

**PART II. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS
AMPEROMÈTRICS MODIFICATS QUÍMICAMENT BASATS EN ENZIMS
OXIDOREDUCTASES**

PART II. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS MODIFICATS QUÍMICAMENT BASATS EN ENZIMS OXIDOREDUCTASES

Des dels orígens dels biosensors enzimàtics amb detecció electroquímica, s'han desenvolupat molts biosensors enzimàtics anomenats de primera generació, basats en la immobilització dels enzims sobre un sistema de transducció adequat, de manera que alguna de les espècies, amb propietats electroquímiques, implicades a la reacció enzimàtica ha permès la determinació directa o indirecta de l'analit d'interès.

Com a un pas endavant, van aparèixer els biosensors de segona generació, que incorporen algun tipus de modificació química adreçada, per exemple, a mediatitzar la detecció d'algun dels compostos que participen a la catàlisi enzimàtica i que, per tant, permeten fer el seguiment de la concentració de l'analit escollit.

Actualment, el que es cerca són biosensors de tercera generació, caracteritzats per buscar la reacció electroquímica directa entre el centre actiu de l'enzim i el transductor. Aquesta opció, però, en la majoria de casos presenta una sèrie de limitacions, entre les que cal destacar la naturalesa i localització del seti actiu de l'enzim, una barrera que requereix de tècniques complexes i especialitzades per a poder ésser modificada.

És per això que apareix, com un camp de gran interès per al desenvolupament de nous biosensors enzimàtics, l'estudi de vies per a realitzar modificacions químiques, que alhora poden ser també emprades per a la immobilització dels enzims amb retenció de la seva activitat. Per tant, l'objectiu és aconseguir biosensors compactes de segona generació que resolguin problemes de passivació, baixa selectivitat relacionada amb la detecció d'espècies interferents, intervals lineals relativament curts, temps de resposta llargs i baixa sensibilitat, entre d'altres.

7 DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS BASATS EN ENZIMS QUE ACTUEN COM A CATALITZADORS DE LA DETERMINACIÓ DE NADH O H₂O₂ MITJANÇANT DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA

7.1 INTRODUCCIÓ

Un cop desenvolupats quimiosensors eficients per a la determinació del cofactor NADH o del producte peròxid d'hidrogen, espècies implicades en les reaccions dels enzims oxidoreductases, com a sistemes bàsics per al desenvolupament de biosensors basats en aquests enzims, encara es pot avançar més enllà en l'optimització de les característiques analítiques d'aquests dispositius. Un pas important que pot representar una aportació essencial en la posterior aplicació dels biosensors que es desenvoluparan, és l'assoliment de sensibilitats més elevades, propietat que pot obtenir-se com a resultat de l'acoblament d'una reacció enzimàtica a la determinació d'aquestes espècies. En realitat, el resultat final és el reciclatge de l'espècie que s'està determinant i això és, en definitiva, el que permetrà obtenir sensibilitats més elevades. La incorporació d'un biocatalitzador al sistema de determinació va adreçada, per tant, a millorar la sensibilitat, atès que implica un augment de la velocitat de la reacció electroquímica. Aquests processos de *bioelectrocatalisi* poden, en alguns casos, dur-se a terme sense la presència de cap mediador redox addicional, si bé habitualment la dificultat de que l'enzim incorporat pugui oxidar-se o reduir-se directament sobre la superfície electròdica fa que la presència d'algun mediador al sistema electroquímic sigui indispensable.

En el cas de l'oxidació del NADH, existeix la possibilitat d'acoblar la reacció de l'enzim *diaforasa*, que per tant actua com a biocatalitzador, a la detecció del cofactor NADH a través d'un mediador redox.^{1,2} La necessitat de mantenir la incorporació d'un mediador redox es fonamenta en el fet que l'enzim diaforasa, com la gran majoria d'enzims, presenta velocitats de transferència electrònica amb la superfície electròdica molt petites, atès que cal suposar que les parts electroactives de l'enzim es troben envoltades per una estructura proteica que representa una barrera estèrica important.³ D'aquesta manera, les molècules de mediador, de grandària molt inferior, són les que fan possible la transferència electrònica entre la superfície electròdica i el centre actiu de l'enzim.⁴

El conjunt d'enzims coneguts amb el nom genèric de diaforasa (Dp), grup que inclou diversos tipus d'enzims capaços d'oxidar el seu substrat β -NADH en presència d'un acceptor d'electrons, fan possible l'avenç d'aquesta reacció a una velocitat d'entre 10² i 10⁴ vegades més gran que qualsevol mediador per si sol,⁵ gràcies a la catàlisi que exerceixen sobre la transferència electrònica d'electrons del cofactor NADH cap al mediador.

Aquest enzim, que es caracteritza per presentar una estabilitat excel·lent,⁶ contribueix amb un procés biocatalític que s'afegeix al procés d'oxidació del NADH en presència de mediador, descrit prèviament.

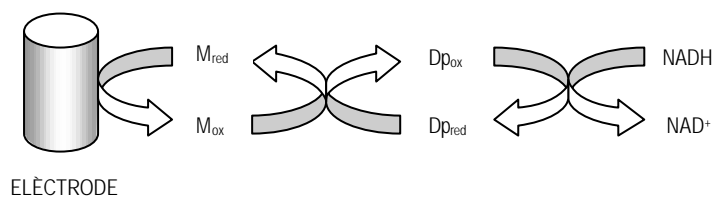


Figura 7.1: Esquema de la reacció mediatitzada d'oxidació del cofactor NADH, biocatalitzada per la presència de l'enzim diaforasa (Dp).

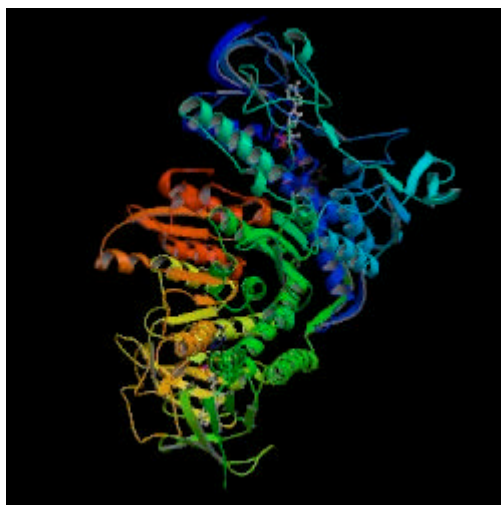


Figura 7.2: Estructura molecular tridimensional de l'enzim diaforasa.

És per tot això que s'ha optat per emprar aquest tipus d'enzims com a elements catalitzadors en els quimiosensors prèviament desenvolupats per a la determinació de NADH, basats en l'electropolimerització de mediadors o l'ús de membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors, amb l'objectiu d'obtenir un increment important de la magnitud dels senyals que ofereixen aquests sensors que ja han demostrat la seva capacitat per a solucionar problemes de passivació de l'elèctrode i de sobrepotencials. Inicialment, s'ha decidit estudiar el comportament de l'enzim diaforasa en solució a fi de comprovar la seva eficiència com a biocatalitzador en l'oxidació mediatitzada de NADH. Posteriorment, en base als resultats obtinguts, s'han proposat diverses alternatives d'incorporació d'aquest enzim als sensors.

L'enzim diaforasa no és l'únic enzim que permet aquest tipus de millora de la sensibilitat quan es treballa amb sistemes basats en l'oxidació de NADH. Així, per exemple un altre enzim que també s'ha emprat àmpliament amb l'objectiu d'amplificar enzimàticament el senyal amperomètric és l'enzim NADH

oxidasa,⁷ que presenta com a avantatge adicional un interval de pH en què és estable més ampli que, per tant, no limitarà tant el tipus d'enzims amb els que es pot co-immobilitzar.

D'altra banda, quan es treballa amb quimiosensors per a la determinació de peròxid d'hidrogen, també és possible la incorporació d'un enzim que actua com a biocatalitzador de la reacció electroquímica en que s'ha de basar el sistema de detecció de peròxid d'hidrogen.^{8,9,10,11,12} Aquest enzim és la *peroxidasa de rave picant* (HRP).^{13,14}

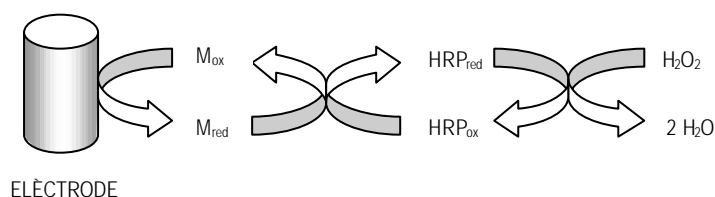


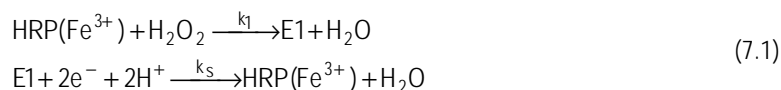
Figura 7.3: Esquema de la reacció mediatitzada de reducció del compost peròxid d'hidrogen, biocatalitzada per la presència de l'enzim peroxidasa de rave picant (HRP).



Figura 7.4: Estructura molecular tridimensional de l'enzim peroxidasa.

Aquest és un enzim que conté un grup hemo i que presenta un mecanisme de reacció força complicat que ha estat àmpliament estudiat.^{15,16,17} Actualment, la reacció del peròxid d'hidrogen en presència de l'enzim HRP es planteja com un procés en què el peròxid d'hidrogen transfereix el seu poder oxidant a l'enzim, reduint-se per donar una molècula d'aigua i provocant l'oxidació de l'enzim que, posteriorment, ja sigui directament sobre la superfície electròdica o mitjançant una transferència d'electrons

mediatitzada, acabarà reduint-se per recuperar el seu estat d'oxidació original. De nou es mostra un sistema que amplifica el senyal com a conseqüència de la presència d'un biocatalitzador al sistema. Cal destacar però, el caràcter singular de l'enzim HRP, atès que presenta un seti actiu relativament exposat, fet que en molts casos ha permès assolir una transferència electrònica directa entre aquest centre actiu i la superfície electròdica, sense necessitat de modificacions.^{18,19,20,21,22} Aquesta reacció té lloc segons el següent mecanisme:



HRP(Fe³⁺) correspon a l'estat d'oxidació inicial de l'enzim HRP quan es troba adsorbit sobre la superfície electròdica, i E1 representa la forma oxidada de l'enzim que resulta de l'oxidació que exerceix el peròxid sobre el grup hemo de l'enzim, procés que implica dos electrons, de manera que l'estat d'oxidació de l'espècie E1 és igual a +5.²³ És per tot això que en cas d'ésser emprat l'enzim HRP com a catalitzador de la reducció de peròxid d'hidrogen, convé tenir present aquest fet.

7.2 EXPERIMENTAL

7.2.1 APARELLS I REACTIUS

7.2.1.1 Aparells

A fi de realitzar mesures de tipus voltamperomètric i amperomètric, s'han utilitzat els aparells descrits a § 2.2.1.1. Els elèctrodes de referència i auxiliar són els descrits igualment a § 2.2.1.1, per a l'estudi dels biosensors per a NADH que incorporen l'enzim diaforasa, i els que s'han detallat a § 6.2.1.1, per a les mesures efectuades amb els biosensors basats en l'enzim HRP. Per últim, l'elèctrode de treball ha estat un compost de grafit-epoxi quan es vol determinar NADH, i un elèctrode de platí (1.6 mm de diàmetre, BAS) quan el que es vol determinar és peròxid d'hidrogen.

L'estudi de l'estructura de les membranes de polisulfona amb enzim diaforasa mitjançant espectroscòpia d'infraroig, s'ha dut a terme amb l'espectròmetre descrit a § 5.2.1.1.

7.2.1.2 Reactius

Per a la preparació dels compòsits de grafit-epoxi s'han utilitzat els mateixos reactius que a § 2.2.1.2.

Els enzims diaforasa (Dp, EC 1.8.1.4.), procedent d'un extracte de cèl·lules de *Clostridium kluyveri*, glucosa oxidasa (GOD, EC 1.1.3.4.), procedent d'*Aspergillus niger*, i peroxidasa del tipus VI-A (HRP, EC 1.11.1.7.), procedent de rave picant, han estat subministrats per la firma comercial Sigma. Per retenir l'enzim en solució sobre la superfície de l'elèctrode s'ha fet ús d'una membrana de diàlisi preparada a partir d'un tub de diàlisi, basat en cel·lulosa regenerada, adquirit a Medicell International (Anglaterra). La N-(2-aminoetil)-piperazina i el triclorur de 1,3,5-tricarbonil benzè s'han adquirit a la firma comercial Aldrich. La glucosa prové de la casa Merck i el Nafió® ha estat subministrat per Fluka. El NADH, el peròxid d'hidrogen, els mediadors, la polisulfona i altres compostos utilitzats, són els mateixos emprats en els capítols precedents.

La resta de reactius usats són de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

7.2.2 **BIOSENSORS BASATS EN L'ENZIM DIAFORASA COM A CATALITZADOR DE L'OXIDACIÓ DE NADH MEDIATITZADA**

7.2.2.1 Estudi de sistemes biosensors amb diaforasa en solució

Com a pas previ per poder avaluar l'efecte que té l'enzim diaforasa en el procés d'oxidació del NADH en presència d'un mediador redox, s'ha optat per treballar amb unes condicions que no alteressin la seva activitat enzimàtica i, per això, s'ha buscat la forma de mantenir-lo en solució. Amb aquest objectiu s'ha preparat una solució d'enzim diaforasa (0.235 U/ μ l) en tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5. A continuació, s'ha dipositat 5 μ l (1.2 U aprox.) d'aquesta solució sobre la superfície de l'elèctrode i s'ha deixat assecat a l'estufa a 40°C fins a l'evaporació total del solvent. Posteriorment, s'ha recobert amb una membrana de diàlisi que reté l'enzim confinat a l'espai que queda entre la superfície de l'elèctrode i la membrana de diàlisi, on es trobarà en solució un cop es submergeixi l'elèctrode a la solució de treball.

Per a cada experiència descrita a continuació s'ha adsorbit enzim nou sobre la superfície del compòsit.

7.2.2.1.1 **Caracterització electroquímica**

S'ha fet ús de la voltamperometria cíclica a fi de poder comparar el comportament electroquímic dels compòsits de grafit-epoxi en el procés mediatitzat de l'oxidació de NADH en presència i en absència de l'enzim diaforasa. Al mateix temps, els voltamperogrames obtinguts han proporcionat la informació necessària sobre els potencials de treball per a cadascun dels mediadors en presència d'enzim. Els

elèctrodes emprats han estat un compost de grafit-epoxi com a elèctrode de treball, un elèctrode de platí com a auxiliar i un de Ag/AgCl com a referència. Amb fins comparatius, l'elèctrode de treball s'ha recobert amb una membrana de diàlisi, inclosos els casos en què no s'ha adsorbit enzim a la seva superfície.

Inicialment, a fi de comprovar si l'enzim posseeix propietats redox, s'omple la cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5 i s'enregistra el voltamperograma cíclic obtingut quan es duu a terme un cicle de potencial entre 0.8 i -0.5 V amb un compost de grafit-epoxi, emprat com a elèctrode de treball, amb l'enzim diaforasa adsorbit a la seva superfície. Posteriorment, s'han preparat solucions 0.2 mM de cada un dels mediadors estudiats, ferricianur, MB, p-BQ, DCPIP, o-PDA i 3,4-DHB (vegeu § 4.1) amb la mateixa solució amortidora, i per a cadascuna d'elles s'ha dut a terme el següent estudi. Primer s'han enregistrat els voltamperogrames cíclics d'una solució de mediador 0.2 mM en absència i presència de NADH (2.6 nM) quan s'empra un compost de grafit-epoxi, sense enzim adsorbit. A continuació s'ha canviat l'elèctrode de treball per un compost amb enzim diaforasa adsorbit a la seva superfície i s'han enregistrat de nou els voltamperogrames corresponents a una solució de mediador en presència o no de NADH.

7.2.2.1.2 *Avaluació de la resposta a NADH*

Per comprovar l'eficiència de l'acoblament enzimàtic de la diaforasa amb un mediador vers l'ús d'un mediador sol, s'ha escollit el MB i s'han fet mesures de l'oxidació de NADH mitjançant un sistema amperomètric discret en què l'elèctrode de treball és, en primer lloc, un compost de grafit-epoxi amb l'enzim adsorbit (1.2 U) i, després, un altre sense enzim. Per això, s'han fet addicions de microvolums d'una solució de NADH 0.01 M a 10 ml d'una solució de MB 0.2 mM. El potencial de treball aplicat ha estat de -0.08 V. La comparació del pendent de les corbes de calibració així obtingudes ha estat un bon indicador de l'efecte de la Dp com a biocatalitzador de la reacció.

A fi de veure l'efecte de la quantitat d'enzim dipositada sobre la superfície de l'elèctrode, s'han emprat 4 elèctrodes de treball amb diferents quantitats de diaforasa sobre la seva superfície (0.0 U, 0.7 U, 1.3 U i 2.0 U) i s'ha mesurat la intensitat de corrent després d'haver addicionat diferents microvolums de NADH a 10 ml d'una solució de MB 0.2 mM, emprada com a solució de treball, fins a obtenir una concentració de NADH a la cel·la de 0.5 mM.

Un cop optimitzada la quantitat d'enzim que cal dipositar sobre la superfície de l'elèctrode, s'han repetit les corbes de calibració en presència (1.3 U) i en absència d'enzim per a un segon mediador, el DCPIP, obtingudes ambdues per addicions successives de petits volums de NADH 1.6 mM a 10 ml d'una solució de DCPIP 0.2 mM. En aquest cas el potencial de treball ha estat 0.115 V.

7.2.2.2 Estudi de biocompòsits amb diaforasa

Atesa la versatilitat que presenten els compòsits de grafit-epoxi²⁴ per acceptar biomolècules al seu interior per donar lloc al que es coneix com a biocompòsits,²⁵ s'ha decidit preparar biocompòsits de diaforasa amb l'objectiu d'estudiar el comportament d'aquest enzim quan es troba retingut en una matriu polimèrica.

7.2.2.2.1 Preparació dels biocompòsits amb diaforasa

Per a la preparació d'aquests compòsits cal afegir a la metodologia descrita a § 2.2.3.1, un pas previ que consisteix en barrejar homogèniament amb el grafit en pols el percentatge en pes necessari de diaforasa, a un volum de 400 µl d'hexà, que s'ha deixat evaporar posteriorment fins a la totalitat abans de continuar amb la mescla de la resina epòxica. Els percentatges d'enzim avaluats han estat: 2, 3 i 4 %. S'ha preparat també un compòsit sense enzim amb el mateix tractament amb hexà, amb l'objectiu de poder fer comparacions de resultats.

7.2.2.2.2 Avaluació de la resposta a NADH

Malgrat que a la bibliografia queda palesa la necessitat d'incorporar un acceptor d'electrons (mediador redox) al sistema de detecció per a què pugui funcionar correctament l'enzim diaforasa, s'ha volgut fer un estudi sobre quina és la resposta obtinguda en absència d'una espècie encarregada de fer més eficaç la transferència electrònica entre la superfície de l'elèctrode i, en aquest cas, l'enzim. S'ha aplicat un potencial de 0.115 V a una cel·la electroquímica que conté 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3 i s'han fet addicions de microvolums d'una solució 1.6 mM de NADH.

Després s'ha repetit la mateixa experiència però enlloc d'omplir la cel·la electroquímica amb 10 ml de tampó fosfat, s'ha omplert amb 10 ml d'una solució de DCPIP 0.2 mM, preparada amb la mateixa solució amortidora, a fi d'avaluar la resposta en presència de mediador dels biocompòsits amb 2, 3 i 4 % de diaforasa i del compòsit preparat sense enzim.

