzimàtiques diferents en la impressió de la capa biològica. Això, sumat al fet de que, malauradament, el procés d'impressió continua tenint una component manual, feia que els dispositius no continguessin la mateixa quantitat exacta de material biològic i per tant les diferències en la sensibilitat també s'incrementaven. Aquest punt, resulta especialment feble quan es compara amb configuracions convencionals desenvolupades per altres investigadors (en aquest sentit resulta remarcable una DSR de 6.6% aconseguida per Serra et al²² en comparar dispositius de dues series diferents).

7.3.2.5 Condicions d'emmagatzematge

Els biosensors eren emmagatzemats a 4°C un mínim de 24 h , abans de ser calibrats. Es va observar, però, que aquells biosensors amb major temps de curació (fins a 60 hores) mostraven millors corbes de calibració i una sensibilitat lleugerament superior. Aquests canvis feren que dels primers biosensors amb pendents de $707 \pm 43 \mu\text{A/M}$ (6% error) es passés a biosensors amb valors de sensibilitat de $870 \pm 43 \mu\text{A/M}$ (5% error), pel mateix contingut d'enzim (13 mg de LOD , es a dir, $26 \text{ mg LOD/ml solgel}$).

Per tal de seguir el comportament dels dispositius en el temps, es realitzaren diferents calibrats amperomètrics.

7.3.2.5.1 Temps de vida dels biosensors LOD

Així doncs, per comprovar si els biosensors desenvolupats perdien activitat enzimàtica durant el procés d'emmagatzematge, es varen realitzar calibrats en diferents dies. En la Figura 7.5 es pot veure el comportament dels dispositius durant les dues primeres setmanes. No es varen apreciar diferències significatives en els seus calibrats. També es comparà la resposta de biosensors calibrats 24 h després de la seva fabricació amb biosensors calibrats 140 dies després de ser fabricats (figura 7.6). El comportament mostrat fou totalment anàleg en la zona lineal (taula 7.2), tot i que en les zones més altes de concentració (zona de saturació) la dispersió dels resultats

era important. Això suposa que la immobilització a la que es veu sotmesa el material biològic podria alterar el seu nombre de setis actius, i per tant saturant-se més ràpidament quan el biosensor s'emmagatzema més enllà dels 4 mesos. Tot i això, les diferències trobades no foren significatives quan la determinació es realitzava en la zona de treball (interval lineal).

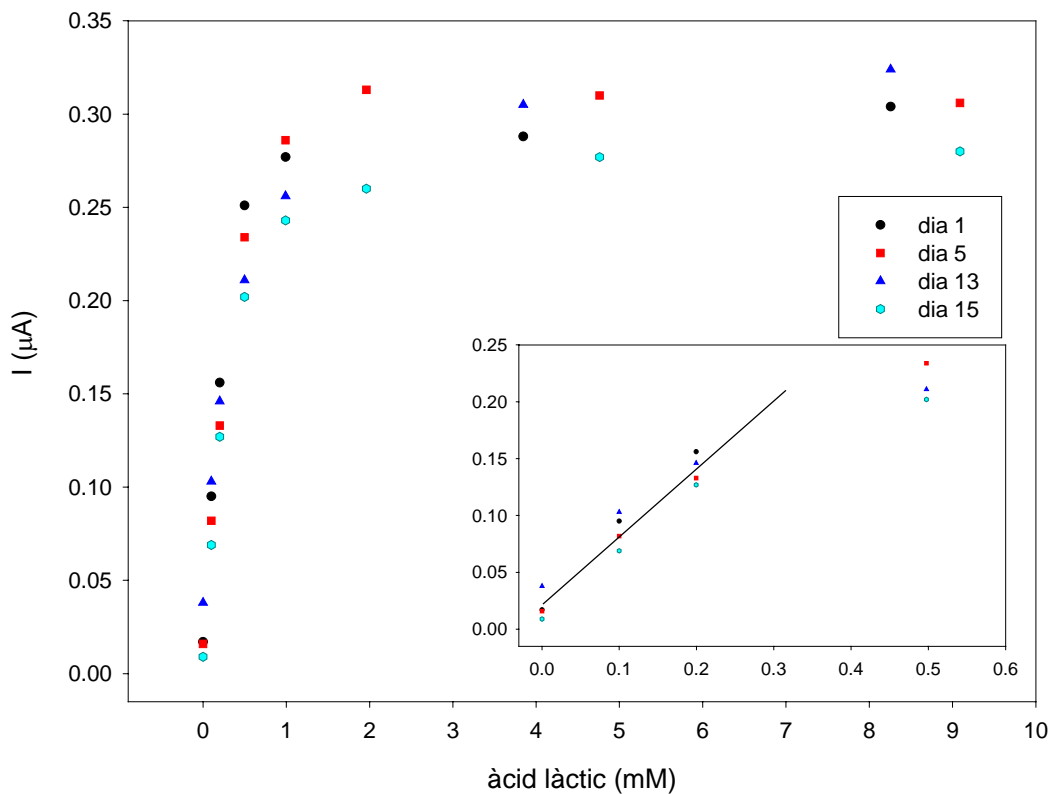


Figura 7.5 Calibracions amperomètriques de biosensors de LOD (26mg/ml sol-gel) amb el temps (durant dues setmanes) en una solució tampó de fosfats (pH=7.0) afegint alíquotes d'àcid làctic. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl.

Taula 7.2 Calibracions amperomètriques en una solució tampó de fosfats (pH=7.0) afegint alíquotes de lactat utilitzant 5 biosensors LOD (26 mg/ml sol-gel) de 1^a generació diferents. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl. Sensibilitat mitjana: $707 \pm 70 \mu\text{A/M}$.

Dia	1	1	1	140	140	140
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	772	696	671	640	700	630
Intercepte	0.017	0.020	0.017	0.012	0.014	0.014
Coefficient regressió lineal	0.9992	0.996	0.9994	0.998	0.996	0.997

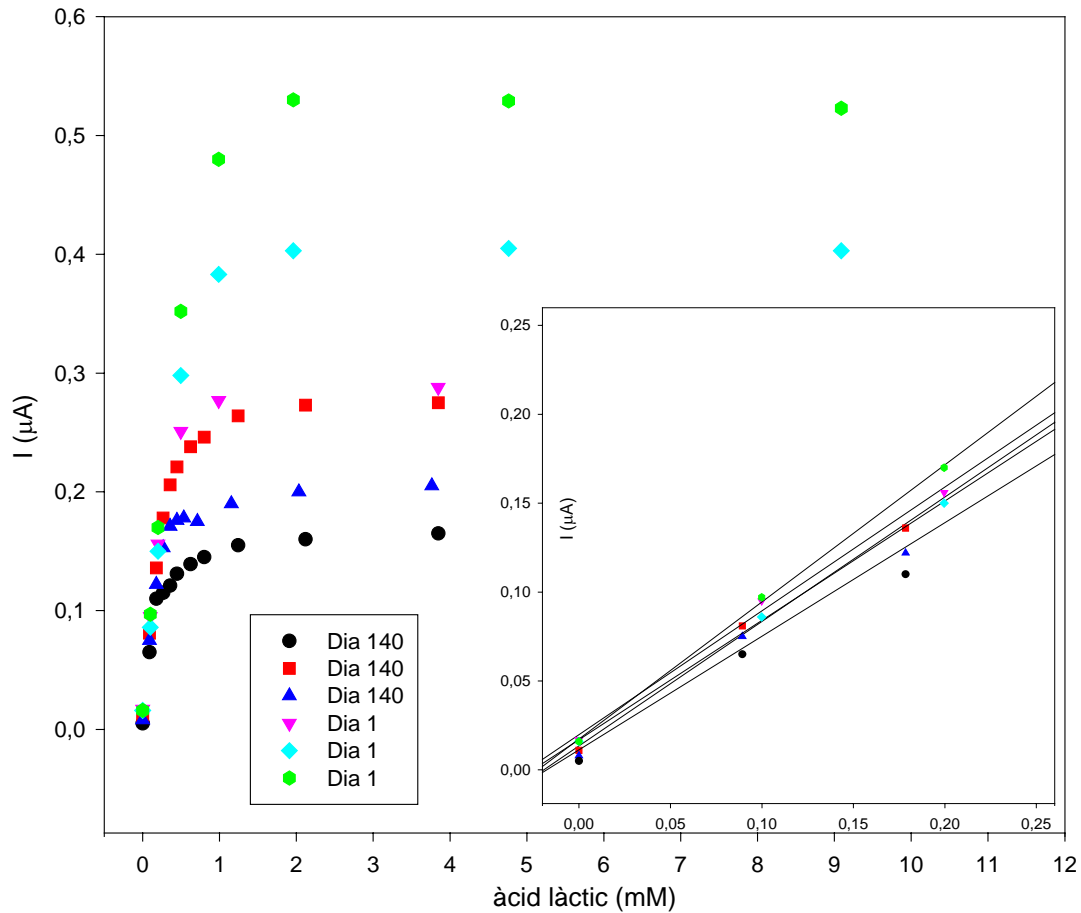


Figura 7.6 Calibracions amperomètriques de biosensors de LOD (26 mg/ml sol-gel) amb el temps (5 mesos de diferència) en una solució tampó de fosfats (pH=7.0) afegint alíquotes d'àcid làctic. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl.

7.3.2.6 Efecte de l'addició de vi en un calibrat amperomètric

Donat que els biosensors donaren bones corbes de calibració, i una resposta lineal en un cert interval davant l'addició d'àcid làctic, es va decidir avaluar el comportament dels dispositius en realitzar addicions de vi Chardonnay. L'addició d'aquestes alíquotes va generar respostes amb comportaments molt semblants a les obtingudes en les calibracions de solucions (de laboratori) conegudes d'àcid làctic. Tot i això, mostraren lleugeres desviacions respecte a les corbes de calibracions estàndard, degut a l'efecte de la matriu complexa. Aquest efecte s'incrementava a les zones altes de concentració, vora els nivells de saturació (Figura 7.7).

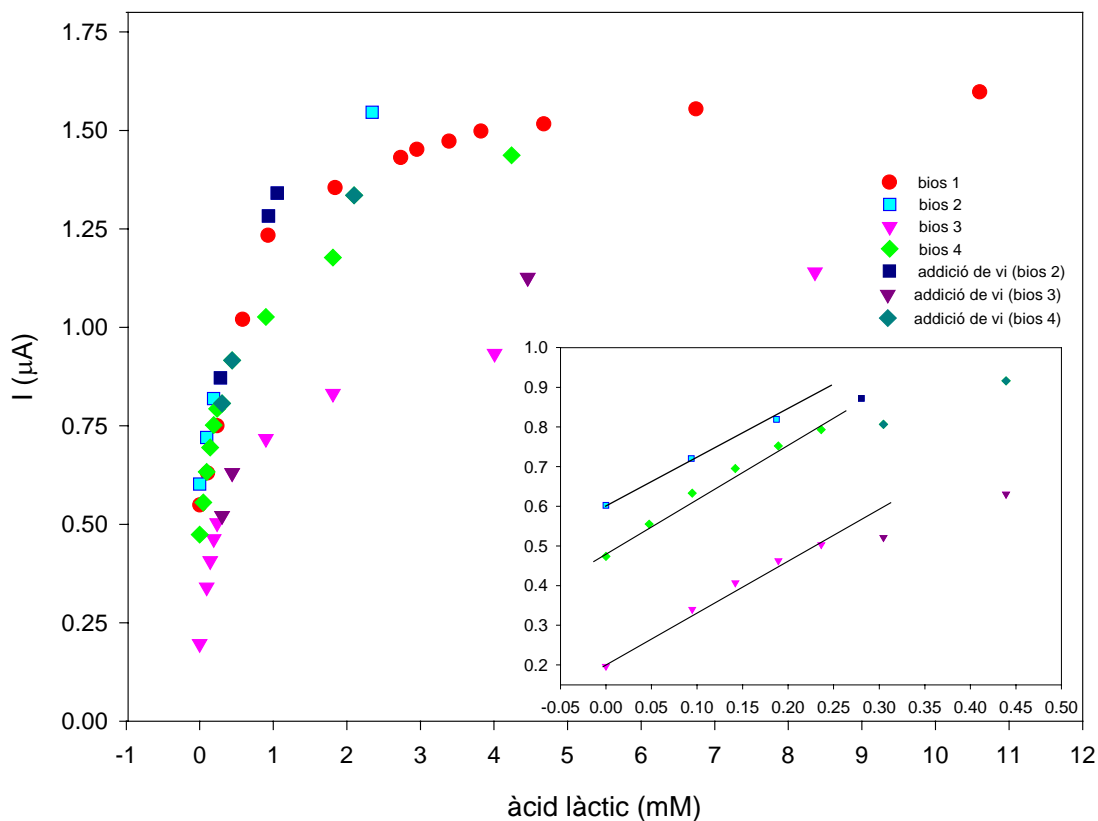


Figura 7.7 Calibracions amperomètriques de biosensors de LOD (30 mg/ml sol-gel) amb el temps en una solució tampó de fosfats (pH=7.0) afegint alíquotes d'una solució d'àcid làctic i d'una mostra real (vi Chardonnay). Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl.

7.3.2.7 Determinació de lactat en vi mitjançant la tècnica de l'addició estàndard

Degut a l'efecte de la mostra real, es va optar per emprar la tècnica de l'addició estàndard (o de patró). Aquesta tècnica és especialment útil per analitzar mostres complexes en les que la probabilitat de que es produeixin efectes deguts a la matriu es considerableⁱⁱ. Un dels mètodes mes habituals per aplicar aquesta tècnica implica l'addició successiva de diferents volums d'una solució patróⁱⁱⁱ a un únic volum de la mostra problema mesurat de forma exacta. Després de cada addició es realitzen les mesures sobre la mostra original. La matriu de la mostra es pràcticament idèntica després de cada addició i la única diferència es la concentració de d'analit, eludint així el problema de l'efecte de la matriu.

ⁱⁱ L'efecte de matriu es coneix com el canvi que experimenta una senyal analítica degut a tot allò que conté la mostra a banda de l'analit (la matriu és, doncs, tot el que hi ha en la mostra problema exceptuant l'analit).

ⁱⁱⁱ En l'addició de patró, el patró és la mateixa substància que l'analit (un patró intern, en canvi, és una substància diferent de l'analit)

En una primera experiència es va estimar la concentració d'àcid làctic en vi a partir d'una mostra sobre la que es realitzaren dues dilucions diferents amb tampó pH 7.0 de fosfat 0.1 M (Figura 7.8). S'utilitzaren 3 biosensors diferents per a cada determinació, per un total de 6 biosensors. La diferència en la resposta fou deguda a l'addició de volums diferents de mostra en la cel·la de mesura (0.5 i 1 ml de vi afegits a 20 ml de la solució tampó).

Els valors trobats (taula 7.3) en la solució foren 0.12 mM i 0.25 mM (concentració de la mostra: 4.9 mM i 5.2 mM respectivament), i els valors estimats mitjançant assaig espectrofotomètric 0.11 i 0.21 mM (concentració de la mostra: 4.5 mM i 4.4 mM respectivament).

Taula 7.3 Anàlisi d'àcid làctic en mostres diluïdes de vi en una solució tampó de fosfat (pH=7.0) utilitzant biosensors LOD (26 mg/ml sol-gel). Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl. (Els valors pertanyen a les concentracions de la mostra no diluïda)

Dilució	Referència* (mM)	Biosensor LOD (mM)	RSD** (%)	Error relatiu*** (%)
1:40	4.5	4.9	8.6	8.2
1:20	4.4	5.2	9.0	15.4

* mètode espectrofotomètric;

**la desviació estàndard relativa (associada a la precisió) fou calculada en base a 3 mesures (n=3);

***error en la exactitud $(\bar{x}-\bar{x})/\bar{x}$

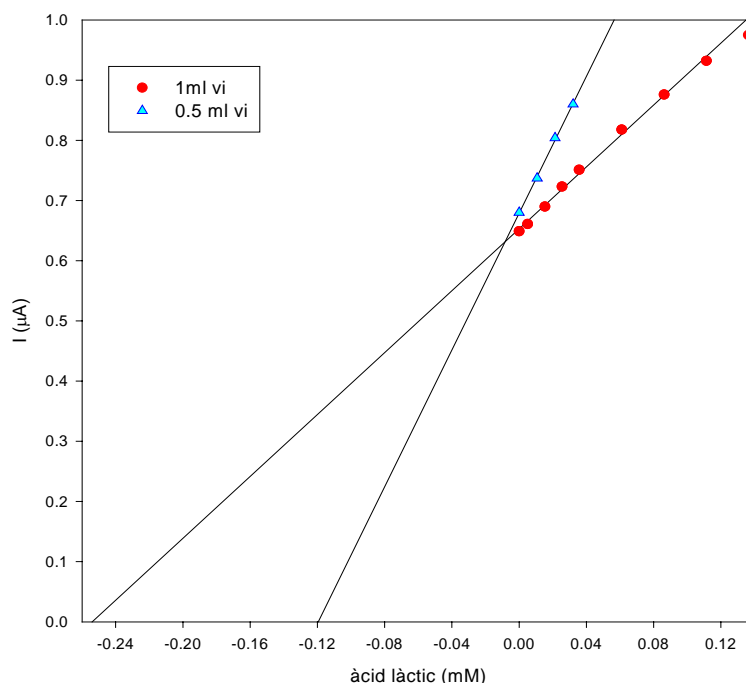


Figura 7.8 Anàlisi de lactat mitjançant biosensors LOD (30 mg/ml sol-gel) en una mostra real de vi Chardonnay sotmès a dues dilucions (1:40/ 1:20) amb una solució de tampó fosfat, pH=7.0, mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl.

S'aprecia com l'error en la mesura (exactitud) es situa al voltant del 12%, i la desviació entre les determinacions aconseguides pels diferents dispositius (precisió) al voltant del 9%. Tot i que aquests resultat són millorables, es va comprovar que els biosensors desenvolupats podien ser utilitzats per a realitzar anàlisis de àcid làctic en mostres de vi, i per tant es provaren en un ventall més ampli de concentracions (§7.3.2.8).

La determinació espectrofotomètrica de lactat en vi es realitzà a partir d'un kit d'anàlisi (Boehringer), tal com es descriu breument a continuació (per més detall veure annex B):

Es preparen 4 solucions que contenen:

a) 1.50 ml de tampó amb 1.9 g de glicina i 3 ml d'hidrazina enrasat a 50 ml; b) 0.15 mg NAD⁺ en 5ml d'aigua; c) solució de LDH (ja preparada) i d) 12 mg de L-lactat en 100 ml d'aigua

A partir d'aquestes solucions i fent el blanc prèviament a cada mesura, es realitza una corba de calibrat amb concentracions creixents de substrat.

7.3.2.8 Resposta del biosensor per a diferents concentracions de vi

A la taula 7.4 es mostra una estimació de la concentració de lactat quan diferent volums de vi Muller Thurgau (d'origen novazelandès) s'afegiren a la solució de treball. La cel·la de mesura contenia 20 ml de tampó fosfat (pH 7.0). Les anàlisis realitzades mitjançant els biosensors desenvolupats presentaven sistemàticament, valors superiors als trobats mitjançant assaig espectrofotomètric.

Taula 7.4 Anàlisi de lactat en mostres reals de vi Muller Thurgau diluït en una solució tamponada de fosfats, pH 7.0, (diferents factors de dilució) mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl. (Els valors pertanyen a les concentracions de la mostra diluïda).

Referència* (mM)	0.11	0.14	0.21	0.45	0.54	0.67	0.81
Biosensor LOD (mM)	0.12	0.16	0.25	0.52	0.65	0.70	1.09
RSD** (%)	8.6	8.9	9.0	7.5	8.3	5.9	10.1
Error relatiu*** (%)	8.2	12.5	15.4	13.5	16.9	4.3	25.7

* mètode espectrofotomètric;

**la desviació estàndard relativa (associada a la precisió) fou calculada en base a 3 mesures (n=3);

***error en la exactitud= $(x_i - \bar{x}) / \bar{x}$

Veiem que el dispositiu de LOD fou capaç de determinar la concentració d'àcid làctic en mostres de vi, tot i que en un ventall de concentracions relativament baix. Per tant, fou necessària la dilució de la mostra, ja que el sensor no aconseguia un senyal de fons estable si se'l submergia directament en vi. Determinacions realitzades amb concentracions majors de 0.9 mM i menors de 0.05 mM mostraren errors superiors al 100 % (valors no mostrats en la taula).

Malgrat la dilució, es pot observar com a partir d'un dispositiu fabricat completament per tecnologia *thick-film*, s'ha pogut quantificar l'analit d'interès amb un error (exactitud) situat al voltant del 12 %, i amb una desviació (precisió) entre els biosensor utilitzats d'aproximadament el 8%. Tot i que s'han aconseguit resultats superiors en l'anàlisi d'àcid làctic emprant un biosensor convencional de LDH²¹, fins ara no tenim notícia d'un sensor realitzat totalment per impressió serigràfica capaç d'analitzar mostres reals.

7.3.2.9 Resposta del biosensor en tres vins diferents

El mateix procediment es va seguir en l'anàlisi d'altres vins (Sauvignon i Chardonnay, a banda del Muller Thurgau). Donat que els millors resultats s'obtingueren per concentracions d'àcid làctic situades al voltant de 0.67 mM (mostra diluïda), es realitzaren les dilucions pertinents per obtenir la concentració esmentada en la solució de treball. Els resultats es mostren en la taula 7.5.

Taula 7.5 Anàlisi de lactat en vins Muller Thurgau, Chardonnay i Sauvignon diluïts en una solució tamponada de fosfats, pH 7.0, (factor de dilució 1:7) mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. S'han utilitzat 12 biosensors LOD (30 mg/ml sol-gel). Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl.

Tipus vins	Muller Thurgau				Chardonnay				Sauvignon			
Biosensor	1 MT	2 MT	3 MT	4 MT	5 Ch	6 Ch	7 Ch	8 Ch	9 S	10 S	11 S	12 S
Referència* (mM)	0.65	0.67	0.66	0.67	0.67	0.66	0.67	0.68	0.69	0.67	0.68	0.71
Biosensor LOD (mM)	0.67	0.69	0.75	1.1**	0.64	0.69	0.76	1.2**	0.71	0.85	1.0	1.3**
Error relatiu*** (%)	3.0	2.9	12	39	4.7	4.3	12	43	4.2	27	32	47

* mètode espectrofotomètric; **exposició prolongada a la mostra de vi; ***error en la exactitud $(x_i - \bar{x}) / \bar{x}$
MT: Muller Thurgau, Ch: Chardonnay, S: Sauvignon.

Si s'observa els percentatges d'error, s'aprecia que els biosensors desenvolupats mostren resultats força acceptables en els vins Muller Thurgau i Chardonnay, on l'error (l'exactitud) es situa entre el 3 i el 12%. Tot i això, dos dels sensors utilitzats han mostrat errors superiors**. Aquests sensors van estar submergits en la mostra real un temps superior als de la resta, i per tant és possible que el vi tingui un efecte destructiu sobre la matriu de sílice o, si més no, sobre l'enzim immobilitzat. La resta de biosensors presentaven valors molt propers entre ells, i mostraven, per tant, una bona precisió (en la taula 7.6 es mostren les desviacions estàndard, en el càlcul de les quals no s'ha tingut en compte el quart biosensor).

Per una altra banda, l'efecte del vi Sauvignon sobre el dispositiu sembla ser més important, i els errors (tant en l'exactitud com en la precisió) han augmentat considerablement. Sembla ser que els components d'aquest vi malmeten d'alguna forma la capa biològica, o si més no, les interferències produïdes per substàncies fàcilment oxidables com els sulfits o àcids com tartàric, succínic o ascòrbic contribueixen a una lectura major dels valor reals (es possible que hi hagi una major presència de les esmentades substàncies). Efectivament, aquestes espècies ja han estat reportades anteriorment com una font d'error en l'anàlisi de lactat¹⁰, i que per tant porten associades determinacions inexactes de l'anàlisi.

Una solució podria semblar l'addició d'una membrana protectora, tot i que ja es va realitzar un intent en aquest sentit amb dispositius desenvolupats en els nostres laboratoris sense aconseguir avenços importants (§8.10), degut possiblement a que les espècies interferents presenten pesos moleculars semblants. Una altra sortida podria ser la disminució del potencial aplicat ja que a 350 mV, tot i que resulta menor que els potencials utilitzats en altres investigacions, el risc d'oxidació d'espècies electroactives encara existeix. Posteriorment, i mitjançant sensors basats en Lactat deshidrogenasa, es va reduir considerablement el potencial aplicat fins a valors negatius (§7.4.3), però malauradament els resultats no milloraren.

Malgrat això, i tenint en compte que és el primer cop que s'utilitza un biosensor *screen-printed* i que per tant, els estudis realitzats són encara preliminars, es pot pensar que els resultats aconseguits són, com a mínim, prometedors. En la taula 7.6 es mostren els resultats de forma resumida.

Taula 7.6 Anàlisi de lactat en mostres reals de vi diluït en una solució tamponada de fosfats, pH 7.0, mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. S'han utilitzat 12 biosensors LOD (veure taula 5). Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl. (Els valors pertanyen a les concentracions de la mostra diluïda).

Mostra vi	Referència* (mM)	Biosensor LOD (mM)	RSD** (%)	Error relatiu*** (%)
Muller Thurgau	0.66	0.70	5.9	5.7
Chardonnay	0.67	0.70	8.2	4.3
Sauvignon	0.69	0.85	17.0	18.8

* mètode espectrofotomètric;

**la desviació estàndard relativa (associada a la precisió) calculada en base a 3 mesures (n=3);

***error en la exactitud $(\bar{x} - x) / \bar{x}$

7.3.2.10 Reproductibilitat del biosensors LOD en mostres reals

En els anàlisis d'àcid làctic realitzats fins ara s'utilitzaren biosensors procedents del mateix lot per a una mateixa mostra de vi. Tal i com succeïa quan es realitzaven calibracions de solucions conegudes d'àcid làctic, les determinacions del substrat en presència de mostres reals mostraren petites variacions quan els biosensors utilitzats pertanyen al mateix lot, entre un 6 i 8% (taula 7.6 i Figura 7.9).

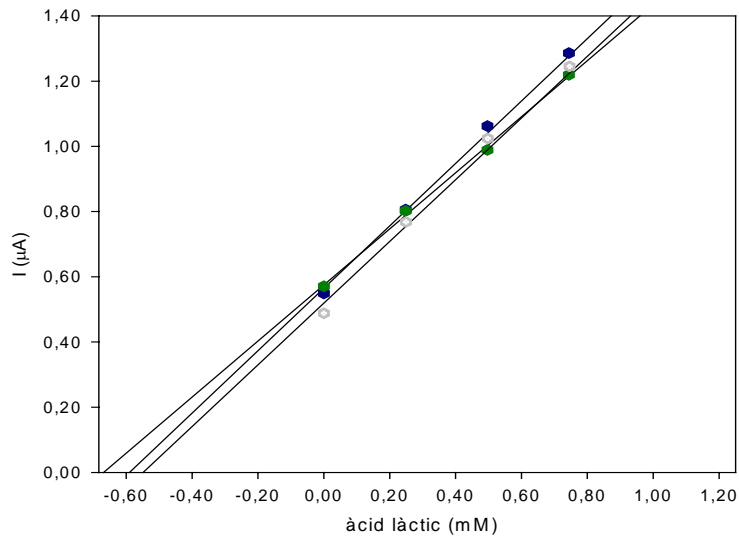


Figura 7.9 Anàlisi de lactat utilitzant biosensors LOD procedents del mateix lot (30 mg/ml sol-gel) en mostres reals de vi Muller Thurgau diluït en una solució tamponada de fosfats, pH 7,0, mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl

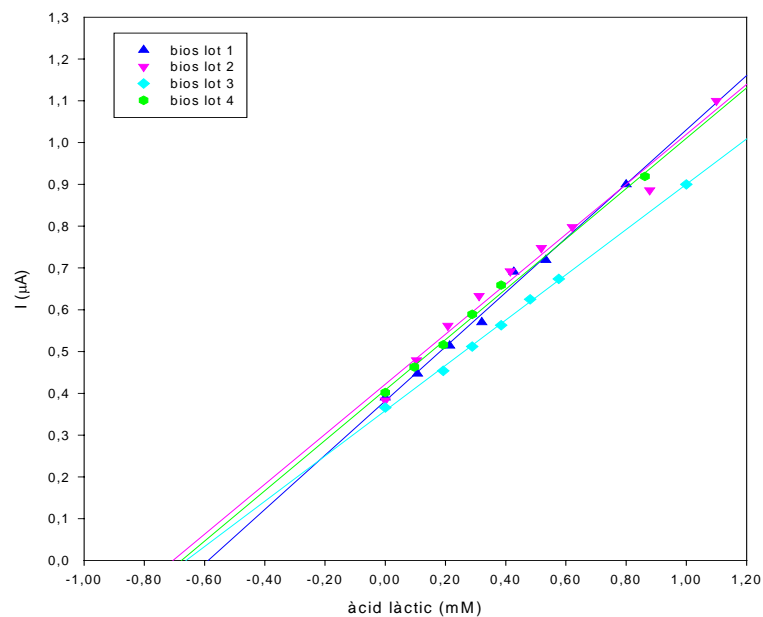


Figura 7.10 Anàlisi de lactat utilitzant biosensors LOD procedents de sèries diferents (30 mg/ml sol-gel) en mostres reals de vi Muller Thurgau diluït en una solució tamponada de fosfats, pH 7,0, mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. Potencial aplicat = 350 mV vs Ag/AgCl.

Com era lògic suposar, quan l'anàlisi de lactat es realitzava utilitzant sensors de sets diferents la imprecisió s'incrementava considerablement, fins un 20% (DSR, n=12) (Figura 7.10).

Els calibrats, realitzats sobre vi Muller Thurgau, també presentaren una menor exactitud, amb un error relatiu sobre els valors registrats mitjançant mètodes espectrofotomètrics del 14%, enfront del 5% aconseguit per biosensors del mateix lot.

7.4 BIOSENSOR BASAT EN LDH

Tal i com s'ha vist anteriorment, si es vol realitzar una determinació simultània de lactat i malat, els enzims utilitzats han de tenir el mateix valor de pH òptim. Donat que la LOD té un pH òptim de 7 i la MDH un pH de 8, es realitzaren estudis preliminars d'un biosensor de lactat deshidrogenasa (LDH, pH òptim 8) per a la determinació de lactat. A això se li ha d'afegir el fet de que la deshidrogenasa és més econòmica que la oxidasa.

Les deshidrogenases, són enzims NAD-dependents (§8.1.1), és a dir, necessiten el cofactor NAD per a realitzar la catàlisi de la reacció enzimàtica, en aquest cas el L-lactat reacciona amb el NAD per formar piruvat, NADH i H⁺ (Figura 7.11).

Aquestes molècules tenen un gran potencial en l'anàlisi de diversos analits en mostres clíniques, mediambientals, i alimentàries. El seu ús, però, ha estat limitat, malgrat les àmplies capacitats catalítiques que presenten. El alt potencial requerit per a la oxidació del NADH (al voltant de 1.0 V en elèctrodes sòlids²⁵) provoca importants interferències que provenen de substàncies fàcilment oxidables presents en la mostra. A més la electrooxidació del NADH transcorre a través de radicals intermediaris que provoca reaccions paral·leles i en conseqüència productes no desitjats que poden adherir-se a la superfície de l'elèctrode provocant-ne la passivació^{25,26,27}.

Per tal de resoldre aquests inconvenients, s'ha recorregut a la modificació química de la superfície dels elèctrodes (elèctrodes modificats químicament). Dins d'aquestes modificacions s'utilitzen els mediadors, tal com quinones^{28,29}, fenazines^{30,31}, fenoxazines^{32,33} i fenotiazines³⁴.

Recentment, s'ha observat que els elèctrodes *thick-film* mostren comportaments electroquímics diferents si es comparen amb els elèctrodes convencionals de superfície renovable³⁵, i particularment en la oxidació del NADH, on les propietats electrocatalítiques difereixen sensiblement, de forma que la electrooxidació del NADH transcorre a un potencial molt menor quan s'empren aquests sensors de capes gruixudes³⁶.

En el nostre cas, es varen aprofitar les característiques electroactives del NADH, espècie que pot ser oxidada en la superfície de l'elèctrode, tot generant-se un senyal proporcional a la concentració de lactat. El potencial d'oxidació és normalment massa alt, com ja s'ha comentat, i per tant es pot utilitzar un mediador per reduir-lo i evitar interferències. El mediador utilitzat fou la

Meldola Blue (MB)^{32,37} (§6.1.1) i es va mesclar amb el grafit durant el procés de construcció del transductor.

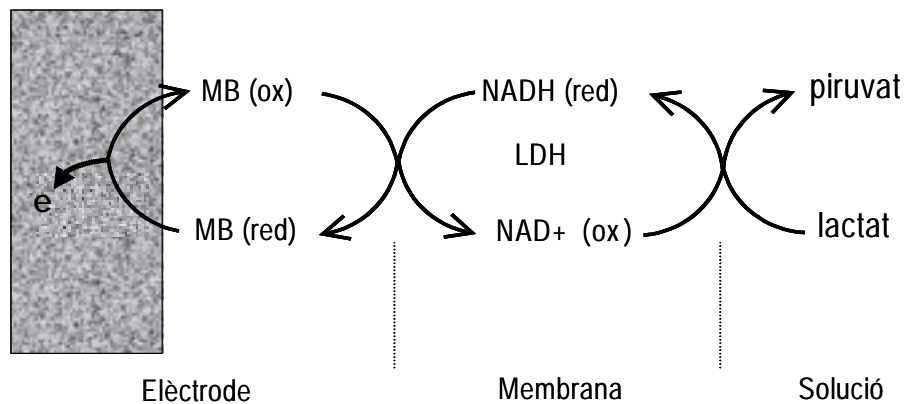


Figura 7.11 Catàlisi enzimàtica de la lactat deshidrogenasa, en presència d'un mediador.

7.4.1 Construcció i caracterització del transductor grafit-MB

Els biosensors basats en deshidrogenases, a diferència dels que es basen en oxidases, necessiten, com ja hem dit, un cofactor. Per tal de reduir el seu potencial d'oxidació sovint s'hi afegeix un mediador. El que es va fer doncs, és incorporar aquest mediador en el procés de construcció de l'elèctrode de grafit (5% MB), seguint el procés següent:

L'aparell utilitzat per a la impressió de les tintes conductores (i del material biològic) fou el mateix que es va emprar anteriorment (DEK 245).

Tal i com es detalla en la construcció dels sensors de LOD i GOD, s'utilitzaren 3 màscares diferents en la construcció de la pista i el transductor, cada una amb el disseny adient per a cada pas del procés de la fabricació del sensor.

El primer pas fou la construcció de la pista conductora mitjançant la impressió per *screen-printing* d'una tinta comercial de plata. Aquesta tinta es va aplicar sobre làmines de poli(clorur de vinil) de 0.5 mm de gruix.

El segon pas presentava una diferència respecte als processos detallats anteriorment.

A la primera impressió de plata se li seguia una segona impressió de grafit amb un 5% de mediador (MB), a diferència del procés anterior en la que s'afegia tinta de carboni platinitzat.

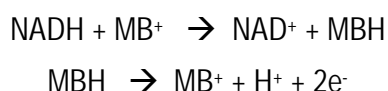
El disseny presentat pel transductor de grafit amb platí era idèntic al mostrat pel transductor de grafit amb MB i, per tant, només es va necessitar una mateixa màscara per a les dues impressions.

El darrer pas fou la utilització d'una tercera màscara per a la impressió d'un polímer dielèctric que permetia aïllar la pista conductora quan aquesta es trobava en contacte amb la solució de treball.

7.4.1.1 Procediments analítics: Calibració amperomètrica

Els transductors es varen avaluar mitjançant la tècnica de l'addició coneguda (§3.5.2). Es va seguir la variació del senyal electroquímic en funció de la variació en la concentració de la espècie estudiada.

La reacció estudiada fou la oxidació del NADH en absència d'àcid làctic i enzim i es va mesurar la intensitat de corrent produïda en un cert rang de concentració.



Les dades obtingudes ens permetrien saber paràmetres que caracteritzarien el sensor, tal com el pendent (sensibilitat), límit superior i inferior de resposta lineal, límit de detecció, reproductibilitat i temps de vida.

La cel·la de treball contenia 20 ml d'una solució tamponada de Tris-HCl a un valor de pH de 8.0 (valor òptim de treball per la LDH). Es varen submergir tres elèctrodes: un elèctrode de referència de Ag/AgCl, un elèctrode auxiliar de fil de platí i com a elèctrode de treball s'utilitzà el transductor desenvolupat. Es varen connectar a un potenciostat que fixava el potencial de treball i donava la lectura del senyal. Les dades es recollien en un ordinador que realitzava les tasques de registrador. La solució s'agitava amb una microhèlix que facilitava el transport per convecció des del si de la solució cap a la superfície de l'elèctrode. La solució de treball contenia alhora una concentració elevada d'electròlit suport que fixava la força iònica del medi, afavoria la conductivitat i reduïa la electromigració.

Per a dur a terme la determinació amperomètrica del NADH es va aplicar el corresponent potencial d'oxidació, 0 mV respecte un elèctrode de calomelans saturat (§7.4.1.2).

Un cop el senyal de fons era estable, s'addicionava el substrat mentre es feien les corresponents lectures d'intensitat de corrent amb el potenciostat (figura 7.12).

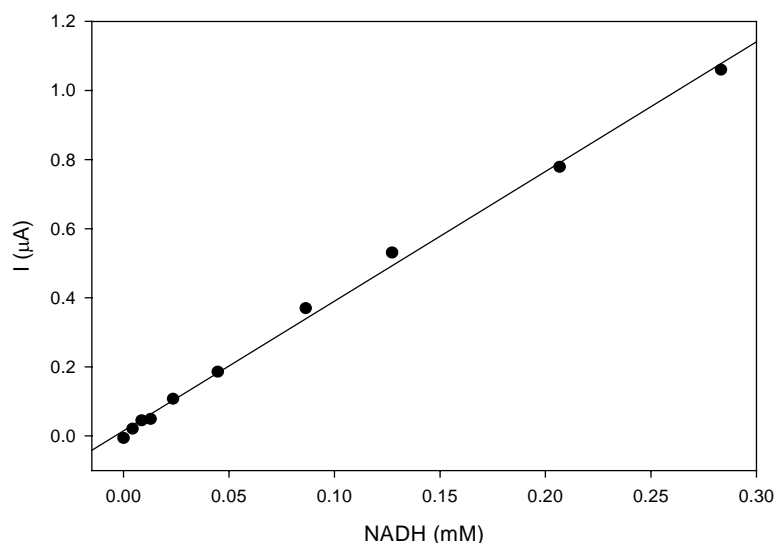


Figura 7.12 Calibracions amperomètriques de transductors grafit/MB (5%) en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) afegint aliquotes d'una solució estàndard de NADH. Potencial aplicat = 0 mV vs Ag/AgCl .

7.4.1.2 Estudi del potencial de treball

Prèviament a la calibració amperomètrica es varen realitzar voltamperometries hidrodinàmiques entre -250 i 250 mV vs Ag/AgCl a concentracions diferents de NADH (0.1, 0.5 i 1.6 mM). Les intensitats de corrent trobades van ser corregides mitjançant mesures del blanc. El potencial òptim de treball es va establir a 0 mV, un valor molt inferior al necessari en absència de MB (figura 7.13). És evident que es podria treballar a majors potencials, on la intensitat es mantindria constant o fins hi tot podria augmentar lleugerament. Tot i això es va decidir treballar a 0 mV per tal d'evitar interferències d'espècies electroactives que podrien oxidar-se a potencials majors. Aquest potencial s'avenia amb l'emprat per altres investigadors ³⁸⁻⁴⁰.

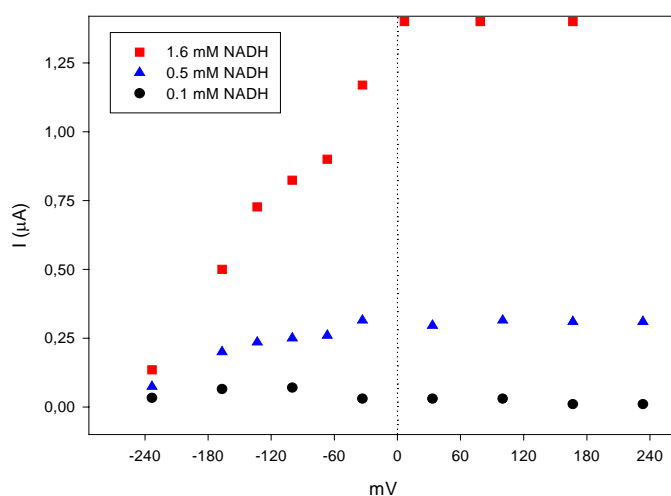


Figura 7.13 Voltamperometries hidrodinàmiques sobre transductors de grafit-MB (5%) entre -250 i 250 mV vs Ag/AgCl a concentracions diferents de NADH (0.1, 0.5 i 1.6 mM), en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0).

7.4.1.3 Reproductibilitat de la resposta

Es va estudiar la reproductibilitat en la resposta d'una sèrie de transductors a tres potencials diferents, 100 mV, 0 mV i -100 mV (figura 7.14). En base a les voltamperometries hidrodinàmiques realitzades prèviament (§7.4.1.2.) i donat el màxim observat a 0 mV, els calibrats realitzats a 0 i 100 mV haurien de tenir una intensitat major que a -100 mV, ja que per sota de 0 volts la resposta disminueix.

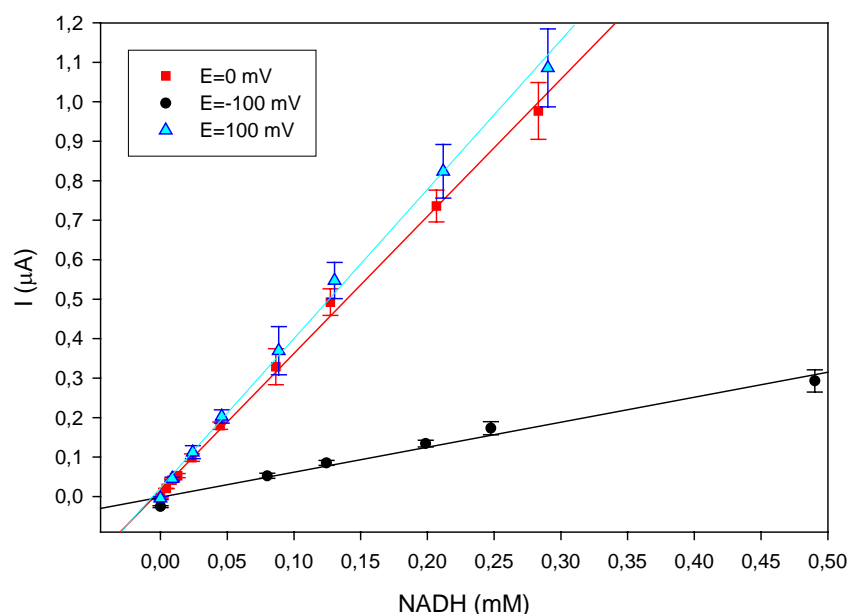


Figura 7.14 Calibracions amperomètriques de 12 transductors grafit/MB (10%) diferents (n=4 per a cada potencial) en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) afegint al·lòtiques d'una solució estàndard de NADH a potencials de treball de 100, 0 i -100 mV vs Ag/AgCl.

Taula 7.7 Calibracions amperomètriques de NADH en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 12 transductors diferents. A) Potencial aplicat: 0 mV, pendent = $3150 \pm 125 \mu\text{A/M}$ (4 % error o DSR). B) Potencial aplicat: -100 mV, pendent = $500 \pm 12 \mu\text{A/M}$ (2 % error). C) Potencial aplicat: 100 mV, pendent = $3400 \pm 240 \mu\text{A/M}$ (5 % error). DSR: desviació estàndard relativa L'error ha estat calculat amb un interval de confiança al 95% i n=4.

A) 0 mV	S1	S2	S3	S4
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	3200	3100	3000	3300
Coefficient Regressió	0.997	0.9998	0.9994	0.9990
B) -100 mV	S5	S6	S7	S8
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	500	483	512	508
Coefficient Regressió	0.993	0.994	0.995	0.997
B) 100 mV	S9	S10	S11	S12
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	3400	3200	3400	3600
Coefficient Regressió	0.993	0.992	0.990	0.991

En la taula 7.7 es comparen els diferents paràmetres de resposta. S'aprecia, sobretot, l'alt increment de la sensibilitat quan es treballa a 0 i 100 mV (6 cops més gran). L'error en la reproductibilitat, però, augmenta en créixer el potencial aplicat.

Així doncs, mitjançant els transductors desenvolupats s'aconseguien sensibilitats de 3150 ± 125 $\mu\text{A/M}$ amb un 4 % error (DSR) sota un potencial de treball de 0 mV.

7.4.1.4 Estabilitat de la resposta en el temps

En la bibliografia han estat reportats en nombroses ocasions problemes de pèrdua de senyal davant de calibrats on s'utilitza NADH. Aquest fenomen, conegut com *fouling* (embrutiment) de l'elèctrode, es caracteritza per l'adsorció de molècules (productes derivats de l'oxidació del NADH probablement⁴¹) sobre la superfície de l'elèctrode que provoquen una pèrdua de sensibilitat o passivació i que, per tant, obliguen a un pretractament o neteja dels elèctrodes per obtenir mesures reproduïbles entre els diferents calibrats^{42,43}.

El *fouling* generalment es dona quan es treballa a potencials elevats en absència de mediador i on es produeix una oxidació directa del NADH. En les condicions del nostre sistema de treball resulta improbable una passivació de l'elèctrode per *fouling* ja que la superfície transductora no entra en contacte directament amb el NADH (si més no, teòricament). En aquest cas, l'intercanvi electrònic es produeix a través del mediador (Blau de Meldola).

Tot i això, es podria produir una disminució del senyal degut a pèrdues del mediador, ja que aquest podria difondre cap a la solució des del biosensor.

En qualsevol cas, resulta evident que calia realitzar un estudi en aquest sentit, puix que podia constituir una font important d'error en la determinació final de lactat.

Així doncs, es va seguir la resposta del transductor en el temps (figura 7.15). Es va comprovar que després d'una calibració, la resposta comença a decaure, aproximadament 25 minuts després de submergir l'elèctrode en la solució. Aquest temps, però, era suficient per aconseguir una resposta lineal del transductor i realitzar la calibració amperomètrica. Donat que els sensors desenvolupats són d'un sol ús, no és necessari un tractament posterior de la superfície per tal de regenerar el dispositiu. Així doncs, i donada la naturalesa dels biosensors fabricats, no es varen apreciar efectes significatius dels fenòmens esmentats, i es va poder obtenir, per tant, informació útil a partir de les rectes de calibrats.

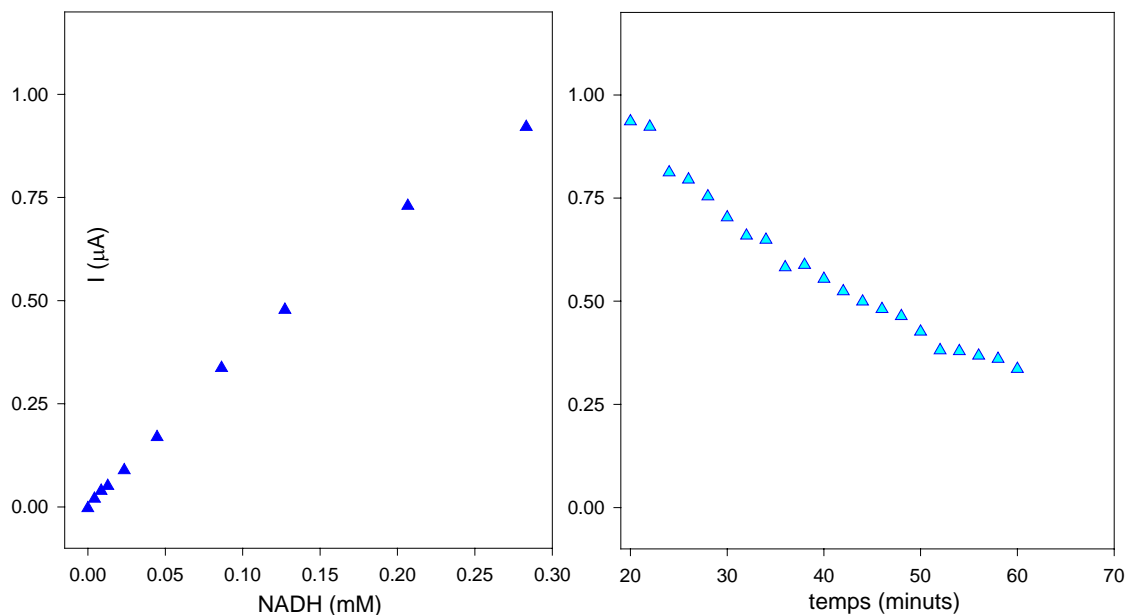


Figura 7.15 Calibració amperomètrica d'un transductor de grafit/MB (5%) en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) afegint alíquotes d'una solució estàndard de NADH. Es va seguir registrant la resposta del sensor en el temps un cop finalitzat l'addició de substrat. Potencial aplicat = 0 mV vs Ag/AgCl .

7.4.1.5 Protocol de neteja dels elèctrodes

Tot i que l'elèctrode de treball es substituïa en cada calibrat, es va observar que en l'ús continuat de l'elèctrode auxiliar (aproximadament 24-36 hores després), la sensibilitat de la resposta decreixia considerablement. Després de 10 calibrats, era necessària una solució 50 cops més concentrada de NADH per aconseguir el mateix senyal. Això va fer concloure, que l'elèctrode, d'alguna forma, restava bloquejat, i que, aparentment, es produïa una deposició o polimerització del NAD sobre la superfície, reduint la superfície efectiva.

Quan es canviaren els elèctrodes es va restablir el senyal inicial, i s'aconseguien pendents del mateix ordre que els obtinguts en calibracions inicials.

Es va observar que si es netejava l'elèctrode auxiliar de platí amb àcid clorhídric la sensibilitat del sistema restava constant (figura 7.16). Així doncs es va establir un protocol de neteja per cada 5 calibracions realitzades, submergint l'elèctrode en HCl 1M durant 20 minuts sota ultrasons. Degut al fet que s'utilitzava un elèctrode de treball nou per a cada calibració, i a que l'elèctrode de referència no es veia afectat pel *fouling*, tan sols l'auxiliar va necessitar un tractament previ.

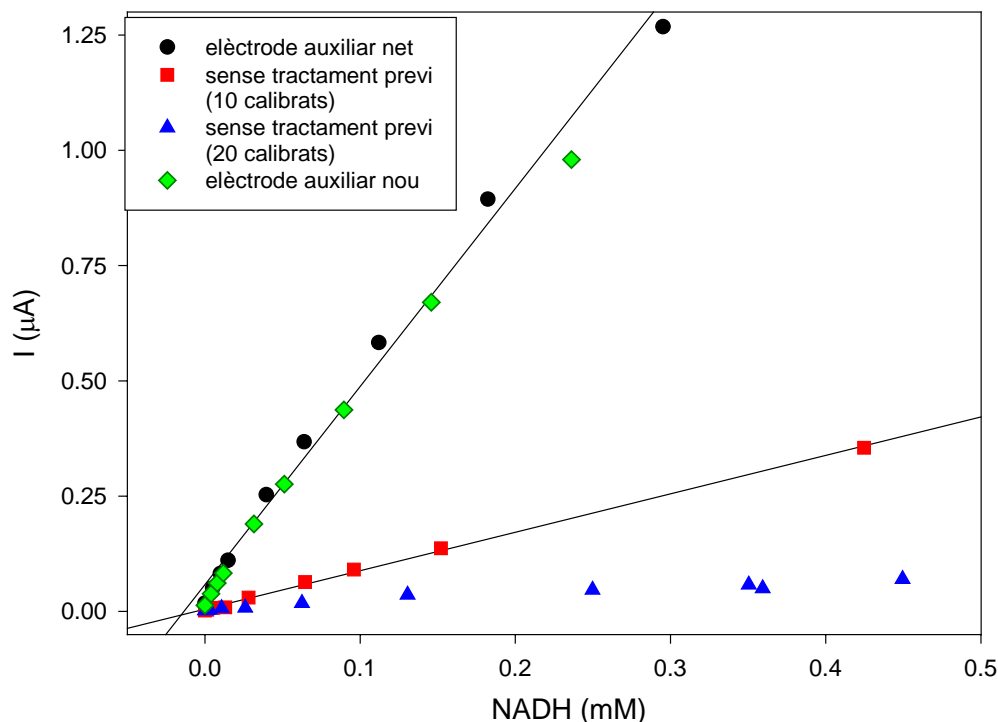


Figura 7.16 Calibracions amperomètriques de transductors de grafit/MB (5%) en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) afegint alíquotes d'una solució estàndard de NADH i utilitzant elèctrodes de treball sotmesos a condicions diferents. Potencial aplicat = 0 mV vs Ag/AgCl .

7.4.2 Construcció i caracterització del biosensor sol-gel/LDH/NAD/grafit/MB

Tot seguit es fabricà el bio-gel que havia d'immobilitzar l'enzim LDH en el seu si. Es barrejaren 0.35 ml TEOS, 0.077 ml aigua, 0.077 ml etanol i 0.058 ml HCl 0.1 M (les mateixes proporcions utilitzades en els biosensors de GOD i LOD), mitjançant un agitador magnètic.

Quan el gel tot just comença a formar-se (comencen a aparèixer els primers grumolls) s'afegeixen 100 µl de LDH (5.000 U/ml, Sigma L2625) i 0.098 g de NAD⁺ en 0.15 ml d'una solució tamponada i s'agita durant 10 minuts més. Tot seguit s'addiciona 0.1 g de trealosa, 1.5 g de CMC i 0.025 g de grafit amb 10% de mediador (MB). La pasta resultant s'imprimeix sobre el transductor de grafit/MB per tècniques de *screen-printing*.

Tot i que el mediador ja està incorporat en el transductor, es va comprovar durant el desenvolupament dels biosensors de MDH (§8.3.6) que si la MB s'incorpora alhora en el gel, els resultats milloren considerablement. Sembla ser, doncs, que es necessari un millor contacte del cofactor amb el mediador.

Cal assenyalar que els primers sensors de deshidrogenasa no contenien trealosa. Aquest component s'afegí per millorar l'estabilitat de la proteïna en la matriu de sílice, ja que en investigacions prèvies s'havien utilitzat per elèctrodes d'alcohol deshidrogenasa^{44,45} i malat deshidrogenasa (§8.3.5) amb efectes favorables. Es provaren, doncs, biosensors de MDH que contenien 1%, 5% i 10 % de trealosa (§8.3.5.1) i s'observà que aquells dispositius amb un 5% mostraven la sensibilitat més alta. Així doncs, el percentatge triat fou del 5% pels biosensors esmentats, percentatge que fou aplicat en els dispositius de LDH.

7.4.3 Optimització del potencial de treball

Es varen realitzar calibrats utilitzant els biosensors desenvolupats a 3 potencials diferents. S'observa que a -200 mV la sensibilitat és major, i els calibrats resulten més estables; la relació senyal:soroll millora considerablement. A rel dels resultats aconseguits, es va triar aquest potencial com el potencial òptim de treball. En la taula 7.8 es poden observar els paràmetres de resposta corresponents als calibrats a diferents potencials.

Taula 7.8 Paràmetres de resposta corresponents a calibracions amperomètriques de 12 biosensors de LDH (2000U/ml sol-gel) NAD/MB a diferents potencials (vs Ag/AgCl) en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) afegint alíquotes d'àcid làctic.(n=4). L'error ha estat calculat amb un interval de confiança al 95% i n=4 per cada un dels potencials de treball.

Potencial aplicat	0 mV	-125 mV	-200 mV
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	0.5 ± 0.1	0.75 ± 0.2	3.6 ± 0.7
Coefficient regressió lineal	0.995	0.996	0.992
DSR (%)	20	30	20

El canvi en el potencial de treball, a banda de proporcionar una major sensibilitat, disminueix el risc d'oxidació de possibles espècies interferents. Així doncs, aplicant un potencial menor al trobat prèviament en l'estudi del transductor, el que fem es reduir el senyal de resposta de nombroses substàncies electroactives presents en la mostra. Aquesta estratègia ha estat seguida per nombrosos autors i particularment en la detecció d'àcid làctic emprant un biosensor de LDH i MB, disminuint el potencial aplicat fins 200 mV (respecte el potencial aplicat al transductor) i arribant en alguns casos a potencials de -150mV ^{18,46-48}. D'aquesta forma s'aconsegueix evitar interferències provinents de substàncies oxidables tal com els àcids tartàric, cítric, acètic, succínic, ascòrbic o sulfits.

Resulta clar doncs, les avantatges que se'n deriven, però no resulta tan evident el perquè de l'augment en la sensibilitat. Anteriorment s'havia trobat que el potencial òptim de treball (§ 7.4.1.2) per un transductor grafit/MB en absència de LDH i afegint el cofactor en solució es situava al voltant del 0 mV, i per tant el que caldria esperar es que el potencial aplicat al biosensor fos, si més no, pròxim a aquest. La disminució en el potencial en un sistema NAD/NADH/mediador quan aquests components s'immobilitzen en una matriu ha estat reportada en nombroses publicacions (M. Polasek et al disminuiren el potencial de treball de 0 a -200 mV en un biosensor de glucosa basat en glucosa deshidrogenasa, respecte el transductor desenvolupat, provocant així un augment de la sensibilitat)⁴⁹, així com el fet de treballar en potencials negatius^{50,51}. Les causes són diverses.

En primer lloc, hem de pensar que les deshidrogenases constitueixen el grup més nombrós d'enzims redox, però en canvi el nombre de investigadors que utilitzen biosensors amperomètrics basats en aquests enzims és força reduït. Hi ha diverses raons del perquè les deshidrogenases han estat emprades en comptades ocasions. La primera és la necessitat d'afegir el cofactor soluble NAD⁺, que dificulta el disseny i per tant la construcció dels dispositius. A això se li afegeix la irreversibilitat del sistema electroquímic NAD⁺ (ox) / NADH (red). En presència, però, d'una deshidrogenasa la reacció redox esdevé reversible, i es pot esquematitzar de la següent forma:



El potencial E° generalment acceptat pel parell redox NAD⁺ / NADH és -560 mV. Per la majoria de reaccions l'equilibri es troba desplaçat cap a la formació de substrat i no pas la de producte, com a conseqüència del baix poder oxidant del cofactor (tal i com se'n pot deduir del valor de E°). Tot i això, l'addició d'un segon enzim⁵² o d'un mediador adequat (que proporcioni una transferència electrònica ràpida entre el cofactor i l'elèctrode) pot conduir la reacció cap a la formació de producte⁵³⁻⁵⁵. Alguns mediadors fins i tot, poden disminuir el potencial aplicat 400 mV, i permeten reaccions d'oxidació per sota del 0 mV, fins a valors de -200 mV ^{27, 49, 56, 57}.