7.2.2.3 Estudi de biocompòsits amb diaforasa i mediador

Si bé ja s'ha comentat en el capítol precedent la impossibilitat de treballar amb compòsits que contenen mediador al seu interior ateses les pèrdues per solubilitat que presenten, s'ha volgut avaluar l'efectivitat del contacte entre l'enzim i el mediador quan ambdós es troben retinguts dins del compòsit. Això s'ha fet amb la idea de, posteriorment, dur a terme estudis dirigits a recobrir la superfície dels compòsits per evitar les pèrdues de mediador, sempre que el guany en sensibilitat compensi la disminució que suposa recobrir l'elèctrode amb algun tipus de membrana.

7.2.2.3.1 Preparació dels biocompòsits amb diaforasa i mediador

En aquest cas, s'afegeix per a cada biocompòsit un 3 % en pes de Dp i un 3 % en pes de mediador al grafit en pols. La mescla resultant es barreja homogèniament amb un petit volum d'hexà que posteriorment s'ha de deixar evaporar abans d'afegir la resina epòxica. D'aquesta forma es preparen diferents biocompòsits amb diaforasa i amb els mediadors MB, p-BQ, DCPIP, o-PDA i 3,4-DHB.

7.2.2.3.2 Caracterització electroquímica

S'omple la cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3 i es realitzen voltamperogrames cíclics per a cadascun dels biocompòsits preparats, a fi de determinar els potencials d'oxidació òptims.

7.2.2.3.3 Avaluació de la resposta a NADH

S'han escollit dos dels biocompòsits preparats per representar corbes de calibració successives per a cada un, amb l'objectiu de conèixer, per una banda, quin tipus de resposta ofereixen a les addicions successives de petits volums de NADH 1.6 mM i, per altra banda, quin comportament ofereixen vers les pèrdues de mediador. Els dos biocompòsits estudiats han estat els que contenen p-BQ i DCPIP. Ambdós elèctrodes s'han submergit inicialment a una cel·la amb 10 ml de tampó i se'ls hi ha aplicat un potencial de treball de 0.375 V i de 0.300 V, respectivament.

7.2.2.4 Estudi de biocompòsits amb diaforasa modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen MB

Un cop estudiat el comportament dels biocompòsits de diaforasa, s'ha decidit recobrir-los amb membranes de polisulfona que, alhora que incorporen els mediadors necessaris per a què tingui lloc la transferència d'electrons entre el cofactor NADH i la superfície electròdica, poden actuar com a barreres protectores per a les possibles pèrdues d'enzim des del si de la matriu del compòsit de grafit-epoxi cap a la solució.

7.2.2.4.1 Preparació dels biocompòsits modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen MB

Els biocompòsits al 2 i al 3 % de Dp preparats prèviament, s'han recobert amb una membrana de polisulfona amb MB segons el procediment descrit a § 5.2.3.1.

7.2.2.4.2 *Avaluació de la resposta a NADH*

S'han efectuat calibracions consecutives per a cadascun dels dos biocompòsits modificats, obtingudes de la mesura de les respostes amperomètriques a addicions successives de microvolums de NADH 1.6 mM a 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3.

7.2.2.5 *Estudi de compòsits modificats amb mediador electropolimeritzat en presència de diaforasa*

La possibilitat de retenir material enzimàtic a l'interior de la capa polimèrica formada durant el procés d'electropolimerització del mediador,^{26,27} representa una simplificació important del sistema de detecció que mereix ésser estudiada amb deteniment, per bé que des d'un inici ja es planteja com un punt complicat a resoldre. Ara bé, l'assoliment d'una metodologia vàlida que permeti formar membranes polimèriques de mediador amb l'enzim a l'interior compensaria tots els esforços invertits en aquest objectiu.²⁸

7.2.2.5.1 *Electropolimerització del mediador en presència de diaforasa*

Atès que l'atrapament de l'enzim a l'interior del polímer de mediador que es forma durant el procés d'electropolimerització requereix la presència de l'enzim a la cel·la electroquímica, cal pensar en el disseny d'una microcel·la a fi de minimitzar la quantitat d'enzim necessària i, per tant, reduir el cost d'aquest procediment. La cel·la que s'ha emprat, adreçada a assolir el mínim consum possible d'enzim, es basa en el disseny proposat per *A. Merkoçi et al.*,²⁹ vàlid per a volums d'entre 100 i 200 μl de solució (vegeu Figura 7.5). La xeringa s'omple amb una solució tampó igual a l'emprada per preparar la solució de treball.

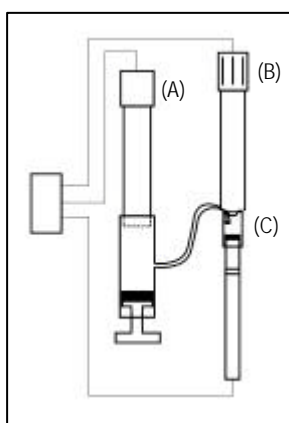


Figura 7.5: Esquema del sistema amperomètric emprat per dur a terme processos de microelectropolimerització. El sistema elèctric consta d'un elèctrode de referència de Ag/AgCl (A), un elèctrode auxiliar de platí (B) i un compòsit de grafit-epoxi convencional com a elèctrode de treball (C).

Amb l'objectiu de fer un assaig previ de les tècniques d'atrapament per electropolimerització, inicialment, s'ha treballat amb un enzim àmpliament utilitzat, la glucosa oxidasa (GOD), de la qual es coneix amb més detall el seu comportament en ésser retinguda a l'interior d'un polímer. A la bibliografia es descriu l'atrapament de l'enzim GOD durant l'electropolimerització de l'o-PDA sobre un elèctrode de platí.^{30,31} Es provarà de repetir aquest procediment sobre la superfície d'un compost de grafit-epoxi. Es preparen 200 µl d'una solució d'o-PDA 5 mM en tampó acetat 0.1 M a pH 5.2, que conté aproximadament 90 U de l'enzim GOD i s'efectua l'electropolimerització mitjançant l'aplicació d'un potencial de 0.65 V durant 15 minuts.

A continuació s'ha intentat reproduir aquesta experiència però amb l'electropolimerització de 3,4-DHB 1 mM i diferents quantitats de diaforasa. En aquest cas s'ha emprat com a solució de treball una solució amortidora de fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3.

Atès que s'està treballant amb un volum de cel·la molt petit, com a una alternativa per assolir un bon contacte entre l'enzim i el mediador immobilitzats, s'ha optat per adsorbir primer l'enzim i electropolimeritzar a sobre el mediador, suposant que la dissolució de l'enzim al volum de la cel·la és mínima. S'han adsorbit 1.30 U de Dp sobre la superfície del compost i, posteriorment, s'ha submergit l'elèctrode en 100 µl d'una solució de 3,4-DHB 1 mM. L'electropolimerització s'ha dut a terme mitjançant l'aplicació d'un potencial de 0.3 V durant 12 minuts.

Finalment, una darrera estratègia adreçada a mantenir l'enzim retingut per un polímer de mediador, ha consistit en electropolimeritzar 3,4-DHB en les mateixes condicions que s'acaba de veure, però sobre un biocompost amb un 3 % de Dp.

7.2.2.5.2 *Avaluació de la resposta amperomètrica*

L'elèctrode preparat amb l'enzim GOD atrapat a la capa polimèrica formada pel mediador o-PDA s'avalua mitjançant addicions de glucosa 0.1 M a 10 ml de tampó acetat, amb l'aplicació d'un potencial d'oxidació de 0.7 V.

Per a la resta de composts preparats amb diaforasa i 3,4-DHB electropolimeritzat es realitzen corbes de calibració obtingudes com a resultat d'addicions de microvolums de NADH 1.6 mM a 10 ml de tampó fosfat, mentre s'aplica a la cel·la electroquímica un potencial de 0.3 V.

7.2.2.6 *Estudi d'elèctrodes modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa*

Ateses les característiques òptimes assolides en relació a la retenció dels mediadors, quan es treballa amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona, s'ha optat per avaluar el comportament analític d'elèctrodes modificats amb aquest tipus de membranes que, a més d'incorporar els mediadors, inclouen l'enzim diaforasa.

7.2.2.6.1 Preparació dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa

La preparació de les membranes s'ha dut a terme segons el procediment descrit a § 5.2.4.1, però ara amb la incorporació de l'enzim diaforasa, que s'ha realitzat seguint dues estratègies diferents. El primer procediment ha consistit en la incorporació de l'enzim sòlid a la solució inicial de polisulfona amb mediador, en una quantitat igual a 11 unitats/150 μl de polisulfona, prèviament a la precipitació de la membrana. La segona estratègia s'ha basat en aprofitar el procés d'inversió de fases per a submergir la solució de polisulfona amb mediador, dipositada sobre la superfície electròdica, a una solució aquosa d'enzim diaforasa, de concentració igual a 0.0557 unitats/ μl , que és la que provocarà la precipitació de la polisulfona amb el consegüent atrapament de l'enzim a l'interior del polímer.

7.2.2.6.2 Avaluació de la resposta a NADH

Un cop estabilitzada la intensitat de corrent quan s'està aplicant un potencial igual a -0.100 V , es comencen a fer addicions successives de petits volums d'una solució de NADH 1.6 mM, amb l'objectiu de poder representar les corbes de calibració associades a cadascun dels biosensors preparats. Per poder estudiar com evoluciona la resposta d'aquests biosensors, es repeteixen tres corbes de calibració consecutives per a cadascun d'ells.

7.2.2.6.3 Recobriment protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa

Els biosensors que incorporen l'enzim diaforasa a la seva configuració s'han protegit amb dos tipus de capes diferents, adreçades a evitar les pèrdues de l'enzim per dissolució. La primera capa avaluada ha estat una membrana de Nafíó, que s'ha obtingut per deposició i posterior evaporació de 5 μl d'una solució de Nafíó preparada per dilució de Nafíó comercial en una relació 4:1 d'aigua:Nafíó.³² L'altre recobriment que s'ha estudiat és una capa densa de poliamida.^{33,34,35} La poliamida es prepara per un procés de polimerització interfacial, basat en una primera immersió de la superfície que es vol recobrir en una solució de N-(2-aminoetil)-piperazina 2.8 mM i la posterior reacció amb una gota de triclorur de 1,3,5-tricarbonil benzè 5.1 mM preparat en hexà, que és el responsable d'iniciar la reacció de polimerització que de seguida s'atura com a conseqüència de que el mateix clorur d'àcid troba dificultada la seva difusió a través de la capa de polímer que s'ha format. A continuació, és necessari rentar l'elèctrode amb aigua bidestil·lada en abundància, per a eliminar tots els reactius en excés que no han reaccionat. Aquesta metodologia de deposició de membranes permet l'obtenció de capes molt primes de poliamida, fet que representa un aspecte molt important alhora d'assegurar una bona difusió de l'analit.

7.2.2.6.4 *Avaluació de la resposta a NADH*

De la mateixa manera que s'ha descrit a § 7.2.2.6.2, s'estudia el comportament de les corbes de calibració successives obtingudes amb els elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors i diaforasa, que ara s'han cobert amb diferents capes protectores.

7.2.2.6.5 *Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig*

S'ha enregistrat l'espectre d'infraroig d'una membrana de grafit-polisulfona amb MB i enzim diaforasa incorporat sòlid al compòsit abans de que precipiti. Aquesta membrana s'ha assecat en un ambient sec durant tot un dia.

7.2.3 *BIOSENSORS BASATS EN L'ENZIM HRP COM A CATALITZADOR DE LA REDUCCIÓ DE PERÒXID D'HIDROGEN MEDIATITZADA*

7.2.3.1 *Estudi d'elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen HRP*

Un cop comprovada l'eficiència dels elèctrodes de platí recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls per a la determinació de peròxid d'hidrogen com es va estudiar al capítol anterior, i amb la intenció d'obtenir sensibilitats més elevades, s'ha aprofitat l'efecte bioelectrocatalític que suposa la incorporació de l'enzim HRP al disseny d'aquests sensors.³⁶

7.2.3.1.1 *Preparació dels elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen HRP*

El disseny d'aquest tipus de biosensors consta de dues membranes que es dipositen successivament una sobre de l'altra. En primer lloc, sobre la superfície electròdica d'un elèctrode de platí, es diposita una al·lquota de 10 µl d'un dels compòsits amb xerogel modificat amb algun metall, sintetitzat segons el procediment descrit a § 6.2.3.1. A continuació, un cop s'ha deixat el temps suficient per a què s'assequi, es fa una segona deposició, però en aquest cas d'un gel de sílice preparat segons la ruta sintètica detallada a § 6.2.2.1, però amb la diferència de què no incorpora metalls sinó enzim HRP i de què s'ha preparat amb TEOS com a únic precursor de silici i amb etanol com a dissolvent.³⁷ Un cop preparat l'hidrogel, s'ha escalfat per a eliminar l'etanol i així evitar que aquest pugui ésser contraproduent en l'estabilitat de l'enzim. Per últim, es dipositen de nou 10 µl d'aquest gel, que contenen 100 unitats de l'enzim HRP, sobre la primera membrana de xerogel que s'ha format, i es deixa que s'evapori el dissolvent en un ambient sec.

7.2.3.1.2 *Avaluació de la resposta a peròxid d'hidrogen*

S'han avaluat les característiques analítiques dels biosensors desenvolupats per a la determinació de peròxid d'hidrogen. A una cel·la electroquímica que contenia 15 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.9 en agitació contínua, s'ha aplicat un potencial de -0.2 V, fins que s'ha estabilitzat la mesura d'intensitat, moment en què s'ha començat a fer addicions de microvolums de solucions de peròxid d'hidrogen de diferent concentració (4 o 78 mM) i així poder mesurar la resposta amperomètrica com a canvis de la intensitat de corrent.

7.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

7.3.1 *BIOSENSORS BASATS EN L'ENZIM DIAFORASA COM A CATALITZADOR DE L'OXIDACIÓ DE NADH MEDIATITZADA*

7.3.1.1 *Estudi de sistemes biosensors amb diaforasa en solució*

7.3.1.1.1 *Caracterització electroquímica*

A la Figura 7.6, on es mostra el voltamperograma cíclic obtingut quan s'empra com a elèctrode de treball un compost amb l'enzim Dp retint sobre la seva superfície mitjançant una membrana de diàlisi, s'observa el comportament electroquímic quasi reversible d'aquest enzim, que presenta un pic d'oxidació a -0.12 V i un pic de reducció a -0.2 V.

Els voltamperogrames representats a la Figura 7.7, que corresponen als mediadors MB i 3,4-DHB en absència i en presència d'enzim, mostren com la presència d'enzim provoca un augment del senyal obtingut. Aquest fet sembla confirmar l'actuació de l'enzim Dp com a catalitzador de la reacció entre el NADH i el mediador quan s'empren aquests mediadors redox en solució. Aquest comportament no s'observa de forma tan evident als voltamperogrames obtinguts per a la resta de mediadors estudiats.

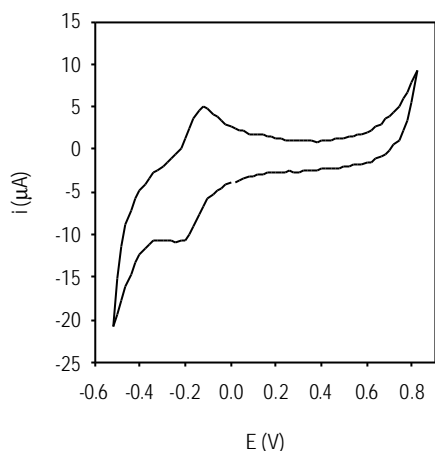


Figura 7.6: Voltamperograma cíclic d'una solució de fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5 quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi amb enzim Dp (aproximadament 1.2 U) retingut sobre la seva superfície mitjançant l'ús d'una membrana de diàlisi. El cicle de potencial s'ha iniciat cap a potencials negatius.

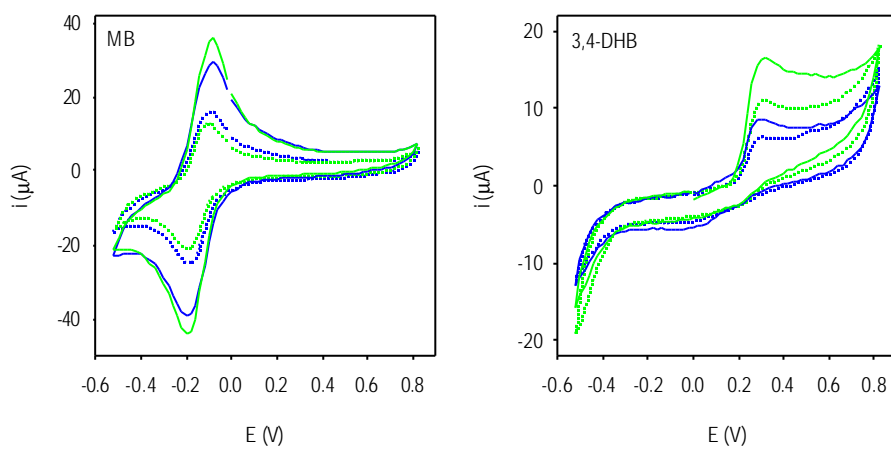


Figura 7.7: Voltamperogrames cíclics d'una solució de mediador 0.2 mM (línies de punts) i d'una mateixa solució després d'afegir NADH fins assolir una concentració igual a 2.6 nM (línies contínues). Com a elèctrode de treball s'ha emprat inicialment un compost de grafit-epoxi (línies blaves) i posteriorment el mateix compost però amb enzim Dp (aproximadament 1.2 U) retingut sobre la seva superfície (línies verdes). En ambdós casos la superfície de l'elèctrode s'ha recobert amb una membrana de diàlisi.

7.3.1.1.2 Avaluació de la resposta a NADH

Si bé els pendents de les corbes de calibració que apareixen a la Figura 7.8 no presenten una bona sensibilitat, això s'explica en base a què les experiències s'han dut a terme amb una membrana de diàlisi sobre la superfície de l'elèctrode a fi d'evitar possibles pèrdues d'enzim, la qual cosa limita notablement la difusió de les espècies electroactives. La comparació de les dues rectes aporta informació de gran utilitat, atès que confirma l'actuació de l'enzim Dp com a biocatalitzador de la reacció d'oxidació de NADH, és a dir, accelera la velocitat a la qual té lloc aquesta reacció quan intervé el DCPIP com a acceptor d'electrons. S'ha observat el mateix comportament quan es treballa amb MB en solució.

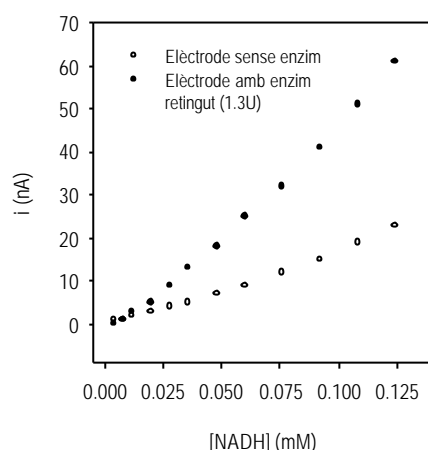


Figura 7.8: Corbes de calibració obtingudes com a resultat d'addicionar microvolums d'una solució 1.6 mM de NADH a 10 ml d'una solució de DCPIP 0.2 mM. En ambdós casos l'elèctrode de treball s'ha recobert amb una membrana de diàlisi. El potencial de treball ha estat de 0.115 V.

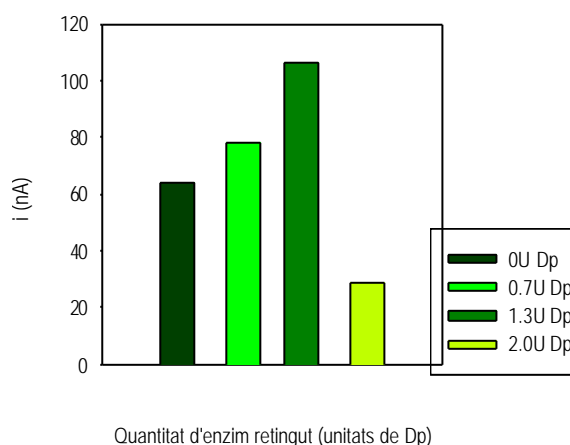


Figura 7.9: Representació de la intensitat mesurada en una solució de MB 0.2 mM quan s'ha addionat NADH fins assolir una concentració 0.5 mM. Cada barra correspon a un elèctrode de treball diferent, essent un compost de grafit-epoxi amb diferents quantitats d'enzim Dp retingut sobre la seva superfície mitjançant l'ús d'una membrana de diàlisi. El potencial de treball aplicat ha estat de -0.04 V.

En base als resultats mostrats al gràfic de barres de la Figura 7.9, hom pot observar com afecta la quantitat d'enzim que es diposita sobre la superfície de l'elèctrode als valors d'intensitat de corrent mesurats. Una quantitat d'enzim d'aproximadament 1.3 U sembla ésser l'òptima, car es pot veure com quantitats inferiors (0.7 U) no són suficients per catalitzar tot el substrat que arriba, mentre que per a quantitats més grans es detecta una disminució del senyal que possiblement és atribuïble a un cobriment excessiu de les partícules de grafit que resten exposades a la superfície dels compòsits, amb la consegüent disminució de la superfície activa de l'elèctrode. Aquesta hipòtesi sembla ésser raonable, atès que en el procés de preparació del sensor es deixa evaporar el solvent de la solució dipositada sobre la superfície de l'elèctrode on es troba dissolt l'enzim, de manera que és possible que una part de les impureses que acompanyen l'enzim quedin adsorbides sobre l'elèctrode, disminuint la seva superfície activa.

7.3.1.2 Estudi de biocompòsits amb diaforasa

7.3.1.2.1 Preparació dels biocompòsits amb diaforasa

La inspecció visual de la superfície dels 3 biocompòsits preparats amb diaforasa, abans de l'obtenció de la primera corba de calibració, presenta un aspecte normal i, per tant, podem suposar que ha curat adequadament. Ara bé, caldrà comprovar mitjançant l'obtenció de calibratges successius si hi ha pèrdues d'enzim o alteracions de la superfície.

7.3.1.2.2 Avaluació de la resposta a NADH

La Figura 7.10(A) confirma el fet que el NADH actua de substrat de la diaforasa i, per tant, les addicions successives de NADH provoquen una resposta per part de l'enzim. Tot i que, tal com s'observa, queda palesa la necessitat d'incorporar un mediador redox, com a acceptor d'electrons, a fi d'afavorir la reacció de transferència electrònica, fet que es confirma amb les corbes de calibració representades a la Figura 7.10(B), on l'acoblament de la reacció enzimàtica de la Dp amb l'oxidació de NADH a través del mediador DCPIP augmenta significativament el senyal obtingut. Això concorda amb el fet que les reaccions descrites per a l'enzim diaforasa habitualment impliquen l'ús de mediadors redox.

El fet que en absència de mediador s'obtingui també resposta a NADH sembla indicar que, un cop el NADH ha reduït la diaforasa, aquest enzim pot ésser regenerat directament sobre la superfície de l'elèctrode amb l'aplicació d'un potencial. Aquesta hipòtesi es veu recolzada pels resultats de la Figura 7.6, on es mostren els pics d'oxidació i reducció de l'enzim diaforasa en solució. Ara bé, els valors d'intensitat de corrent mesurats són petits, possiblement com a conseqüència de la limitació que representa el contacte entre el grafit i els centres actius de l'enzim. És per aquest motiu que la presència d'un mediador en solució afavoreix la reacció i provoca un augment de senyal, atesa la seva mobilitat que facilita la transferència electrònica entre els diferents centres actius implicats.

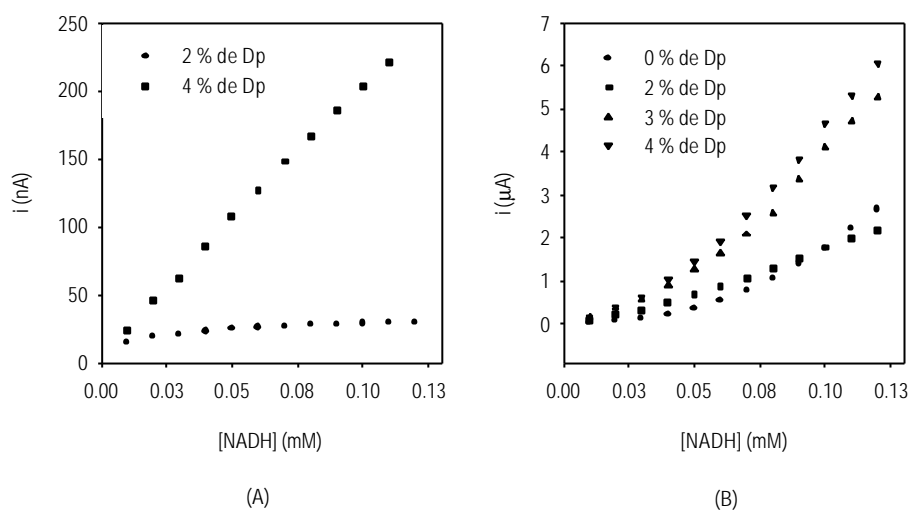


Figura 7.10: Corbes de calibració per a NADH obtingudes quan s'empren biocompòsits preparats amb diferents percentatges d'enzim Dp com a elèctrode de treball. Inicialment la cel·la electroquímica conté (A) 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5 i (B) 10 ml d'una solució de DCPIP 0.2 mM preparada amb aquesta mateixa solució amortidora. El potencial de treball ha estat 0.115 V.

7.3.1.3 Estudi de biocompòsits amb diaforasa i mediador

7.3.1.3.1 Preparació dels biocompòsits amb diaforasa i mediador

Tot i que, inicialment, tots els biocompòsits amb diaforasa i mediador semblen haver curat correctament, una simple inspecció visual de la superfície del compòsit un cop polida, deixa veure petits forats provocats per pèrdues de mediador, fet que ja es preveia en base als estudis precedents.

7.3.1.3.2 Caracterització electroquímica

De l'estudi de la Figura 7.11 es pot afirmar que tots els biocompòsits preparats, en un principi, presenten un potencial d'oxidació associat al mediador que porten incorporat, al qual es pot fer el seguiment de l'oxidació de NADH.

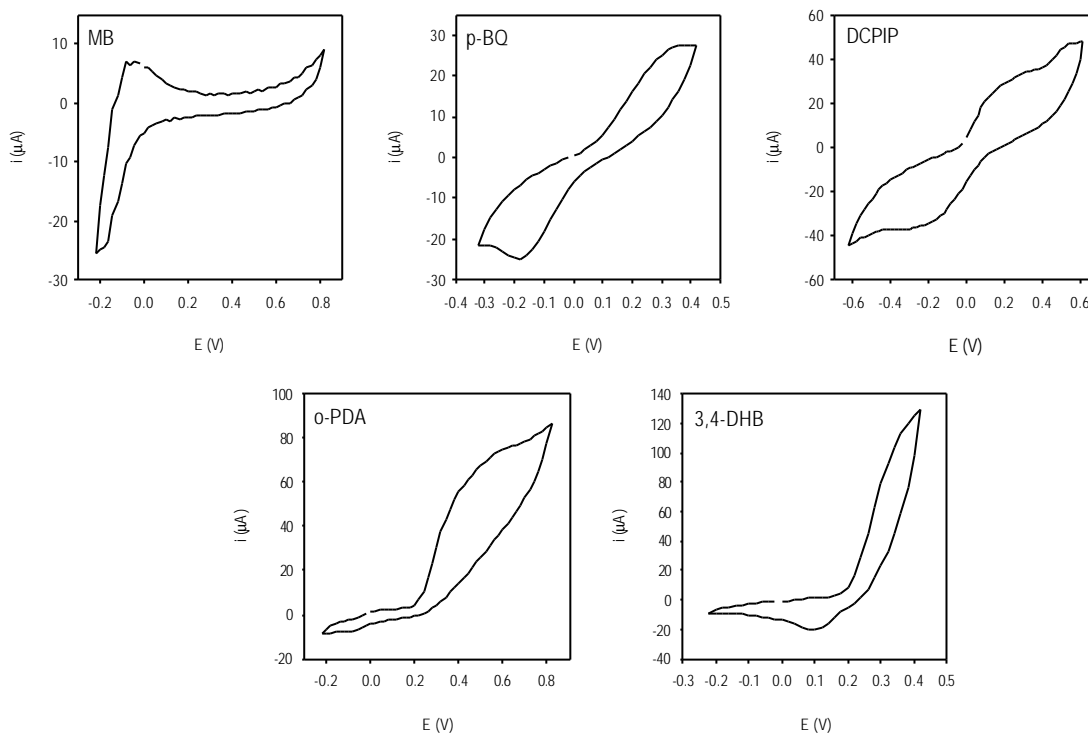


Figura 7.11: Voltamperogrames cíclics dels biocompòsits preparats amb Dp (3 %) i diferents mediadors (3 %), avaluats a una cel·la electroquímica que conté també fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5.

D'altra banda, aquests valors de potencial no difereixen gaire dels obtinguts prèviament amb compòsits preparats únicament amb mediador. De totes formes, la comparació de la intensitat, així com de la definició dels pics dels voltamperogrames obtinguts per aquells (vegeu § 4.3.4.1) i els mostrats a la Figura 7.11 permet dir que malgrat que ara el mediador només representa un 3 % en pes vers el 7 % que representava en aquells, la transferència electrònica sembla ésser molt més efectiva en presència de l'enzim Dp i, fins i tot, es pot dir que l'estabilitat del sensor ha augmentat amb la incorporació de l'enzim juntament amb el mediador a l'interior del compòsit.

7.3.1.3.3 *Avaluació de la resposta a NADH*

Malgrat que la Figura 7.12 sembla confirmar un bon acoblament entre l'enzim i el mediador, ambdós retinguts dins del compòsit, queda palesa la pèrdua continuada de mediador i, possiblement d'enzim, cap a la solució, atesa la disminució que s'observa entre dues corbes de calibració consecutives. Aquest fet fa inviable l'ús d'aquest tipus de biocompòsits com a elèctrodes de treball, excepte si

s'intenta cercar algun mètode que permeti recobrir la superfície de l'elèctrode per evitar aquestes pèrdues, però que alhora no alteri la difusió de les espècies ni el contacte d'aquestes amb l'enzim.

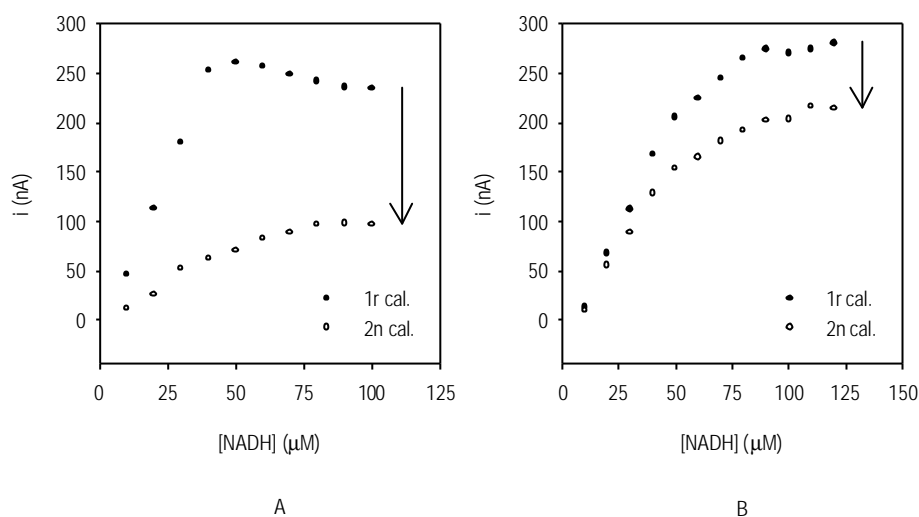


Figura 7.12: Corbes de calibració consecutives per a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un biocompòsit amb enzim Dp (3 %) i mediador (3 %). En (A) el mediador incorporat és p-BQ i en (B) és DCPIP. Els potencials de treball aplicats són (A) 0.375 V i (B) 0.300 V.

7.3.1.4 Estudi de biocompòsits amb diaforasa modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen MB

7.3.1.4.1 Preparació dels biocompòsits modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen MB

Ja es va descriure al Capítol 5 la capacitat dels compòsits de polisulfona per a formar capes homogènies que es caracteritzen per presentar una bona adherència sobre els compòsits de grafit-epoxi, alhora que retenen de manera adequada els mediadors al seu interior. En el cas del mediador MB, la retenció ve confirmada per la coloració lila de la membrana que no es perd amb el seu ús continuat. Un possible inconvenient en la preparació dels biocompòsits de diaforasa recoberts amb aquest tipus de membranes, prové de la possibilitat que el dissolvent dimetilformamida, en què es troba inicialment dissolt el compòsit de polisulfona, afecti a l'estabilitat de l'enzim diaforasa exposat a la superfície del biocompòsit. Ara bé, una de les condicions indispensables per a la bona formació de les membranes, com ja es va dir, és que la solució de polisulfona estigui el mínim temps possible en contacte amb la humitat ambiental, car aquesta provocaria un inici incontrolat de la precipitació. És per aquest motiu, que cal assegurar una inversió de fases immediata després d'haver recobert la superfície amb compòsit de polisulfona, a fi d'intercanviar ràpidament la dimetilformamida per aigua, essent

aquest darrer component en definitiva el que provoca la precipitació de la polisulfona. Per tant, es considera que el temps en què l'enzim diaforasa pot estar en contacte amb el dissolvent és mínim, així que se suposa que el seu grau de desnaturalització és menyspreable.

7.3.1.4.2 Avaluació de la resposta a NADH

La Figura 7.13 mostra corbes de calibració successives obtingudes per als biocompòsits amb diaforasa al 2 % (A) i al 3 % (B) modificats amb membranes de polisulfona amb mediador MB. Queda palesa la disminució considerable de sensibilitat que mostren aquests biosensors d'una corba de calibració a la següent, fet que possiblement s'explica en base a la pèrdua per dissolució de l'enzim diaforasa des de la superfície del biocompòsit cap a la solució, a través de l'estructura porosa de la polisulfona, atès que no pot ésser deguda a la pèrdua de mediador, puix que ja es va demostrar que el mediador queda perfectament retintut a la membrana.

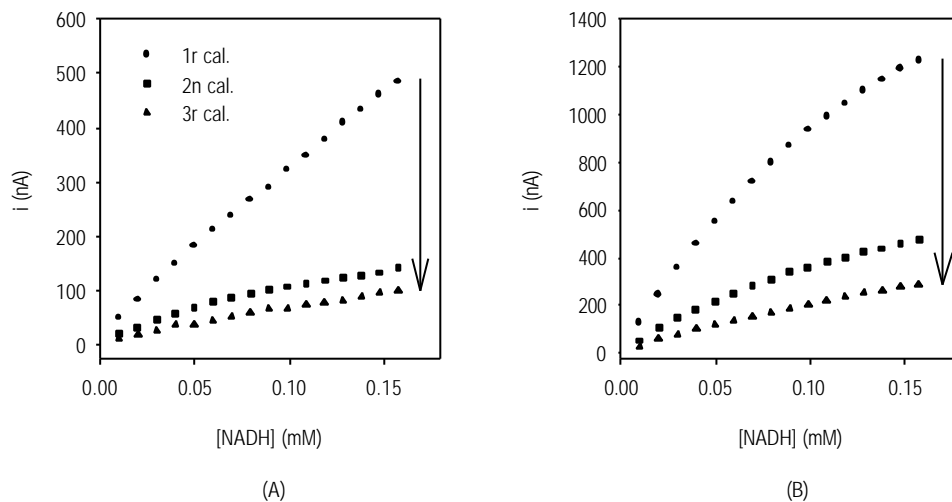


Figura 7.13: Corbes de calibració consecutives per a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un biocompòsit amb enzim Dp al 2 % (A) i al 3 % (B), recobert amb una membrana de polisulfona amb MB. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V en ambdós casos.

7.3.1.5 Estudi de composts modificats amb mediador electropolimeritzat en presència de diaforasa

7.3.1.5.1 *Electropolimerització del mediador en presència de diaforasa i avaluació de la resposta amperomètrica*

L'estudi realitzat amb l'enzim GOD confirma, segons mostra la corba de calibració representada a la Figura 7.14, la possibilitat d'electropolimeritzar un mediador en presència d'un enzim, amb la finalitat que aquest darrer quedi retingut a la capa polimèrica formada pel mediador mantenint llur activitat. Ara bé, el disseny d'una metodologia a seguir ha de passar per una sèrie d'etapes d'optimització.

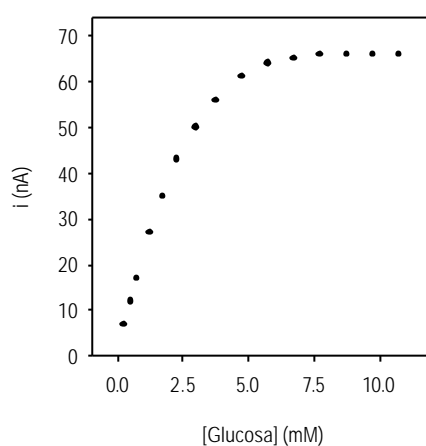


Figura 7.14: Corba de calibració per a glucosa, obtinguda amb un elèctrode de treball basat en un compost de grafit-epoxi amb l'enzim GOD retingut sobre la seva superfície a l'interior d'una capa polimèrica de mediador o-PDA electropolimeritzat. El potencial de treball emprat ha estat 0.7 V.

De l'avaluació de la influència de l'enzim diaforasa sobre les corbes de calibració obtingudes per a NADH, representades a la Figura 7.15, es dedueix que la presència d'una quantitat elevada d'enzim dificulta el procés d'electropolimerització, mentre que quan es redueix aquesta quantitat els valors comencen a tendir cap el que sembla ésser l'òptim, corresponent a un elèctrode en què el procés d'electropolimerització ha tingut lloc en absència d'enzim.

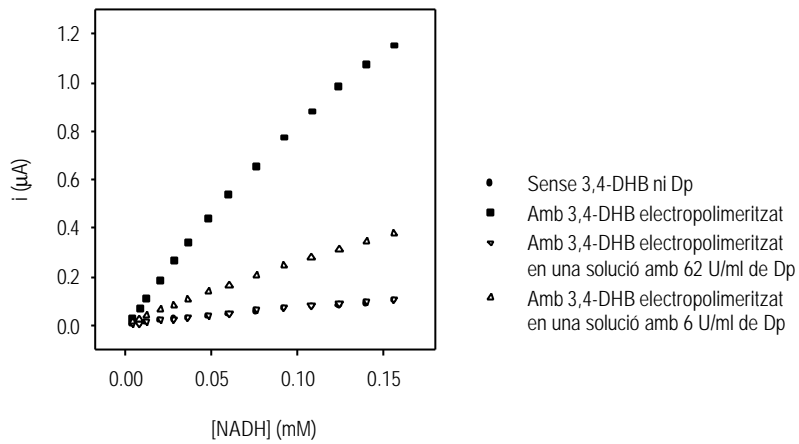


Figura 7.15: Estudi comparatiu de la resposta a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi sobre la superfície del qual s'ha electropolimeritzat 3,4-DHB en presència de diferents quantitats d'enzim Dp en solució. El potencial de treball per a l'obtenció de les corbes de calibració representades ha estat 0.3 V.