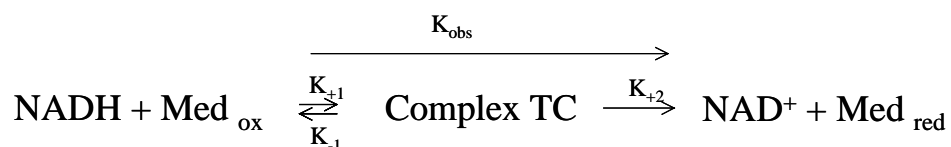
Però no tan sols s'ha observat una espectacular disminució del potencial de treball en presència de mediadors, sinó que aquest potencial encara pot disminuir més depenent del tipus d'immobilització a la que es sotmet el cofactor i sobre tot el mediador, i del material que forma la matriu. S'han trobat diferències de fins a 100 mV⁵⁶ quan el mediador es troba en solució o adsorbit sobre alguna superfície, i fins i tot en el cas particular de la Meldola Blue disminucions de més de 100 mV depenent de si s'adsorbeix o es mescla amb grafit (en el que s'han arribat a aplicar potencials de -175 mV) ^{32, 33}.

El fet de que el potencial del sistema mediador/cofactor canvi quan es comparen els valors en solució o d'altres tipus d'immobilització, es podria explicar per la interacció d'alguna part de la

molècula adsorbida amb la superfície de l'elèctrode. No es pot realitzar, però, una completa explicació amb tan sols experiments electroquímics.

Es possible que la oxidació electroquímica del NADH es realitzi a través d'un mecanisme de reacció molt més complex que el suggerit anteriorment. A partir d'un sèrie d'experiències electroquímiques s'ha proposat la existència d'un intermediari en la transferència de càrrega entre el mediador adsorbit i el NADH ^{27, 33, 56, 57}.

Aquestes observacions podrien indicar la existència de diversos passos⁵⁸, esquematitzats de la següent forma:



La existència d'aquest complex ha estat recolzada pel treball realitzat per Cotton i col·laboradors. Seguint la reacció d'oxidació de NADH en presència d'un mediador, es va detectar, a través de tècniques SERS (surface enhanced Raman scattering), la presència d'una espècie que no podia ser interpretada com un producte derivat de NAD⁺, NADH o el mediador reduït o oxidat, i si com el complex TC intermediari proposat, electroactivament actiu en un interval de -200 a 0 mV.

Així doncs, l'esmentat complex es podria formar-se en determinades condicions d'immobilització del mediador i fins i tot del cofactor, explicant parcialment el canvi en el potencial i la major eficiència en el intercanvi electrònic. Fins i tot es podria pensar en una competència entre el complex i la forma totalment reduïda del mediador, de forma que la reacció en presència de mediadors de transferència electrònica lenta transcorreria a través del complex.

Tot i això, resulta evident la necessitat d'una major comprensió de la interacció entre les molècules mediadores (i els catalitzadors en general) i la superfície de l'elèctrode, per tal de que noves molècules puguin ser sintetitzades amb propietats catalítiques més eficients.

En definitiva doncs, i malgrat no s'ha pogut esbrinar del cert el perquè, el fet de canviar les condicions tant del cofactor (lliure en solució en l'estudi del transductor i immobilitzat en la matriu de sílice en el biosensor) com del mediador (mesclat amb grafit o sol-gel) han modificat, d'alguna forma, el potencial d'oxidació d'aquest (tot i que, com deia Isaac Asimov, la frase més excitant que es pot escoltar en ciència, la que anuncia nous descobriments, no és "Eureka" -ho he trobat- sinò "resulta extrany ...").

7.4.4 Optimització del contingut d'enzim

Es varen construir biosensors amb tres càrregues enzimàtiques diferents, 250, 500 i 1000 U en la biotinta, és a dir, 500, 1000 i 2000 U enzimàtiques per ml de sol-gel respectivament (figura 7.17). El pendent resultà 2.6 vegades més gran quan es doblà la quantitat de material biològic de 1000 U a 2000 U/ml sol-gel però tan sols augmentà 1.5 vegades en passar de 500 U a 1000 U. S'observa però, que tal i com succeïa en els sensors de LOD, la reproductibilitat dels calibrats disminueix a mesura que augmentem la càrrega enzimàtica. També es va notar una lleugera resposta sigmoïdal en dispositius amb un contingut d'enzim alt.

A partir dels resultats aconseguits (taula 7.9), es va determinar en 1000 U/ml sol-gel com la composició òptima de material biològic, tot i que no es pot descartar càrregues superiors en estudis posteriors.

Taula 7.9 Calibracions amperomètriques en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) afegint alíquotes de solucions estàndard de lactat utilitzant biosensors LDH amb càrregues enzimàtiques diferents. Potencial aplicat = -200 mV. L'error ha estat calculat amb un interval de confiança al 95% i n=8.

LDH	500 U	1000 U	2000 U
Pendent ($\mu\text{A}/\text{M}$)	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2	3.6 ± 0.7
Coefficient regressió lineal	0.995	0.996	0.990
Error (%) (DSR)	10	12	20

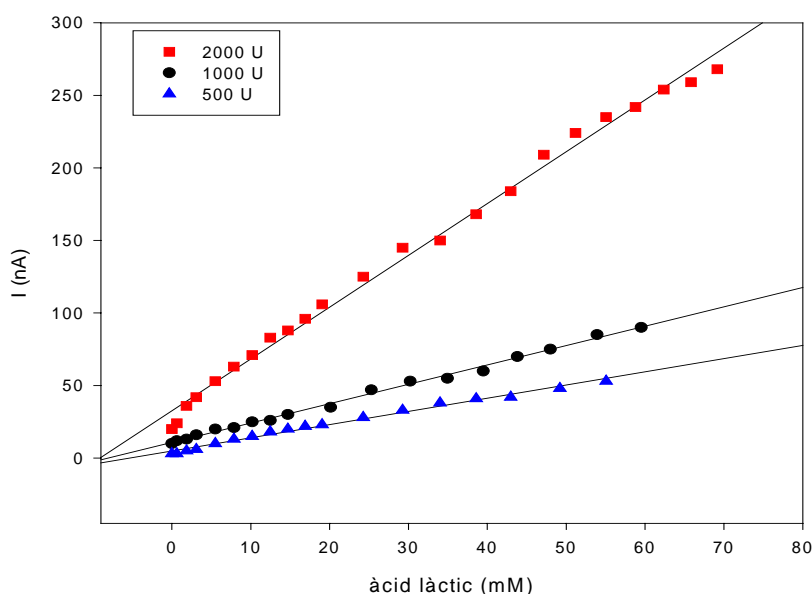


Figura 7.17 Calibracions amperomètriques de biosensors LDH/NAD/MB amb càrregues enzimàtiques diferents (500 U, 1000 i 2000 U /ml sol-gel) en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) afegint alíquotes d'àcid làctic. Potencial aplicat = -200 mV vs Ag/AgCl.

7.4.5 Reproductibilitat dels biosensors

En la gràfica s'observa tres calibrats realitzats sobre biosensors diferents de LDH. La reproductibilitat fou menor a l'obtinguda en els biosensors de LOD, i les corbes de calibració eren lleugerament sigmoïdals (figura 7.18). Aquesta característica fou també observada en el desenvolupament de biosensors de MDH (§8.3.7).

La sensibilitat aconseguida, 1.4 ± 0.2 i 3.6 ± 0.6 ($\mu\text{A}/\text{M}$) per biosensors amb 1000 i 2000 U/ml sol-gel respectivament, fou també inferior a l'obtinguda pels biosensors de LOD (entre 500 i 1000 cops); el límit superior de resposta fou de 70 mM molt superior al registrat emprant LOD i el límit de detecció de 0.1 mM, lleugerament superior al detectat en els dispositius basats en oxidases.

L'increment en el 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. Si la sensibilitat de la zona on la concentració de substrat és més baixa, decreix fins equiparar-se al de la zona més alta, fa l'efecte d'ampliar-se el rang lineal.

Sembla ser, doncs, que la immobilització de la lactat oxidasa resulta molt més eficient que la de la deshidrogenasa, ja que per aproximadament la mateixa activitat, la resposta aconseguida resulta molt menor.

Els resultats aconseguits s'avenien amb els aconseguits per altres investigadors ($1\text{-}20\text{ mM}^{18}$) i fins i tot en alguns casos es milloraven ($0\text{-}0.4\text{ mM}$ i $10\ \mu\text{A}/\text{M}$ ⁵⁹; $0.1\text{-}2.0\text{ mM}$ i $8.6\ \mu\text{A}/\text{M}$ ⁶⁰) i treballant, a més, a potencials molt més elevats ($E = 600\text{mV}$), on l'error degut a les interferències augmenta. Tot i això, algunes investigacions dutes a terme per altres laboratoris ofereixen sensibilitats majors ($22\ \mu\text{A}/\text{M}^{18}$, $100\ \mu\text{A}/\text{M}^{50}$), tot i que amb intervals lineals molt menors. Hem de tenir present que el biosensor desenvolupat ha estat realitzat en un 100% mitjançant tècniques serigràfiques, essent el primer cop que es desenvolupa una tinta d'impressió on cofactor, mediador i enzim s'immobilitzen conjuntament. L'avantatge que en resulta, tal i com s'ha comentat anteriorment, és evident ja que possibilita la producció de sensors *reagentless* a un preu molt inferior als elèctrodes convencionals (un càlcul aproximatiu del cost del biosensor desenvolupat estaria al voltant dels 30 cèntims d'euro).

Altres diferències observades respecte els sensors LOD foren la qualitat de les impressions i el temps d'estabilització. El sol-gel que contenia l'oxidasa s'imprimia perfectament sobre els transductors de grafit/Pt i un cop el biosensor estava enllestit, el temps d'estabilització necessari per a començar el calibrat un cop aquest es submergia en la solució de treball era inferior als 5 minuts. Per una altra banda, les pastes sol-gel que contenien la LDH, presentaven impressions de qualitat inferior (segurament originades pel considerable augment de components en el gel) i

el temps d'estabilització per un biosensor es situava al voltant dels 15 minuts. El temps augmentava per ambdós biosensors en contacte amb mostres reals.

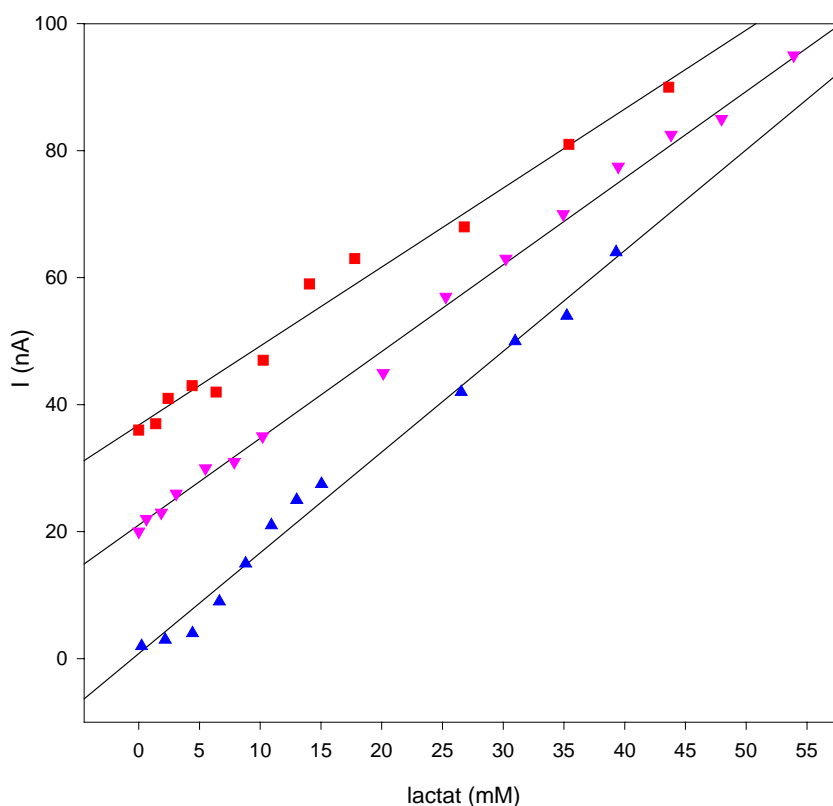


Figura 7.18 Calibracions amperomètriques de biosensors de LDH (1000 U/ml sol-gel) NAD/MB en una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) afegint al·lotes d'àcid làctic. Potencial aplicat = -200 mV vs Ag/AgCl.

En la taula 7.10 es resumeixen els paràmetres de resposta per ambdós dispositius.

Taula 7.10 Paràmetres de resposta de calibracions amperomètriques realitzades sobre biosensors de LOD (1080 U/ml sol-gel) i LDH (1000 U/ml sol-gel) en solucions tamponades de fosfats (pH=7.0) i tris-HCl (pH=8.0) respectivament, afegint al·lotes de lactat. L'error ha estat calculat amb un interval de confiança al 95% i n=8

	LDH	LOD
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	1.4 ± 0.2	1472 ± 90
Interval lineal (mM)	0.1 - 70	0.05 - 0.4
Coefficient regressió lineal	0.996	0.998
Error (%) (DSR)*	12	6
Potencial aplicat	-200 mV	350 mV

*Desviació estàndard relativa

7.4.6 Determinació de lactat en mostres reals mitjançant la tècnica de l'addició estàndard

L'anàlisi de lactat en vi emprant els biosensors de LDH es va realitzar de forma anàloga a la utilitzada mitjançant els dispositius de LOD, es a dir, emprant el mètode de l'addició estàndard. Es va estimar la concentració d'àcid làctic en vi en mostres diluïdes amb tampó tris-HCl (pH=8.0). En la cel·la de mesura s'afegiren entre 0.5 i 10 ml de vi Muller Thurgau, segons la concentració final desitjada, a 20 ml de la solució tampó (figura 7.19).

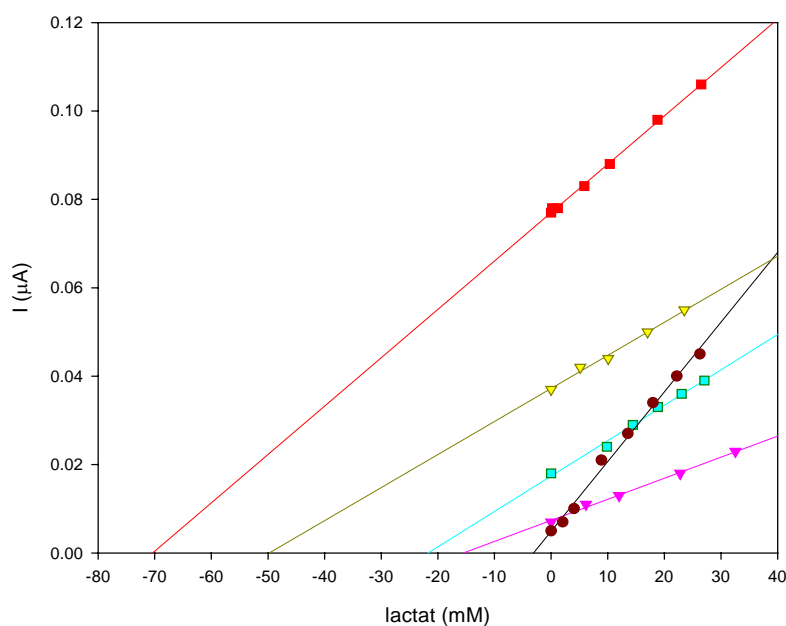


Figura 7.19 Anàlisi de lactat en vi Muller Thurgau diluït (diferents factors de dilució) mitjançant biosensors LDH (1000U/mg sol-gel) en solucions tamponades de tris-HCl (pH=8.0), utilitzant la tècnica de l'addició estàndard. Potencial aplicat = -200 mV.

En la taula 7.11 es poden comparar les concentracions trobades utilitzant els tres mètodes descrits: assaig espectrofotomètric, anàlisi amb biosensors LDH i anàlisi amb biosensors LOD.

Taula 7.11 Concentracions d'àcid làctic trobades a partir de l'anàlisi de lactat en vi Muller Thurgau diluït (diferents factors de dilució) mitjançant biosensors de LOD (1080 U/ml sol-gel) i LDH (1000 U/ml sol-gel) en solucions tamponades de fosfats (pH=7.0) i tris-HCl (pH=8.0) respectivament, utilitzant la tècnica de l'addició estàndard (n=3 per a cada concentració). Els resultats aconseguits es van comparar amb aquells obtinguts mitjançant mètodes espectrofotomètrics. Potencial aplicat = 350 mV (biosensors LOD); -200 mV (biosensors LDH).

Referència* (mM)	0.11	0.14	0.45	0.67	0.81
Biosensor LOD (mM)	0.12	0.16	0.52	0.70	1.09
Biosensor LDH (mM)	5	15	23	50	70

* mètode espectrofotomètric;

És evident que els dispositius amb enzim LOD immobilitzat ofereixen resultats molt propers als trobats mitjançant l'assaig espectrofotomètric, mentre que els sensors que contenen LDH mostren concentracions molt allunyades, aproximadament 100 vegades superiors a les reals, i que provoquen un augment espectacular de l'error en la determinació d'àcid làctic en mostres de vi.

Havíem vist que la immersió prolongada dels biosensors de LOD en les mostres reals produïa un deteriorament de la capa enzimàtica i provocava un augment de la inexactitud en les mesures. Sembla ser doncs que aquest efecte nociu del vi sobre el bio-gel actua molt més ràpidament sobre la deshidrogenasa que sobre l'oxidasa. Podríem esperar que aquest efecte es veies minimitzat en afegir una membrana difusional als sensors de LDH, però experiències anàlogues realitzades sobre altres biosensors amb deshidrogenases (§8.10) no han millorat els resultats.

Una altra font d'error podria provenir de les interferències existents en les mostres de vi, tal com glucosa, fructosa, àcid cítric, tartàric, succínic, acètic, fòrmic, màlic, metanol i etanol. Investigacions realitzades per altres autors²² emprant LOD demostraren que la majoria dels esmentats interferents provoquen errors petits en el senyal (al voltant de l'1%) quan aquests es troben en relació 1:1. Àcids com el tartàric o el succínic podrien provocar errors majors però les concentracions trobades en vi no resulten suficients per produir efectes significants⁶¹. Ara bé, s'hauria de comprovar si quan treballem amb deshidrogenases les interferències provoquen efectivament el mateix error o per el contrari augmenten considerablement. Això podria explicar que en treballar amb l'oxidasa els errors fossin molt menors.

També es va observar un *leaking* important en els biosensors de LDH que sens dubte contribuïren a una menor exactitud en els resultats. Això, afegit al fet de que la resposta dels dispositius de LDH experimentaven respostes molt més ràpides que els LOD, ens fa pensar que la matriu de sílice exercia molt poca resistència al pas de les diferents molècules, facilitant per tant el pas de l'analit i augmentant així el temps de resposta, però alhora, permetent el *leaking* del mediador i augmentant l'error en la mesura.

Una solució podria ser l'ús de substàncies d'un major pes molecular o l'addició de membranes més efectives a les comentades en §8.9 (biosensor de MDH). Actualment s'està treballant en els nostres laboratoris una forma més efectiva d'immobilitzar la LDH juntament amb el cofactor i el mediador, per tal de desenvolupar biosensors que proporcionen resultats més acurats. S'està experimentant amb noves formulacions, i s'ha desenvolupat un sensor basat en una membrana de poliuretà (1%), (dissolt en tetrahidrofurà i dimetilformamida) que ha aconseguit disminuir espectacularment les fuites del mediador cap al si de la solució. No ha estat aplicat encara en mostres reals.

7.5 CONCLUSIONS

1- S'ha comprovat que a partir de biosensors fabricats mitjançant una tecnologia relativament senzilla i econòmica, com és la formació de matrius de sílice i la impressió serigràfica de tintes, es poden realitzar determinacions d'àcid làctic tant en solucions estàndard com en mostres reals.

2- La preparació del bio-gel, així com la seva impressió i la del transductor de C/Pt, va seguir bàsicament el camí descrit en el capítol anterior, substituint l'enzim GOD per **LOD**. Com succeïa en els sensors de glucosa anteriorment desenvolupats, es van poder observar clarament estructures cristal·lines en els sensors preparats sense grafit que contenien lactat oxidasa. La naturalesa opaca dels sensors que contenen grafit impossibiliten qualsevol evidència visual de la formació del gel. Altres propietats presents en el material desenvolupat, com la formació de monòlits rígids o la resistència a l'acetonitril, coincideixen amb els compòsits procedents de solucions amb precursors sol-gel i materials opacs construïts per altres autors⁶²⁻⁶⁷.

3- La composició òptima per un biosensor sol-gel/LOD/CMC/grafit és de 15 mg de LOD, 1.5 g de CMC (2%) i 0.025 g de grafit afegits sobre una solució que conté els precursors sol-gel (0.35 ml de TEOS, 0.077 ml d'aigua i etanol i 0.058 ml d'àcid clorhídric 0.1M). Tot i que els sensors amb càrregues enzimàtiques superiors mostraven sensibilitats superiors, el error en la reproductibilitat augmentava.

4- Tal i com succeïa en la determinació de glucosa, el potencial de treball escollit ha estat de 350 mV.

5- A diferència dels transductor grafit-epoxi (capítol 3) el biosensor fabricat a partir de tintes comercials de grafit platinitzat i el bio-gel desenvolupat, no necessita una etapa d'activació electroquímica prèvia.

6- L'immobilització de la lactat oxidasa resulta 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 (si es conserva a 4°C). Tot i això, el seu ús resulta limitat ja que encara que la zona de treball no es significativament vegi afectada, els setis actius de l'enzim es veuen saturats més ràpidament.

7- L'avaluació dels biosensors de LOD cal portar-la a terme a un pH 7.0, on la línia base i el soroll de fons són menors, 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 (6 % d'error). L'error es veu triplicat quan es comparen biosensors procedents de diferents impressions. Aquests resultats es repeteixen quan s'analitzen mostres reals.

9- L'interval lineal trobat es situa entre 0.05 (\pm 0.01)- 0.45 (\pm 0.02) mM i el pendent és de $1472 \pm 90 \mu\text{A/M}$ pels biosensors optimitzats. No s'ha afegit una membrana externa, limitant de la difusió, i per tant, la resposta curbi-lineal dels sensors de lactat fins 1.5 mM aproximadament, indica que la capa de gel ofereix molt poca resistència difusional, si no gens, al substrat.

10- En afegir alíquotes de vi sobre un calibrat de solucions estàndard d'àcid làctic, s'ha observat un lleuger efecte de matriu sobre la resposta del sensor. Aquest fet va provocar la utilització del mètode de l'addició estàndard en realitzar l'anàlisi de lactat en vi. Quan es comparen els valors obtinguts en mostres reals utilitzant els nostres sensors amb aquells aconseguits mitjançant mètodes espectrofotomètrics, es troben diferències d'entre el 3 i el 12%, depenent de la dilució realitzada i del tipus de vi (en el cas del vi Chardonnay l'error s'incrementava). Els biosensors desenvolupats mostren sistemàticament determinacions amb un valor major als reals. Aquests resultats empitjoren si es posa en contacte el dispositiu amb la mostra real de forma prolongada.

11- La cinètica de la reacció enzimàtica del LOD s'ajusta al model descrit per Michaelis-Menten. El valor trobat per la $K_{m_{app}}$ és de 0.5 mM, valor molt proper al trobat en solució, fet que indica que la matriu proporciona una mínima barrera difusional i/o una baixa modificació dels centres actius de l'enzim degut a la immobilització i, per tant, una bona afinitat pel substrat.

12- Es va observar que els sensors de LOD responien més ràpidament que els de GOD. Els biosensors, a més, necessiten un temps de curació de almenys 24 h a 4°C, abans de ser calibrats. S'ha observat, però, que aquells biosensors amb major temps de curació mostren millors corbes de calibració i una sensibilitat lleugerament superior.

13- S'ha desenvolupat un nou transductor basat en grafit i Meldola Blue per a la fabricació dels sensor **LDH**, substituint el catalitzador de platí emprat en els sensors de LOD pel mediador MB. A la tinta de grafit es va afegir el mediador (1:20) i la mescla resultant va ser dipositada sobre làmines de polièster mitjançant tècniques serigràfiques.

14- Els transductors van ser avaluats mitjançant calibracions de NADH ($E=0\text{mV}$) i s'obtingueren respostes lineals de pendent: $3150 \pm 125 \mu\text{A/M}$ (4 % error) amb un límit superior d'interval lineal de 0.3 mM.

15- Per a l'obtenció del bio-gel es barrejaren 0.35 ml TEOS, 0.077 ml aigua, 0.077 ml etanol i 0.058 ml HCl 0.1 M (les mateixes proporcions utilitzades en els biosensors de GOD i LOD). Quan el gel tot just comença a formar-se s'afegeixen 100 μl de LDH (5.000 U/ml), 0.098 g de NAD^+ en 0.15 ml d'una solució tamponada, 0.1 g de trealosa (per millorar l'estabilitat de la proteïna en la matriu de sílice), 1.5 g de CMC i 0.025 g de grafit amb 10% de mediador (MB). La pasta resultant s'imprimeix sobre el transductor de grafit/MB per tècniques de *screen-printing*.

En la bibliografia no ha estat reportat la immobilització de cap mediador ni tampoc de cap cofactor en el bio-gel (ni en cap altra pasta d'impressió), conjuntament amb el material biològic. És doncs el primer cop, fins on nosaltres sabem, que es realitza l'esmentada immobilització.

Tan sols s'ha reportat en una ocasió un sensor *screen printed* de lactat ⁴⁶ on el mediador i el cofactor es trobessin immobilitzats conjuntament amb el material biològic, tot i que aquesta darrera capa biològica fou senzillament dipositada sobre el transductor afegint 2 μl d'una solució enzimàtica sobre la superfície de treball. En aquest cas, tan sols el transductor havia estat construït mitjançant tècniques *thick film*.

16- Els biosensors resultants han mostrat una baixa sensibilitat ($1.4 \pm 0.2 \mu\text{A/M}$) comparada amb l'obtinguda mitjançant els dispositius basat en LOD (500 cops superior) i s'ha doblat l'error en la reproductibilitat (12%). L'interval lineal però ha estat més ampli (0.1 - 70 mM) fet que podria indicar que la capa de gel ofereix una resistència difusional considerable al substrat. La resposta, a més, mostrava una lleugera corba sigmoïdal.

Tot i que algunes investigacions dutes a terme per altres laboratoris ofereixen sensibilitats lleugerament majors, hem de tenir present que el biosensor desenvolupat ha estat realitzat en un 100% mitjançant tècniques serigràfiques. L'avantatge que en resulta és evident, ja que possibilita la producció de sensors *reagentless* a un preu molt inferior als elèctrodes convencionals

17- El fet de no protegir el sensor amb cap membrana difusional sembla afectar molt més als sensors de LDH que als de LOD, com ho demostra l'espectacular augment de l'error en la determinació d'àcid làctic en mostres de vi.

18- Tal i com succeeix amb els sensors LOD i GOD i contràriament amb els transductor grafit-epoxi (capítol 3) el biosensor fabricat a partir de tintes comercials de grafit-Meldola Blue i bio-gel, no necessita una etapa d'activació electroquímica prèvia.

19- L'avaluació dels biosensors de LDH cal portar-la a terme a un pH 8.0, on la resposta és més estable i la sensibilitat major. El potencial aplicat al biosensor és 200 mV inferior al del transductor, fet que permet evitar interferències d'espècies electroactives fàcilment oxidables.

En resum, s'han desenvolupat sensors que contenen lactat oxidasa o lactat dehidrogenasa immobilitzades en gels de sílice utilitzant tècniques de *screen-printing*. S'han realitzat determinacions d'àcid làctic en vins blancs però només els dispositius amb LOD mostraren resultats prou acurats, que tot i estar encara lleugerament per sota dels aconseguits mitjançant mètodes espectrofotomètrics, suposa una important millora en l'abaratiment dels costos d'anàlisi. Malauradament, sembla ser que l'enzim LDH no es capaç de mantenir el nivell necessari de funcionalitat en el bio-gel.