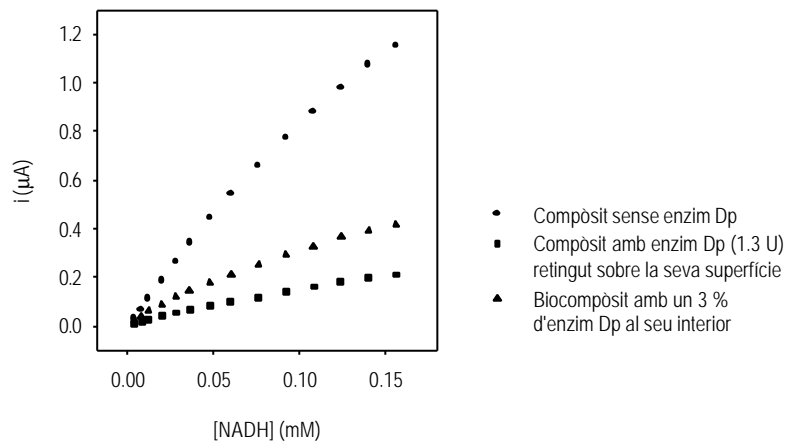


Figura 7.16: Estudi comparatiu de la resposta a NADH obtinguda quan s'utilitza un elèctrode de treball amb 3,4-DHB electropolimeritzat sobre la seva superfície, essent el compost de base un compost de grafit-epoxi sense enzim Dp, un altre amb enzim Dp prèviament adsorbit sobre la superfície abans de dur a terme el procés d'electropolimerització del mediador, i un darrer corresponent a un biocompost que incorpora l'enzim Dp a l'interior de la matriu polimèrica que forma el compost. El potencial de treball és 0.3 V.

Per últim, les corbes de calibració per a NADH mostrades a la Figura 7.16 indiquen que la capa polimèrica formada per l'electropolimerització del mediador 3,4-DHB no és vàlida com a membrana

dirigida a retenir l'enzim adsorbit sobre la superfície de l'elèctrode, o l'atrapat dins el compòsit atès que, per comparació amb resultats experimentals obtinguts prèviament, s'observa que en aquest cas s'obtenen pendents més petits que els corresponents al biocompòsit de diaforasa i a l'enzim adsorbit sobre l'elèctrode i recobert per una membrana de diàlisi, ambdós amb el mediador en solució. D'altra banda, l'obtenció de sensibilitats inferiors a l'assolida quan s'electropolimeritza el mediador sol sobre la superfície del compòsit, sembla fer notar la dificultat que troba el mediador per poder electropolimeritzar-se quan la superfície sobre la qual ho ha de fer no és totalment llisa, ja sigui perquè presenta petits forats a causa de pèrdues de l'enzim de dins del biocompòsit, perquè l'adsorció de l'enzim satura la superfície, fent-la inaccessible, com a conseqüència, al mediador, o bé perquè la modifica d'alguna altra manera, afectant per exemple a la seva conductivitat.

7.3.1.6 Estudi d'elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa

7.3.1.6.1 Preparació dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa

Les membranes que han incorporat l'enzim diaforasa sòlid al compòsit de polisulfona prèviament a la inversió de fases, no han resultat ésser tan homogènies com les membranes equivalents sense enzim, atès que la presència de l'enzim, tot i haver-se homogeneïtzat bé inicialment amb el grafit, ha format petits grumolls quan s'ha dispersat a la polisulfona. En canvi, les membranes que han aprofitat la inversió de fases per a què en l'intercanvi de la dimetilformamida per aigua, hagi entrat l'enzim diaforasa just en el moment de la precipitació de la polisulfona, han mostrat la mateixa aparença visual que les membranes sense enzim.

7.3.1.6.2 Avaluació de la resposta a NADH

La Taula 7.1 recull els paràmetres analítics corresponents a les corbes de calibració obtingudes amb cadascun dels biosensors preparats (vegeu Figures 7.17 i 7.18). S'observa com els dos atrapaments físics emprats per a la incorporació de l'enzim diaforasa a la configuració del sensor, demostren la presència i activitat d'aquest enzim, car s'aconsegueix en tots els casos amplificar de forma considerable la sensibilitat dels sensors desenvolupats (vegeu Taula 5.4). Ara bé, entre les dues estratègies utilitzades, queda palès amb els valors de sensibilitat obtinguts, que la incorporació de l'enzim sòlid a la configuració de l'elèctrode permet assolir una millor amplificació de la resposta com a resultat del procés de bioelectrocatalisi que té lloc, possiblement com a conseqüència d'una major quantitat d'enzim retingut. De fet, sembla lògic pensar que pugui tenir lloc un determinat grau de desnaturalització de l'enzim incorporat com a sòlid, pel fet d'estar un cert temps en contacte amb el solvent dimetilformamida, temps que en el cas de l'altra estratègia per a la incorporació, basada en

l'entrada de l'enzim durant el procés d'inversió de fases, és menyspreable. No obstant això, encara que hi pugui haver certa desnaturalització, sembla ésser que la quantitat d'enzim retintut d'aquesta manera és suficient com per a amplificar el senyal d'aquests sensors.

Malgrat aquests resultats, les corbes de calibració de la Figures 7.17 i 7.18 són resultat d'una disminució lenta però progressiva dels pendents associats a mesura que es van repetint consecutivament, de manera que els valors de reproductibilitat calculats no són aleatoris, sinó que provenen d'una disminució continuada. Aquest fet, només s'explica com a resultat de pèrdues de l'enzim, retintut a l'interior de la membrana de polisulfona, cap a la solució, atès que el mediador ja es va comprovar que quedava perfectament retintut, sense mostrar pèrdues amb el seu ús continuat.

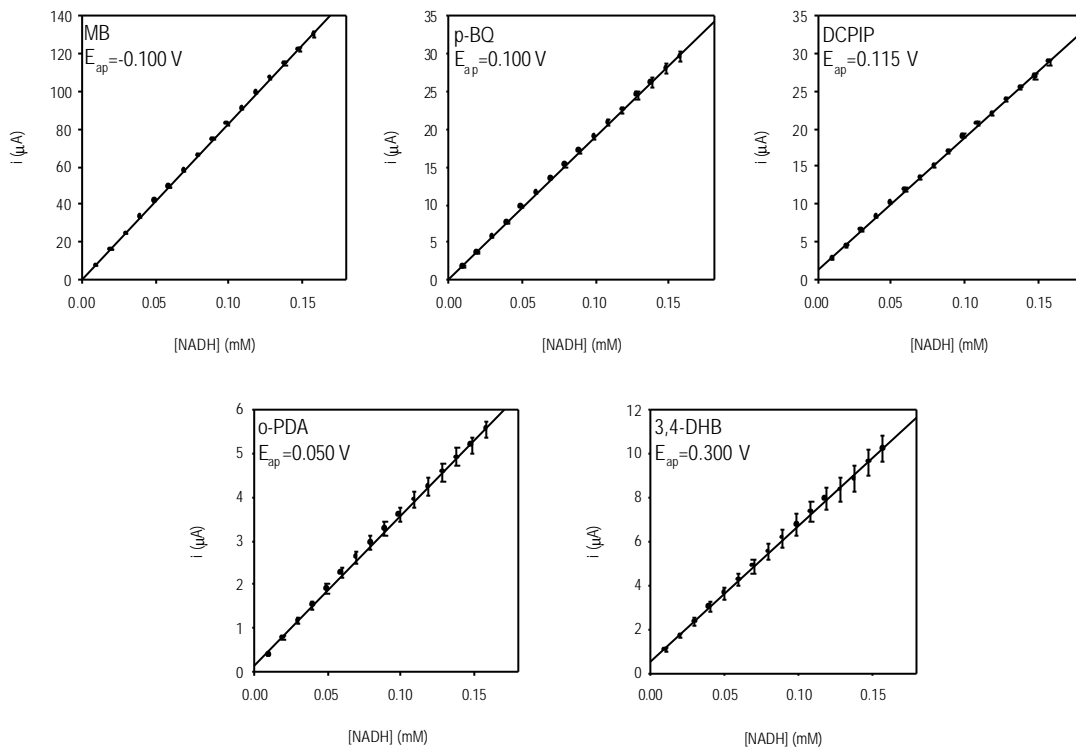


Figura 7.17: Corbes de calibració per a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi modificat amb diferents membranes de grafit-polisulfona i mediador que incorporen l'enzim diaforasa en el seu interior afegit com a sòlid a la mescla inicial del compost de polisulfona prèviament a la seva precipitació. A cada gràfic s'indica el mediador present a la membrana de polisulfona i el potencial de treball emprat. Cada corba correspon a la mitjana de 3 corbes de calibració successives, la variabilitat de les quals s'ha representat amb barres d'error corresponents a \pm el valor de la desviació estàndard associada a la intensitat de corrent mesurada per a cada concentració de NADH assajada.

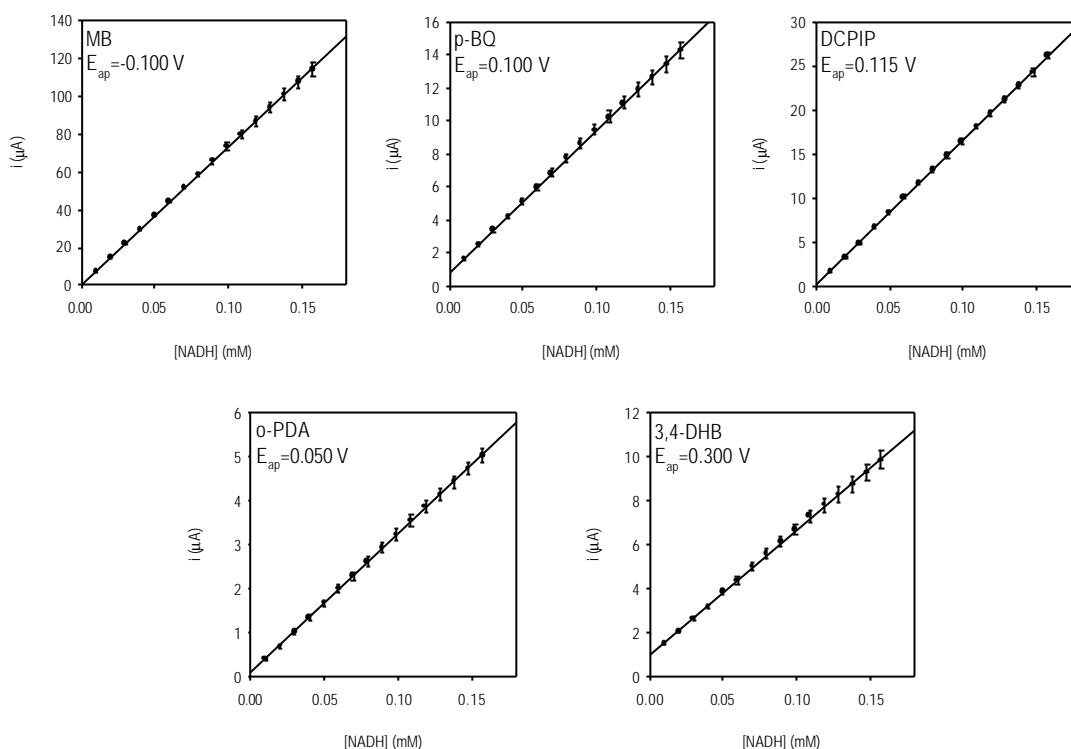


Figura 7.18: Corbes de calibració per a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi modificat amb diferents membranes de polisulfona-grafit i mediador que incorporen l'enzim diaforasa en el seu interior introduït durant el procés d'inversió de fases. A cada gràfic s'indica el mediador present a la membrana de polisulfona i el potencial de treball emprat. Cada corba correspon a la mitjana de 3 corbes de calibració successives, la variabilitat de les quals s'ha representat amb barres d'error corresponents a \pm el valor de la desviació estàndard associada a la intensitat de corrent mesurada per a cada concentració de NADH assajada.

Taula 7.1: Paràmetres de calibració obtinguts de l'avaluació de l'oxidació de NADH quan s'empren elèctrodes modificats amb membranes de polisulfona amb cadascun dels mediadors assajats i enzim diaforasa incorporat mitjançant dues estratègies diferents. Els potencials aplicats han estat els mateixos que apareixen a la Taula 5.4 per a cadascun dels mediadors. Tots els càlculs s'han fet per a $n=3$.

MEDIADOR	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
<u>Enzim Dp sòlid a la polisulfona</u>			
MB	832000	0.9973 a 0.9999	4
p-BQ	190050	0.9980 a 0.9998	7
DCPIP	180350	0.9964 a 0.9988	4
o-PDA	34730	0.9960 a 0.9997	10
3,4-DHB	63110	0.9950 a 0.9968	15

MEDIADOR	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (μA/M)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
<u>Enzim Dp incorporat per inversió de fases</u>			
MB	728000	0.9988 a 0.9998	9
p-BQ	85710	0.9847 a 0.9997	10
DCPIP	164880	0.9964 a 0.9995	4
o-PDA	31500	0.9965 a 0.9992	10
3,4-DHB	56800	0.9950 a 0.9997	12

7.3.1.6.3 *Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa*

S'han emprat capes de Nafió i de poliamida com a recobriments protectors per a evitar les pèrdues de l'enzim diaforasa cap a la solució, enzim que s'ha incorporat com a sòlid al compòsit de polisulfona prèviament a la formació de la membrana per precipitació. Les membranes de Nafió, més gruixudes que les de poliamida, són clarament visibles, atès que ofereixen lluentor al compòsit de polisulfona. Tanmateix, la poliamida, tot i ser una capa molt més prima, també confereix certa lluentor a la membrana que cobreix, si bé no és tan evident com per al Nafió.

7.3.1.6.4 *Avaluació de la resposta a NADH*

Els valors de reproductibilitat recollits a la Taula 7.2 demostren com en tots els casos, excepte quan es treballa amb DCPIP com a mediador, la presència de les capes protectores de Nafió i de poliamida han aconseguit reduir notablement les pèrdues d'enzim diaforasa, atès que ara s'obtenen valors més baixos de RSD que, en base als gràfics de la Figura 7.19, no responen a pèrdues tan importants de sensibilitat com les obtingudes quan es treballa sense capa protectora. Malgrat aquesta millora en l'estabilitat dels biosensors, només per al biosensor preparat amb MB compensa la pèrdua de sensibilitat que provoca la presència d'una segona capa en relació al valor que s'obté per al sensor equivalent sense enzim diaforasa.

D'altra banda, per a tots els casos estudiats, excepte per als biosensors preparats amb o-PDA i amb DCPIP, s'han obtingut sensibilitats més elevades quan es recobreix la polisulfona amb Nafió que amb poliamida. A més, a la bibliografia s'explica com la incorporació d'espècies redox catióniques a un polímer aniónic perfluorosulfonat, com el Nafió, provoca un augment de la porositat de la membrana protectora,³⁸ fet que permet justificar que els elèctrodes preparats amb MB hagin estat els que han mostrat una major sensibilitat, atès que és l'únic mediador que presenta càrrega positiva, en el seu cas per a l'espècie oxidada.^{39,40} És part d'aquesta espècie catiónica MB⁺, la que interacciona electrostàticament amb els centres sulfonatats d'intercanvi catiónic, i així modifica la porositat de la

capa de Nafió, fet que en definitiva acaba afavorint la difusió del cofactor NADH cap a les molècules de mediador que es troben retingudes a la membrana de polisulfona.

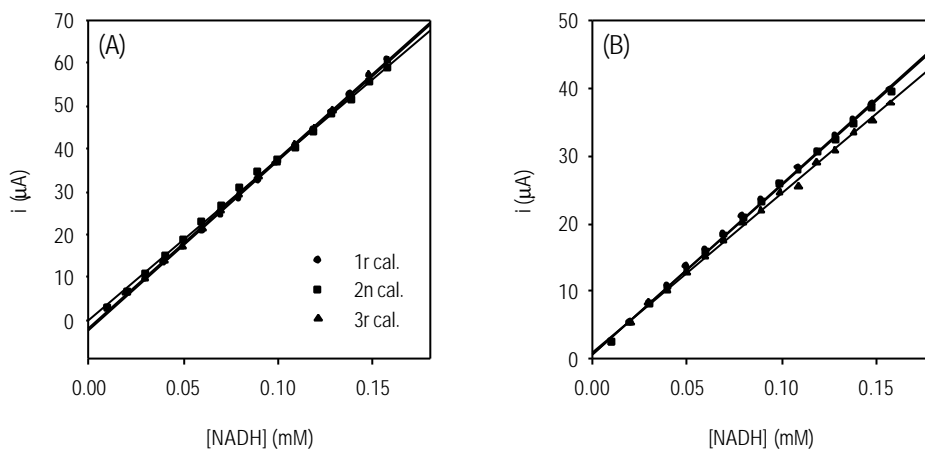


Figura 7.19: Corbes de calibració successives per a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi modificat amb una primera membrana de polisulfona-grafit amb MB i enzim diaforasa, incorporat com a sòlid a la mescla inicial, i una segona capa protectora, de Nafió (A) o de poliamida (B). El potencial de treball emprat ha estat -0.100 V.

Taula 7.2: Paràmetres de calibració obtinguts de l'avaluació de l'oxidació de NADH quan s'empren elèctrodes modificats amb una primera membrana de polisulfona amb cadascun dels mediadors assajats i enzim diaforasa incorporat sòlid abans de la precipitació de la polisulfona, i una segona membrana protectora. Com a segona capa s'han assajat membranes de Nafió i de poliamida. Els potencials aplicats han estat els mateixos que apareixen a la Taula 5.4 per a cadascun dels mediadors. Tots els càlculs s'han fet per a $n=3$.

MEDIADOR	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
<u>Membrana de Nafió</u>			
MB	389510	0.9984 a 0.9999	3
p-BQ	25340	0.9965 a 0.9987	10
DCPIP	37570	0.9945 a 0.9991	9
o-PDA	15100	0.9917 a 0.9981	2
3,4-DHB	30940	0.9959 a 0.9969	4

MEDIADOR	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (μA/M)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
<u>Membrana de poliamida</u>			
MB	244640	0.9991 a 0.9997	4
p-BQ	17930	0.9995 a 0.9998	7
DCPIP	86710	0.9855 a 0.9963	10
o-PDA	20130	0.9938 a 0.9987	5
3,4-DHB	5050	0.9930 a 0.9986	4

7.3.1.6.5 Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig

La Figura 7.20 mostra els espectres d'infraroig corresponents a dues membranes de polisulfona amb grafit i MB, una sense i l'altra amb enzim diaforasa al seu interior.

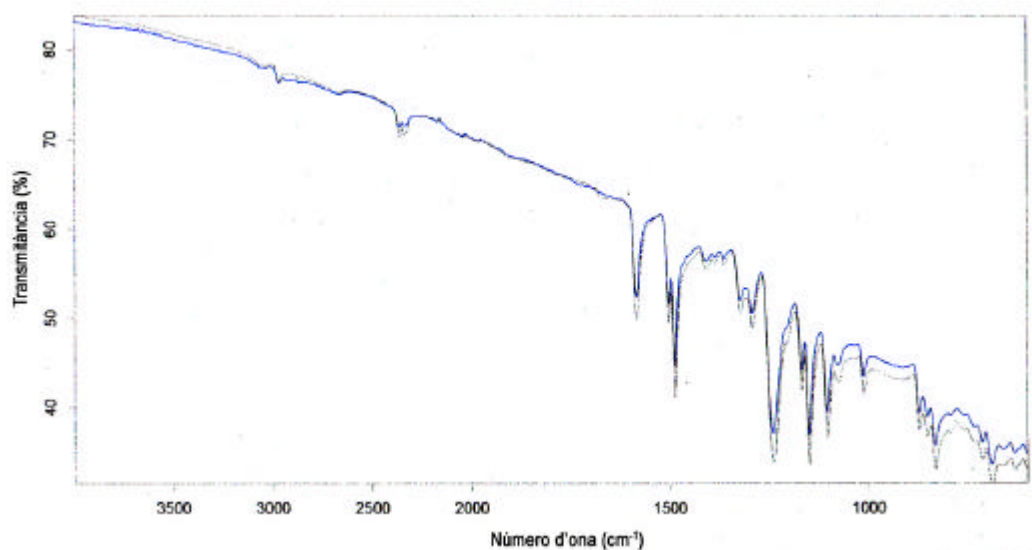


Figura 7.20: Espectres d'absorció en l'infraroig corresponents a diferents membranes de polisulfona: polisulfona amb grafit i MB (línia blava) i polisulfona amb grafit, MB i enzim diaforasa (línia negra).

El solapament dels dos espectres, resultat de l'absència de noves bandes i de desplaçaments de les bandes ja existents, quan la membrana incorpora també enzim diaforasa, indica que a la superfície del biocompòsit de polisulfona no hi ha una quantitat suficient d'enzim com per a poder generar cap senyal

a l'infraroig, atès que la tècnica es basa en mesures de reflectància, de manera que la radiació tan sols penetra uns pocs micròmetres a la membrana i, per tant, no pot aportar informació de l'interior de les membranes. Aquests resultats es poden explicar en base al tipus d'immobilització enzimàtica duta a terme, car l'enzim s'ha incorporat a l'interior de la matriu polimèrica prèviament a la seva precipitació, fet que justifica que la major part d'enzim hagi quedat retingut al si del polímer en el moment en què aquest ha precipitat, i tan sols una mínima part hagi quedat exposat a la superfície.

7.3.2 BIOSENSORS BASATS EN L'ENZIM HRP COM A CATALITZADOR DE LA REDUCCIÓ DE PERÒXID D'HIDROGEN MEDIATITZADA

7.3.2.1 Estudi d'elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen HRP

7.3.2.1.1 Preparació dels elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen HRP

La incorporació de l'enzim HRP al sensor s'ha dut a terme amb una segona membrana, atès que la presència de metalls a la primera membrana basada en xerogels, podria causar la inhibició de l'enzim. És per aquest mateix motiu que s'ha evaporat l'etanol, emprat com a dissolvent, del gel de sílice en què s'ha retingut l'enzim. Aquest gel es diferencia clarament del compòsit amb xerogel dipositat en primer lloc, ja que és incolor, en contrast a les diferents coloracions pròpies de cadascun dels metalls presents als xerogels emprats.

7.3.2.1.2 Avaluació de la resposta a peròxid d'hidrogen

La Taula 7.3 recull els paràmetres analítics obtinguts de les corbes de calibració representades a la Figura 7.21 per a tres biosensors basats en xerogels modificats amb diferents metalls i una segona membrana de gel de sílice que incorpora enzim HRP com a bioelectrocatalitzador de la reducció de peròxid d'hidrogen. La reducció enzimàtica de peròxid d'hidrogen a través de l'enzim HRP, té lloc mitjançant l'oxidació del catió Fe^{3+} de l'enzim per donar un radical catiònic amb Fe^{4+} , que es troba sobre l'anell porfirínic o a la cadena polipeptídica, i la consegüent reducció mediatitzada d'aquest radical catiònic al catió Fe^{3+} inicial.⁴¹

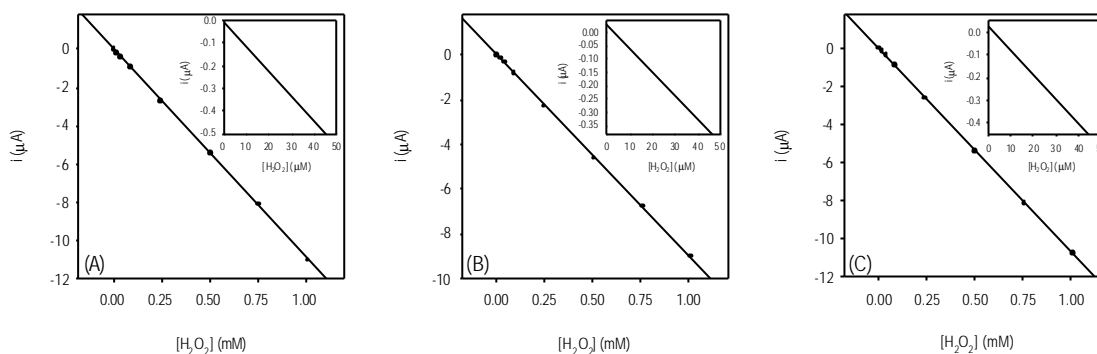


Figura 7.21: Corbes de calibració per a la reducció de peròxid d'hidrogen quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode de platí amb una primera membrana de xerogel, modificat amb metalls, ceri (A), zinc (B) i ferro (C), i una segona membrana de gel de sílice que conté l'enzim HRP. Cada gràfica conté una ampliació dels primers punts de la corba de calibració representada. El potencial de treball emprat ha sigut de -0.200 V.

Taula 7.3: Paràmetres de calibració extrets de les corbes de calibració per a la reducció de peròxid d'hidrogen, quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode de platí modificat amb una primera membrana preparada amb acetat de cel·lulosa (AC), polietilenglicol (PEG) i xerogel, modificat amb metalls, i una segona membrana de gel de sílice que conté l'enzim HRP. Cada valor s'ha calculat per a $n=3$, excepte la desviació estàndard relativa (RSD), que s'ha calculat a partir de 5 mesures de la intensitat de corrent corresponent a l'addició de peròxid d'hidrogen fins a una concentració igual a 0.1 mM.

TIPUS DE MEMBRANA	INTERVAL LINEAL (M)	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (A/M)	LÍMIT DE DETECCIÓ (μ M)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	RSD (%)
Xerogel modificat amb ceri / AC / PEG / HRP	$2.1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	-0.01089	5	0.99932	2.4
Xerogel modificat amb zinc / AC / PEG / HRP	$4.1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	-0.00890	8	0.99938	3.9
Xerogel modificat amb ferro / AC / PEG / HRP	$4.1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	-0.01099	4	0.99936	3.1

Els tres xerogels avaluats han mostrat un bon comportament en ésser incorporats a la configuració dels biosensors amb enzim HRP per a la determinació de peròxid d'hidrogen en base a la seva reducció. Ara bé, els millors resultats en quant a les sensibilitats més elevades i els límits de detecció més baixos, s'han obtingut per als xerogels que incorporen els metalls electroactius ceri i ferro, si bé el xerogel amb zinc ofereix uns paràmetres analítics propers als d'aquests altres biosensors.

7.4 CONCLUSIONS

Les conclusions extretes del present capítol han estat:

1 L'acoblament de la reacció enzimàtica de la Dp a la detecció del cofactor NADH a través de l'ús de MB o DCPIP en solució, com a acceptors d'electrons susceptibles de reoxidar-se, millora la sensibilitat del sistema mitjançant un procés de biocatàlisi.

2 L'optimització de la quantitat d'enzim que s'ha d'adsorbir sobre la superfície de l'elèctrode esdevé un clar indicador de què un excés de material biològic provoca un recobriment de la superfície conductora que dificulta l'accés de les espècies electroactives cap a les partícules de grafit. Com a conseqüència té lloc un augment de la resistència i, per tant, una disminució de la conductivitat, de manera que s'obté una marcada pèrdua de sensibilitat. D'altra banda, també queda palesa la necessitat d'una quantitat mínima d'enzim adsorbit, per sota de la qual la velocitat de la reacció és inferior a l'òptima.

3 Els biocompòsits de Dp mostren una estabilitat elevada, amb una pèrdua mínima d'activitat enzimàtica després de 2 mesos guardats a 4°C.

4 Si bé els biocompòsits de Dp per si sols responen a l'addició de NADH, la magnitud de la resposta esdevé notablement amplificada en presència de DCPIP en solució. Ara bé, malgrat la baixa sensibilitat mostrada pels biocompòsits en absència de mediador, el fet de poder regenerar directament l'enzim és especialment interessant, atès que poder treballar sense mediadors representaria una important simplificació del sistema.

5 De les corbes de calibració de NADH obtingudes amb biocompòsits de diferents percentatges de Dp, s'observa que el biocompòsit amb un 4 % de Dp és el que dona un major senyal d'intensitat de corrent. Ara bé, d'acord amb la inspecció visual de la superfície dels compòsits un cop efectuada l'anàlisi, es conclou que el biocompòsit amb un 2 % de Dp és l'únic que manté llisa i reproducible la seva superfície entre corbes de calibració successives. Els altres compòsits presenten una retenció defectuosa de l'enzim, de manera que propicien la lixiviació de material enzimàtic, responsable de la formació de petits forats a la seva superfície.

6 Malgrat que també mostren pèrdues de mediador, els biocompòsits amb Dp i mediador (p-BQ i DCPIP) al seu interior semblen ésser més estables que els corresponents compòsits sense l'enzim. No obstant això, cal cercar un mitjà vàlid per evitar les pèrdues de mediador cap a la solució, que fan inviable l'ús d'aquests biocompòsits.

7 El recobriment dels biocompòsits de diaforasa amb membranes de polisulfona amb MB no aconsegueix actuar com a barrera protectora per evitar les pèrdues d'enzim, que acaba lixiviant per l'estructura porosa de la membrana. Tanmateix, la presència de l'enzim a l'interior del compòsit no permet millorar la sensibilitat en relació als resultats obtinguts quan es treballa només amb membranes de polisulfona amb mediador.

8 La retenció de l'enzim Dp durant el procés d'electropolimerització de 3,4-DHB no permet un bon acoblament de les reaccions en què esdevenen implicats ambdós, com queda demostrat amb l'obtenció d'una disminució de la intensitat de corrent més pronunciada quan l'elèctrode de treball s'ha preparat mitjançant l'electropolimerització de 3,4-DHB en presència d'una quantitat creixent de Dp en solució. Per tant, sembla ser que l'enzim dificulta el procés d'electropolimerització.

9 L'obtenció de sensibilitats inferiors quan l'electropolimerització de 3,4-DHB té lloc sobre un biocompòsit de Dp (3 %) o sobre un compòsit amb Dp adsorbida a la seva superfície, respecte a l'electropolimerització d'aquest mediador sobre la superfície neta d'un compòsit de grafit-epoxi, sembla indicar la dificultat que troba el mediador per polimeritzar sobre una superfície que no resulta ésser totalment llisa, bé perquè mostra forats com a conseqüència de pèrdues de l'enzim, bé perquè el material adsorbit a sobre fa difícil l'accés del mediador a les partícules de grafit responsables de la conducció necessària per dur a terme qualsevol procés electroquímic.

10 La incorporació de l'enzim diaforasa a l'interior de la matriu de polisulfona mitjançant el seu atrapament físic al compòsit inicial, permet una major amplificació del senyal que quan es reté l'enzim durant el procés d'inversió de fases. De totes formes, en ambdós casos l'enzim es perd progressivament de la matriu polimèrica.

11 Les capes de Nafíó i de poliamida aconseguen una millor retenció de l'enzim diaforasa a la membrana de polisulfona. Ara bé, només els biosensors preparats amb MB assoleixen sensibilitats superiors a les obtingudes en absència d'enzim, que en el cas del Nafíó, que és el que permet obtenir senyals més grans, s'explica en base a la interacció de les espècies catióniques del mediador, MB⁺, amb els centres aniónics de la membrana, fet que provoca un increment de la seva porositat i, per tant, afavoreix la difusió del cofactor NADH al seu través.

12 La presència de l'enzim HRP en una membrana de gel de sílice dipositada sobre un compòsit de xerogel amb metalls dispersos, fa possible la determinació de la reducció de peròxid d'hidrogen mitjançant un procés de bioelectrocatalisi que permet una bona amplificació del senyal mesurat. El peròxid d'hidrogen oxida el centre metàl·lic de l'enzim que, alhora, torna al seu estat d'oxidació original a través dels centres metàl·lics del xerogel. Els biosensors preparats amb els xerogels amb ceri i ferro han mostrat els millors resultats.

13 En resum, les experiències realitzades confirmen el fet que els enzims Dp i HRP es poden incorporar en configuracions compactes del sistema de detecció, per actuar com a biocatalitzadors de les reaccions d'oxidació de NADH i de reducció de peròxid d'hidrogen, respectivament. En el cas de l'enzim diaforasa, s'ha vist com la seva incorporació en membranes de polisulfona i MB, amb un segon recobriments protector, ja sigui Nafíó o poliamida, permet obtenir biosensors per a NADH molt sensibles, tot i que encara queda per resoldre completament els problemes de lixiviació de l'enzim. D'altra banda, la incorporació de l'enzim HRP en gels de sílice dipositats sobre compòsits basats en xerogels modificats amb metalls, amplifica el senyal en més d'un 50 %, alhora que s'ha comprovat que reté més d'un 80 % de la resposta inicial després d'efectuar 120 mesures.

7.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ A. E. G. Cass. *Biosensors. A Practical Approach* New York, Oxford University Press (1990) pp 32-33
- ² K. Takamizawa, S. Uchida, M. Hatsu, T. Suzuki, K. Kawai. *Canadian Journal of Microbiology*, **46** (2000) 350-357
- ³ R. Antiochia, A. E. G. Cass, G. Palleschi. *Analytica Chimica Acta*, **345** (1997) 17-28
- ⁴ H. A. O. Hill, G. S. Sanghera. A. E. G. Cass (Ed.). *Biosensors – A Practical Approach*. Oxford, IRL Press (1990) pp 19-46
- ⁵ J. Kulys, G. Gleixner, W. Schuhmann, H-L. Schmidt. *Electroanalysis*, **5** (1993) 201-207
- ⁶ H-C. Chang, A. Ueno, H. Yamada, T. Matsue, I. Uchida. *Analyst*, **116** (1991) 793-796
- ⁷ C. J. McNeil, J. A. Spoor, D. Cocco, J. M. Cooper, J. V. Bannister. *Analytical Chemistry*, **61** (1989) 25-29
- ⁸ L. Gorton. *Electroanalysis*, **7** (1995) 23-45
- ⁹ R. Matsumoto, M. Mochizuki, K. Kano, T. Ikeda. *Analytical Chemistry*, **74** (2002) 3297-3303
- ¹⁰ A. I. Yaropolov, M. R. Tarasevich, S. D. Varfolomeev. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **5** (1978) 18-24
- ¹¹ W. Li, M. Xian, Z. Wang, C. Sun, M. Zhao. *Thin Solid Films*, **386** (2001) 121-126
- ¹² Y. Nakabayashi, H. Yoshikawa. *Analytical Sciences*, **16** (2000) 609-613
- ¹³ M. Cosgrove, G. J. Moody, J. D. R. Thomas. *Analyst*, **113** (1988) 1811-1815
- ¹⁴ J. Li, L.-T. Xiao, X.-M. Liu, G.-M. Zeng, G.-H. Huang, G.-L. Shen, R.-Q. Yu. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **376** (2003) 902-907
- ¹⁵ H. B. Dunford, J. S. Stillman. *Coordination Chemistry Reviews*, **19** (1976) 187-251
- ¹⁶ G. L. Eichhorn, L. G. Marzilli (Eds.). *Advances in Inorganic Biochemistry*. New York, Elsevier Biomedical, Vol. 4 (1982) pp 41-68
- ¹⁷ A. G. Sykes (Ed.). *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*. London, Academic Press, Vol. 3 (1984) pp 175-212
- ¹⁸ V. Razumas, J. Jasaitis, J. Kulys. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **12** (1984) 297-322
- ¹⁹ V. A. Bogdanovskaya, M. R. Tarasevich, R. Hintsche, F. Scheller. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **19** (1988) 581-584
- ²⁰ G. Jönsson, L. Gorton. *Electroanalysis*, **1** (1989) 465-468
- ²¹ J. Zhao, R. W. Henkens, J. Stonehuerner, J. P. O'Daly, A. L. Crumbliss. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **327** (1992) 109-119
- ²² E. E. Ferapontova, V. G. Grigorenko, A. M. Egorov, T. Börchers, T. Ruzgas, L. Gorton. *Biosensors & Bioelectronics*, **16** (2001) 147-157
- ²³ T. Ruzgas, L. Gorton, J. Emnéus, G. Marko-Varga. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **391** (1995) 41-49
- ²⁴ S. Alegret. *Analyst*, **121** (1996) 1751-1758

- ²⁵ K. Kalcher. *Electroanalysis*, **2** (1990) 419-433
- ²⁶ S. A. Emr, A. M. Yacynych. *Electroanalysis*, **7** (1995) 913-923
- ²⁷ W. Schuhmann. *Mikrochimica Acta*, **121** (1995) 1-29
- ²⁸ L. Gorton. *Electroanalysis*, **7** (1995) 23-45
- ²⁹ A. Merkoçi, B. Baraj, S. Buzo. *JJCLA*, **17** (1992) 89-92
- ³⁰ C. Malitesta, F. Palmisano, L. Torsi, P. G. Zambonin. *Analytical Chemistry*, **62** (1990) 2735-2740
- ³¹ R. Garjonyte, A. Malinauskas. *Sensors and Actuators*, **B63** (2000) 122-128
- ³² A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton, O. A. Bobrova, L. V. Lukachova, A. K. Gladilin, A. V. Levashov. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 4335-4341
- ³³ M. Mulder. *Basic Principles of Membrane Technology*. Netherlands, Kluwer Academic (1996)
- ³⁴ W. S. W. Ho, K. K. Sirkar. (Eds.). *Membrane Handbook*. New York, Van Nostrand Reinhold (1992)
- ³⁵ H. Tsutsumi, K. Fujita. *Electrochimica Acta*, **40** (1995) 879-882
- ³⁶ J. Li, S. N. Tan, H. Ge. *Analytica Chimica Acta*, **335** (1996) 137-145
- ³⁷ M. L. Ferrer, F. del Monte, D. Levy. *Chemistry of Materials*, **14** (2002) 3619-3621
- ³⁸ G. Fortier, M. Vaillancourt, D. Bélanger. *Electroanalysis*, **4** (1992) 275-283
- ³⁹ L. Gorton, A. Tortensson, H. Jaegfeldt, G. Jöhansson. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **161** (1984) 103-120
- ⁴⁰ R. Appelqvist, G. Marko-Varga, L. Gorton, A. Torstensson, G. Jöhansson. *Analytica Chimica Acta*, **169** (1985) 237-247
- ⁴¹ T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emeneus, L. Gorton, G. Marko-Varga. *Analytica Chimica Acta*, **330** (1996) 123-138

**PART IIA. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS
AMPEROMÈTRICS BASATS EN ENZIMS DESHIDROGENASES**

PART IIA. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN ENZIMS DESHIDROGENASES

Els enzims deshidrogenases es poden dividir en dos grans grups, segons si depenen d'un cofactor enllaçat o d'un cofactor soluble que ha d'actuar com a cosubstrat de la reacció enzimàtica. Els enzims del primer grup, en què s'inclouen les flavoproteïnes dependents dels cofactors FAD o FMN i les deshidrogenases dependents de pirroloquinolina quinona (PQQ), poden ésser incorporats en configuracions electròdiques compactes que tan sols han d'assegurar un bon acoblament entre el centre electroactiu de l'enzim i la superfície electròdica, sovint mitjançant la incorporació de mediadors redox que, en aquest cas, aquesta és l'única funció que desenvoluparan. En canvi, els enzims del segon grup són els que depenen de NAD^+ o NADP^+ ,¹ que com ja s'ha explicat en capítols precedents, presenten una sèrie d'inconvenients relacionats amb la detecció amperomètrica d'aquest cofactor, que en molts casos han limitat la seva aplicació en el desenvolupament de biosensors amperomètrics.