Bibliografia

¹ *Enología*. Ed. Alhambra, Madrid, 1969

² J. García Barceló, *Enología práctica* Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 1984

³ F.L.Hart, H.J. Fisher, *Análisis moderno de alimentos*, Ed. Acribia, Zaragoza, 1991

⁴ G.H.Fleet, *Wine. Microbiology and technology*. Harwood academic publishers, Chur, 1992

⁵ E. Peynaud, *Chemistry of Wine making*, American Chemical Society- Washinton, D.C., 1974

⁶ Mareca Cortés, I. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. *Métodos oficiales de análisis*. Madrid, 1981

⁷ Amerine, M.A. & Dugh, C.S. *Metodología de análisis de vinos y derivados*. Sociedad expendedora del Panadés, S.A. (SEPSA), Vilafranca del Penedès, 1976

⁸ Goded Mur, A. *Análisis de vinos y mostos*, Ed. Acribia. Zaragoza, 1976

⁹ Técnicas modernas aplicadas al análisis de los vinos. Editorial DOSSAT, S.A. Madrid, 1994

¹⁰ J. Katrlík, A. Pizzariello, V. Mastihuba, J. Svorc, M. Stredansky, S. Miertus. *Anal. Chim. Acta*, 379(1-2) (1999) 193

- 11 G. Palleschi, D. Compagnone, G. Volpe, M. Esti, C. Messia, E. La Notte, *Spec. Publ. - R. Soc. Chem. Biosensors for Food Analysis*, 167 (1998) 124
- 12 M. Gilis, M. Comtat, P. Strehaiano, "Amperometric biosensors in wine analysis". Symp. Int. Oenol., 5th (1996) 496
- 13 M. Gilis, H. Durliat, M. Comtat, *Am. J. Enol. Vitic.* 47(1), (1996), 11
- 14 G. Palleschi, D. Compagnone, G. Volpe, M. Esti, E. La Notte, *Talanta*, 41(6) (1994) 917
- 15 M. I. Prodromidis, S. M. Tzouwara-Karayanni, M. I. Karayannis, P. Vadgama, A. Maines, *Analyst*, 121 (1996) 435
- 16 I. Willner, A. Riklin, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1535
- 17 H. C. Yoon, H. Kim, *Anal. Chim. Acta*, 336 (1996) 57
- 18 S. D. Sprules, J. P. Hart, S. A. Wring, R. Pittson, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 17
- 19 M. Boujita, M. Chapleau, N. El Murr, *Electroanalysis*, 8 (1996) 3173
- 20 G. Jobst, I. Moser, M. Varahram, P. Svasek, E. Aschauer, Z. Trajanoski, P. Wach, P. Kotanko, F. Skrabal, G. Urban, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3173
- 21 S. Miertus, J. Katrlík, A. Pizzariello, M. Stredansky, J. Svitel, J. Svorc. *Biosens Bioelectr.* 13 n. 7-8 (1998) 911
- 22 B. Serra, A.J. Reviejo, C. Parrado, J.M. Pingarrón, *Biosens Bioelectr.* 14,5 (1999) 505
- 23 Catalogue, Sigma Chemical, 1995
- 24 T.-M. Park, E. I. Iwuoha, M. R. Smith, R. Freaney, A. J. McShane, *Talanta*, 44 (1997) 973
- 25 W. J. Blaedel, R. A. Jenkins, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1337
- 26 H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 14 (1987) 147
- 27 L. Gorton, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 82 (1986) 1245
- 28 D. C. S. Tse, T. Kuwana, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1315
- 29 M. J. Batchelor, M.J. Green, C. L. Sketch, *Anal. Chim. Acta*, 221 (1989) 289
- 30 A. Torstensson, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.*, 130 (1981) 199

- ³¹ S. Yabuiki, F. Mizutani, M. Asai, *Biosens. Bioelectron.*, 6 (1991) 311
- ³² L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G. Johansson, *J. Electroanal. Chem.*, 161 (1984) 103
- ³³ B. Persson, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.*, 292 (1990) 115
- ³⁴ J. Kulys, G. Gleixner, W. Schumann, H. L. Schnidt, *Electroanalysis*, 5 (1993) 201
- ³⁵ C. S. Cha, M.J. Shao, C. C. Liu, *Sensors and Actuators*, B2 (1990) 277
- ³⁶ A. Silber, C. Bräuchle, N. Hampp, *J. Electroanal. Chem.*, 390 (1995) 83
- ³⁷ R. Appelqvist, G. Marko-Varge, I. Gorton, A. Torstensson, G. Johansson, *Anal. Chim. Acta*, 169 (1985) 237
- ³⁸ C. Ramirez Molina, N. Boujtita, N. El Murr, *Anal. Chim. Acta*, 401 (1999) 155
- ³⁹ F. Tobalina, F. Pariente, L. Hernandez, H. D. Abruña, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta*, 395 (1999) 17
- ⁴⁰ M. J. F. Villamil, A.J. Miranda Ordieres, P. Tuñon Blanco, *Anal. Chim. Acta*, 345 (1997) 37
- ⁴¹ W. J. Blaedel, R. A. Jenkins, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1337
- ⁴² H. Jaegfeldt, *J. Electroanal. Chem.*, 110 (1980) 295
- ⁴³ J. Moiroux, P.J. Elving, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 346
- ⁴⁴ S. D. Sprules, I. C. Hartley, R. Wedge, J. P. Hart, R. Pittson, *Anal. Chim. Acta*, 329 (1996) 215
- ⁴⁵ B. Appleton, T. D. Gibson, J. R. Woodward, *Sensors Actuators*, B (1997) 65
- ⁴⁶ A. Avramescu T. Noguier, V. Magearu, J. L. Marty, *Anal. Chim. Acta*, 433 (2001) 81
- ⁴⁷ J. L. Marty, comunicació personal
- ⁴⁸ J. Katrlík, A. Pizzariello, V. Mastihuba, J. Svorc, M. Stred'anský, S. Miertus, *Anal. Chim. Acta*, 379 (1999) 193
- ⁴⁹ M. Polasek, L. Gorton, R. Appelqvist, G. Marko-Varga, G. Johansson, *Anal. Chim. Acta*, 246 (1991) 283
- ⁵⁰ H. Ch. Shu, N. Wu, *Talanta*, 54 (2001) 361
- ⁵¹ J. Wang, P. V. A. Pamidi, M. Jiang, *Anal. Chim. Acta*, 360 (1998) 171

- ⁵² M. Le and G. Means, *Enzyme and Microbial Technology*, 23 (1998) 50
- ⁵³ H. U. Bergmeyer, *Methods in Enzymatic Analysis*, VCH, Weinheim, 1985.
- ⁵⁴ G.G. Guilbault, *Analytical uses of Immobilized Enzymes*, Dekker, New York, 1984.
- ⁵⁵ L. Gorton, G. Bremle, E. Csoregi, B. Persson, G. Jonsson-Pettersson, *Anal. Chim. Acta*, 249 (1991) 43.
- ⁵⁶ B. Persson, *J. Electroanal. Chem.*, 287 (1990) 61
- ⁵⁷ L. Gorton, G. Johansson, A. Torstensson, *J. Electroanal. Chem.*, 196 (1985) 81
- ⁵⁸ L. Gorton, E. Csoregi, E. Dominguez, J. Emneus, G. Jonsson-Pettersson, G. Marko-Varga, B. Persson, *Anal. Chim. Acta*, 250 (1991) 203
- ⁵⁹ C. M. Halliwell, E. Simon, C. Toh, Ph. Bartlett, A. Cass, *Anal. Chim. Acta*, 453 (2002) 191
- ⁶⁰ A. Silber, C. Bräuchle, N. Hampp, *Sensors Actuators, B* 18-19 (1994) 235
- ⁶¹ H. Gillis, H. Durliat, M. Comtat, *Am. J. Enol. Vitic*, 47 (1996) 11
- ⁶² S. Sampath, O. Lev, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2015
- ⁶³ J. Wang, P.V.A. Pamidi, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4490
- ⁶⁴ S. D. Sprules, J. P. Hart, S. A. Wring, R. Pittson, *Analyst*, 119 (1994) 253
- ⁶⁵ I. Pankratov, O. Lev, *J. Electroanal. Chem.*, 393 (1995) 35
- ⁶⁶ M. Tsionsky, G. Gun, V. Glezer, O. Lev, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1747
- ⁶⁷ J. Wang, P.V.A. Pamidi, C. Parrado, D.S.Park, J. Pingarron, *Electroanalysis*, 9 (1997) 908

Desenvolupament i avaluació de biosensors sol-gel de malat deshidrogenasa basats en tecnologia planar: anàlisi d'àcid màlic en vi

8.1 INTRODUCCIÓ

Tal i com ja s'ha comentat, l'objectiu principal en els nostres estudis fou el desenvolupament d'un biosensor capaç de detectar i determinar concentracions d'àcid làctic i màlic en vins. En aquest capítol es descriu la fabricació i posterior optimització d'un sensor de malat, a partir de la immobilització de malat deshidrogenasa en sol-gel, de forma anàloga a les tècniques descrites anteriorment (§§§ 6.4, 7.4.1 i 7.4.2).

Així mateix, es mostraran els resultats obtinguts en l'anàlisi d'àcid màlic en vins utilitzant el nostre biosensor, i es compararà amb els obtinguts mitjançant els mètodes tradicionals d'anàlisi, comentats ja anteriorment en §7.2.

Les deshidrogenases, tal i com s'ha vist en la LDH (§7.4), necessiten un cofactor (NAD) per catalitzar la reacció enzimàtica. En aquest cas el malat reacciona amb el NAD per formar oxaloacetat i NADH.

El NADH pot ser oxidat a la superfície de l'elèctrode, generant-se un senyal proporcional a la concentració de malat. El potencial d'oxidació, com ja s'ha dit, és normalment massa alt, i per tant es pot utilitzar un mediador (§ 6.1.1) per reduir-lo i evitar interferències. El mediador utilitzat, com en el cas de la LDH, fou el Blau de Meldola o Meldola Blue (MB)^{1,2}, que es va mesclar amb el grafit durant el procés de construcció del transductor.

La importància del sistema NADH/NAD⁺ en el món dels biosensors resulta evident, si ens fixem en la gran quantitat de publicacions i investigadors que s'hi dediquen. La detecció amperomètrica de l'àcid màlic fou basada exclusivament en aquest sistema (a diferència de l'àcid làctic on s'utilitzaren dos sistemes diferents basats en oxidases i deshidrogenases. Tot i que ja és va

introduir de forma preliminar en el capítol anterior, es creu convenient fer-ne ara un breu recordatori, tot centrant-nos en el sistema NADH/NAD⁺ i descrivint-lo, amb més detall:

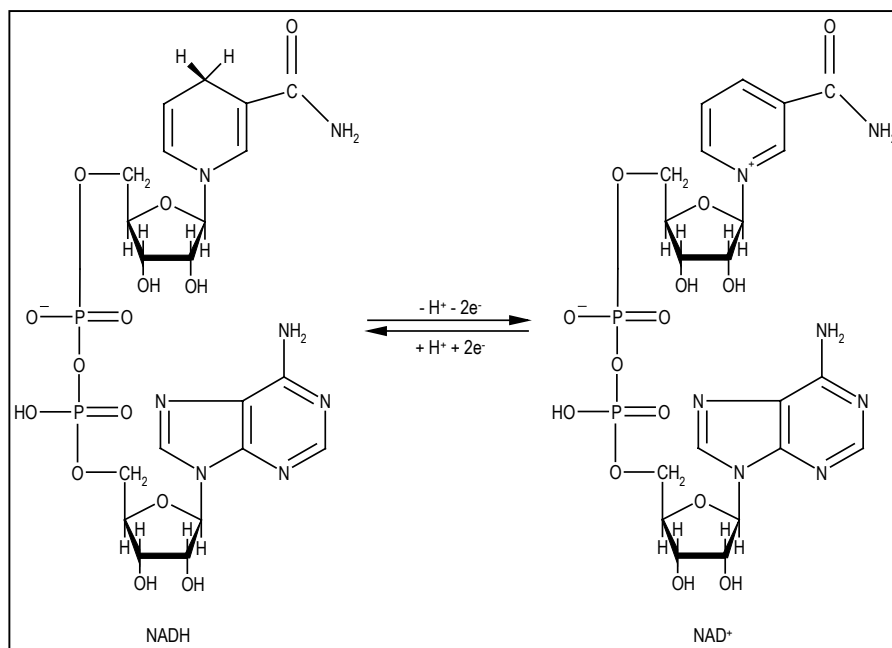
8.1.1 Sistema NADH/NAD⁺

La importància de la detecció del *nicotin adenin dinucleòtid* (NADH/NAD⁺)³ prové de la funció que exerceix com a *cofactor* dels enzims anomenats *deshidrogenases*. El NAD⁺, actua com a un cosubstrat indispensable, que s'ha d'enllaçar a l'*apoenzim* a fi de transformar-lo en *holoenzim*. Així, l'enzim esdevé actiu com a conseqüència de la nova conformació adoptada, de manera que te la capacitat de reaccionar amb el substrat per formar el producte de la reacció enzimàtica.

Ateses les propietats òptiques i electroquímiques del parell NADH/NAD⁺, sovint s'empra el seguiment de la transformació d'una de les espècies constituents del parell en l'altra com a fonament del sistema de detecció de les anàlisis basades en reaccions enzimàtiques que incorporen alguna deshidrogenasa.

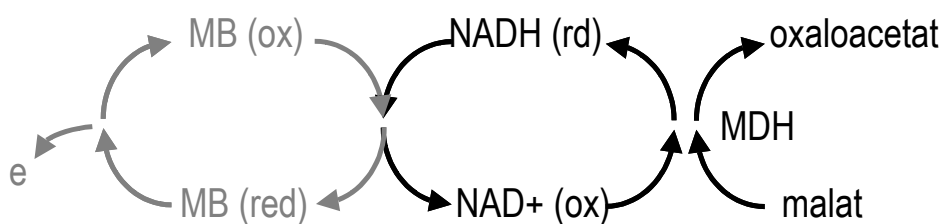
Tradicionalment la majoria dels assaigs s'han dut a terme mitjançant mesures espectrofotomètriques, aprofitant les absorcions que presenta el parell NADH/NAD⁺ en els espectres de UV-visible. Ara bé, les característiques electroquímiques de la molècula de NADH també fan possible el seu seguiment mitjançant tècniques electroquímiques.

Si bé els assaigs electroquímics presenten una sèrie d'avantatges en relació als espectrofotomètrics⁴, entre els que cal destacar la reducció del temps d'anàlisi, una mínima manipulació de la mostra, l'ús d'un equip més econòmic i la possibilitat de fer mesures en sistemes en condicions molt més flexibles (sistemes de flux per fer mesures en continu, mostres tèrboles o acolorides,..), tan sols un reduït nombre de publicacions, com ja s'ha comentat, proposen una detecció electroquímica per a sistemes que incorporen deshidrogenases. Aquest ús restringit, recordem, és degut principalment a la irreversibilitat de la reacció electroquímica del parell NADH/NAD⁺ sobre un elèctrode sense modificar, a diferència de la reversibilitat pròpia quan la reacció està catalitzada enzimàticament per una deshidrogenasa. Habitualment, s'intenta basar el sistema de detecció en l'oxidació de NADH, si bé els sobrepotencials ⁵ requerits provoquen una pèrdua de selectivitat. En aquest punt, sorgeix un altre factor que dificulta la viabilitat de treballar amb el parell NADH/NAD⁺ com a sistema de detecció redox, atès que el procés d'oxidació de NADH a NAD⁺ sovint porta associades una sèrie de complexes reaccions paral·leles, que es caracteritzen per produir una *passivació* progressiva de la superfície de l'elèctrode^{6,7}, passivació o *fouling* que fou estudiada anteriorment (§7.5.1.4).



Malgrat la dificultat palesa en relació a l'ús de sistemes electroquímics per a la detecció de NADH, el gran número de deshidrogenases descrites, associades a reaccions enzimàtiques que impliquen un ampli ventall de substrats i de productes, permet dissenyar sistemes d'anàlisi molt versàtils que justifiquen els esforços dirigits a resoldre aquests problemes.

En el cas concret dels biosensors MDH, la reacció seguida es va basar en:



El NADH s'oxida en la superfície del transductor, obtenint un senyal proporcional a la concentració de malat. El potencial d'oxidació és molt alt i per aquesta raó es pot utilitzar un mediador per reduir-lo i evitar interferències. El Blau de Meldola (MB) fou el mediador escollit.

8.2 CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL TRANSDUCTOR

Tal i com es detalla en la construcció del sensors de LOD i GOD, i anàlogament al procés seguit en els sensors de LDH, s'utilitzaren tres màscares diferents en la construcció de la pista i el transductor, cada una amb el disseny adient per a cada pas del procés de la fabricació del sensor. La impressió de les tintes conductores es va realitzar utilitzant el mateix aparell (DEK 245) ja descrit.

Primerament, i seguint el procés dut a terme en la fabricació dels sensors de LDH (§ 7.4.1), es va fabricar un transductor de grafit (5% MB) seguint el procés següent:

El primer pas, fou la construcció de la pista conductora mitjançant la impressió per screen-printing d'una tinta comercial de plata (Acheson, Electrodag 427SS). Aquesta tinta es va aplicar sobre làmines de poli (clorur de vinil) de 0.5 mm de gruix.

A la primera impressió de plata se li seguia una segona impressió de grafit (Acheson, Electrodag 423SS) amb un 5% de mediador (MB). Es va observar que la resposta del NADH esdevenia independent a la quantitat de mediador immobilitzat un cop s'excedia d'un cert valor; aquestes observacions foren realitzades per altres investigadors ^{8,9}.

El darrer pas fou la utilització d'una tercera màscara per a la impressió d'un polímer dialèctric (Tinta dielèctrica, Acheson SS241 12) que permetia aïllar la pista conductora quan aquesta es trobava en contacte amb la solució de treball.

8.2.1 Estudi del potencial de treball

Prèviament a la calibració amperomètrica es varen realitzar voltamperometries hidrodinàmiques entre -250 i 250 mV vs Ag/AgCl a concentracions diferents de NADH (0.1, 0.5 i 1.5 mM). Les intensitats de corrent trobades van ser corregides mitjançant mesures del blanc. El potencial òptim de treball es va establir a 0 mV, un valor molt inferior al necessari en absència de MB. Els resultats es mostren en la taula 8.1 i § 7.4.1.2 (figura 7.13).

Taula 8.1 Resultats obtinguts de voltamperometries hidrodinàmiques sobre transductors de grafit-MB (5%) per una concentració 1.6 mM de NADH, en una solució tampó de Tris-HCl (pH=8.0).

Potencial (mV)*	-220	-100	-60	0	100	200
Intensitat (µA)	0.15	0.8	0.9	1.4	1.4	1.4

* vs Ag/AgCl

8.2.2 Avaluació del transductor

8.2.2.1 Procediment d'anàlisi

Els transductors utilitzats per a la construcció de biosensors de MDH són els mateixos desenvolupats i caracteritzats pels biosensors de LDH ja que ambdós es basen en la determinació de NADH segons el següent esquema:



Els transductors, tal i com vàrem veure (§7.4.1.1), es varen avaluar mitjançant el mètode de l'addició coneguda (§3.5.2), on es segueix la variació del senyal electroquímic en funció de la variació en la concentració de la espècie estudiada.

A partir de les dades obtingudes es calcularen els paràmetres que caracteritzarien el sensor (pendent, interval de resposta lineal, límit de detecció, reproductibilitat i temps de vida).

La cel·la de treball contenia 20 ml d'una solució tamponada de Tris-HCl a un valor de pH de 8.4 (valor òptim de treball per la MDH), i per tant, el mateix que es va utilitzar en les determinacions d'àcid làctic amb biosensors de LDH, possibilitant així una possible determinació simultània de lactat i malat mitjançant un mateix biosensor en estudis posteriors.

El procediment seguit fou el descrit anteriorment (§7.4.4.1): es varen submergir l'elèctrode de referència de Ag/AgCl, l'elèctrode auxiliar de fil de platí i el transductor desenvolupat (elèctrode de treball). Es varen connectar a un potenciostat que fixava el potencial de treball i donava la lectura del senyal. La solució s'agitava amb una microhèlix que facilitava el transport per convecció des del si de la solució cap a la superfície de l'elèctrode. La solució de treball contenia alhora una concentració elevada d'electròlit suport que fixava la força iònica del medi, afavoria la conductivitat i reduïa la electromigració.

Per a dur a terme la determinació amperomètrica del NADH es varen aplicar diferents potencials d'oxidació (-100, 0 i 100 mV). Un cop el senyal de fons era estable, s'addicionava el substrat mentre es feien les corresponents lectures d'intensitat de corrent amb el potenciostat.

En la taula 8.3 es comparen els diferents paràmetres de resposta. S'aprecia, sobretot, l'alt increment de la sensibilitat quan es passa de -100 a 0 mV (6 cops més gran). L'error en la reproductibilitat (DSR), però, es duplica entre ambdós potencials.

S'observa, a més, com a 100 mV es produeix un major error i la resposta resulta menys estable; la sensibilitat de la resposta, a més, pràcticament no varia, o molt poc, respecte als calibrats realitzats a 0 mV.

Taula 8.2 Calibracions amperomètriques de NADH en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 12 transductors diferents.

Potencial aplicat (mV)*	-100	0	100
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	500 ± 12	3150 ± 125	3400 ± 240
Coefficient de Regressió	0.995	0.9992	0.993
<i>DSR</i> ** (n=4)	2	4	5

* vs Ag/AgCl; **Desviació estàndard relativa per n=4 (per a cada un dels potencials) i interval de confiança al 95%

Tal i com s'ha comentat anteriorment, en la bibliografia s'han reportat en nombroses ocasions problemes de pèrdua de senyal o passivació dels elèctrodes, davant de calibrats on s'utilitza NADH^{6, 7, 10}. Es va seguir, doncs, la resposta del transductor en el temps i es va comprovar que després d'una calibració, la resposta comença a decaure aproximadament 25 minuts després de posar l'elèctrode en solució. Aquest temps, però, era suficient per aconseguir una bona resposta del transductor i realitzar una calibració amperomètrica completa (§7.4.1.4, figura 7.15). En absència de NAD⁺-NADH en la solució, no es va apreciar cap tipus de disminució en la resposta. Es va observar, però, que en l'ús continuat dels elèctrodes auxiliar i de treball (aproximadament 24-36 hores després), la sensibilitat de la resposta decreixia considerablement (§7.4.1.5). Els elèctrodes, d'alguna forma, restaven passivats (o bloquejats), i aparentment, es produïa una deposició o polimerització del NAD sobre la superfície, reduint la superfície efectiva. Quan es canviaren els elèctrodes o es netejaren amb àcid clorhídric es va restablir el senyal inicial, i s'aconseguien pendents del mateix ordre que les calibracions inicials (§7.4.1.5, figura 7.16).

8.2.2.2 Efecte de l'activació electroquímica en la resposta del transductor

En la bibliografia apareixen nombroses referències a processos d'activació del sensor¹¹⁻¹³. Generalment aquests processos es basen en l'aplicació de potencials alts sobre el sensor durant un període de temps relativament curt (5 o 10 minuts). Després d'aquest procés, la seva superfície activa sembla augmentar, de forma que el corrent mesurat s'incrementa considerablement (§3.4).

En el Grup de Sensors i Biosensors, s'havien desenvolupat tècniques semblants per augmentar la conductivitat dels transductors i sensors en generals. S'havia observat que, bé sigui aplicant

un potencial elevat o bé sotmetent a l'elèctrode a una voltamperometria cíclica, la sensibilitat del sensor aconseguia un increment molt important (§3.4).

Així doncs, i basats no sols en la nostra experiència sinó en la d'altres investigadors que havien aplicat mètodes semblants, es va decidir sotmetre els sensors sol-gel desenvolupats a un procés d'activació. Els resultats varen mostrar (figura 8.1) que en el cas particular dels sensors desenvolupats mitjançant aquesta tecnologia, no només no calia l'aplicació d'algun procés d'activació, sinó que fins i tot n'era contraproductiu, simplificant la seva construcció i adequant-se a un futur mètode de fabricació en massa dels dispositius.

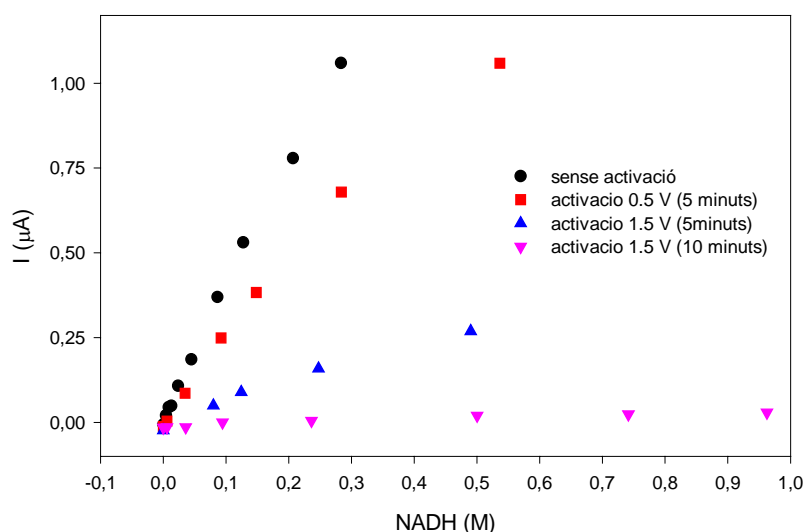


Figura 8.1 Calibracions amperomètriques de NADH mitjançant transductors grafit/MB en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) sotmesos a diferents tractaments electroquímics. Potencial aplicat: 0mV vs Ag/AgCl.

8.2.3 Estudi de l'enzim en solució

Com a pas previ a la construcció del biosensor de MDH, es va realitzar l'estudi de la resposta del sensor addicionant l'enzim i el cofactor en la solució, en un pas previ a la immobilització en la matriu de sílice.

Les concentracions de NAD⁺ i MDH emprades venen representades en la taula 8.3:

Taula 8.3 Concentracions de cofactor i enzim emprades en les calibracions amperomètriques de transductors de grafit/MB (5%). La solució de treball és una solució tampó de tris-HCl (pH=8.0) a la que s'hi afegeix alíquotes d'una solució estàndard de malat. Potencial aplicat = 0 mV vs Ag/AgCl .

	NAD ⁺		
MDH	0.1 mM	1 mM	10 mM
4 U	-	-	-
16 U	-	+	+
60 U	+	+	+

Només aquells sensors calibrats en altes concentracions de NAD⁺ i MDH en la solució de treball donaren resposta amperomètrica (signe + en la taula). Els resultats es mostren en la figura 8.2. Es evident, però, que resulta molt més convenient la immobilització de la proteïna i del cofactor sobre la superfície del sensor ja que d'aquesta forma el dispositiu esdevé *reagentless*, amb el que es simplifica considerablement el procés d'anàlisi. A més, aquesta tecnologia porta associada alhora un significant estalvi de reactius, tot i que, malauradament, la serigrafia de biosensors no està encara prou automatitzada, produint-se pèrdues de material que encareixen la fabricació. Tot i això, el consum de reactiu produït és sensiblement inferior quan s'utilitzen sensors *reagentless* (§8.3.2). Es va prosseguir, doncs, amb la encapsulació dels reactius dins del sol-gel.

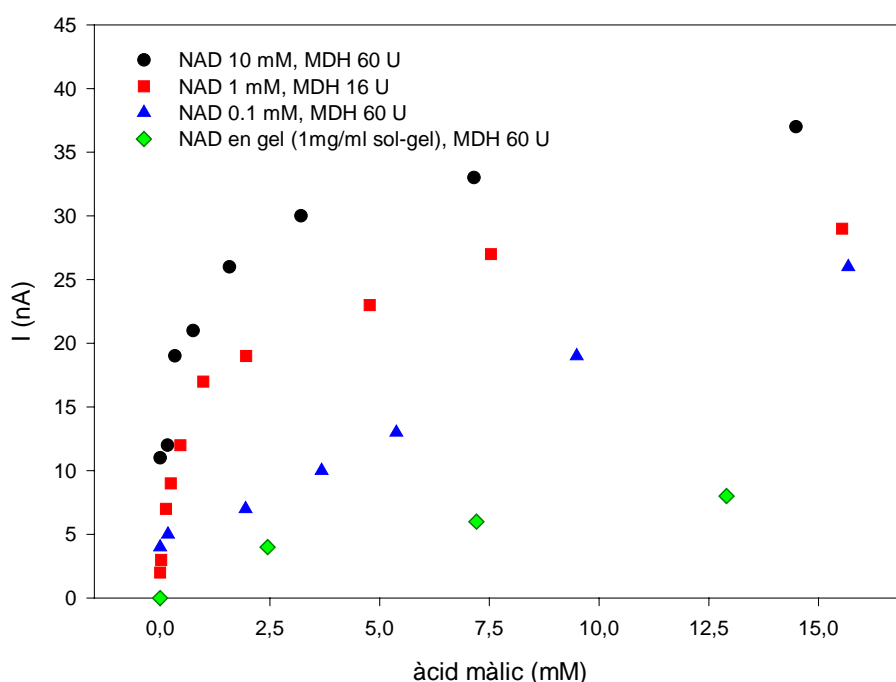


Figura 8.2 Calibracions amperomètriques de 3 transductors de grafit/MB (5%) i un 4t sobre els que s'ha imprès una matriu de sol-gel amb 1mg/ml de NAD immobilitzat en la xarxa de sílice. La solució de treball és una solució tampó de tris-HCl (pH=8.4) a la que s'hi afegeix alíquotes d'una solució estàndard de malat. Potencial aplicat = 0 mV vs Ag/AgCl .

En un primer pas es va introduir el cofactor en la matriu de sílice. La resposta obtinguda fou inferior a les observades en calibrats on el NADH estava lliure en solució. És possible que l'enzim trobi un major impediment per interaccionar amb el cofactor quan aquest es troba dins la matriu, i per tant disminueixi la quantitat de espècie electroactiva formada.