En la majoria de casos interessa dirigir els estudis cap al disseny de sistemes de detecció amperomètrica, ja que aquests porten associades sensibilitats superiors a les obtingudes per a sistemes basats en detecció potenciomètrica, car no depenen logarítmicament dels potencials d'electrode respecte de la concentració. A més, atès que aquest grup constitueix el grup més important d'enzims redox, que inclou enzims que impliquen substrats o productes d'interès en diversos camps, com el clínic, el mediambiental o l'alimentari, l'assoliment d'un sistema de detecció amperomètrica reproducible i aplicable a diversos enzims deshidrogenases, representa un pas essencial en el desenvolupament de nous biosensors. És per aquest motiu que en els propers dos capítols s'inclou el desenvolupament de dos biosensors amperomètrics: un per a la determinació de lactat, i un segon per a la determinació d'ió amoni, que amb l'acoblament posterior a un segon enzim permetrà el seu ús per a la determinació d'urea. En ambdós casos s'han aprofitat els quimiosensors desenvolupats prèviament per a la determinació de l'oxidació del cofactor NADH, alhora que s'han volgut comparar diferents configuracions per a demostrar el bon comportament analític dels biosensors amperomètrics finals, basades en l'aplicació de diferents estratègies d'immobilització enzimàtica segons el tipus de retenció del mediador que s'ha emprat. De fet, aquesta és una etapa molt important per a l'obtenció de biosensors amb unes característiques analítiques òptimes, atès que d'ella dependrà que la velocitat de transferència del substrat des del si de la solució cap a la membrana que conté l'enzim presenti la mínima limitació difusional, que els canvis del microambient on es troba el centre actiu de l'enzim siguin el més suaus possibles per no afectar a la seva activitat i, per últim, que la interacció del substrat o altres espècies implicades a la reacció enzimàtica amb la membrana que conté l'enzim, per exemple per adsorció, sigui menyspreable, a fi de no perdre sensibilitat.²

¹ H. Huck, A. Schelker-Graf, J. Danzer, P. Hirsch, H-L. Schmidt. *Analyst*, **109** (1984) 147-150

² G. A. Evtugyn, H. C. Budnikov, E. B. Nikolskaya. *Talanta*, **46** (1998) 465-484

8 DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA

8.1 INTRODUCCIÓ

En el present capítol, s'ha desenvolupat un biosensor per a la determinació de lactat, que incorpora l'enzim *lactat deshidrogenasa* (LDH), com a un primer exemple de biosensor basat en enzims deshidrogenases.

La determinació ràpida i reproducible de lactat és d'importància cabdal en diversos camps, com l'anàlisi alimentària i el control de processos biotecnològics (per exemple, indústries vinícoles¹ i indústries basades en la fermentació làctica²), la medicina esportiva³ i, especialment, els estudis metabòlics per a diagnòs clíniques, atès que aquest compost s'associa a diverses malalties (per exemple, fallades d'alguns òrgans, parada cardíaca, càncer gàstric, leucèmia, diabetis mellitus, hipòxia, etc.)^{4,5,6}. És per això que s'han desenvolupat diferents mètodes per a l'anàlisi de lactat, la majoria basats en anàlisis enzimàtiques amb detecció espectrofotomètrica.^{7,8} També es recull a la bibliografia l'ús de reactors enzimàtics immobilitzats (IMER) acoblats a diferents detectors en sistemes d'injecció en flux (FIA)⁹ o d'anàlisi per injecció seqüencial (SIA)^{10,11} per a la determinació de concentracions de lactat.

No obstant això, els biosensors electroquímics han esdevingut un mètode molt útil per a la determinació de lactat, atès que, com ja s'ha comentat prèviament, combinen l'especificitat inherent de les reaccions enzimàtiques amb la sensibilitat pròpia d'una transducció amperomètrica. A més, posseeixen altres avantatges, com ara una resposta ràpida, una instrumentació relativament senzilla i econòmica, i són operacionalment manejables, característiques que han portat a l'aparició d'un cert nombre de dispositius comercials, principalment usats en medicina esportiva.¹² Aquests biosensors es poden basar en l'ús dels enzims *lactat oxidasa* (LOx)^{13,14,15,16,17} o *lactat deshidrogenasa* (LDH)^{1,18,19,20}. Malgrat que els sensors basats en l'enzim LOx, que depèn de la detecció d'oxigen o de peròxid d'hidrogen, s'han aplicat en anàlisis clíniques²¹, encara no han resolt alguns problemes, com la seva dependència amb la concentració d'oxigen molecular (O₂), les interferències que afecten de manera significativa a la mesura, com per exemple quan a la mostra hi ha àcid ascòrbic, i la manca d'estabilitat, relacionada amb el curt temps de vida que presenten com a conseqüència de la desactivació de l'enzim LOx.^{22,23,24,25}

Per això es mostra com a una bona alternativa l'enzim LDH, malgrat que, d'altra banda, un dels principals problemes relacionats amb el seu ús, és l'equilibri desfavorable cap a la formació de piruvat i NADH que implica mesures de corrent molt petites. És per aquest motiu que, generalment, esdevé indispensable a fi de desplaçar l'equilibri cap a la formació de NADH, l'ús de solucions d'un pH alcalí i concentracions elevades de la forma oxidada del cofactor (NAD⁺).



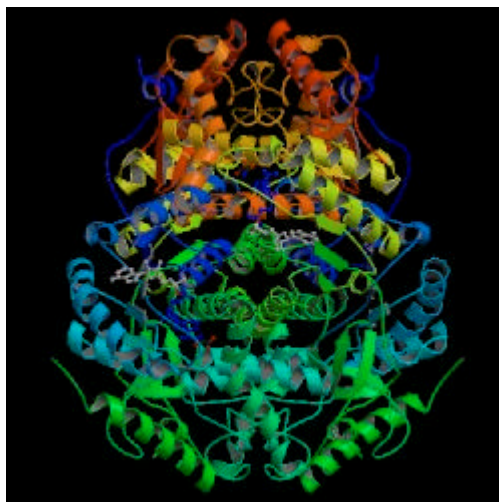


Figura 8.1: Estructura molecular tridimensional de l'enzim lactat deshidrogenasa.

L'enzim LDH es caracteritza per l'existència de diferents *isozims*, és a dir, es tracta d'un enzim format per quatre cadenes polipeptídiques que poden ser de dos tipus, M o H. Al múscul esquelètic l'isozim predominant és el que conté quatre cadenes M, mentre que al cor majoritàriament es troba l'isozim format per quatre cadenes H. La resta de teixits contenen una mescla de les 5 possibles combinacions de quatre cadenes que poden ser M o H. Cada isozim posseeix unes característiques cinètiques determinades i, per tant, mostra una afinitat diferent en vers els dos possibles substrats. L'isozim M₄ afavoreix l'oxidació ràpida de lactat a piruvat, mentre que el H₄ mostra més afinitat pel piruvat en front de lactat.²⁶ Així, l'opció de poder treballar amb cadascun dels diferents isozims purificats, es mostra com una altra alternativa que permet dur a terme un disseny més adequat del biosensor amperomètric a desenvolupar per a l'anàlit que es vol determinar, que en aquest cas és el lactat.

8.2 EXPERIMENTAL

8.2.1 APARELLS I REACTIUS

8.2.1.1 Aparells

Les mesures d'intensitat de corrent amb aplicació d'un potencial constant s'han dut a terme amb l'amperímetre descrit a § 2.2.1.1. L'electrode de referència de Ag/AgCl i l'auxiliar de platí emprats

també són els esmentats en aquell mateix apartat. Com a elèctrode de treball s'ha utilitzat un elèctrode de configuració convencional modificat, basat en un compòsit de grafit-epoxi, excepte per al desenvolupament dels biosensors per a la determinació de lactat basats en matrius de gel de sílice i en el darrer pas dels biosensors basats en membranes de polisulfona, casos en què s'han usat elèctrodes de configuració plana construïts mitjançant tecnologia serigràfica (*screen printed*) per a la deposició consecutiva de les diferents capes (conductora, transductora i aïllant). La preparació d'aquests elèctrodes s'ha realitzat amb un sistema d'impressió serigràfica DEK 248 (DEK, Regne Unit), que inclou màscares de monofilament, construïdes en poliamida (200 x 400 mm², malla 110 fils·cm⁻¹, 70 µm de gruix), i metàl·liques, segons la capa a dipositar, totes elles amb el disseny adequat per a la construcció de 36 elèctrodes per lot.

S'ha emprat un espectròmetre com el descrit a § 5.2.1.1 per a l'estudi, mitjançant espectroscòpia d'infraroig, de l'estructura de les membranes de polisulfona amb enzim LDH.

8.2.1.2 Reactius

Per a la preparació dels elèctrodes de configuració convencional basats en compòsits de grafit-epoxi, s'han usat els reactius detallats a § 2.2.1.2, mentre que per a la fabricació dels elèctrodes de configuració plana s'han emprat tintes de plata, de grafit i aïllant de les cases Gwent Electronic Materials (GEM, Anglaterra), per als elèctrodes modificats amb gels de sílice a la seva configuració, i Acheson (USA), per als biosensors basats en membranes de polisulfona.

Els enzims lactat deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27) de cor de pollastre i de múscul de conill, i diaforasa (Dp, EC 1.8.1.4) d'un extracte de cèl·lules de *Clostridium kluveri*, han estat subministrats per la casa comercial Sigma, que també ha proporcionat els productes poli(vinil alcohol) (PVOH), carboximetil cel·lulosa (CMC), poli(vinil pirrolidona) (PVP), hidroxietil cel·lulosa (HEC), lactitol, trealosa i NAD⁺. El tetraetoxisilà (TEOS) s'ha adquirit a Fluka i el copolímer catiónic GAFQUAT a ISP Corporation (USA).

La polisulfona, el NADH, els mediadors i els reactius emprats per a la preparació de membranes de Nafió i de poliamida són els mateixos utilitzats prèviament.

La resta de reactius usats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

8.2.2 DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA MODIFICATS AMB GELS DE SÍLICE QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT

Com a primera metodologia per al desenvolupament de biosensors per a lactat basats en l'enzim LDH, s'ha optat per emprar gels de sílice com a matrius on immobilitzar l'enzim, atès que ofereixen un

ambient adequat, proper al que l'enzim té *in vivo*.^{27,28,29,30,31,32} S'ha treballat amb compòsits de gels de sílice, preparats per addició de grafit abans de l'inici del procés de gelació, que tot seguit s'han serigrafiat sobre la superfície d'elèctrodes de configuració plana. La dispersió del grafit en pols a l'interior de la matriu rígida de xerogel que s'ha format, resultat de la percolació de les partícules de carboni a través de l'esquelet de sílice, proporciona una elevada conductivitat a les membranes, alhora que ajuda a modificar adequadament la porositat del gel de sílice i les característiques de la seva superfície, redueix els efectes d'encongiment del gel i millora la seva resistència vers impactes i fractures.³³ No obstant això, resulta necessària l'addició d'altres components, com són alguns aglutinants o *binders*, que milloren la consistència del material híbrid resultant, de manera que és més fàcil de serigrafiar, alhora que esdevé més ben protegit de possibles fractures.^{34,35,36,37,38} Alguns polímers que contenen ponts d'hidrogen febles s'han emprat com a aglutinants de gels de sílice amb l'objectiu d'aconseguir materials resistent a possibles fractures³⁹, però el problema és que s'obtenen materials macroporosos, que no retenen l'enzim amb tanta eficàcia. En canvi, els polímers amb ponts d'hidrogen forts són capaços de minimitzar la separació de fases que té lloc durant el procés de formació del gel de sílice. És per això que es dedueix la necessitat d'emprar un polímer d'aquest darrer tipus com a substància aglutinant.

8.2.2.1 Preparació d'elèctrodes de configuració plana que incorporen MB

S'han preparat els elèctrodes de configuració plana mitjançant tecnologia serigràfica (*screen-printing process*), basada en la deposició de diferents capes successivament, sobre un suport sòlid de PVC. S'han emprat màscares de monofilament construïdes en poliamida per a la deposició de les diferents tintes de la firma Gwent. En primer lloc, la tinta de plata s'imprimeix com a pista conductora, de manera que un extrem correspon a la part on es dipositarà la tinta de grafit, i l'altre ha de servir de punt de connexió. A continuació la tinta de carboni grafit s'imprimeix com a un rectangle de 6.0 x 4.0 mm² o bé una circumferència de 7.0 mm de diàmetre, que correspondrà a la superfície sensora. Amb la mateixa màscara s'imprimeix una tercera capa amb una mescla que conté tinta de grafit i un 5 % en pes de mediador MB, o bé un 5 % en pes del producte que s'obté de la reacció entre solucions 0.01 M de MB i de la sal de Reinecke⁴⁰. Finalment, la tinta aïllant es diposita cobrint els elèctrodes, excepte la superfície sensora i l'extrem que ha de servir de connexió (vegeu Figura 8.2). El procés de curat ha consistit en mantenir cadascuna de les 4 capes impreses a 45°C durant un parell d'hores.

8.2.2.1.1 Avaluació de la resposta d'elèctrodes de configuració plana que incorporen MB

Com a pas previ s'ha usat la voltamperometria cíclica amb l'objectiu de determinar el potencial de treball dels elèctrodes desenvolupats, emprats com a elèctrode de treball. S'ha omplert la cel·la electroquímica amb 10 ml de tampó fosfat 0.07 M a pH 7.2, i s'han efectuat 10 cicles consecutius de potencial entre -0.8 i 0.8 V. A continuació s'ha addicionat NADH fins assolir una concentració igual a

$2.5 \cdot 10^{-4}$ M, i s'han repetit els 10 cicles de potencial. La velocitat d'escombrat ha estat en tots els casos igual a $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Un cop fixat el potencial de treball, els elèctrodes preparats s'han avaluat mitjançant l'obtenció de corbes de calibració per a NADH, basades en addicionar microvolums d'una solució 0.01 M de NADH a 10 ml de tampó fosfat 0.07 M a pH 7.2, un cop s'ha assolit una intensitat de corrent constant.

A fi de comprovar la viabilitat de l'ús d'aquests elèctrodes per a la determinació de lactat a través de la reacció enzimàtica de l'enzim LDH, s'ha fet un estudi basat en la incorporació de l'enzim LDH en solució quan s'empra un d'aquests elèctrodes com a elèctrode de treball. La cel·la electroquímica s'ha omplert amb 10 ml d'una solució de lactat 0.2 M preparada en el mateix tampó fosfat emprat prèviament, que a més contenia un excés de NAD^+ . A continuació s'han fet addicions de diferents quantitats d'enzim LDH, que han cobert un interval de 0 a 95 U.

8.2.2.2 Preparació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

Per a la preparació del gel de sílice s'han emprat 438 μl de TEOS, 97 μl d'aigua bidestil·lada, 97 μl d'etanol i 7.5 μl d'àcid clorhídric 1 M. La mescla resultant s'ha de mantenir en agitació constant dins la campana de vapors. Un cop han passat uns 50 minuts, s'addicionen al gel de sílice que s'està formant 200 μl de tampó Tris 0.05 M a pH 8.0, 200 μl d'una solució de NAD^+ 0.75 M i diferents quantitats d'enzim LDH. Per últim, una hora després d'haver començat el procés de síntesi, s'afegeixen 0.3 g d'algun compost aglutinant (carboximetil cel·lulosa, poli (vinil alcohol), hidroxietil cel·lulosa, poli (vinil pirrolidona) o GAFQUAT), 0.002 g de mediador MB i 0.015 g de grafit. Immediatament després de la incorporació del grafit en pols, ja es pot procedir a imprimir els elèctrodes amb el compòsit resultant basat en un gel de sílice. Aquesta deposició del gel de sílice que contindrà l'enzim, es realitza amb l'ús d'una màscara metàl·lica que mostra uns petits rectangles foradats que s'han d'encaixar just a sobre de la superfície sensora de cadascun dels elèctrodes construïts prèviament (vegeu Figura 8.2).

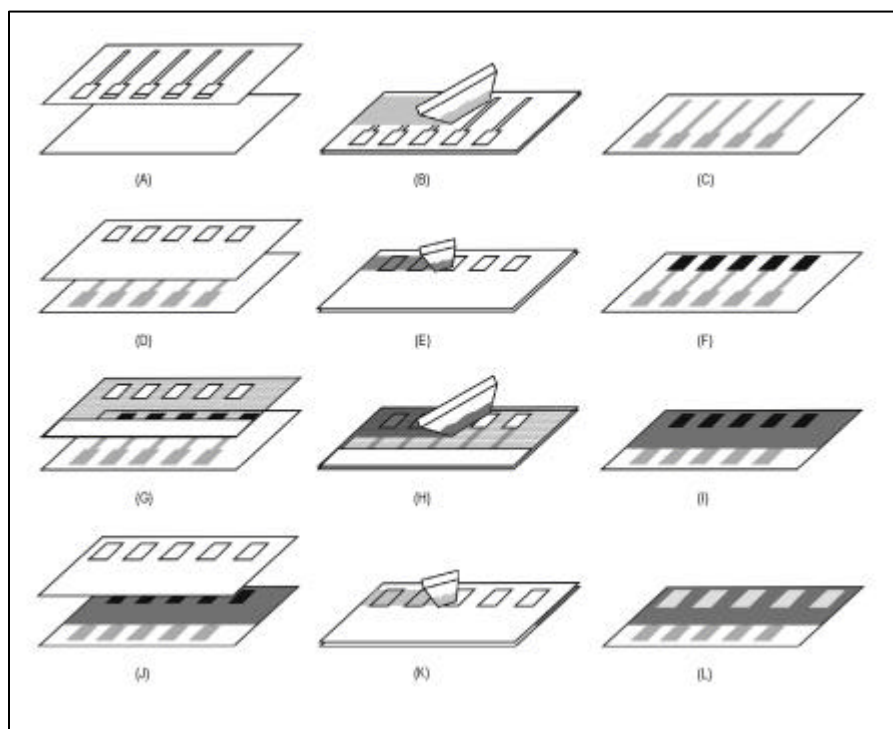


Figura 8.2: Procés de construcció de sensors per tecnologia serigràfica. (A)-(C) Procés d'impressió de les pistes conductores amb tinta de plata; (D)-(F) Procés d'impressió de la superfície sensora amb tinta de carboni grafit, que es repeteix per la mescla preparada amb tinta de grafit i un 5 % en pes de MB; (G)-(I) Procés d'impressió de la capa protectora amb tinta aïllant; (J)-(L) Procés d'impressió del gel de sílice sobre la superfície sensora.

8.2.2.3 Avaluació i optimització de la resposta a lactat

L'avaluació dels elèctrodes preparats ha consistit en l'obtenció de corbes de calibració o mesures puntuals per a lactat, obtingudes quan s'addicionen microvolums de solucions de lactat de diferents concentracions a la cel·la electroquímica que conté tampò fosfat 0.07 M a pH 7.2 o, en els casos en què ha estat necessari, una solució de NAD^+ 0.06 M preparada amb la mateixa solució amortidora. El potencial de treball aplicat ha sigut -0.100 V.

8.2.2.3.1 Optimització de la composició del gel de sílice

Un cop fixades les quantitats de cadascun dels components que han de formar el gel de sílice, es va haver d'addicionar un compost aglutinant a fi de conferir al gel la consistència adequada per a poder ésser imprès. Els polímers emprats com a compostos aglutinants del gel de sílice amb enzim LDH, NAD^+ i mediador MB han estat: carboximetil cel·lulosa al 0.5, 1 i 2 %, poli (vinil alcohol) al 5, 10 i 25 %, i

poli (vinil pirrolidona) al 10 %, hidroxietil cel·lulosa al 3 % i GAFQUAT al 50 %. De tots ells, s'han escollit els que han proporcionat unes propietats físiques més adequades als gels de sílice sintetitzats, adreçades a aconseguir una impressió òptima.

8.2.2.3.2 Optimització de la quantitat d'enzim

S'ha optimitzat la quantitat d'enzim LDH, present a la solució de NAD⁺ preparada en tampó fosfat 0.07 M a pH 7.2, que s'incorpora directament al gel de sílice durant la seva síntesi. Les quantitats d'enzim avaluades van de 30 a 900 U/ml de solució de NAD⁺. En aquest cas l'optimització s'ha fet en funció de la sensibilitat mostrada per a cadascun dels biosensors desenvolupats en vers la seva resposta a lactat, tal com s'ha descrit prèviament.

8.2.2.3.3 Addició d'agents estabilitzants

Els elèctrodes preparats amb el polímer GAFQUAT ja han incorporat des d'un inici un 10 % de lactitol com a agent estabilitzant. D'altra banda, s'ha comparat la resposta que ofereixen biosensors preparats amb hidroxietil cel·lulosa al 3 % amb la quantitat d'enzim LDH optimitzada anteriorment, en absència i en presència de 0.05 g de trealosa, un altre compost de conegut caràcter estabilitzant per a enzims.^{41,42}

8.2.2.3.4 Optimització de la temperatura d'anàlisi

S'ha avaluat la temperatura òptima d'anàlisi per als biosensors desenvolupats, en aquest cas per als que incorporen GAFQUAT com a polímer aglutinant. L'estudi s'ha realitzat mitjançant les sensibilitats corresponents a l'interval de concentracions de lactat que comprèn de $1.25 \cdot 10^{-4}$ a $1.20 \cdot 10^{-3}$ M de les corbes de calibració obtingudes amb els biosensors optimitzats, quan es varia la temperatura de la solució de treball emprada de 25 a 40°C.

8.2.2.3.5 Optimització de la solució amortidora emprada

El següent pas en l'optimització de la resposta per a lactat obtinguda amb els biosensors preparats amb composts basats en gels de sílice que incorporen l'enzim LDH, ha estat l'avaluació de la intensitat mesurada quan s'addiciona lactat, fins a una concentració igual a 0.125 M, a la cel·la electroquímica que conté diferents solucions amortidores com a solució de treball. S'han emprat els biosensors preparats amb hidroxietil cel·lulosa com a compost aglutinant. Les solucions tampó que s'han estudiat han sigut: tampó borat 0.05 M a pH 9.0, tampó glicinat 0.05 M i 0.5 M, ambdós a pH 9.0, tampó fosfat 0.08 M a pH 7.2, tampó carbonat-bicarbonat 0.1 M a pH 10.0 i tampó Tris 0.05 M a pH 8.0.

8.2.2.3.6 Increment de la superfície sensora

Com a una possible via per augmentar la sensibilitat obtinguda amb els biosensors per a lactat desenvolupats, s'ha decidit modificar el disseny dels elèctrodes de configuració plana emprats, amb l'objectiu d'incrementar l'àrea de la superfície sensora. S'han comparat les sensibilitats mostrades pels biosensors, preparats amb GAFQUAT, basats en ambdues configuracions: la rectangular de 24 mm² i la circular de 38 mm².

8.2.2.3.7 Recobriment protector dels elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

A fi d'augmentar l'interval lineal que ofereixen els biosensors optimitzats, s'ha optat per recobrir-los amb diferents quantitats de poliuretà a l'1 %, ⁴³ preparat per dissolució en una mescla de dos dissolvents, tetrahidrofurà i dimetilformamida en una proporció de 98:2. La forma emprada per a dipositar la membrana de poliuretà ha estat mitjançant l'ús d'un aerògraf. Aquest aerògraf s'ha mantingut en una posició determinada, i els diferents lots d'elèctrodes preparats, fixats sobre una superfície circular, han anat girant, quedant exposats a intervals de temps controlats segons la velocitat de gir, a l'aerosol de poliuretà. D'aquesta manera s'ha aconseguit una estratègia reproducible per a l'obtenció de recobriments de poliuretà.

8.2.2.3.8 Estudi de les característiques analítiques

Amb els biosensors que han mostrat les millors característiques de resposta, s'han efectuat corbes de calibració per a lactat que han permès avaluar els següents paràmetres de calibració: sensibilitat, límit de detecció, interval lineal de resposta i reproductibilitat entre 5 elèctrodes preparats de la mateixa manera. Per últim, s'ha realitzat un seguiment de l'estabilitat d'emmagatzematge d'aquests biosensors durant un període de temps d'una setmana. Entre calibracions els biosensors s'han guardat en un lloc sec a 4°C.

8.2.3 DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT

8.2.3.1 Preparació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

Inicialment s'han preparat els compòsits basats en grafit-polisulfona amb els diferents mediadors estudiats (MB, 3,4-DHB, o-PDA i DCPIP) segons la metodologia detallada a § 5.2.4.1. A fi d'incorporar

l'enzim LDH a les membranes de polisulfona que han de recobrir la superfície dels compòsits de grafit-epoxi, s'ha seguit una estratègia basada en aprofitar la inversió de fases que ha de donar lloc a la precipitació de la membrana, per a intercanviar el dissolvent dimetilformamida en què s'ha dissolt la polisulfona sòlida, per una solució aquosa que conté l'enzim LDH. És a dir, s'ha substituït l'aigua bidestil·lada, refredada fins a 4°C, emprada per a provocar la precipitació de la membrana, per una solució aquosa de l'enzim LDH, d'aproximadament 545 U/ml. D'aquesta manera s'afavoreix l'entrada de l'enzim al polímer i llur retenció a l'interior polimèric durant la precipitació. La durada de la inversió de fases ha estat en tots els casos de 35 minuts, temps després del qual la membrana formada s'ha rentat amb aigua en abundància, per eliminar les restes de dissolvent, així com l'enzim, el mediador i el grafit que no hagin quedat ben retinguts.

8.2.3.2 Estudi comparatiu de la resposta a lactat segons l'isozim emprat: M₄ o H₄

S'ha escollit el MB entre tots els mediadors, per a preparar dos tipus diferents de biosensors per a lactat, segons la metodologia exposada a l'apartat anterior. La diferència entre ambdós ha estat la procedència de l'enzim LDH emprat, que ha estat de múscul de conill i de cor de pollastre. Tanmateix, en base al biosensor que ha mostrat les millors característiques de resposta, s'ha desenvolupat un tercer tipus de biosensor equivalent a aquest, però que ahora incorpora NAD⁺ en una concentració igual a 3 mM, a la solució aquosa d'enzim LDH, amb 545 U/ml, que s'ha emprat per a dur a terme la inversió de fases.

8.2.3.3 Avaluació i optimització de la resposta a lactat

L'avaluació dels biosensors desenvolupats s'ha realitzat mitjançant l'obtenció de corbes de calibració consecutives per a lactat, quan s'empra com a solució de treball una solució de NAD⁺ 3 mM, preparada amb tampó fosfat 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.5, o en els casos en què el NAD⁺ ja s'ha incorporat a la membrana de polisulfona, la cel·la electroquímica s'omple amb la solució amortidora sense cap altre compost. El potencial de treball que cal aplicar dependrà en tots els casos del mediador incorporat al biosensor.

8.2.3.3.1 Optimització del temps d'inversió de fases

El procés d'optimització dels biosensors per a lactat basats en membranes de polisulfona que incorporen l'enzim LDH, s'ha realitzat amb aquells biosensors que incorporen MB com a mediador redox. El primer paràmetre a optimitzar relacionat amb la metodologia utilitzada per a la preparació d'aquests biosensors, ha estat el temps de durada del procés d'inversió de fases en què la membrana de polisulfona que està precipitant estarà en contacte amb la solució enzimàtica. S'han estudiat diferents temps que van de 5 minuts a 1 hora.

8.2.3.3.2 *Optimització de la quantitat d'enzim*

Com a segon pas en l'optimització dels biosensors per a lactat basats en membranes de polisulfona, s'ha estudiat la quantitat d'enzim LDH present a la solució que s'empra per a realitzar l'etapa d'inversió de fases que porta a la precipitació de la membrana de polisulfona. Les quantitats d'enzim avaluades han cobert l'interval de 180 a 3645 U/ml.

8.2.3.3.3 *Optimització de la solució amortidora emprada*

Un cop la configuració del biosensor per a lactat ha estat optimitzada, s'ha procedit a cercar la solució amortidora més adequada per ésser usada com a solució de treball. Les solucions tampó avaluades han estat: tampó fosfat 0.05 M de pH 6.5 a 8.0, tampó Tris 0.05 M de pH 7.5 a 8.5, tampó HEPES 0.05 M de pH 7.0 a 8.0 i tampó imidazol 0.05 M de pH 6.5 a 7.5, tots ells amb KCl 0.05 M.

8.2.3.3.4 *Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa*

Per evitar possibles pèrdues de l'enzim des del si de la membrana cap a la solució que l'envolta i, per tant, millorar la reproductibilitat entre corbes de calibració successives, s'han protegit aquestes membranes amb diferents capes protectores. L'estudi s'ha realitzat amb biosensors preparats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb MB i l'enzim LDH, incorporat al polímer durant l'etapa d'inversió de fases. Tanmateix, s'ha inclòs també un biosensor amb NAD⁺ a la membrana de polisulfona, incorporat juntament amb l'enzim LDH, a la mateixa solució emprada per a dur a terme la inversió de fases. Aquests biosensors s'han recobert amb 5 µl de Nafió (4:1, aigua:Nafió), 5 µl d'acetat de cel·lulosa al 2 % o amb una de les 3 capes denses de poliamida preparades amb diferents amines: N-(2-aminoetil)-piperazina, piperazina i 1,3-fenilendiamina, segons el procediment descrit a § 7.2.2.6.3. El biosensor que conté NAD⁺ a la seva configuració, s'ha recobert amb una capa de poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina. L'avaluació dels biosensors finals s'ha basat en l'obtenció de corbes de calibració per a lactat, per a estudiar la seva sensibilitat i, especialment, l'estabilitat d'aquest paràmetre quan s'efectuen corbes de calibració consecutives.

8.2.3.3.5 *Estudi de les característiques analítiques*

S'han caracteritzat els biosensors desenvolupats a partir de membranes de polisulfona amb MB, que incorporen l'enzim LDH i, en alguns casos, el cofactor NAD⁺, recoberts alguns d'ells amb diferents capes protectores, mitjançant l'estudi d'una sèrie de paràmetres d'interès per a futures aplicacions. A fi de conèixer amb més detall el seu comportament, s'han estudiat les seves cinètiques enzimàtiques, d'on s'han extret els valors de la constant aparent de Michaelis per a cadascun dels biosensors preparats.

Aquest paràmetre és un bon indicador de l'afinitat que hi ha entre l'enzim i el substrat i, en definitiva, de la influència que té l'ambient en què es troba l'enzim sobre el seu comportament, car el valor de K_M^{ap} no correspon a una propietat intrínseca de l'enzim, sinó que respon a les propietats de tot l'elèctrode enzimàtic en conjunt. Amb aquest objectiu, s'ha fet un ajust de les corbes de calibració obtingudes experimentalment a les d'una cinètica enzimàtica clàssica de tipus Michaelis-Menten, mitjançant la representació de Lineweaver-Burk, és a dir, dels dobles recíprocs (l'invers de la intensitat de corrent vers l'invers de la concentració de lactat).

A part de la reproductibilitat entre corbes de calibració successives, també és d'especial interès la reproductibilitat entre biosensors preparats seguint el mateix procediment, atès que dona informació sobre el grau de fiabilitat del procés de preparació d'aquests biosensors. Una bona reproductibilitat entre biosensors evitarà haver de fer una calibració inicial per a cadascun d'ells i, per tant, estalviarà temps i reactius. A fi de calcular aquest paràmetre, s'han preparat 3 biosensors de cada tipus, seguint sempre la mateixa metodologia de preparació entre ells, i s'ha efectuat una corba de calibració per a cadascun, que ha permès conèixer llur sensibilitat. La desviació estàndard relativa associada a les sensibilitats dels 3 biosensors, preparats de la mateixa manera, s'ha donat com una mesura de la reproductibilitat de la metodologia de preparació de cada biosensor.

Finalment, s'ha estudiat l'estabilitat d'emmagatzematge de diferents biosensors per a lactat basats en membranes de polisulfona amb MB i enzim LDH que incorporen capes denses de poliamida com a recobriments protectors vers possibles pèrdues de l'enzim per lixiviació. S'ha avaluat la sensibilitat mostrada per a tots ells durant un període de temps d'una setmana, mitjançant l'obtenció de corbes de calibració periòdiques. Entre calibracions els biosensors s'han emmagatzemat en solució tampó a 4°C.

8.2.3.4 Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador

Al Capítol 7 es va estudiar l'efecte catalitzador que té l'enzim Dp sobre l'oxidació mediatitzada del cofactor NADH. En aquest apartat s'ha volgut aprofitar aquesta propietat de l'enzim Dp per aconseguir un increment de la sensibilitat mostrada per tots els biosensors desenvolupats basats en membranes de polisulfona que incorporen MB i l'enzim LDH.⁴⁴ Si bé es va comprovar a § 7.3.1.6.2 que l'enzim es mostra especialment actiu com a biocatalitzador quan s'incorpora com a sòlid en el compost de polisulfona prèviament a la seva precipitació, en aquest cas s'ha volgut estudiar també l'efecte mostrat quan s'incorpora juntament amb l'enzim LDH a la mateixa solució emprada per a dur a terme la inversió de fases. Aquest estudi s'ha realitzat per al biosensor preparat sense cap recobriment i, atès que aquests biosensors requereixen d'una capa protectora per a evitar pèrdues de l'enzim LDH per dissolució, només ha servit per confirmar quina és la millor estratègia d'incorporació de l'enzim Dp a la configuració electròdica.

8.2.3.4.1 Recobriments protectors dels elèctrodes modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims lactat deshidrogenasa i diaforasa

Ambdós enzims, LDH i Dp, han demostrat no quedar ben retinguts a l'interior de la matriu polimèrica que ofereixen les membranes de polisulfona, fet que es veu reflectit en una reducció notable de la sensibilitat mostrada per a corbes de calibració successives efectuades amb els biosensors que incorporen algun d'aquests enzims. Aquest efecte encara es veu més agreujat quan el biosensor avaluat incorpora ambdós enzims a la seva configuració. És per aquest motiu que s'ha decidit avaluar la sensibilitat i, especialment, l'estabilitat dels biosensors per a lactat basats en membranes de grafit-polisulfona que incorporen MB i els enzims LDH, incorporat en la solució emprada per a dur a terme la inversió de fases, i Dp, incorporat com a sòlid al compost inicial de polisulfona prèviament a la seva precipitació, tots ells recoberts amb alguna capa protectora, ja sigui Nafíó o una de les 3 capes denses de poliamida diferents, preparades amb N-(2-aminoetil)-piperazina, piperazina o 1,3-fenilendiamina. Com a paràmetre indicador d'aquesta estabilitat s'han efectuat 3 corbes de calibració successives per a lactat amb cadascun dels biosensors avaluats, a fi de comparar l'evolució de la sensibilitat mostrada per aquestes corbes. Així, el resultat es dona com a una pèrdua de sensibilitat, entre la primera i l'última corba de calibració.

8.2.3.5 Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig

S'ha utilitzat l'espectroscòpia d'infraroig per a l'obtenció d'informació estructural de les membranes de grafit-polisulfona amb MB i enzim LDH, incorporat en la solució emprada per a dur a terme el procediment d'inversió de fases. Les membranes avaluades s'han assecat en un ambient sec durant tot un dia. Les mesures dutes a terme són de reflectància, de manera que la radiació només penetra uns pocs micròmetres al gruix de la membrana.

8.2.3.6 Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

Com a darrer pas, s'ha volgut validar la viabilitat d'imprimir les membranes basades en composts de polisulfona amb MB que incorporen l'enzim LDH, sobre la superfície d'elèctrodes de configuració plana, amb l'objectiu d'ésser implementats en estudis posteriors a sistemes de flux, en què aquest tipus d'elèctrodes són més fàcilment implementables. Així, primerament s'han construït elèctrodes de configuració plana seguint la metodologia emprada a § 8.2.2.1, basada en l'ús de tecnologia serigràfica (*screen-printing process*), però amb algunes petites modificacions. Per començar, les tintes emprades han estat les de la casa Acheson i, en aquest cas, s'han dipositat sobre un suport sòlid de polièster. S'han emprat màscares metàl·liques per a la deposició de les tintes de plata i de carboni-grafit. Aquesta

darrera de nou ha definit una superfície sensora rectangular de 6.0 x 4.0 mm². La tercera capa d'aquests elèctrodes ha estat l'aïllant, que s'ha dipositat amb l'ús d'una màscara de monofilament construïda en poliamida, que ha permès el pas de la tinta per a cobrir tots els elèctrodes i deixar només exposada la superfície sensora i l'extrem que ha de servir de connexió. El procés de curat també ha consistit en deixar cadascuna de les 3 capes impreses a l'estufa a 45°C durant dues hores. Un cop els elèctrodes ja han estat construïts, només queda dipositar la membrana de polisulfona, etapa que s'ha fet també serigràficament, amb l'ús de la mateixa màscara metàl·lica utilitzada per a imprimir la capa corresponent a la superfície de grafit. Aquest pas cal fer-lo amb certa rapidesa a fi de minimitzar el temps que la polisulfona està en contacte amb la humitat ambiental abans d'ésser submergida ràpidament a la solució que conté l'enzim LDH, que ha estat refredada a 4°C, per a dur a terme el procés d'inversió de fases.

La caracterització electroquímica d'aquests biosensors s'ha dut a terme mitjançant l'obtenció de voltamperogrames hidrodinàmics en l'interval de potencial de -0.3 a 0.8 V. S'han enregistrat els voltamperogrames corresponents a una solució de NAD⁺ 3 mM preparada en tampó imidazol 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.0, abans i després d'addicionar lactat fins assolir una concentració de 1·10⁻² M.

Finalment, amb l'objectiu d'avaluar la resposta a lactat, s'han efectuat corbes de calibració successives mitjançant addicions de microvolums de diferents solucions de lactat a la cel·la electroquímica que conté la solució de NAD⁺ esmentada anteriorment, quan s'aplica un potencial de treball de -0.1 V. Aquest estudi s'ha repetit amb biosensors als quals se'ls hi ha aplicat cadascun dels següents recobriments protectors: Nafió, acetat de cel·lulosa o una capa densa de poliamida.

8.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

8.3.1 DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA MODIFICATS AMB GELS DE SÍLICE QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT

L'estudi de diferents compostos aglutinants incorporats als gels de sílice sintetitzats, juntament amb el recobriments dels elèctrodes finals amb membranes de poliuretà, han donat com a resultat materials híbrids, entesos com a una mescla de components orgànics i inorgànics, que permeten arribar a un compromís en què el gel obtingut queda protegit de possibles fractures, alhora que pot ésser fàcilment emprat per a preparar biosensors basats en capes primes, atesa la consistència del gel aconseguida, que retenen millor l'enzim al seu interior⁴⁵.