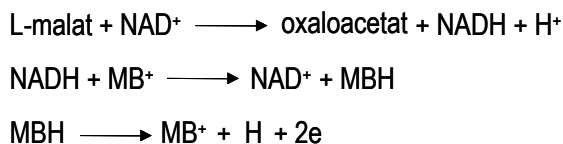
8.3 CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL BIOSENSOR

Els biosensors de MDH varen seguir els procediments desenvolupats en el disseny i construcció dels biosensors GOD. Tot i això, i degut a que l'enzim utilitzat era una deshidrogenasa, es va afegir el cofactor (NAD) al gel, a més de la MDH, el grafit i la CMC, seguint doncs, el protocol de preparació descrit anteriorment per la LDH (§7.5.4). Tot i que en les primeres proves no es va incloure el mediador (MB) al gel, estudis posteriors demostraren que la resposta del dispositiu millorava quan aquest s'inclouïa en la matriu de sílice (§8.4.7).

El protocol seguit per a la elaboració de la capa enzimàtica en la construcció dels biosensors de MDH fou la següent:

Als precursors sol-gel (0.515ml) s'afegeixen 90µl de MDH (25000U/2.3ml) a 0.1 g de NAD⁺ en 0.1 ml de tampó tris-HCl (pH=8.4) i s'agiten durant 10 minuts. Tot seguit s'addicionen 0.09 g de trealosa, 1.5 g de carboxi metil cel·lulosa (CMC) i 0.025 g de grafit (amb un 10% del mediador Blau de Meldola). La pasta resultant s'imprimeix sobre els transductors de grafit/MB.

Els biosensors es varen avaluar, mitjançant la tècnica de l'addició coneguda (§3.5.2). Es va seguir la variació del senyal electroquímic en funció de la variació en la concentració de àcid màlic, seguint el següent sistema:



Tal i com s'havia realitzat anteriorment, les calibracions es varen realitzar en una cel·la electrolítica envoltada d'una camisa d'aigua a 22°C. La solució de treball contenia 20 ml de tampó Tris-HCl a un valor de pH de 8.4 (valor òptim de treball per la MDH) agitada amb una micro hèlix. Seguint el procediment habitual, s'hi submergiren tres elèctrodes: un elèctrode de referència de Ag/AgCl, un elèctrode auxiliar de fil de platí i com a elèctrode de treball s'utilitzà el biosensor desenvolupat. Es varen connectar a un potenciostat que fixava el potencial de treball i les dades eren recollides en un ordinador.

Per a dur a terme la determinació amperomètrica de l'àcid màlic es va aplicar un potencial d'oxidació de 0 mV (que disminuï a -125 mV posteriorment) respecte un elèctrode Ag/AgCl. Un cop el senyal de fons era estable, s'addicionava el substrat mentre es feien les corresponents lectures d'intensitat de corrent amb el potenciostat.

A continuació, es detallen els passos seguits en el desenvolupament i optimització del biosensor, les etapes seguides durant la seva construcció així com els resultats obtinguts en la seva caracterització.

8.3.1 Estimació de la activitat enzimàtica de MDH en la matriu de sílice

8.3.1.1 Assaig espectrofotomètric

Un cop desenvolupat el transductor, el següent pas lògic a seguir era la immobilització del material biològic en el sol-gel. Primerament, doncs, es va estudiar la resposta de l'enzim quan es troba retingut en la matriu de sílice. Es va realitzar, per tant, un assaig espectrofotomètric per comprovar l'activitat enzimàtica de la MDH. El procediment seguit fou anàleg al seguit pels enzims anteriors. Els resultats demostraren que la proteïna roman activa en el gel.

8.3.1.2 Calibració amperomètrica

Tot seguit, es varen realitzar calibrats emprant diferents tipus de sensors. A banda del sensor de NAD (b) utilitzat anteriorment (§8.2.3) i del transductor (l'anomenarem tipus 0), se'n varen emprar dos més (a i c):

- a) Biosensors amb MDH immobilitzat en sol-gel i NAD lliure en solució
- b) Sensors amb NAD immobilitzat en sol-gel i MDH lliure en solució
- c) Biosensors amb enzim i cofactor immobilitzats en sol-gel

Recordem que en tots ells el mediador s'incorpora al dispositiu (mesclat en la tinta de grafit) durant el procés d'impressió del transductor.

Es va apreciar una clara disminució del senyal quan es comparaven els biosensors tipus a), b) i c) amb les calibracions on l'enzim i el cofactor estaven lliures en solució i s'utilitzava el transductor (tipus 0) com a dispositiu d'anàlisi (figura 8.3).

Quan l'anàlisi es realitza emprant els biosensors amb l'enzim immobilitzat [biosensor tipus (a)], el substrat, degut a la matriu de sílice, té un major impediment per accedir als setis actius de la proteïna, i aquesta, a més a més, afecta probablement en major o menor grau la activitat enzimàtica. En conseqüència la sensibilitat obtinguda resulta menor.

En els calibrats emprant dispositius on el cofactor es troba retingut en la matriu i l'enzim lliure en solució (sensors b) tot i que el senyal és major respecte als biosensors (a), continua essent inferior als calibrats realitzats pels transductors (tipus 0). El cofactor té ara una menor accessibilitat a l'enzim ja que es troba immobilitzat en el gel i la biomolècula en solució, fet que dificulta la formació de l'holoenzim i per tant la catàlisi de l'àcid. Tot plegat genera una menor quantitat de producte oxidable, i per tant, el senyal de la resposta obtinguda disminueix.

A més, el fet de que la resposta del sensor es vegi més afectada pel fet de d'immobilitzar l'enzim en la matriu (a) que pel fet de retenir el cofactor en el gel (b), sembla confirmar que en la

davallada del senyal no tan sols intervén la dificultat de les molècules de passar a través de la xarxa de sílice sinó que d'alguna forma la immobilització del material biològic en la matriu afecta llur activitat, tal i com s'havia suggerit.

Els resultats respecte al biosensors (a) amb MDH immobilitzat en el gel (i cofactor lliure en solució) milloren lleugerament quan ambdós (enzim i cofactor) són retinguts en la sílice [biosensor tipus (c)], degut a una major accessibilitat i, per tant, una millor interacció entre els dos. Tot i això, l'increment del senyal resulta poc important i el senyal continua sent força inferior als dels sensor (b) on l'enzim es troba lliure. S'observa per tant, un cop més, que el material biològic pateix una disminució de l'activitat enzimàtica quan s'immobilitza en el gel de sílice.

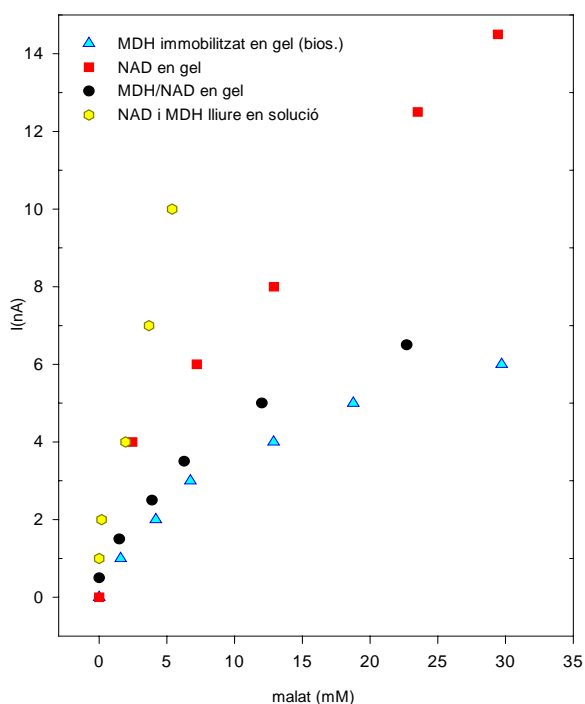


Figura 8.3 Calibracions amperomètriques (tampó tris-HCl, pH=8.4) de sensors de grafit/MB (5%) sobre els que s'ha imprès una matriu de sol-gel amb a) 1000 U de MDH/ml sol-gel (1mM de NAD lliure en solució); b) 0.1g de NAD/ml sol-gel (MDH lliure 60U); c) 2000 U de MDH i 0.1g de NAD per ml de sol-gel immobilitzat en el reticle de sílice. Potencial aplicat = 0 mV vs Ag/AgCl

△: biosensor a); □: sensor b); ●: biosensor c) ○: transductor tipus 0

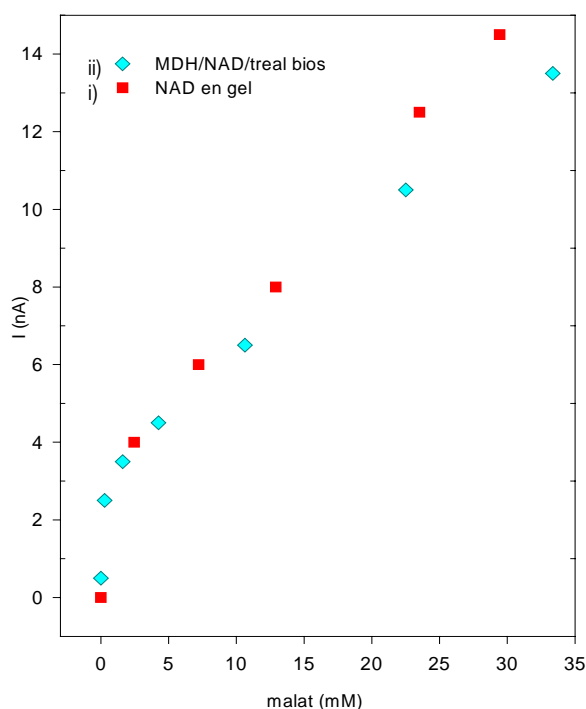


Figura 8.4 Calibracions amperomètriques de sensors de grafit/MB (5%) sobre els que s'ha imprès una matriu de sol-gel amb i) 0.1g de NAD/ml sol-gel (MDH lliure 60U); ii) 2000 U de MDH, 0.2g de NAD i 0.5% trealosa per ml de sol-gel immobilitzat en el reticle de sílice. Condicions de treball com figura 8.2.

Es va fer un intent per millorar la sensibilitat del sensor afegint trealosa¹⁴ (optimització en §8.3.5), un estabilitzant proteic. Els resultats obtinguts s'acosten força als aconseguits per aquells sensors amb el cofactor immobilitzat i l'enzim lliure en solució (figura 8.4). Sembla ser doncs, que l'efecte que produïa la sílice sobre la MDH es minimitza quan aquesta s'immobilitzava en el gel juntament amb trealosa.

8.3.2 Optimització de MDH i NAD⁺

Es varen preparar diferents formulacions per tal d'optimitzar el contingut d'enzim i cofactor necessaris en el sol-gel. En la taula següent s'indiquen les quantitats utilitzades i les sensibilitats obtingudes mitjançant la calibració dels biosensors.

Taula 8.4 Calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 27 biosensors MDH-NAD diferents (3 per cada formulació). Els valors del pendent trobats porten associat una DSR del 15% (n=3). Potencial aplicat: 0 mV vs Ag/AgCl. El mediador s'incorpora al dispositiu (mesclat en la tinta de grafit) durant el procés d'impressió del transductor.

<i>MDH /ml sol-gel</i>	Sensibilitat (μA/M)		
	<i>NAD⁺ /ml sol-gel</i>		
	<i>0.02 g</i>	<i>0.1 g</i>	<i>0.2 g</i>
<i>200 U</i>	-*	-*	-*
<i>1000 U</i>	-*	0.3	0.4
<i>2000 U</i>	0.2	0.5	1

*pendents negligibles

La màxima quantitat de reactiu que permetia una adequada impressió de la matriu de sílice fou de 0.2g de NAD i 2000 U de MDH per ml de sol-gel. Concentracions majors impossibilitaven la correcta deposició del gel sobre el sensor.

És evident que les sensibilitats trobades són molt petites i que, a més, porten associades una desviació important en les mesures (DSR=15%). Les considerables concentracions de cofactor i enzim utilitzades es deuen a les pèrdues que es produeixen durant el procés d'impressió. Cal pensar, a més, que amb aquestes quantitats es poden fabricar al voltant de 100 biosensorsⁱ i per tant la quantitat de material que conté cada dispositiu és molt inferior. Si tenim en compte que tan sols cal un dispositiu per anàlisi, resulta fàcil adonar-se que aquestes quantitats són molt inferiors (sis cops menors tant pel cofactor com per l'enzim) a les requerides en un anàlisi convencional on els reactius s'afegeixen a la solució i no es troben immobilitzats en el sensor (taula 8.3). Hem de tenir en compte a més, que durant el procés d'impressió es produeixen pèrdues de material i per tant aquest estalvi podria encara incrementar-se més, millorant la tècnica de forma que les pèrdues es minimitzin.

ⁱ Aquesta quantitat resulta aproximada i fàcilment ampliable

8.3.3 Estudi del potencial de treball

Tot i les millores produïdes, la sensibilitat continuava essent baixa. Es varen realitzar calibrats a diferents potencials per comprovar si el senyal podia augmentar. En la Figura 8.5 i Taula 8.5 es pot apreciar l'efecte de reduir progressivament el potencial aplicat sobre el biosensor. Es va comprovar que el salt més significatiu es produïa al aplicar un potencial d'entre -75 i -100 mV, i que la intensitat de corrent es mantenia pràcticament constant a partir de -111 mV. Incrementos majors no provocaven efectes notoris en la resposta del sensor i tan sols contribuïen al augment del corrent de la línia base. Per tant el potencial de treball aplicat es va establir en -125 mV.

Taula 8.5 Sensibilitats trobades en realitzar calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) a diferents potencials de treball utilitzants biosensors MDH - NAD - trealosa (2000 U - 0.2g - 5% respectivament per ml de sol-gel). El mediador (MB) s'incorpora al dispositiu (mesclat en la tinta de grafit) durant el procés d'impressió del transductor.

Potencial (mV)	100	0	-10	-75	-111	-150	-200	-250	-300
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	-	1	4	8	9	9	9	10	10

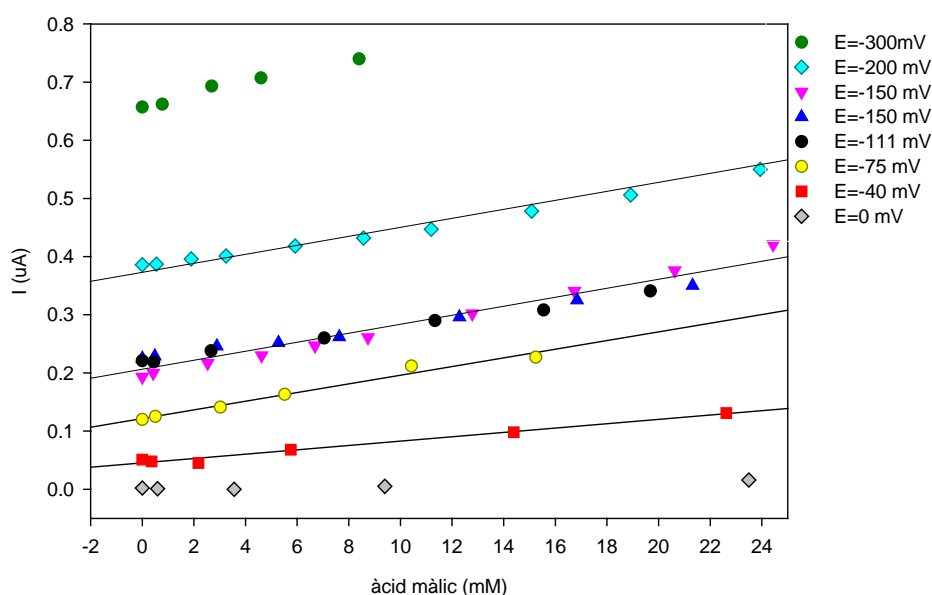


Figura 8.5 Calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) a diferents potencials de treball utilitzants biosensors MDH - NAD - trealosa (2000 U - 0.2g - 5% respectivament per ml de solgel) basats en transductors grafit/MB.

El canvi en el potencial de treball, a banda de proporcionar una major sensibilitat, disminueix el risc d'oxidació de possibles espècies interferents. Així doncs, aplicant un potencial menor al trobat prèviament en l'estudi del transductor, el que fem es reduir el senyal de resposta de nombroses substàncies electroactives presents en la mostra. Aquesta estratègia ha estat seguida per nombrosos autors i arribant en alguns casos a potencials de -150mV¹⁵⁻¹⁸.

D'aquesta forma s'aconsegueix evitar interferències provinents de substàncies oxidables tal com els àcids tartàric, cítric, acètic, succínic, ascòrbic o sulfits.

Aquest canvi en el potencial també ha estat observat en els sensors de LDH (§7.4.3). Sembla ser que el fet de canviar les condicions tant de l'enzim com del cofactor (lliure en solució en l'estudi del transductor o immobilitzat en la matriu de sílice en el biosensor) han modificat, d'alguna forma, el potencial de treball. Aquest fenomen, tal i com es va comentar en §7.4.3, fou observat en anterioritat per diversos investigadors, els quals varen trobar diferències de fins a 100 mV¹⁹ quan el mediador es troba en solució o adsorbit sobre alguna superfície, i fins i tot en el cas particular de la Meldola Blue disminucions de més de 100 mV depenent de si s'adsorbeix o es mescla amb grafit (en el que s'han arribat a aplicar potencials de -175 mV^{1, 20}).

8.3.4 Estabilitat de la resposta en el temps

Tal i com es va estudiar el transductor amb calibracions amperomètriques de NADH (§8.2.2), es va realitzar un seguiment en el temps de la estabilitat en la resposta dels biosensors desenvolupats (Figura 8.6). Durant el temps que durava el calibrat (aproximadament uns 20 minuts) no semblava apreciar-se cap efecte significatiu sobre la resposta del dispositiu. Tot i això, si es mantenia submergit en solució el temps suficient (sense addició de substrat), s'apreciava una disminució en el corrent anàleg a la observada durant l'avaluació del transductor associada molt possiblement al fenomen conegut com *fouling* [o fins tot a pèrdues parcials de material (leaking)]. Un cop finalitzada l'experiència, s'utilitzava un elèctrode de treball nou, i es realitzava un procés de neteja (descriu a §7.4.1.5) sobre l'auxiliar aproximadament cada 5 calibrats.

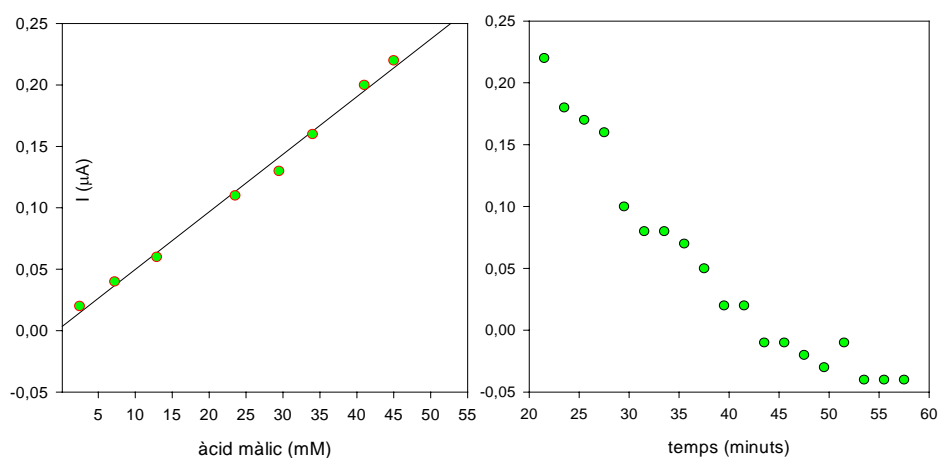


Figura 8.6 Calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) utilitzant biosensors MDH - NAD - trealosa (2000 U - 0.2g - 5% respectivament per ml de solgel) sobre transductor de grafit i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl. Seguidament a la calibració (duració aprox. 20 minuts), es manté submergit 40 minuts més (per un total de 60 m.) sense addició de substrat.

8.3.5 Efecte de l'addició de estabilitzants biològics en la resposta del biosensor trealosa-NAD-MDH sobre transductor de grafit/MB

Com ja s'ha comentat, existeixen dues raons bàsiques per immobilitzar els receptors biològics, contribuir a la millora de l'estabilitat i el temps de vida del dispositiu i evitar pèrdues a la solució.

Molts investigadors han reportat que sucres tal com trealosa, maltosa, lactosa, sucrosa, glucosa i galactosa poden ser emprats per estabilitzar proteïnes, especialment enzims²¹⁻²⁴. Malgrat, no existeix una explicació plenament satisfactòria per a l'ús d'aquests compostos com a estabilitzants, la seva eficàcia s'ha demostrat sobretot de forma experimental. Una explicació general rau en el fet de que disminuint l'efecte de l'aigua i mantenint interaccions apropiades amb la proteïna es produeix una millora en l'estabilitat.

Els dissacàrids, sobretot, han estat especialment útils en deshidrogenases²⁵ i cal destacar-ne la trealosa, sucre que es troba en nombrosos organismes i el qual asseca i deshidrata en condicions naturals. En estudis anteriors realitzats per altres autors^{14,26} i en el propi institut d'investigació d'AgResearch, s'havia comprovat com aquest sucre incrementava l'estabilitat dels enzims, i per tant, n'augmentava la seva activitat enzimàtica. Tot i que no existeix una adequada explicació per aquest fenomen, es pot observar una veritable estimulació de la cinètica enzimàtica per lleugers moviment moleculars de la molècula per tal d'acomodar aquests sucres. Sembla ser que els compostos polihidroxil (sucres alcohols en general) redueixen les interaccions aigua-proteïna fent que les interaccions hidrofòbiques de l'estructura de la proteïna se'n vegin reforçades. Aquests grups hidroxil substitueixen, d'alguna forma, les interaccions amb l'aigua necessàries per a la retenció de l'estructura terciària de la proteïna i la subseqüent activitat de la molècula. Això porta a un augment de la resistència a la desnaturalització de l'estructura de la proteïna i en el cas dels enzims un augment de llur estabilitat.

La penetració d'aquests compostos en la proteïna i el subseqüent assecament contribueixen a l'augment de la estabilitat. La eficiència del procés proposat pot dependre de la grandària molecular, la forma, la càrrega i les propietats químiques de la molècula²⁷. Fins i tot aquests additius podien fer disposar els centres actius de l'enzim més fàcilment al substrat, o, en alguns casos, fer disminuir o augmentar la concentració local de substrat²⁸.

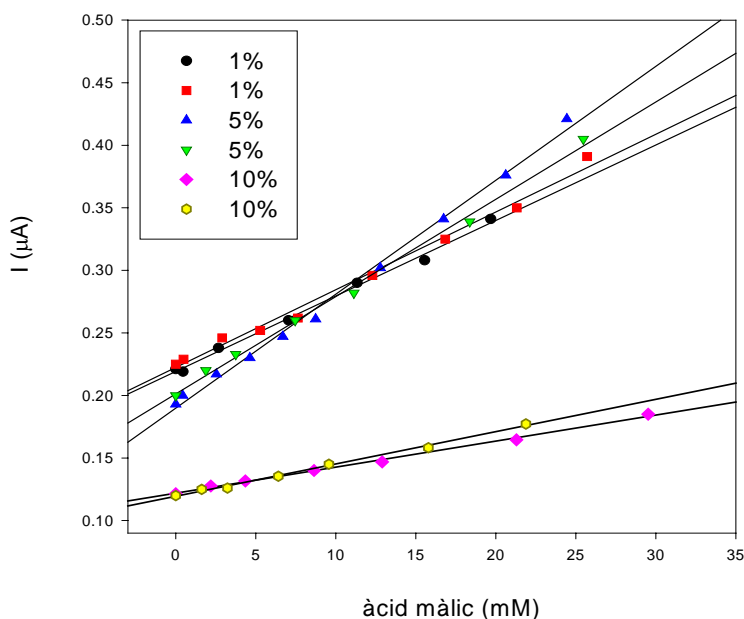
Cert polímers podrien permetre o facilitar el pas d'aquest estabilitzants cap a l'interior augmentant l'estabilitat i preservant l'estructura 3D més temps. Estudis realitzats per Gibson et al²⁹ revelaren que mentre la trealosa era un bon estabilitzant quan l'enzim es trobava immobilitzat en polímers tal com DEAE dextran/lactitol (95% de la seva activitat després de 35 dies a 37°C, era un estabilitzant molt pobre quan aquest es trobava adsorbit senzillament sobre la superfície de l'elèctrode. Es va observar, per una altra banda, que els sucres no cíclics semblen minvar llur activitat.

Es va optar, doncs, per afegir trealosa en el gel. Les primeres experiències realitzades (§8.3.1.2) mostraren una millora en els resultats, i per tant, tot seguit, es dugué a terme la seva optimització.

8.3.5.1 Optimització del contingut de trealosa

Es varen fabricar biosensors amb diferents continguts d'estabilitzant, 1, 5 i 10%. En la figura 8.7 es pot observar alguna de les calibracions realitzades sobre els sensors. Els millors resultats s'obtingueren per aquells dispositius amb un contingut del 5% de trealosa (taula 8.6). Els sensors amb el contingut més alt (10%) tenien un pendent molt baix, degut potser a que aquesta quantitat de estabilitzant constituïa una barrera difusional massa important per a que el substrat arribes a l'enzim. Els biosensors amb 1% de trealosa oferiren millors respostes, tot i que amb sensibilitats un 25 % inferiors als dispositius amb un 5%. El soroll de fons, a més es va veure incrementat.

Figura 8.7 Calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) utilitzant biosensors MDH (2000 U/mlsolgel) – NAD (0.2g/mlsolgel) amb diferents quantitats de trealosa, (1,5 i 10% respectivament per ml de solgel) sobre transductor de grafit i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.



Taula 8.6 Calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 9 sensors diferents. Potencial aplicat: -125 mV. La desviació estàndard relativa (DSR) fou calculada en base a 3 mesures (n=3) i l'error amb un interval de confiança del 95%. Altres detalls com figura 7.

Trealosa (%)	1	5	10
Pendent (µA/M)	6.1± 0.2	8.5± 0.5	2.3± 0.5
Regressió	.9991	.9991	.9990
DSR* (%)	2	5	20

Així doncs, tant en sensibilitat com en estabilitat de resposta i soroll de fons, els millors dispositius foren aquells amb un 5% de trealosa.

8.3.6 Efecte de la incorporació del mediador en la matriu de sílice gel en la resposta del biosensor MB-trealosa-NAD-MDH.

Durant el desenvolupament del biosensor es van anar produint diferents canvis en la seva configuració. Havíem vist com en un primer pas s'havia integrat l'enzim i el cofactor. Tot seguit es va incorporar trealosa per aportar major estabilitat a la proteïna i augmentar-ne la activitat enzimàtica.

El darrer pas fou afegir el mediador (MB) al gel per millorar el contacte amb el cofactor. Recordem que fins ara el mediador es barrejava amb el grafit en el procés de fabricació del transductor. Així doncs, en un intent de millorar la interacció entre el mediador i el cofactor, s'immobilitzaren conjuntament en el procés de formació del gel. El mediador fou afegit juntament amb el grafit en pols, en la darrera etapa de la preparació del gel d'impressió. La quantitat final fou del 10% en pes del grafit addicionat. Els resultats es poden veure en la figura 8.8.

Comprovem com la sensibilitat va millorar, però la resposta resultava lleugerament sigmoïdal.

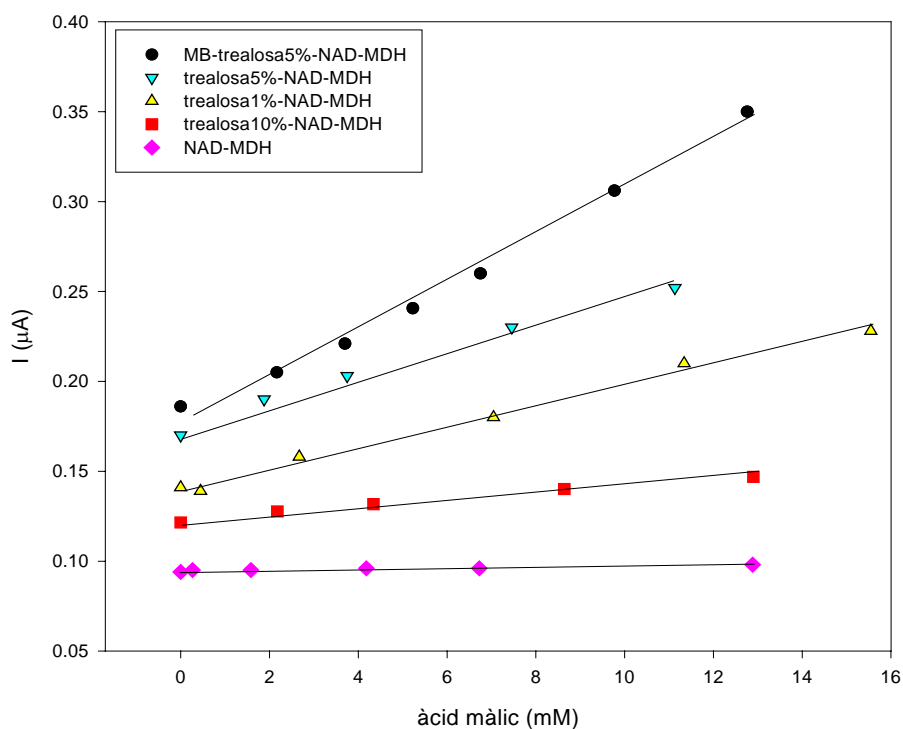


Figura 8.8 Calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) utilitzant biosensors MDH - NAD - trealosa-grafit-MB, (2000 U - 0.2g - 5% -1%-0.1% respectivament per ml de solgel) sobre transductor de grafit i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.

Cal tenir present que en la bibliografia no apareix cap immobilització de mediador, cofactor i enzim conjuntament, no tan sols ja en sol-gel sinó en cap tinta o pasta d'impressió. Per tant és el primer cop en el que realitza amb resultats satisfactoris.

8.3.7 Paràmetres de resposta. Interval lineal, pendent, reproductibilitat i límit de detecció

A partir de la dades obtingudes en la gràfica anterior, un cop el biosensor havia estat optimitzat, se n'extragueren els paràmetres de resposta. El límit superior de resposta lineal fou de 0-14 mM (amb un límit de detecció de 0.07 mM) i un pendent de 14 ± 0.5 ($\mu\text{A/M}$). Es pot observar la millora en la sensibilitat del biosensor de malat quan es compara amb les obtingudes pels dispositius anteriors (Taula 8.7) i fins tot en dispositius desenvolupats per altres investigadors ($1.0\mu\text{A/M}$) amb intervals lineals inferiors (0.25-2.0 mM)³⁰.

Taula 8.7 Calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant diferents biosensors. Potencial aplicat: -125 mV. L'error fou calculat en base a 4 mesures (n=4) amb un interval de confiança del 95%.

Biosensor	MB-5%trealosa - NAD-MDH	5%trealosa - NAD-MDH	1%trealosa - NAD-MDH	10%trealosa - NAD-MDH	NAD-MDH
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	14 ± 0.5	8.5 ± 0.5	6.1 ± 0.2	2.3 ± 0.5	1 ± 0.2
Regressió	.9996	.9992	.9994	.9991	.990

L'interval lineal dels biosensors de malat deshidrogenasa permeten una zona de treball relativament ampla si ho comparem amb els valors trobats per altres autors; 0.25-2.0 mM³⁰, 0-1.1mM¹⁸ i 1-2 mM³³ amb sensibilitats d'ordres inferiors o iguals a les nostres mitjançant dispositius anàlegs als desenvolupats, i fins i tot milloren la de sensors fabricats mitjançant convencionals (*no screen-printing*) 0.015-1.5³¹.

La composició final de la capa enzimàtica per a la construcció dels biosensors de MDH fou de 0.35 ml TEOS, 0.077 ml aigua, 0.077 ml etanol, 0.058 ml HCl 0.1M (precursors sol-gel) als que s'afegiren 90 μl de MDH (25000U/2.3ml), 0.1 g de NAD⁺ (en 0.1 ml de tampó Tris-HCl, pH=8.4), 0.09 g de trealosa, 1.5 g de carboxi metil cel·lulosa (CMC) i 0.025 g de grafit (amb un 10% del mediador Blau de Meldola).

Aquestes quantitats permetien la fabricació d'un 50 dispositius biosensors.

Es varen realitzar diverses calibracions sobre un mateix biosensor per comprovar la seva reproductibilitat i estabilitat al llarg del temps. Tal i com era de preveure, s'observà una disminució de la sensibilitat a mesura que s'anaven realitzant les calibracions i, per tant, no era recomanable un ús continuat dels dispositius desenvolupats. Aquesta pèrdua de senyal es va associar a la deposició de productes de la reacció sobre la superfície del sensor, fenomen repetidament observat en anterioritat.

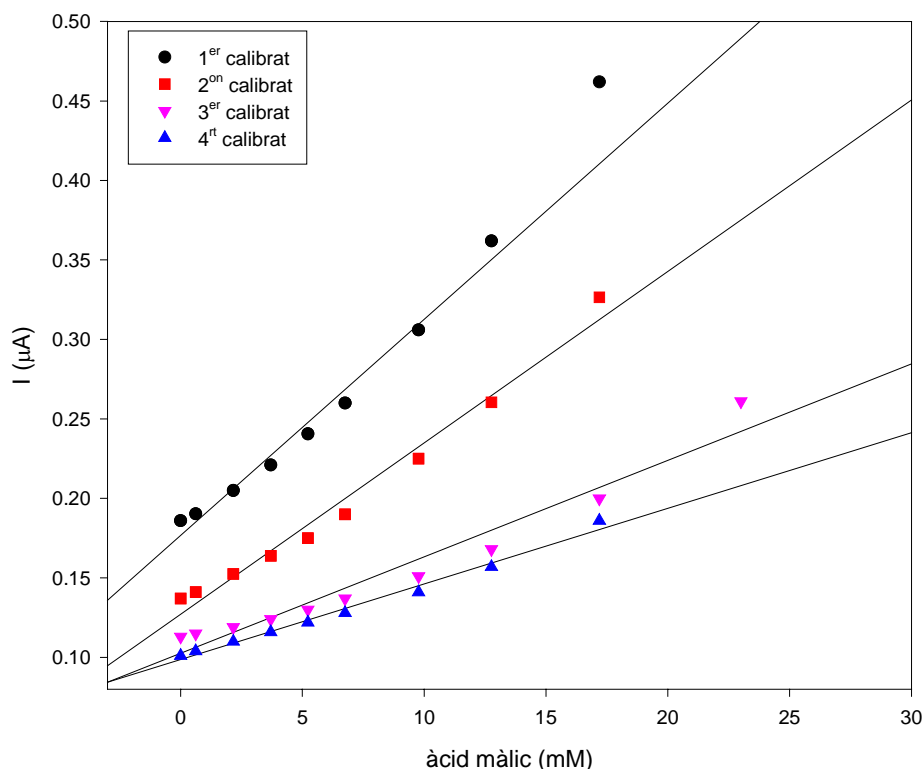


Figura 8.9 Calibracions amperomètriques successives de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) utilitzant el mateix biosensor MDH - NAD - trealosa-grafit-MB, (2000 U - 0.2g - 5% -1%-0.1% respectivament per ml de solgel) sobre transductor de grafit i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.

Taula 8.8 Sensibilitats obtingudes de calibracions amperomètriques successives de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) utilitzant el mateix biosensor MDH - NAD - trealosa-grafit-MB, (2000 U - 0.2g - 5% -1/10% respectivament per ml de solgel) sobre transductor de grafit i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.

Calibrat	1	2	3	4
Sensibilitat ($\mu A/M$)	14	11	6	5

Cal destacar que es varen realitzar estudis de reproductibilitat per a biosensors de diferents lots. Tal i com era de preveure, el error associat a la sensibilitat de la resposta va augmentar. La construcció dels biosensors i el procés de impressió porta associat, malauradament, un component manual, que fa que sigui pràcticament impossible una deposició exactament igual de material biològic sobre els sensors, quan aquests són fabricats a partir de gels diferents. Les causes son diverses, el procés d'homogenització, preparació de solucions, però sobretot la impressió semiautomàtica del gel. Aquest fet va provocar doncs, que l'error situat en un 3% per dispositius que provenen del mateix lot augmentes fins un 15% en biosensors de lots diferents. Aquestes diferències van augmentar quan es realitzaren determinacions en mostres reals. L'error en el sensibilitat dels dispositius (precisió) quan es treballava en una solució que contenia vi es

situava al voltant del 6% (quan treballàvem amb sensors procedents de diferents lots de fabricació, però, l'error era molt superior), tot i que la exactitud es situava en un marge acceptable del 10% (§8.7).

Taula 8.9 Sensibilitats obtingudes de calibracions amperomètriques de malat en una solució tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 16 biosensors diferents; a) 8 del mateix lot (pendent 14 ± 0.5) i b) 8 de lots diferents (pendent 14 ± 2). L'error fou calculat amb un interval de confiança del 95% ($n=8$). Potencial aplicat: -125 mV.

	Sensibilitat ($\mu\text{A/M}$)								DSR* (%)
Bios mateix lot	13.7	14.1	13.9	14.0	13.6	14.0	13.9	14.4	3
Bios diferent lot	14	13	15	16	13	15	14	14	15

*desviació estàndard relativa

Finalment, es va comparar la cinètica de la reacció enzimàtica descrita per Michaelis-Menten de la MDH quan aquesta es troba immobilitzada en el gel o lliure en solució. Es va comprovar que la cinètica s'ajusta al model descrit per Michaelis-Menten. El valor trobat per la $K_{m,app}$, 8 mM, és superior al valor trobat en solució (1mM), 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.

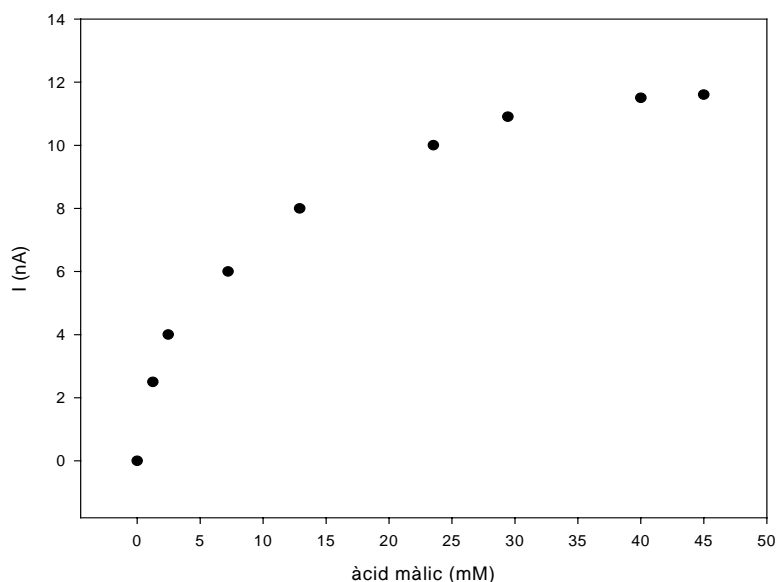


Figura 8.10 Resposta amperomètrica de biosensors MDH - NAD - trealosa-grafit-MB sobre transductor de grafit i MB en una solució tampó de Tris-HCl (pH 8.4), afegint al·lòtotes d'àcid màlic. Potencial aplicat = -125 mV vs Ag/AgCl. $K_{m,app} = 8$ mM.

8.4 EFECTE DE L'ADDICIÓ DE VI EN UN CALIBRAT AMPEROMÈTRIC

El següent pas en el desenvolupament dels biosensors va ser comprovar l'efecte que produïa l'addició d'una mostra de vi en la resposta del sistema. Es varen realitzar calibracions amb solucions d'àcid màlic preparades al laboratori i es varen afegir al·lòquotes de vi puntuals durant l'experiment. Tot i l'absència d'una membrana externa, qualsevol interferència provenint de les mostres de vi semblaven no tenir un efecte prou important com per no permetre l'anàlisi d'àcid màlic utilitzant els biosensors desenvolupats. Tot i això, es va recomanar l'ús de l'addició estàndard degut a les lleugeres desviacions observades en la resposta del sensor quan s'addicionava vi en el calibrat de malat.

8.5 ANÀLISI D'ACID MÀLIC PER MÈTODES ESPECTROFOTOMÈTRICS

Les mesures realitzades pels biosensors MDH - NAD – trealosa-grafit-MB en mostres de vi es compararen amb els resultats obtinguts per mètodes espectrofotomètrics. A continuació es descriu en línies generals el protocol seguit en aquest anàlisi, tot i que es mostra de forma més detallada en l'annex B.

ÀCID D-MÀLIC

DETERMINACIÓ PER MÈTODE ENZIMÀTIC

1. Principi

En presència de D-malat-deshidrogenasa (D-MDH), l'àcid D-màlic (D-malat) s'oxida a oxalacetat per la nicotinamida-adenín-dinucleótid (NAD). L'oxalacetat format es transforma en piruvat i diòxid de carboni.

La formació de NADH, mesurada per l'augment de l'absorbància a la longitud d'ona de 334, 340 o 365 nm, és proporcional a la quantitat de D-malat present.

2. Reactius

En el comerç es presenten reactius per unes 30 determinacions en kits que contenen:

- a) recipient 1 d'uns 30 ml de solució tampó d'àcid [N-(2-hidroxiètil)piperazina-N'-2-etano-sulfònic] pH = 9,0 i estabilitzadors;
- b) recipient 2 d'uns 210 mg de NAD liofilitzat;
- c) recipient 3 (en número de tres) de D-MDH liofilitzat, per analitzar 8 mostres.

Preparació de les solucions

1. Dissoldre el contingut d'un dels recipients 3 amb 1 en 0,6 ml d'aigua bidestil·lada. Portar la solució a 20-25 °C abans d'utilitzar-la.
2. Dissoldre el contingut del recipient 2 en 4 ml d'aigua bidestil·lada.

Estabilitat de les solucions

El contingut del recipient 1 es conserva al menys un any a + 4 °C; la solució 2 es conserva al voltant de 3 setmanes a + 4 °C y 2 mesos a - 20 °C; la solució 3 es conserva 5 dies a + 4 °C.

3. Material

3.1. Un espectrofotòmetre que permeti efectuar mesures a 340 nm (màxim d'absorció del NADH) o un fotòmetre d'espectre discontinu que permeti efectuar las mesures a 334 nm y 365 nm. Donat que es tracta de mesures absolutes de absorbància (no hi ha corba de calibrat, sinó referència al coeficient d'extinció del NADH), les escales de longitud d'ona i las absorbàncies del aparell han de ser controlades.

3.2. Cubetes d'1 cm de trajecte òptic de vidre o cubetes d'un solo ús.

3.3. Micropipetes que permetin prendre volums compresos entre 0,01 y 2 ml.

4. Preparació de la mostra

La determinació de D-malat s'efectua en general directament en el vi sense decoloració prèvia. Degut a que la quantitat de D-malat en la cubeta ha d'estar compresa entre 2 g i 50 g, es convenient diluir el vi de tal forma que la concentració de malat estigui compresa entre 0,02 y 0,5 g/l o 0,02 y 0,3 g/l (segons l'equip emprat).

5. Procediment

El espectrofotòmetre s'ajusta a la longitud d'ona de 340 nm, les mesures d'absorbància es realitzen en les cubetes d'1 cm de trajecte òptic i el zero d'absorbància s'ajusta respecte l'aire (sense cubeta en el trajecte òptic) o respecte a l'aigua.

En las cubetes d'1 cm de trajecte òptic, introduir:

Pipetejat en les cubetes	Blanc (ml)	Mostra (ml)
Solució 1	1	1
Solució 2	0.2	0.2
mostra	-	0.1
Aigua bidestil·lada	1	0.9

Barrejar. després d'uns 6 minuts, mesurar les absorbàncies de les solucions blanc i prova (A1). Afegir 0.01 ml de la solució 3 i barrejar; esperar el final de la reacció (uns 20 minuts) i mesurar les absorbàncies de les solucions blanc i prova (A2).

Determinar las diferències d'absorbància (A2 - A1) del blanc i de la prova. Deducir la diferència d'absorbància del blanc de la diferència d'absorbància de la prova.

Nota:

El temps necessari per a l'acció dels enzims es dona a títol indicatiu ja que pot variar d'un lot a un altre. Es recomana determinar-ho para cada lot.

L'àcid D-màlic reacciona ràpidament. Una activitat complementaria de l'enzim transforma també l'àcid L-tartàric tot i que la velocitat sigui molt menor. Es la raó per la qual hi ha una lleugera reacció paràsit que es possible corregir per extrapolació.

6. Expressió dels resultats

La concentració en miligrams per litre es calcula mitjançant la fórmula general:

$$c = (V \times PM \times \Delta A) / (e \times d \times v \times 1000)$$

V= volum de la prova en ml (en aquest cas 2,95 ml)

v=volum de la mostra en ml (en aquest cas 0,1 ml)

PM= massa molecular de la substància estudiada (en aquest caso, àcido D-màlic = 134,09)

d= trajecte òptic de la cubeta en cm (en aquest cas 1 cm)

e=coeficiente de absorció molar del NADH:

a 340 nm= 6,3 (1 mmol-1 cm-1)

a 365 nm= 3,4 (1 mmol-1 cm-1)

a 334 nm= 6,18 (1 mmol-1 cm-1).

Si s'ha realitzat una dilució durant la preparació de la mostra, multiplicar el resultat pel factor de dilució.

7.1. Límit de repetitivitat

La diferència absoluta entre dos resultats individuals obtinguts amb una matèria idèntica sotmesa a assaig, pel mateix operador, utilitzant els mateixos instruments, en l'interval de temps més curt, no sobrepassarà el valor de repetitivitat r en més del 5 % de los casos.
r= 11 mg/l.

7.2. Límit de reproducibilitat

La diferència absoluta entre dos resultats individuals obtinguts en una matèria idèntica sotmesa a assaig en dos laboratoris diferents no sobrepassarà el valor de reproducibilitat R en més del 5 % dels casos.

R= 20 mg/l.

8. Observacions

Donada la precisió del mètode, els valors d'àcid D-màlic inferiors a 50 mg/l han de ser confirmats por mitjà d'un altre mètode d'anàlisi emprant un altre principi de mesura³².

La mostra de vi en la cubeta no ha de ser superior a 0,1 ml per tal d'evitar eventuais inhibicions de l'activitat enzimàtica pels polifenols.

8.6 DETERMINACIÓ DE MALAT EN VINS MITJANÇANT LA TÈCNICA DE L'ADDICIÓ ESTÀNDAR

La tècnica de l'addició estàndard es especialment útil per analitzar mostres complexes en les que la probabilitat de que es produeixin efectes deguts a la matriu es considerable. Un dels mètodes més habituals per aplicar aquesta tècnica implica l'addició successiva de diferents volums d'una solució patró a un únic volum del problema mesurat de forma exacta. Després de cada addició es realitzen les mesures sobre la mostra original. La matriu de la mostra és pràcticament idèntica després de cada addició i l'única diferència és la concentració d'analit.

L'anàlisi d'àcid màlic es realitzà en 3 vins diferents: Chardonnay, Sauvignon i Muller Thurgau.

8.6.1 Anàlisi d'àcid màlic en vi Chardonnay

8.6.1.1 Resposta del biosensor per a diferents concentracions de vi

En una primera experiència es va estimar la concentració d'àcid màlic en vi a partir d'una mostra sobre la que es realitzaren tres dilucions diferents amb tampó pH 8.4 de Tris-HCl. S'utilitzaren 8 biosensors diferents procedents del mateix lot per a la determinació. S'afegiren volums diferents de la mateixa mostra en la cel·la de mesura per una concentració final de 2, 4 i 6 mM d'àcid màlic.

En la gràfica (figura 8.11) se'n mostren els calibrats i en la Taula 8.10 es mostra l'error produït en la determinació. Els valors es compararen amb els resultats aconseguits per mètodes espectrofotomètrics.

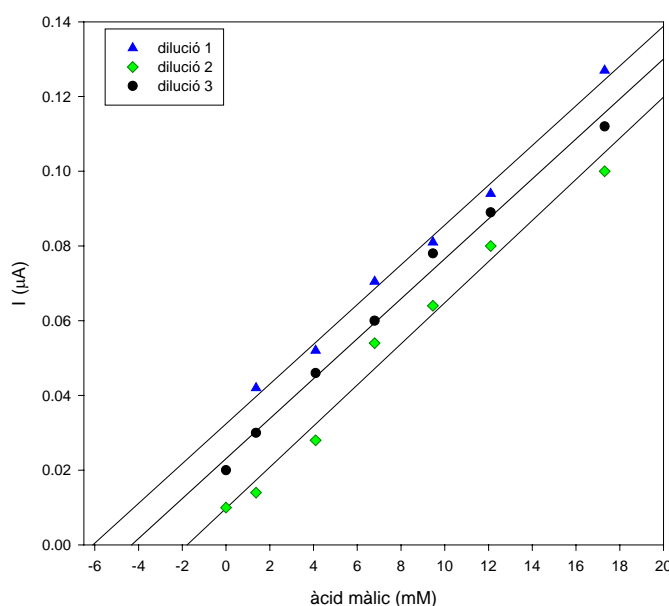


Figura 8.11 Anàlisi de malat mitjançant biosensors MDH - NAD – trealosa-grafit-MB en una mostra real de vi Chardonnay sotmès a 3 dilucions diferents amb una solució de tampó de pH=8.4, mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. Potencial aplicat = -125 mV vs Ag/AgCl.

Taula 8.10 Anàlisi d'àcid màlic en mostres diluïdes de vi en una solució tampó pH=8.4 utilitzant biosensors MDH. Potencial aplicat = -125 mV vs Ag/AgCl. (Els valors pertanyen a les concentracions de la mostra diluïda).

Referència* (mM)	Biosensor MDH (mM)	RSD** (%)	Error relatiu*** (%)
2.0	1.9	3	5
4.0	4.2	3	5
6.0	6.1	3	1

* mètode espectrofotomètric; **desviació estàndard relativa (precisió) per a n=3 (6 i 4 mM) i n=2 (2 mM);

*** error en la exactitud $(\bar{x}_i - \bar{x}) / \bar{x}$

S'aprecia com l'error en la mesura (exactitud) es situa al voltant del 5% (1% en les mostres més concentrades), i la desviació entre les determinacions aconseguides pels diferents dispositius (precisió) en el 3%. Els resultats obtinguts, per tant, demostren que els biosensors desenvolupats poden ser utilitzats per a realitzar anàlisis de àcid màlic en mostres de vi i amb resultats més acurats que els aconseguits en l'anàlisi d'àcid làctic. Els estudis es continuaren estudiant la resposta en biosensors de diferents lots.

8.6.1.2 Anàlisi d'àcid màlic mitjançant biosensors de lots diferents

A partir dels resultats obtinguts, s'observà que els millors resultats s'havien aconseguit per una concentració de 6 mM d'àcid màlic en la cel·la de treball (§8.6.1.1). Així doncs, es realitzà l'anàlisi d'àcid màlic en aquest vi mitjançant biosensors que provenien de lots diferents. A partir d'una mateixa mostra de vi, s'obtingueren 6 al·lquotes sobre les que es realitzaren els diferents calibrats (figura 8.12).

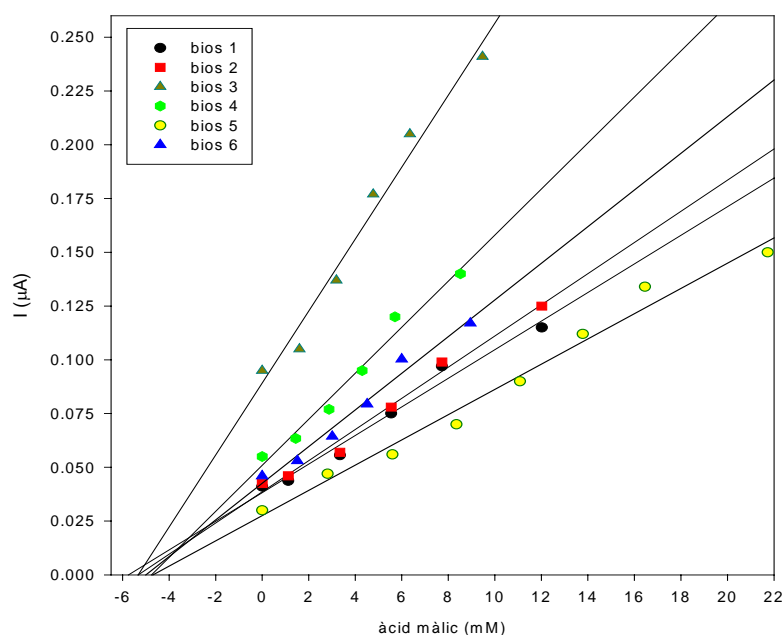


Figura 8.12 Determinació amperomètrica de malat en una mostra de vi Chardonnay tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 6 biosensors MDH - NAD - trealosa-grafit-MB diferents i que provenen de lots diferents amb un 5% de trealosa i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.

S'aprecia que tot i presentar sensibilitats diferents (possiblement degut a que s'han dipositat quantitats d'enzim diferents en el procés d'impressió) la concentració d'àcid màlic detectada és aproximadament la mateixa.

En la taula 8.11 es pot observar els valors obtinguts (mM) per a cada un dels calibrats.

Taula 8.11 Valors obtinguts de la determinació amperomètrica de malat en una mostra de vi Chardonnay tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 6 biosensors diferents. Potencial aplicat: -125 mV. En el càlcul del percentatge d'error es compararen els resultats obtinguts a través dels biosensors desenvolupats amb les dades obtingudes de l'anàlisi espectrofotomètrica.

	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6
Referència*	5.5	5.5	5.3	5.4	5.3	5.3
Biosensor	5.7	5.4	4.8	5.2	4.9	5
Error relatiu**	3	2	10	4	8	6

* mètode espectrofotomètric;

** error en la exactitud= $(x_i - \bar{x}) / \bar{x}$

Veiem que el dispositiu de MDH fou capaç de determinar la concentració d'àcid màlic en vi, tot i que fou necessària la dilució de la mostra, ja que el sensor no aconseguia un senyal de fons estable si se'l submergia directament en vi.

Malgrat la dilució, es pot observar com a partir d'un dispositiu fabricat completament per tecnologia *thick-film*, s'ha pogut quantificar l'analit d'interès amb un error (exactitud) situat al voltant del 5.5 %, i amb una desviació (precisió) entre els biosensor utilitzats del 6.5 %. Aquests resultats són molt propers als aconseguits per altres investigadors emprant biosensors convencionals de MDH ³¹. Fins ara no tenim notícia d'un sensor realitzat totalment per impressió serigràfica capaç d'analitzar mostres reals.

8.6.2 Anàlisi d'àcid màlic en vi Sauvignon

Anàlogament a les determinacions realitzades en vi Chardonnay, es realitzà l'anàlisi d'àcid màlic en vi Sauvignon mitjançant biosensors que provenien de lots diferents. A partir d'una mateixa mostra de vi, s'obtingueren 6 alíquotes sobre les que es realitzaren els diferents calibrats (figura 8.13). Tal i com succeïa anteriorment la concentració d'àcid màlic detectada és aproximadament la mateixa. Pels diversos biosensors emprats tot i presentar sensibilitats diferents. En la Taula 8.12 es pot observar els valors obtinguts per a cada un dels calibrats.

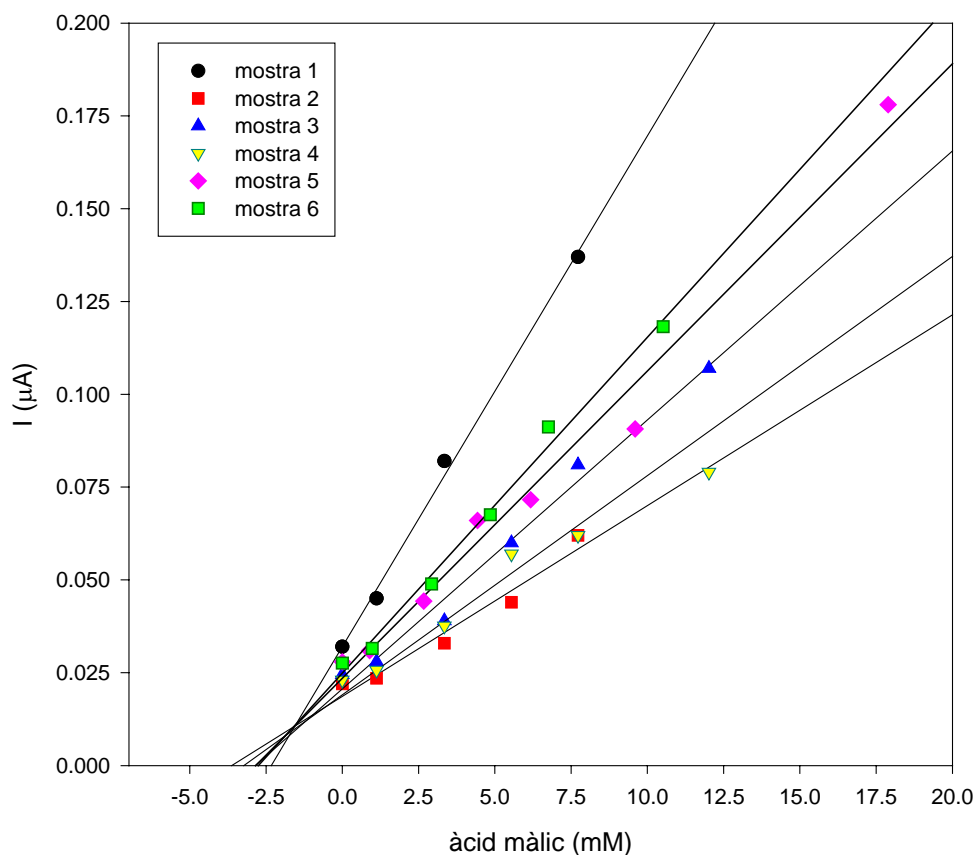


Figura 8.13 Determinació amperomètrica de malat en una mostra de vi Sauvignon tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 6 biosensors diferents i que provenen de lots diferents amb un 5% de trealosa i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.

Taula 8.12 Valors obtinguts en l'anàlisi de malat en una mostra de vi Sauvignon tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 6 biosensors de lots diferents. Potencial aplicat: -125 mV. En el càlcul del percentatge d'error es compararen els resultats obtinguts a través dels biosensors desenvolupats amb les dades obtingudes de l'anàlisi espectrofotomètric.

	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6
Referència*	2.5	2.5	2.5	2.5	2.8	2.8
Biosensor	2.3	2.7	2.8	2.8	3.2	3.4
Error relatiu**	9	7	10	10	12	18

* mètode espectrofotomètric;

**error en la exactitud= $(x_i - \bar{x}) / \bar{x}$

Veiem que a partir dels biosensors *thick-film* desenvolupats es pot determinar la concentració d'àcid màlic en altres tipus de vi (prèvia dilució), tot i que, com ja succeïa en els dispositius de LOD, l'efecte del vi Sauvignon sembla ser més important que el realitzat per altres vins com el Chardonnay. Els errors han augmentat lleugerament amb un error relatiu (exactitud) situat al voltant del 10 %, i amb una desviació (precisió) entre els biosensor utilitzats del 14 %. Sembla

ser que els components d'aquest vi malmeten d'alguna forma la capa biològica, o si més no, és possible que hi hagi una major presència de substàncies interferents fàcilment oxidables com els sulfits o àcids com tartàric, succínic o ascòrbic que contribueixen a lectures errònies.

Posteriorment es va afegir una membrana protectora d'acetat de cel·lulosa (§ 8.10) tot i que, malauradament, els resultats no milloraren.

8.6.3 Anàlisi d'àcid màlic en vi Muller Thurgau

Anàlogament a les determinacions realitzades en vi Chardonnay i Sauvignon, es realitzà l'anàlisi d'àcid màlic en vi Muller Thurgau mitjançant biosensors que provenien de lots diferents. A partir d'una mateixa mostra de vi, s'obtingueren 9 alíquotes sobre les que es realitzaren els diferents calibrats (Figura 8.14). Tal i com succeïa anteriorment, fou necessària una dilució prèvia a l'anàlisi. La concentració d'àcid màlic detectada fou força propera a la trobada mitjançant mètodes espectrofotomètrics. En la Taula 8.13 es pot observar els valors obtinguts per a cada un dels calibrats.

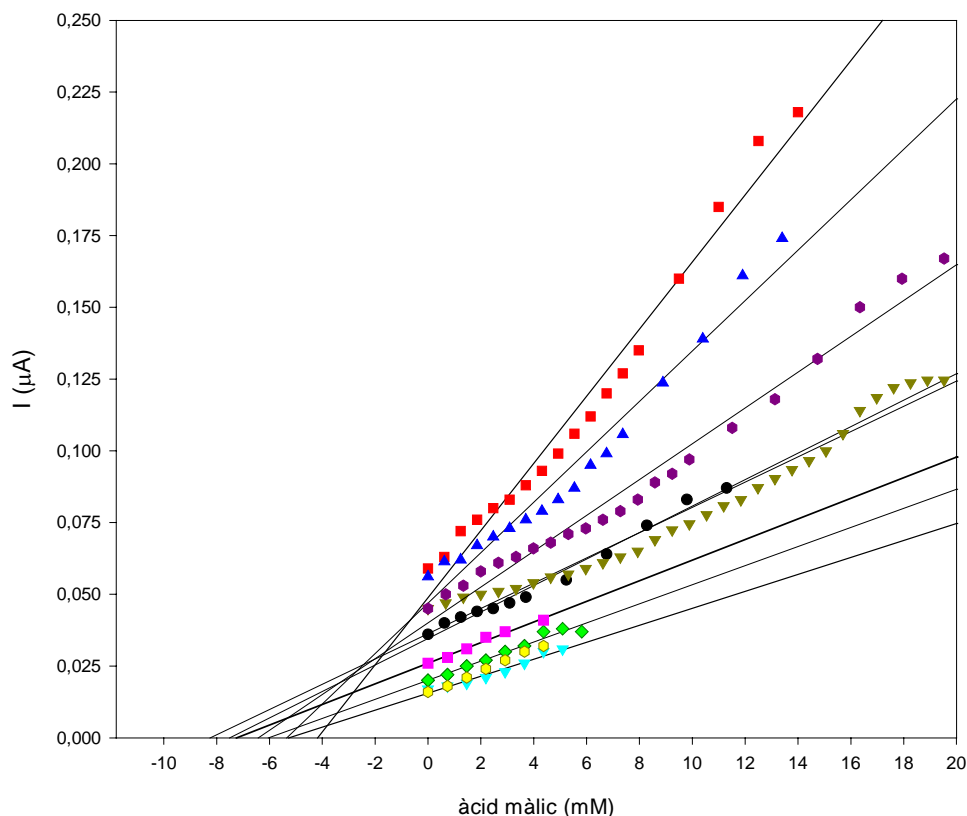


Figura 8.14 Determinació amperomètrica de malat en una mostra de vi Muller Thurgau tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 9 biosensors MDH - NAD – trealosa-grafit-MB diferents amb un 5% de trealosa i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl..

Taula 8.13 Determinació amperomètrica de malat en una mostra de vi Muller Thurgau tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 9 biosensors diferents amb un 5% de trealosa i MB. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl. En el càlcul del percentatge d'error es compararen els resultats obtinguts a través dels biosensors desenvolupats amb les dades obtingudes de l'anàlisi espectrofotomètric. $\bar{x}=6.2 \pm 2$

	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6	Mostra 7	Mostra 8	Mostra 9
Referència*	6	5.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6	6	5.5
Biosensor	5.4	4.8	7.1	7.2	7.3	8.1	6.4	5.8	4.2
Error relatiu**	11	15	8	10	11	16	6	3	25

Comprovem doncs, que a partir dels biosensors *thick-film* desenvolupats es pot determinar la concentració d'àcid màlic en diferents tipus de vi (prèvia dilució), tot i que l'efecte realitzat pels vins Muller Thurgau i Sauvignon resulten més importants que el del vi Chardonnay. L'error en l'exactitud es continua situant al voltant del 10% (tot i que en alguns dispositius és sensiblement superior) i la desviació (precisió) entre els biosensors ha augmentat fins un 17 %. Tot i això, si observem la mitjana de les mesures ($\bar{x}=6.2 \pm 2$), aquesta és molt propera al valor obtingut a partir del mètode de referència ($\bar{x}=6.1 \pm 0.5$, Taula 8.14). Així doncs, tot i que els sensors presenten certa imprecisió en aquest vi, els resultats aconseguits són molt exactes.

En la taula següent es resumeixen els resultats aconseguits en cada un dels vins:

Taula 8.14 Anàlisi de malat en mostres reals de vi diluïdes en una solució tamponada de Tris-HCl, pH 8.4, mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. S'han utilitzat 21 biosensors MDH (n=6 per Ch. i S., i n=9 per M.Th.). Potencial aplicat = -125 mV vs Ag/AgCl.

Mostra vi	Referència* (mM)	Biosensor MDH (mM)	RSD** (%)	Error relatiu*** (%)
Chardonnay	5.4	5.2	6	4
Sauvignon	2.6	2.9	14	10
Muller Thurgau	6.1	6.2	17	2

* mètode espectrofotomètric;

** desviació estàndard relativa (error de precisió);

*** error en la exactitud $(x_i - \bar{x}) / \bar{x}$

Els millor resultats es varen aconseguir en vi Chardonnay, en el que no sols s'obtingueren valors molt exactes sinó que a més amb bona precisió entre les diferents determinacions.

Si observem la figura 8.15 no s'observen diferències significatives entre els diversos calibrats realitzats en els tres vins. Tan sols destacar la lleugera resposta sigmoïdal presentada en aquells sensors exposats a vi M.Th.

Malgrat que és necessària una dilució, s'observa com a partir d'un dispositiu fabricat completament per tecnologia d'impressió serigràfica, es poden realitzar anàlisis en mostres reals.

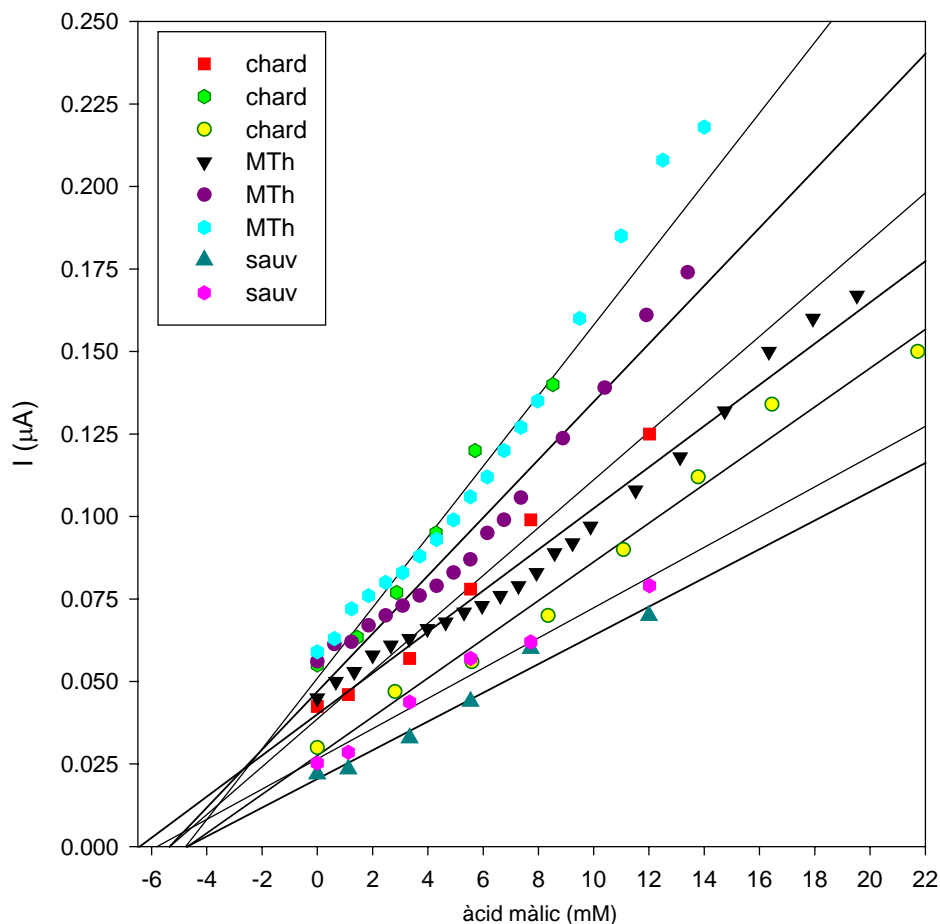


Figura 8.15 Anàlisi de malat en vins Muller Thurgau, Chardonnay i Sauvignon diluïts en una solució tamponada de Tris-HCl, pH 8.4, mitjançant la tècnica de l'addició estàndard. S'han utilitzat biosensors MDH - NAD - trealosa-grafit-MB procedents de lots diferents. Potencial aplicat = -125 mV vs Ag/AgCl.

8.7 REPRODUCTIBILITAT DELS BIOSENSORS DESENVOLUPATS EN MOSTRES REALS

Tot i que les sensibilitats obtingudes pels nostres biosensors no són determinants quan s'utilitza una tècnica com l'addició estàndard, resulta important observar-les per tal de tenir un major coneixement de la repetitivitat (dins del mateix lot de fabricació) o de la reproductibilitat (sensors fabricats en lots i dies diferents) dels dispositius desenvolupats.

A continuació es mostra (taules 8.15 i 8.16) les sensibilitats obtingudes en una sèrie de biosensors (del mateix lot i de lots diferents), així com l'error associat en la concentració d'àcid màlic trobat en la mostra de vi mitjançant l'addició estàndard.

Taula 8.15 Determinació amperomètrica de malat en una mostra de vi Sauvignon tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant biosensors diferents provinents del mateix lot (a), pendent mitjà = $5.4 \pm 0.4 \mu\text{A/M}$, i de lots diferents (b). Potencial aplicat: -125 mV. En el càlcul del percentatge d'error es compararen els resultats obtinguts amb les dades de l'anàlisi espectrofotomètric.

Biosensor (a)	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8
Error anàlisi vi (%)	10	15	8	7	11	10	10	11
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	5.42	5.15	5.50	5.56	5.32	5.40	5.35	5.24
Biosensor (b)	S1	S2	S3	S4	S5	S6		
Error anàlisi vi (%)	9	7	10	10	12	18		
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	5.3	5.9	7.2	8.2	9.3	12.9		

Taula 8.16 Determinació amperomètrica de malat en una mostra de vi Chardonnay tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant biosensors diferents provinents del mateix lot (a), pendent mitjà = $6.4 \pm 0.4 \mu\text{A/M}$, i de lots diferents (b). Potencial aplicat: -125 mV. En el càlcul del percentatge d'error es compararen els resultats obtinguts amb les dades de l'anàlisi espectrofotomètric.

Biosensor ^a	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8
Error anàlisi vi (%)	5	8	7	5	4	7	6	6
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	6.34	6.45	6.50	6.67	6.38	6.48	6.42	6.29
Biosensor ^b	ch1	ch2	ch3	ch4	ch5	ch6		
Error anàlisi vi (%)	3	2	10	4	8	6		
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	6.1	6.6	7.2	8.5	10.7	15.4		

Com era de preveure, i tal com havia succeït en els sensors de LOD i LDH, els biosensors que pertanyen al mateix lot oferiren sensibilitats amb desviacions molt inferiors a aquells dispositius fabricats en diferents dies. Un cop més, el procés no és prou automàtic o acurat per disminuir suficientment l'error, i això provoca que les capes biològiques impreses sobre els transductors no tinguin el mateix gruix o un contingut d'enzim exactament igual en tots ells. Tot i això l'exactitud de l'anàlisi no se'n va veure significativament afectada ja que aquest es situaven per sota del 10% en la majoria de casos.

Cal notar, a més, el fet de la disminució en la reproductibilitat dels sensors (en termes de sensibilitat) quan aquests es calibren en mostres reals. Els sensors han duplicat l'error en la desviació respecte als calibrats estàndard en absència de vi i s'ha passat d'una DSR del 3% (solucions estàndard) al 6% en mostres reals. Com s'ha comentat, el problema s'agreuja quan els sensors pertanyen a lots diferents, fet que no impossibilita un correcte anàlisi de l'analit d'interès. Amb anterioritat ja s'havia observat com tot i que els sensors podien presentar sensibilitats diferents la concentració d'àcid màlic trobada s'acostava molt al valor real (fig 12-15).

8.8 OPTIMITZACIÓ DEL CONTINGUT DE TREALOSA EN SENSORS APLICATS A MOSTRES REALS

Tot i que anteriorment havíem observat que aquells biosensors amb un 5% de trealosa, oferien sensibilitats superiors, es va voler comprovar si aquest efecte estabilitzant que realitzava es modificava en mostres reals. Es varen, doncs, realitzar anàlisis d'àcid màlic en vi emprant dispositius amb 1, 5 i 10% de trealosa. Es volia sobretot comparar la resposta d'aquells biosensors amb un contingut de l'1 i el 5% ja que tot i que els darrers havien ofert millors resultats, els primers, pels valors obtinguts, no es podien descartar en un disseny final.

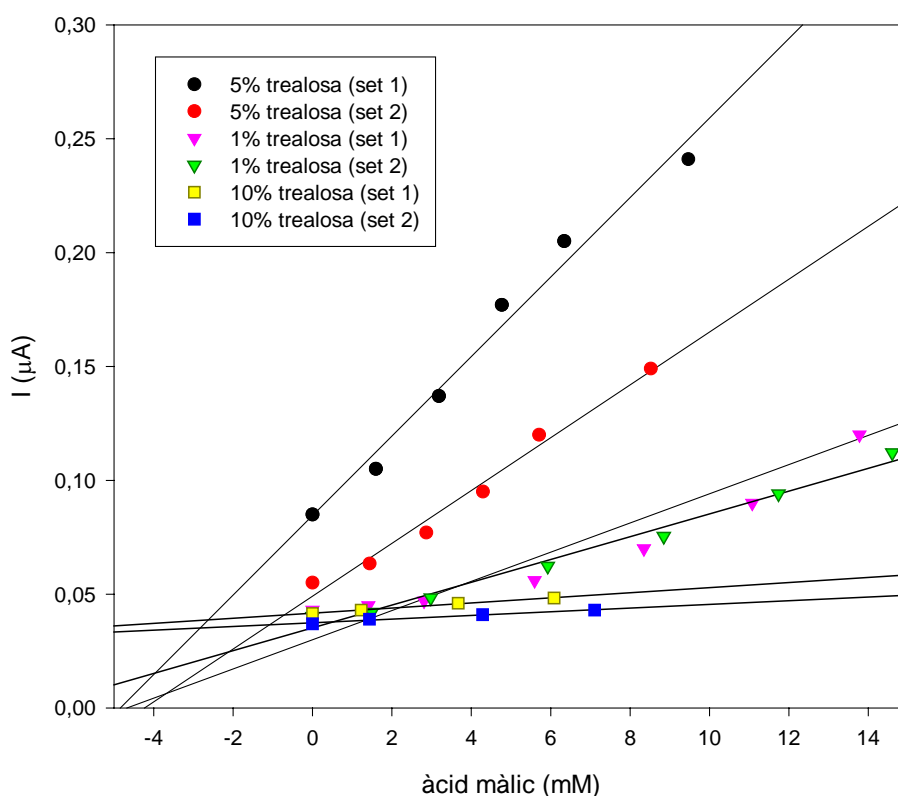


Figura 8.16 Anàlisi de malat en una mostra de vi Chardonnay tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 6 biosensors MDH - NAD – trealosa-grafit-MB diferents i que provenien de dos sets (1 i 2) amb 1, 5 i 10% de trealosa. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.

Taula 8.17 Valors obtinguts de la determinació amperomètrica de malat en una mostra de vi Chardonnay tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant 6 biosensors diferents i de lots diferents amb 5, 1 i 10% de trealosa (5% MB). Potencial aplicat: -125 mV. En el càlcul del percentatge d'error es compararen els resultats obtinguts a través dels biosensors desenvolupats amb les dades obtingudes de l'anàlisi espectrofotomètric.

	Bio 1 (5%)	Bio 2 (5%)	Bio 3 (1%)	Bio 4 (1%)	Bio 5 (10%)	Bio 6 (10%)
Error anàlisi vi (%)	7	9	10	30	.*	.*
Pendent ($\mu\text{A/M}$)	15.7	11.2	6.4	5.0	1.1	0.8
Regressió	.99	.99	.99	.99	.999	.99

*errors superiors al 100%

Veiem com efectivament els sensors que contenen un 5% de trealosa continuen oferint els millors resultats en mostres reals, amb sensibilitats superiors i una major exactitud en les mesures.

8.9 COMPARACIÓ DE LA RESPOSTA DE BIOSENSORS BASATS EN TRANSDUCTORS DE GRAFIT VS BIOSENSORS BASATS EN TRANSDUCTORS DE GRAFIT-MELDOLA BLUE

Degut a que el mediador ja s'havia incorporat en el gel, es varen construir sensors en els que el transductor tan sols contenia grafit. Així doncs, sobre la pista conductora de plata, es va imprimir grafit, en lloc de la tinta conductora de carboni amb 5% de MB.

Es va observar que en absència de MB en el transductor la sensibilitat disminuïa de forma considerable (de l'ordre de 10 vegades) i l'error en la determinació d'àcid màlic en mostres de vi fou al voltant del 50%.

En la gràfica es compara la resposta de 5 biosensors basats en transductors de grafit amb un biosensor de tinta de grafit i MB. En la zona ampliada es pot apreciar en més detall els calibrats dels 5 sensors. S'aprecia clarament la manca de linealitat, i per tant, l'augment de l'error en l'anàlisi de malat mitjançant la tècnica de l'addició estàndard.

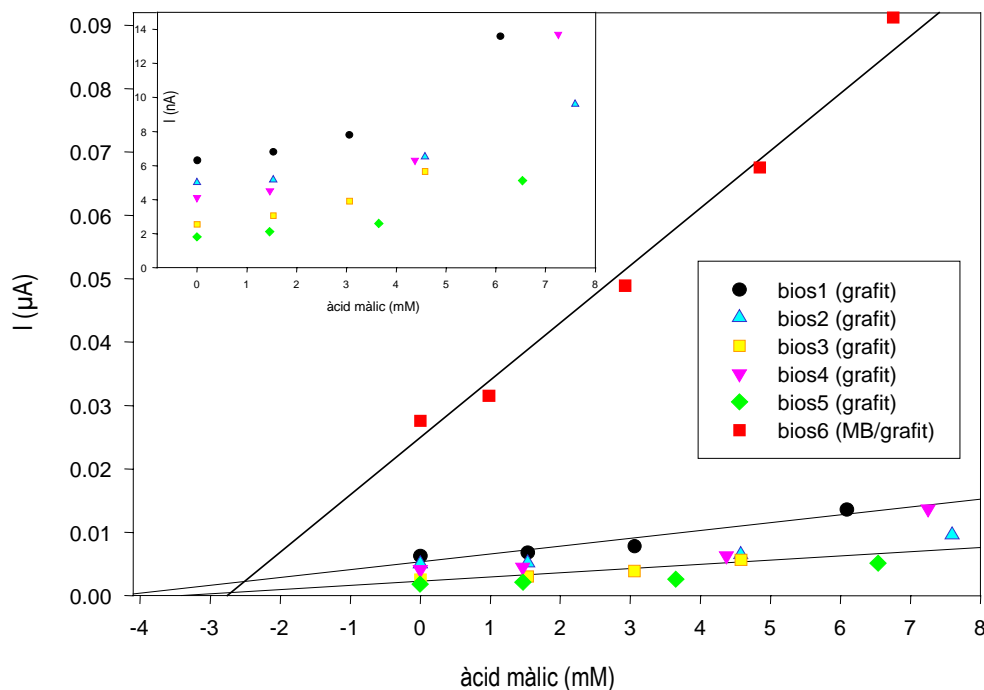


Figura 8.17 Anàlisi amperomètric de malat en una mostra de vi tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant diferents biosensors MDH - NAD - trealosa-grafit-MB (gel) amb un 5% de trealosa i absència de MB en el transductor de grafit (bios 1-5) i de tinta de grafit/MB (bios 6). En tots ells s'hi ha afegit el mediador al gel. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.

Es pot concloure, doncs, que els biosensors que contenen MB, tant en el transductor com en el gel, són els que ofereixen una millor resposta i major precisió en els resultats i que per tant ambdós immobilitzacions són recomanables en el disseny del dispositiu atès que existeix un major i millor contacte entre el transductor el cofactor, l'enzim i el mediador.

8.10 EFECTE DE L'ADDICIÓ DE UNA MEMBRANA D'ACETAT DE CEL·LULOSA (AC) EN LA RESPOSTA DEL BIOSENSOR

Per tal de disminuir l'efecte del vi i, per tant, minimitzar l'error en l'anàlisi de les mostres, es va aplicar al sensor una membrana de d'acetat de cel·lulosa (AC) per tal de proveir al dispositiu una barrera més eficient per a les possibles interferències en la matriu. Aquesta membrana es va aplicar al sensor mitjançant tècniques d'*airbrush*. Aquesta tècnica es basa en l'aplicació d'una capa (en aquest cas d'AC) sobre un dispositiu situat sobre un plat que gira. El material a dipositar és dividit en petites gotes (mitjançant un aspersor) i s'aplica sobre la superfície que es requereixi cobrir. El procés de deposició s'aconsegueix mitjançant aire comprimit, i el material es dispersa sobre el sensor, des de el centre fins els extrems, mitjançant la centrifuga. El gruix de la capa és funció de la viscositat de la solució, velocitat i acceleració angular de la centrifuga i del temps d'exposició. Aquesta tècnica es coneix també com *spray-coating* o atomització.

Es varen provar dues solucions de percentatges 0.2% i 1% d'AC. Els millors resultats s'obtingueren pel primer, pels quals, tot i que la sensibilitat era inferior, la resposta s'ajustava millor a un model lineal. Per ambdues composicions la precisió i l'exactitud en el valor d'àcid màlic detectat era aproximadament la mateixa.

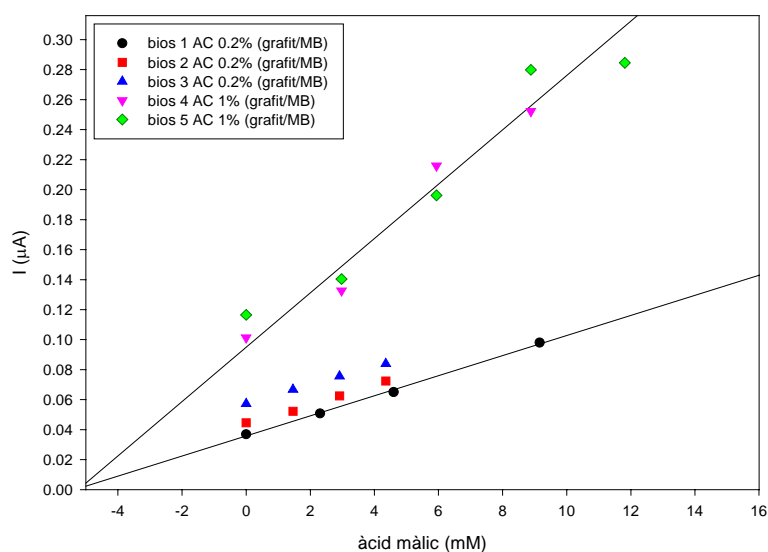


Figura 8.18 Anàlisi amperomètric de malat en una mostra de vi tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant diferents biosensors MDH - NAD – trealosa-grafit-MB amb membrana d'AC, 5% de trealosa i MB en el transductor de grafit i el gel. Potencial aplicat: -125mV vs Ag/AgCl.

Quan es comparen els resultats aconseguits per biosensors amb i sense membrana d'AC s'aprecien les diferències en els anàlisis realitzades mitjançant ambdós dispositius. Es varen produir algunes millores, la resposta no presentava un efecte tan sigmoïdal (si no gens) i els calibrats mostraven sensibilitats més properes entre ells. Malauradament, però, els valors d'àcid màlic obtinguts mitjançant la tècnica de l'addició estàndard varen ser menys acurats que els aconseguits emprant biosensors sense membrana. L'exactitud en l'anàlisi va disminuir entre un 10 i un 15 %.

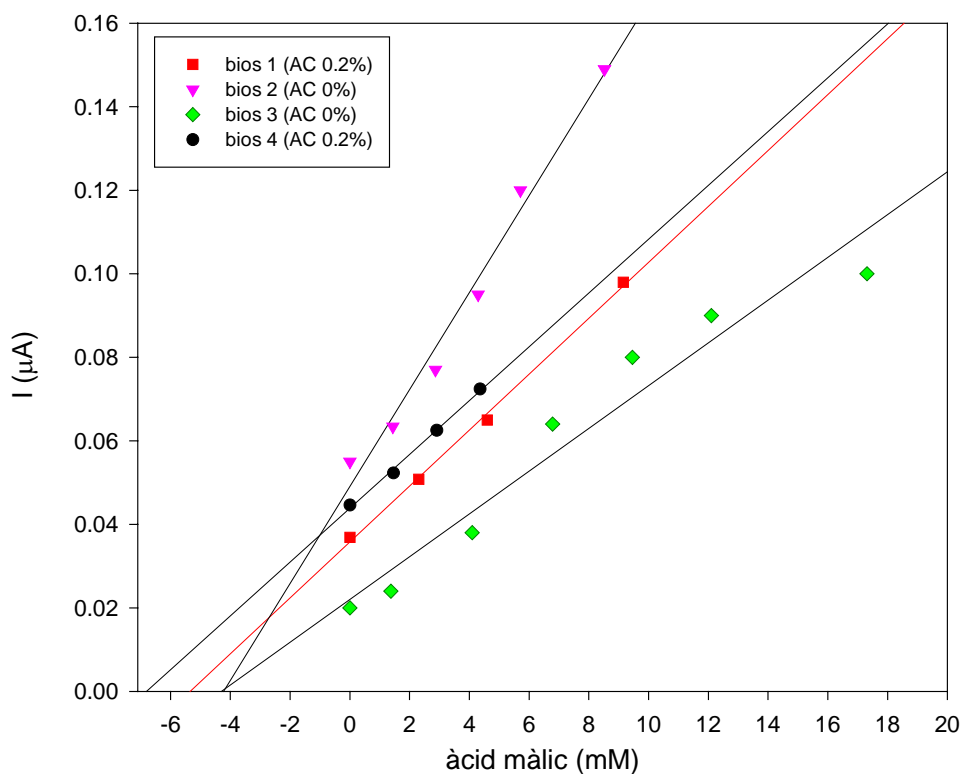


Figura 8.19 Anàlisi amperomètric de malat en una mostra de vi tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant biosensors MDH - NAD - trealosa-grafit-MB amb membrana d'AC 0.2% (bios 1 i 4) i sense membrana (bios 2 i 3). Tots ells contenen 5% de trealosa i MB en el transductor de grafit i el gel. Potencial aplicat: -125mV vs Ag/AgCl.

La membrana d'AC s'afegí també en aquells dispositius basats en transductors de grafit (sense MB) i es compararen les respostes obtingudes. En la gràfica s'aprecia com en aquest cas pràcticament no hi va haver diferència (excepte per una disminució del corrent residual), i que per tant es pot descartar definitivament els transductors basats en tinta de grafit i 0% de mediador.

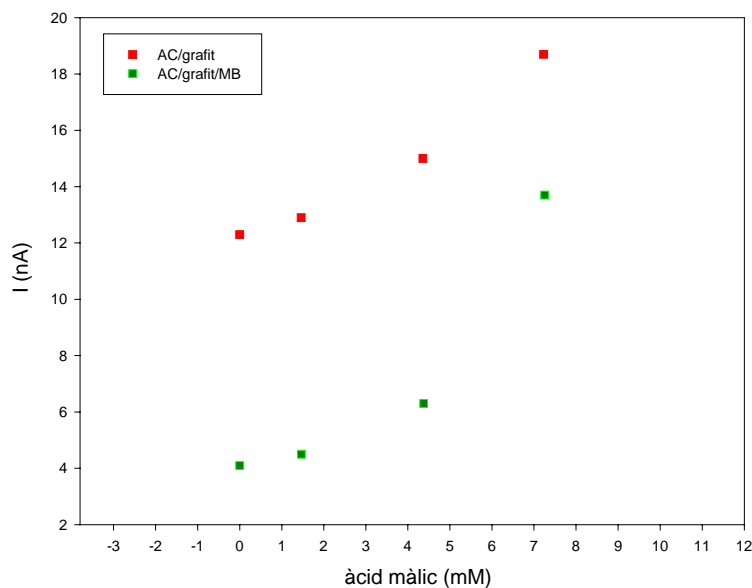


Figura 8.20 Anàlisi amperomètric de malat en una mostra de vi tamponada de Tris-HCl (pH 8.4) emprant biosensors MDH - NAD – trealosa-grafit-MB amb membrana d'AC 0.2%, 5% de trealosa, a) basats en transductors grafít/MB i b) absència de MB en el transductor de grafít. En tots ells s'hi ha afegit el mediador al gel. Potencial aplicat: -125 mV vs Ag/AgCl.

8.11 CONCLUSIONS

1-S'ha comprovat que a partir de biosensors fabricats mitjançant una tecnologia relativament senzilla i econòmica, com és la formació de matrius de sílice i la impressió serigràfica de tintes, es poden realitzar determinacions d'àcid màlic no tan sols en solucions estàndard sinó també en mostres reals.

2- La preparació del bio-gel, així com la seva impressió i la del transductor de C/MB, va seguir bàsicament el camí descrit en capítols anteriors, substituint l'enzim GOD, LOD o LDH per MDH. Com succeïa en els sensors de glucosa anteriorment desenvolupats, es van poder observar clarament estructures cristal·lines en els sensors preparats sense grafít que contenien malat oxidasa. La naturalesa opaca dels sensors que contenen grafít impossibiliten qualsevol evidència visual de la formació del gel.

3- Per a l'obtenció del bio-gel es barrejaren 0.35 ml TEOS, 0.077 ml aigua, 0.077 ml etanol i 0.058 ml HCl 0.1 M (les mateixes proporcions utilitzades en els biosensors de GOD, LOD i LDH). Quan el gel tot just comença a formar-se (aproximadament 45 minuts després), s'afegeixen 90 µl de MDH (10.870 U/ml), 0.098 g de NAD⁺ en 0.15 ml d'una solució tamponada, s'agita durant 10 minuts i tot seguit s'addiciona 0.1 g de trealosa al 5% (per millorar l'estabilitat de la proteïna en la

matriu de sílice), 1.5 g de CMC i 0.025 g de grafit amb 10% de mediador (MB). La pasta resultant s'imprimeix per tècniques de *screen-printing* sobre transductors de grafit/MB, (en els que es basaren també els biosensors LDH). Aquests transductors s'avaluaren mitjançant calibracions de NADH i s'obtingueren respostes lineals de pendent: $3150 \pm 125 \mu\text{A/M}$ (3 % error) amb un límit superior d'interval lineal de 0.3 mM.

4- Tot i que el potencial de treball trobat pel transductor fou de 0.0 mV, el potencial òptim aplicat en les mesures realitzades mitjançant el biosensor va disminuir fins -125 mV. El fet de treballar a potencials inferiors va permetre evitar moltes interferències existents en les mostres reals. En els anàlisis mitjançant la LOD, el potencial aplicat de 350 mV provocava que algunes espècies electroactives presents en la mostra poguessin donar senyal, proporcionant, per tant, un major error en la resposta.

5- A diferència dels transductor grafit-epoxi (capítol 3) el biosensor fabricat a partir de tintes comercials de grafit i Meldola Blue i sol-gel, no necessita una etapa d'activació electroquímica prèvia.

6- La immobilització de la malat deshidrogenasa resulta suficientment forta perquè les pèrdues d'enzim al llarg d'un calibrat siguin mínimes, i prou estable perquè un biosensor es pugui utilitzar després d'un emmagatzematge prolongat (un mínim de dos mesos) a 4°C.

Tot i això no es recomana el seu ús continuat ja que s'observà una disminució de la sensibilitat a mesura que s'anaven realitzant diversos calibrats. Aquesta pèrdua de senyal es va associar a l'adsorció de productes de la reacció sobre la superfície del sensor, fenomen repetidament observat en experiments realitzats per altres investigadors. Això va obligar a netejar l'elèctrode auxiliar amb HCl cada 6 mesures. Aquest fenomen no afectava els elèctrodes de treball ja que recordem que aquests són d'un sol ús; a més es va comprovar que durant el temps en que es realitzava la mesura, el fouling produït a l'elèctrode no era prou important com per evitar una correcta resposta del sensor.

7- L'avaluació dels biosensors de MDH cal portar-la a terme a un pH 8.4, on la línia base i el soroll de fons són menors, la resposta és més estable i la sensibilitat major. A pH neutres (o inferiors) la reacció catalitzada per la MDH condueix a la formació de malat i la formació de NADH no n'és afavorida. Això podria impossibilitar el desenvolupament d'un hipotètic sensor biamperomètric de lactat i malat ja que els sensors de LOD treballen a valors de pH 7.0. La majoria d'investigadors han emprat valor de pH bàsics per desplaçar la reacció i augmentar la formació de NADH, però recentment s'ha comprovat³³ que l'ús d'un mediador que proporcioni

una transferència electrònica eficient i/o un enzim diaforasa¹⁸, pot canviar l'equilibri cap a la formació d'oxaloacetat, permetent la formació de NADH en medi neutre. Així doncs, i paral·lel a les investigacions que s'estan duent a terme per millorar el biosensor de LDH (pH de treball 8.4), es podria intentar incorporar al dispositiu de MDH un segon enzim diaforasa per tal de que ambdós sensors poguessin operar alhora en un mateix medi, aconseguint mesures simultànies de lactat i malat.

Altres investigadors han intentat la determinació simultània dels dos àcids mitjançant sensors basats en transductors *screen-printing*, amb resultat fins ara infructuosos^{30, 34}. Tot i això, sí que s'han aconseguit mesures simultànies d'ambdós analits amb dispositius convencionals³¹.

8- La reproductibilitat i homogeneïtat dels sensors enzimàtics procedents d'una mateixa sèrie presenten valors acceptables en llur sensibilitat (3 % d'error). L'error augmenta espectacularment quan es comparen biosensors procedents de diferents impressions (15%). Els estudis posteriors, per tant, s'haurien d'orientar cap a una major automatització del procés, o si mes no, disminuir les diferències d'impressió ajustant de forma més acurada paràmetres tal com la pressió o la velocitat entre d'altres. No obstant això, aquest error es minimitza quan s'analitzen mostres reals, ja que malgrat les diferències en el pendent, el fet de que la concentració de màlic es determini a partir de la tècnica de l'addició estàndard, permet aconseguir anàlisi d'una gran exactitud en els diferents dispositius.

Aquestes diferències en la sensibilitat van disminuir en afegir una membrana externa d'acetat de cel·lulosa i, a més, la resposta obtinguda fou més lineal. Malauradament, però, els valors d'àcid màlic obtinguts varen ser menys acurats que els aconseguits emprant biosensors sense membrana. L'exactitud en l'anàlisi va disminuir entre un 10 i un 15 %.

9- El límit superior de resposta lineal fou 14 mM (amb un límit de detecció de 0.07 mM). El pendent fou de $14 \pm 0.5 \mu\text{A/M}$ per a sensors MB-5%trealosa -NAD-MDH.

En la bibliografia no s'han reportat investigacions referents a biosensors de malat d'impressió serigràfica amb mediador i cofactor immobilitzats juntament amb l'enzim, fins al moment (fins on sabem, la immobilització dels tres components no només no s'ha produït en sol-gel sinó tampoc en cap altra tipus de matriu). Tot i això, es varen comparar aquestes dades amb dispositius més convencionals. Els resultats s'adiuen amb els aconseguits per altres investigadors mitjançant dispositius semblants (interval lineal 0-10 mM i sensibilitat $20 \mu\text{A/M}$ ³³), aconseguint en alguns casos millores molt sensibles a les publicades (0-1.1 mM¹⁸, 0.25-2.0 mM³⁰, 0.015-1.5 mM^{31,18} d'interval lineal amb sensibilitats 15 vegades inferiors^{30, 35}).

10- Experimentalment es va observar que el temps de resposta dels sensors de MDH (i LDH) era inferior als sensors de LOD i GOD; una possible explicació és el fet de que el peròxid d'hidrogen, producte electroactiu que en resulta de la catàlisi enzimàtica de les oxidases, ha de travessar tot el gel i arribar al transductor per oxidar-se. En l'anàlisi de malat (i lactat en el cas de la LDH) el cofactor i el mediador es troben en el gel i per tant això podria provocar que la transferència electrònica a través del NAD i la MB, continguts en tota la matriu, fos més ràpida que en el cas del lactat o de la glucosa. La resposta, però, en el cas de les hidrogenases, mostrava una lleugera corba sigmoïdal, resposta que en la oxidasa es mantenia molt més lineal, amb coeficients de regressió superiors.

11- La cinètica de la reacció enzimàtica s'ajusta al model descrit per Michaelis-Menten. El valor trobat per la $K_{m,app}$, 8 mM, és superior al valor trobat 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.

12- El potencial de treball escollit per al biosensor optimitzat ha estat de -125 mV, un potencial suficientment baix per evitar que la majoria d'espècies electroactives existents en la mostra de vi poguessin interferir en l'anàlisi.

13- En afegir alíquotes de vi sobre un calibrat de solucions estàndard d'àcid màlic, s'ha observat un lleuger efecte de matriu sobre la resposta del sensor (tal i com succeïa en l'anàlisi de lactat). Aquest fet va provocar la utilització del mètode de l'addició estàndard en realitzar l'anàlisi de malat en vi. Quan es comparen els valors obtinguts en mostres reals utilitzant els nostres sensors amb aquells aconseguits mitjançant mètodes espectrofotomètrics, les diferències varien, en funció del dispositiu emprat i del vi analitzat, entre un 2 i un 20% aproximadament. Els millors resultats s'aconseguien pel vi Chardonnay, on la gran majoria de sensors presentaven diferències inferiors al 10%. Tal i com succeïa en els sensors de LOD, els resultats empitjoren quan es posa en contacte el dispositiu amb la mostra real de forma prolongada.

14- Tot i que els resultats han estat força satisfactoris i han millorat les determinacions realitzades per altres grups d'investigació, les anàlisis realitzades per S. Miertus et al³¹ han estat més exactes. S'ha de tenir en compte però, que a diferència dels anteriors sensors, els desenvolupats en els nostres laboratoris permeten realitzar determinacions de l'analít sense necessitat d'afegir cap reactiu (*reagentless*) i a més, les tècniques utilitzades en la seva construcció són perfectament compatibles amb la fabricació en massa d'elèctrodes, abaratint sensiblement els costos de producció i reduint-ne el temps necessari. Un càlcul aproximatiu del cost del biosensor desenvolupat estaria al voltant dels 30 cèntims d'€ (50 ptes), molt per sota

dels costos d'un anàlisi espectrofotomètric o dels elèctrodes convencionals. A més, per la seva simplicitat, els biosensors resulten molt més pràctics pels usuaris no especialistes, permetent, per exemple, comprovacions ràpides i *in situ* de la fermentació alcohòlica durant la producció del vi.

Fins ara cap grup investigador, a banda del nostre, ha desenvolupat un biosensor *screen-printing* capaç d'analitzar lactat o malat en mostres reals.

En conclusió, s'han desenvolupat sensors que contenen malat deshidrogenasa utilitzant tècniques dissenyades per a la formació i impressió de gels de sílice. S'han realitzat determinacions d'àcid màlic en vins blancs amb resultats prou acurats.

Bibliografia

- ¹ L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G. Johansson. *J. Electroanal.*, 161 (1984) 103
- ² R. Appelqvist, G. Marko-Varge, I. Gorton, A. Torstensson, G. Johansson, *Anal. Chim. Acta*, 169 (1985) 237
- ³ A. L. Underwood, R. W. Burnett. *Electroanalytical Chemistry*, 6 (1973) 13
- ⁴ A. E. G. Cass. *Biosensors. A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, 1989, p. 82-83
- ⁵ E. A. H. Hall. *Biosensors*, Prentice Hall, New Jersey, 1991, p. 126
- ⁶ L. Gorton. *Electroanalysis*, 7 (1995) 23
- ⁷ R. L. McCreery. *Control of Electron Transfer Kinetics at Glassy Carbon Electrodes*, ABI summerschool, Tuebingen, 1996
- ⁸ G. Bremle L. Gorton, B. Persson, G. Jonsson-Pettersson, *Electroanalysis*, 3 (1991) 77
- ⁹ L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G. Johansson, *J. Electroanal.*, 161 (1984) 103
- ¹⁰ J. Moiroux, P. J. Elving. *J. Electroanal. Chem.*, 102 (1979) 93
- ¹¹ M. Lambrechts, W. Sansen, *Biosensors: microelectrochemical devices*, ed. Nova York, 1992
- ¹² J. Wang et al, *Analyst*, 121 (1996) 345

- ¹³ C. A. Galan-Vidal, J. Muñoz, C. Dominguez, S. Alegret, *Sensors Actuators*, B52 (1998) 257
- ¹⁴ B. Appleton, T.D. Gibson, J. R. Woodward, *Sensors Actuators B* 43 (1997) 65
- ¹⁵ S. D. Sprules, J. P. Hart, S. A. Wring, R. Pittson,, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 17
- ¹⁶ A. Avramescu T. Noguera, V. Magearu, J. L. Marty, *Anal. Chim. Acta*, 433 (2001) 81
- ¹⁷ J. L. Marty, comunicació personal
- ¹⁸ J. Katrlík, A. Pizzariello, V. Mastihuba, J. Svorc, M. Stred'anský, S. Miertus, *Anal. Chim Acta*, 379 (1999) 193
- ¹⁹ B. Persson, *J. Electroanal., Chem.*, 287 (1990) 61
- ²⁰ B. Persson, L. Gorton, *J. Electroanal., Chem.*, 292 (1990) 115
- ²¹ P. Monsan, D. Combes, *Ann. NY Acad Sci*, 434 (1983) 48
- ²² G. Larreta, X. Zu Feng, D. Thomas, *NY Acad Sci*, 542 (1984) 294
- ²³ J. H. Crow, L. M. Crowe, F. F. Carpartner, C. A. Wistrom, *Biochemist*, 242 (1987) 1
- ²⁴ J.F. Back, D. Oakenfull, M.B. Smith, *Biochemistry*, 18 (1987) 5191
- ²⁵ T. D. Gibson, J. R. Woodward, *Analyt. Proc.*, 23 (1986) 360
- ²⁶ S. D. Sprules, I.C. Hartley, R. Wedge, J. P. Hart, R. Pittson,, *Anal. Chim. Acta*, 329 (1996) 215
- ²⁷ C. O. Fagain, *Stabilizing protein function*, Springer Verlag, Berlin, 1997
- ²⁸ J. T. Scummacher, I. Munch, T. Richter, I. Rohm, U. Bilitewski, *Jnl Mol Catal B-Enzym*, 7 (1999) 67
- ²⁹ T. D. Gibson, J.R. Woodward, in P. G. Edelman, J. Wang (ed). *Biosensors and Chemical Sensors*, American Chemical Society, Atlanta, 1991, cap. 5
- ³⁰ A. Silber, C. Bräuchle, N. Hampp, *Sensors Actuators, B* 18-19 (1994) 235
- ³¹ S. Miertus, J. Katrlík, A. Pizzariello, M. Stred'anský, J. Svorc, J. Svitel, *Biosens. Bioelectron.*, 13 (1998) 911
- ³² P. Przyborski, *Mitteilungen Klosterneuburg*, 43 (1993) 215

³³ A. Maines, M. I. Prodromidis, S. M. Tzurowara-Karayanni, M. I. Karayannis, D. Ashworth, P. Vadgama, *Anal Chim Acta*, 408 (2000) 217

³⁴ U. Bilitewski, G. C. Chemnitz, P. Rüger, R. D. Schmid, *Sensors Actuators, B7* (1992) 351

³⁵ S. Miertus, *Analytica Chimica Acta*, 379 (1999) 193

Capítol 9

Resum i conclusions generals

Durant el present treball s'ha comprovat que a partir de biosensors fabricats mitjançant una tecnologia relativament senzilla i econòmica, com és la formació de tintes (bio-)electroactives (ja sigui mitjançant matrius de sílice o d'epoxi) i llur impressió serigràfica (tècniques que permeten acoblar-se a processos automatitzats de producció massiva), es poden realitzar determinacions de diversos analits d'interès en l'àmbit alimentari (pesticides, vins) no només en solucions de laboratori sinó també en mostres reals. Els resultats aconseguits suposen una important millora en l'abaratiment dels costos d'anàlisi i la reducció del temps necessari.

Els sensors planars desenvolupats en els nostres laboratoris permeten, en alguns casos, realitzar determinacions de l'analit sense necessitat d'afegir cap reactiu (*reagentless*), possibilitant, per la seva simplicitat, futures comprovacions ràpides i *in situ* pels usuaris no especialistes. Un càlcul aproximatiu del cost dels biosensors desenvolupats estaria al voltant dels 0,30 € (50 ptes).

Fins ara cap grup investigador, a banda del nostre, ha desenvolupat un biosensor serigrafiat capaç d'analitzar lactat o malat en mostres reals.

El treball realitzat s'ha portat a terme en dues parts molt diferenciades; en una primera s'han desenvolupat biosensors *screen-printed* basats en resines epoxi per a l'anàlisi de pesticides i en una segona biosensors *screen-printed* basats en matrius de sílice (sol-gel) per a la determinació d'àcids màlic i làctic en vins. En ambdós casos el procediment ha estat anàleg, amb la fabricació i optimització de les tintes d'impressió i del biosensor resultant i l'aplicació dels dispositius en mostres, primer de laboratori, i finalment reals.

Biosensors planars basats en matrius epoxi per a l'anàlisi de pesticides

Primerament es va desenvolupar un transductor amperomètric mitjançant tecnologia serigràfica de capes gruixudes i fotolitografia. El procés de fabricació fou relativament simple, obtenint d'aquesta forma dispositius econòmics i d'un sol ús.

Aquests elèctrodes varen constar d'una base de fibra de vidre on es gravaren les pistes de coure i sobre les que s'imprimiren, en un extrem, una pasta conductora de grafit i polímer Epo-Tek. Les pistes conductores s'aïllaren de la solució de treball mitjançant un encapsulant fotocurable (Ebecryl 600). La pasta havia de passar per un procés de curat, per tal d'adquirir l'apropiada consistència i no produir-se pèrdues en contacte amb la solució de treball.

Tot i fabricar-se de forma parcialment automàtica, els transductors mostraren una bona reproductibilitat i extens temps de vida (més d'un any, si es guarda en sec).

Un cop optimitzat el transductor s'estudià el desenvolupament d'un biosensor que permetés determinar butiril o acetiltiocolina.

S'utilitzaren tres metodologies diferents per la fabricació de biosensors; **manual**, que consistí en la deposició de l'enzim sobre el transductor planar d'epotek i grafit (adsorció física) i posterior addició manual de glutaraldehyd que immobilitzà l'enzim mitjançant *cross-linking*; 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**, basats en la incorporació del material biològic directament a la pasta d'impressió conductora, esdevenint el procés de fabricació en un sol pas.

Les proves demostraren que amb els mètodes utilitzats no hi havia pèrdues significatives de material biològic i, per tant, la immobilització era prou forta per realitzar, al menys, un calibrat de forma eficient. A més, proporcionava una matriu adequada per a que el material biològic conservés les seves propietats catalítiques durant els primers cinc mesos.

Tot seguit, i mitjançant els biosensors desenvolupats, es dugué a terme la determinació de pesticides organofosforats i carbamats. La detecció es basà en la inhibició del material biològic que conforma el biosensor. Es realitzaren calibrats de butiril o acetiltiocolina en absència de pesticida, i s'obtingué un senyal que provenia de la oxidació del producte originat en la reacció d'hidròlisi catalitzada per la colinesterasa. Posteriorment, en posar en contacte el biosensor amb el pesticida (procés d'incubació), alguns dels setis actius de l'enzim quedaven ocupats, produint-se, per tant, una alteració parcial d'aquest (inhibició). L'efecte produït era el de tenir menys enzim, generant-se una quantitat menor de producte electroactiu, que provocava que en realitzar

un nou calibrat de la butiril o acetiltiocolina, el pendent que s'obtenia era menor. Aquesta pèrdua de sensibilitat es podia associar a la concentració de pesticida present en el medi, i extreure així, una recta de calibrat de pesticides.

S'estudiaren el paraoxon i el carbofuran, i en ambdós casos s'obtingueren rectes de calibrat que relacionaven el percentatge d'inhibició de l'enzim amb el logaritme de la concentració de pesticida emprant biosensors pertanyent a les tres configuracions diferents.

Els millors resultats s'obtingueren per biosensors amb un 32 % de grafit, i 0.112 mg de BChE (8.7 U/mg) immobilitzada amb 4 µl d'una solució de glutaraldehid al 6.25 % sobre la superfície del transductor. Es va assolir un límit inferior i superior de resposta lineal de 2.12×10^{-10} i 2.12×10^{-5} M respectivament pel carbofuran i de 6×10^{-10} i 1.7×10^{-5} M respectivament pel paraoxon, i límits de detecció entre 10 i 100 vegades superiors a les configuracions de capa múltiple i biocompòsit.

Finalment, i emprant biosensors de configuració manual, es varen realitzar anàlisis en mostres reals. Es va comprovar, que el biosensor resultà prou selectiu per detectar l'existència d'inhibidors en presència d'altres espècies interferents, i que, per tant, a partir de dispositius simples i econòmics de fabricació massiva, era possible determinar inhibidors enzimàtics presents en matrius complexes.

Els resultats obtinguts es situaren al voltant d'un 105 % de recuperació en mostres d'aigua de l'aixeta, i del 110 % en mostres de suc de taronja per paraoxon.

Pel carbofuran, la recuperació millorà lleugerament, i es mantingué el percentatge al voltant del 103 % en tot l'interval (aigua de xarxa).

Biosensors planars basats en matrius de sílice per a l'anàlisi de vins

Seguidament al desenvolupament de biosensors serigrafiats basats en resines epoxi, es va iniciar l'estudi de dispositius planars basats en la immobilització del material biològic per tècniques sol-gel. Aquests biosensors s'aplicaren en l'anàlisi de lactat i malat en mostres reals (vi blanc).

El transductor emprat en aquests sensors seguí bàsicament el procés comentat pels transductors epoxi, tot i que la formulació de la tinta es modificà, substituint la pasta epoxi-grafit per un tinta comercial de grafit platinitzat (en el cas de les oxidases) o de grafit i MB (per les deshidrogenases). Aquesta s'imprimí sobre un substrat de PVC. Les pistes conductores, a més, no s'obtingueren per tècniques fotolitogràfiques sinó que s'imprimiren serigràficament mitjançant tintes comercials de plata, obtenint un sensor fabricat completament per tècniques serigràfiques.

Es desenvolupà una pasta d'impressió a partir de precursors sol-gel, enzim (GOD o LOD), CMC i grafit en la que el material biològic restava homogeneïtzat i conservava la seva funcionalitat un cop imprès mitjançant tècniques de screen-printing sobre el transductor.

El bio-gel es va modificar en el cas de les hidrogenases (LDH o MDH), per a una configuració final *sol-gel/LDH (o MDH)/cofactor (NAD)/estabilitzant (trealosa)/CMC/grafit/mediador(MB)* per tal d'incloure el cofactor, necessari en aquest tipus d'enzim (fins on nosaltres sabem, fou el primer cop que es realitza una immobilització de mediador i cofactor en bio-gel o en qualsevol altra pasta d'impressió, conjuntament amb el material biològic).

Els calibrats realitzats mitjançant els biosensors esmentats, oferiren bones respostes amb un ampli interval de treball, a un potencial de treball molt inferior a l'utilitzat emprant altres materials. En la determinació de lactat, l'interval lineal trobat es situà entre 0.05 (± 0.01)- 0.45 (± 0.02) mM i un pendent de $1472 \pm 90 \mu\text{A/M}$. En la determinació de malat, el límit superior de resposta lineal fou 14 mM (amb un límit de detecció de 0.07 mM) i una sensibilitat de $14 \pm 0.5 \mu\text{A/M}$.

Es va comprovar, que les capes enzimàtiques resultaven suficientment estables per resistir immersions prolongades en solucions agitadaes i les pèrdues de material biològic al llarg d'un calibrat eren mínimes. A més, el biosensor era prou estable per a poder ser utilitzat un mínim de 5 mesos després de la seva construcció (conservat a 4°C) conservant pràcticament intactes les seves propietats catalítiques. Tot i això no se'n recomana un ús continuat ja que s'observà una disminució de la sensibilitat a mesura que s'anaven realitzant diversos calibrats. Aquesta pèrdua de senyal es va associar a l'adsorció de productes de la reacció sobre la superfície del sensor, fenomen repetidament observat en experiments realitzats per altres investigadors.

Els biosensors desenvolupats s'aplicaren a mostres reals i els resultats es compararen amb els aconseguits mitjançant mètodes espectrofotomètrics. Les diferències trobades (entre un 3 i un 12% per LOD i un 2 i un 20% per MDH en funció del dispositiu emprat i del vi analitzat) suposaren, tot i el major error associat en l'anàlisi amb biosensors, una important millora en l'abaratiment dels costos d'anàlisi.

Resulta evident que la fita final en el desenvolupament de biosensors és la construcció de dispositius robustos i econòmics que no necessitessin supervisió especialitzada per a llur utilització. La autonomia de la font d'alimentació, el pes molt baix i dimensions reduïdes, possibiliten l'ús del biosensor en mesures de camp. Aquest equip, a més, permet la connexió en sèrie de diversos dispositius per al control simultani de diversos elèctrodes de forma

independent, i fins i tot emprant la mateixa cel·la de treball, permetent una futura construcció de biosensors multiparamètrics (de lactat i malat per exemple).

Els materials emprats compleixen tots els requisits plantejats prèviament; robustesa, sensibilitat, baix cost, minaturització i la possibilitat de construir-se en nombroses configuracions; el seu ús resulta senzill, la resposta és ràpida i atès que resulten estables almenys 5 mesos després de llur construcció els fan viables per a ser implementat en kits i per tant llur utilització en mesures de camp. A més pot aplicar-se a diferents àmbits d'anàlisi analític, tal com agroalimentari, mediambiental o mèdic.

Tot i això, la seva aplicació comercial no resulta immediata. Existeixen encara, malauradament, importants limitacions que dificulten aquest darrer pas. En la determinació de pesticides els biosensors realitzats sota configuració semi-manual superen els resultats dels dispositius fabricats mitjançant tècniques més automatitzades i en la detecció dels àcids del vi, la determinació es du a terme emprant el mètode de l'addició estàndard, fet que dificulta llur implantació en forma de kit.

Cal, doncs, buscar components que protegeixen de forma més efectiva l'enzim de la mostra complexa i alhora no en disminueixin les seves capacitats catalítiques. Alhora aquests components han de ser perfectament compatibles amb les tècniques d'impressió serigràfica ja que el dispositiu final ha de poder-se construir de forma totalment automatitzada.

ANNEXES

Part del treball descrit en la present Memòria ha donat lloc a les següents publicacions:

The strategy of renewing biosensor surface: past, present and future. A review

S. Alegret, E. Fàbregas, F. Céspedes, A. Merkoçi, S. Solé, M. Albareda-Sirvent, M.I. Pividori
Química Analítica, 18 (suplem.1) (1999) 109

Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review

M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret
Sensors and Actuators. B, 69 (2000) 153

Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology

M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret
Analytica Chimica Acta, 442 (2001) 35

Thick-film biosensors for pesticides produced by screen-printing of graphite-epoxy composite and biocomposite pastes

M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret
Sensors and Actuators. B, 79 (2001) 48

Preliminary estimates of lactic and malic acid in wine using electrodes printed from inks containing sol-gel precursors

M. Albareda-Sirvent, A. L. Hart
Sensors and Actuators. B, Chemical, (acceptat)

(Vegeu Annex C).

El treball descrit en aquesta Memòria s'ha pogut dur a terme gràcies als següents estalons institucionals:

Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Madrid.

Projecte *"Desarrollo de biosensores y bioinstrumentación analítica basados en biomateriales compuestos"* (BIO 96-0740) y *bioinstrumentación avanzada. Biosistemas analíticos integrados, biosensores y sensores biomiméticos aplicados a los campos mediomambiental y alimentario* (BIO2000-0681-C02-01)

Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid. Per la concessió d'una beca de Formació de Personal Investigador (FPI, 1997-2000)

Generalitat de Catalunya. Beques per a estades curtes a l'estranger (BE, 2001)

European Science Foundation, Scientific Programme on Artificial Biosensing Interfaces (ABI) per la concessió d'una beca per assistir al Curs de Microsistemes per a bioanalítics a Neuchatel, Suïssa (1998)