8.3.1.1 Preparació i avaluació de la resposta d'elèctrodes de configuració plana que incorporen MB

Un cop preparats els elèctrodes de configuració plana que incorporen MB, o bé el producte que s'obté de la reacció entre aquest mediador i la sal de Reinecke, el primer pas ha estat avaluar els voltamperogrames cíclics obtinguts en absència i en presència de NADH per a cadascun d'ells. En ambdós casos apareix un pic d'oxidació ben definit, que clarament s'incrementa quan la solució de treball conté NADH. Aquests pics permeten escollir quins han de ser els potencials de treball òptims emprats per a l'obtenció de corbes de calibració quan s'usen aquests dos tipus de sensors com a elèctrode de treball. A la Figura 8.3 es mostren les corbes de calibració obtingudes quan s'aplica un potencial de treball de 0.06 V per als elèctrodes amb MB, i de 0 V per als que incorporen el producte resultant de la reacció entre el MB i la sal de Reinecke.

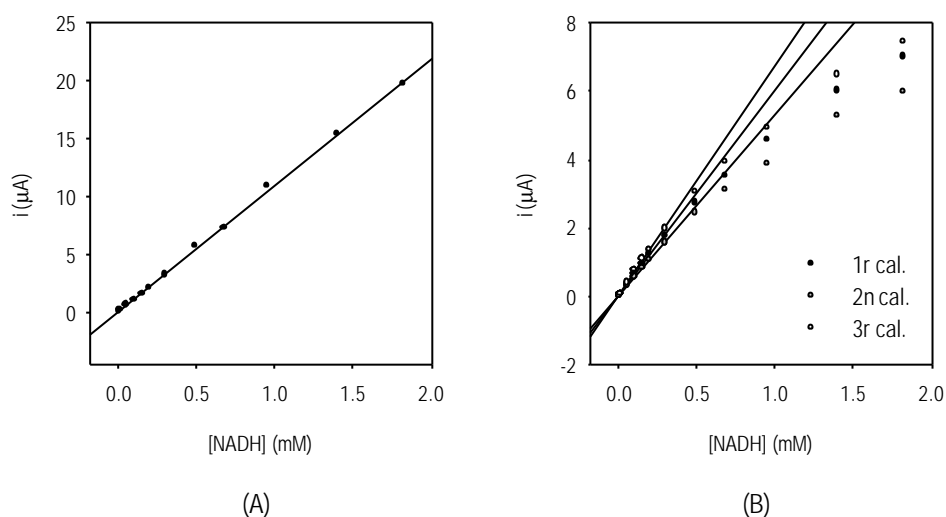


Figura 8.3: Corbes de calibració per a NADH quan l'elèctrode de treball de configuració plana incorpora (A) MB o (B) el producte resultant de la reacció d'aquest mediador amb la sal de Reinecke. El potencial de treball aplicat per a cada tipus d'elèctrode ha estat 0.06 V i 0 V, respectivament. L'interval de concentracions de NADH avaluat va de $1 \cdot 10^{-5}$ M fins a $1.8 \cdot 10^{-3}$ M.

Els elèctrodes que incorporen MB, han mostrat una sensibilitat elevada ($10970 \mu\text{A/M}$), corresponent al pendent de la zona lineal de la corba de calibració efectuada, que en aquest cas cobreix tot l'interval de concentracions de NADH avaluat, és a dir, de $1 \cdot 10^{-5}$ a $1.8 \cdot 10^{-3}$ M. No obstant això, només és possible obtenir una primera corba de calibració amb ells, atès que el mediador es perd ràpidament per dissolució a la solució de treball. En canvi, quan la incorporació del mediador s'ha fet mitjançant el producte resultant de la seva reacció amb la sal de Reinecke, amb els elèctrodes resultants ha estat possible fer calibracions successives sense que s'observi una pèrdua continuada de la sensibilitat, ans al contrari, la variació entre els pendents associats a cada corba de calibració ha estat aleatòria. Malgrat això, aquests elèctrodes manifesten una sensibilitat marcadament inferior (aproximadament

d'uns $6000 \mu\text{A}/\text{M}$) a la zona lineal de les corbes de calibració obtingudes, que en aquest cas comprèn un interval de concentracions força més reduït ($1 \cdot 10^{-5}$ a $3 \cdot 10^{-4}$ M NADH), alhora que la reproductibilitat entre corbes de calibració, tot i ésser aleatòria i no causada per pèrdues del producte que conté el mediador, és massa elevada (RSD= 12 %). Aquests resultats possiblement són conseqüència de dos fets. En primer lloc, atès que tant pel mediador com pel producte resultant de la seva reacció amb la sal de Reinecke, s'ha incorporat un 5 % en pes a la tinta de carboni grafit amb què s'ha recobert la superfície sensora, es dedueix que la quantitat de mediador disponible per a mediatitzar l'oxidació del NADH és superior en els elèctrodes que incorporen el mediador directament. També es pot entendre que la capacitat catalítica del mediador i del producte que conté el mediador amb la sal de Reinecke, és clarament inferior per aquest últim. D'altra banda, si bé la incorporació del producte de reacció entre el mediador MB i la sal de Reinecke assegura una millor retenció del mediador a la configuració electròdica que permet l'obtenció de diverses corbes de calibració successives, cal pensar que els elèctrodes preparats no presenten aquest producte distribuït de forma totalment homogènia a tota la superfície sensora, així com què no tot el producte incorporat mostra la mateixa capacitat catalítica, fets que poden explicar l'obtenció de l'elevat valor de RSD associat als pendents de corbes de calibració successives.

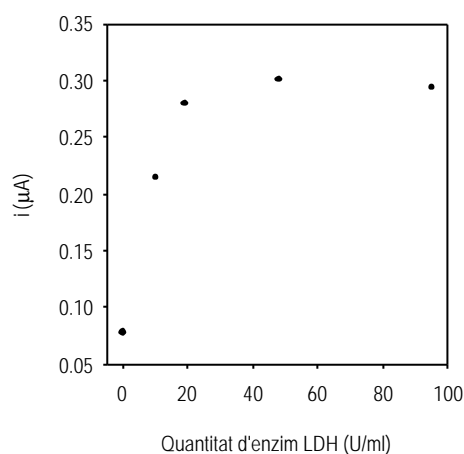


Figura 8.4: Resposta obtinguda quan es fan addicions successives d'enzim LDH a una cel·la electroquímica que conté una solució de lactat 0.2 M, amb un excés de cofactor NAD^+ , preparada en tampó fosfat 0.07 M a pH 7.2. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un elèctrode de configuració plana que incorpora MB. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

La Figura 8.4 ha servit per comprovar la viabilitat de l'ús dels elèctrodes que incorporen MB per ésser emprats en la determinació de lactat basada en la reacció enzimàtica de l'enzim LDH. S'observa com la resposta obtinguda augmenta a mesura que s'incrementa la quantitat d'enzim LDH addicionat a la cel·la electroquímica, fins arribar a un punt, als voltants de 40 U/ml, en què sembla ser que la intensitat

de corrent arriba a un màxim que varia molt poc per a quantitats superiors d'enzim. Això possiblement és degut a què s'ha consumit el lactat que hi havia inicialment a la solució, car el NAD⁺ es trobava en excés, fet que limita l'avenç del procés de biocatàlisi que ha d'efectuar l'enzim LDH.

8.3.1.2 Preparació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

L'elecció de cadascun dels paràmetres implicats en la síntesi de gels de sílice és de gran importància, car les propietats d'aquest material depenen de les proporcions de cadascun dels precursors emprats i de les condicions en què s'ha realitzat la síntesi. Així, per exemple, sovint el primer paràmetre a definir correspon a la proporció d'aigua i precursor de silici. Quan predomina el contingut d'aigua, vol dir que la velocitat d'hidròlisi de l'alcòxid emprat es veurà accelerada, fet que sovint portarà a la formació de xerogels amb un grau de porositat elevat. En canvi, si la proporció d'aigua és baixa en relació a la del precursor de silici, la velocitat d'hidròlisi de l'alcòxid serà més petita i, com a resultat, s'obtidran xerogels densos.^{46,47} A la síntesi realitzada, s'ha escollit una proporció d'aigua:TEOS petita, que ha de portar a l'obtenció de gels poc porosos. El precursor escollit determinarà el caràcter més hidrofòbic o hidrofílic del gel format.⁴⁸ En aquest cas, s'ha usat TEOS, un compost fortament hidrofòbic. També és molt important el tipus i la quantitat de catalitzador que s'empra. Una catàlisi bàsica accelera les etapes d'hidròlisi i condensació, alhora que incrementa la dissolució de les partícules de sílice, de manera que afavoreix l'obtenció de xerogels porosos. D'altra banda, una catàlisi àcida, com l'escollida, provoca la formació de polímers ramificats, que de nou són responsables de l'obtenció de gels densos.⁴⁹ La quantitat de catalitzador emprada es veu directament reflectida en la microestructura que mostra el gel final.⁵⁰ Atès que el derivat de silici emprat com a precursor no és miscible amb aigua, cal addicionar un solvent, com per exemple etanol, que ajuda a homogeneïtzar la mescla durant la polimerització. És molt important controlar la quantitat i el moment d'addició d'aquest solvent, car pot ésser contraproduent en els casos en què es vol incorporar un enzim al gel.⁵¹

Un cop es mesclen tots els precursors i es sotmeten a agitació contínua, comença la primera etapa de síntesi del gel de sílice, corresponent a la formació de partícules col·loïdals que es troben en suspensió (*sol*) (vegeu Figura 6.1). Passats uns 50 minuts aproximadament, s'ha pogut observar com aquestes partícules han iniciat un procés d'agregació, moment en què la viscositat ha començat a incrementar.^{52,53} Just en aquest punt, és quan s'ha addicionat l'enzim, dissolt en tampó juntament amb el seu cofactor.^{54,55} És molt important controlar la temperatura, de manera que cal refredar lleugerament la mescla abans de la incorporació de l'enzim. A més, aquest enzim s'addiciona en una solució amortidora, que serà la responsable de modificar el pH del gel, concretament l'ha d'augmentar, atès que és excessivament àcid, a fi que l'enzim trobi un ambient favorable que no propiciï la seva desnaturalització.^{56,57,58,59,60,61}

Els gels de sílice, a més de proporcionar ambients adequats que protegeixen la integritat dels enzims incorporats, posseeixen les propietats necessàries per a acceptar altres modificadors.⁶² No obstant

això, és la mida de porus la que defineix quines molècules poden ésser incorporades sense perill de pèrdues per lixiviació. En aquest cas s'ha incorporat grafit,^{63,64,65} per aconseguir la conductivitat desitjada, un compost aglutinant que ajuda a homogeneïtzar i a conferir la consistència adequada al gel,⁶⁶ i un mediador redox,^{67,68,69,70} MB, per a mediatitzar l'oxidació del NADH en què es basarà el sistema de detecció per a la determinació de lactat. Atès que les condicions de treball escollides afavoreixen la formació de gels densos, poc porosos, cal pensar que les pèrdues de tots aquests components seran mínimes. Tanmateix, aquesta poca porositat és la que ha permès continuar el treball amb els elèctrodes de configuració plana que incorporen MB enlloc del producte de reacció d'aquest mediador amb la sal de Reinecke, car se suposa que el gel serà capaç de protegir la superfície sensora de les pèrdues d'aquesta espècie, que trobarà aquesta capa densa com a una barrera que li dificultarà la difusió cap a la solució de treball.

8.3.1.2.1 Optimització de la composició del gel de sílice

Inicialment, l'estudi de la composició de cadascun dels components emprats en la síntesi del gel de sílice s'ha realitzat en funció de les propietats físiques mostrades pel material final. Un cop obtingut un gel de sílice que incorporava adequadament l'enzim, el cofactor, el mediador i el grafit al seu interior, es va decidir estudiar l'efecte de l'addició de diferents polímers, adreçats a aconseguir la consistència necessària per a poder imprimir el gel final sobre la superfície sensora d'elèctrodes de configuració plana. En primer lloc, es va descartar la poli (vinil pirrolidona), atès que la seva presència dona com a resultat materials trencadissos que, en lloc de ser incolors com s'espera d'un gel de sílice, són de color blanc, fet que en aquest cas no representa un problema perquè la detecció ha de ser de tipus electroquímic i no òptic. Ara bé, el fet de trencar-se fàcilment representa un greu problema, ja que això és precisament el que pretén evitar l'addició d'un compost aglutinant. Els gels preparats amb carboximetil cel·lulosa tampoc han presentat les propietats físiques desitjades, car per a cap dels percentatges avaluats d'aquest polímer, no s'ha obtingut un material homogeni, característica molt important a fi d'assolir biosensors reproduïbles. Per últim, el poli (vinil alcohol) ha servit per homogeneïtzar els gels, així com per conferir una certa viscositat que permeti imprimir el compost final. No obstant això, totes les mesclures obtingudes amb aquest polímer han mostrat una densitat massa baixa, fet que ha portat a elèctrodes que presenten superfícies sensores poc definides, atès que la impressió amb un gel massa líquid provoca que sigui molt difícil la seva deposició a un espai perfectament confinat. Com a resultat, únicament els gels de sílice preparats amb hidroxietil cel·lulosa al 3 % i GAFQUAT al 50 %, han proporcionat la consistència òptima per a poder ésser impresos de manera que la capa resultant sigui perfectament homogènia, fet que permetrà l'obtenció de membranes de gruix reproduïble, alhora que cobreixi exclusivament l'àrea corresponent a la superfície sensora que deixa exposada la màscara emprada en el procés d'impressió.

8.3.1.2.2 Optimització de la quantitat d'enzim

La Figura 8.5 mostra el perfil de sensibilitats per a elèctrodes preparats amb gels de sílice que incorporen diferents quantitats d'enzim LDH i hidroxietil cel·lulosa al 3 % com a polímer aglutinant. S'observa com s'assoleix un valor òptim de sensibilitat quan s'usa una solució de NAD⁺ amb 200 U/ml per a la preparació del gel de sílice que recobreix els elèctrodes avaluats, atès que són necessàries quantitats d'enzim molt més elevades per a l'obtenció de biosensors que mostrin sensibilitats lleugerament superiors.

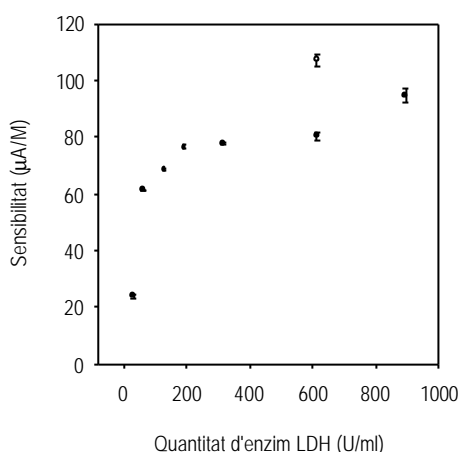


Figura 8.5: Perfil corresponent a l'optimització de la quantitat d'enzim LDH present a la solució de NAD⁺ que s'addiciona al gel de sílice durant la seva síntesi, en funció de la sensibilitat mostrada per cadascun dels biosensors de configuració plana preparats. S'ha emprat hidroximetil cel·lulosa al 3 % com a polímer aglutinant. L'estudi s'ha dut a terme per a biosensors modificats amb gels de sílice que no incorporen cap agent estabilitzant (cercles negres), excepte per a una quantitat d'enzim d'aproximadament 600 U/ml, cas en què s'ha incorporat trealosa (cercle blanc). Cada punt de la gràfica s'ha calculat com a la mitjana de les sensibilitats corresponents a les 4 corbes de calibració obtingudes per a cada biosensor. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm el valor de la desviació estàndard associada. Atès que tots els biosensors contenen MB com a mediador, el potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

8.3.1.2.3 Addició d'agents estabilitzants

Malgrat que els gels de sílice semblen oferir un ambient semblant al que els enzims acostumen a trobar *in vivo*, l'addició d'agents estabilitzants quan els gels incorporen enzims, sovint és necessària si es pretén aconseguir materials que retenguin l'activitat enzimàtica durant un cert període de temps. És més, aquests agents protegeixen l'enzim de la seva desnaturalització durant la pròpia síntesi del gel, així com un cop ja està preparat el biosensor. Quan es treballa amb el polímer GAFQUAT, sempre es recomana addicionar un agent estabilitzant. Així, tots els biosensors preparats amb GAFQUAT han incorporat un 10 % de lactitol com a agent estabilitzant, que ajuda a protegir l'enzim de la seva desnaturalització. Pel que fa als biosensors que incorporen hidroxietil cel·lulosa al 3 % com a compost

aglutinant, la mateixa Figura 8.5 inclou els valors de les sensibilitats obtingudes quan es treballa amb una mateixa quantitat d'enzim LDH, en absència i en presència de trealosa. De la comparació d'aquest paràmetre per ambdós tipus de biosensors, es dedueix l'efecte estabilitzant que proporciona al gel la presència de la trealosa, car la sensibilitat passa d'uns 80 $\mu\text{A}/\text{M}$ en absència de trealosa, a uns 107 $\mu\text{A}/\text{M}$ quan el gel conté aquest sucre. Una possible explicació a aquest efecte, es basa en atribuir l'estabilització a l'efecte protector que confereix la matriu amorfa del sucre a l'enzim.⁷¹

8.3.1.2.4 Optimització de la temperatura d'anàlisi

L'estudi de la temperatura òptima de treball s'ha realitzat amb biosensors preparats amb GAFQUAT al 50 %, com a polímer aglutinant, amb un 10 % de lactitol, emprat com a agent estabilitzant. La resta de paràmetres, inclosa la quantitat d'enzim emprada, s'han mantingut iguals als dels biosensors desenvolupats amb hidroxietil cel·lulosa al 3 %. De nou l'avaluació s'ha fet en base a la comparació de les sensibilitats obtingudes, en aquest cas per a cadascuna de les temperatures assajades. La Taula 8.1 mostra una sensibilitat òptima quan es treballa a 30°C. No obstant això, la diferència que s'obté per a aquest paràmetre quan es treballa a temperatura ambient no és suficient com per justificar la termostatització de la cel·la electroquímica. És per això que es va decidir continuar el procés d'optimització dels biosensors basats en matrius de gels de sílice que incorporen l'enzim LDH per a la determinació de lactat, a temperatura ambient (25°C).

Taula 8.1: Paràmetres de calibració corresponents a les corbes de calibració per a la determinació de lactat, efectuades a diferents temperatures, quan s'empren elèctrodes de treball de configuració plana basats en gels de sílice que incorporen enzim LDH, GAFQUAT com a polímer aglutinant, lactitol com a agent estabilitzant, cofactor NAD⁺ i MB com a mediador. L'interval de concentracions de lactat avaluat va de $1.25 \cdot 10^{-4}$ a $1.20 \cdot 10^{-3}$ M. Cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals, obtinguts per a diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100V.

TEMPERATURA D'ANÀLISI (°C)	PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
25	89	0.9981	6
30	123	0.9998	5
35	119	0.9999	6
40	87	0.9989	6

8.3.1.2.5 *Optimització de la solució amortidora emprada*

L'optimització de la solució amortidora emprada en la preparació de la solució de treball que s'utilitza per a fer les anàlisis amb els biosensors per a lactat desenvolupats, s'ha dut a terme en base a la comparació de les intensitats de corrent obtingudes per a una concentració de lactat 0.125 M quan la cel·la electroquímica conté diferents solucions tampó. Segons els resultats inclosos a la Figura 8.6, la solució Tris 0.05 M a pH 8.0 correspon a la solució amortidora òptima per a ésser emprada com a solució de treball.

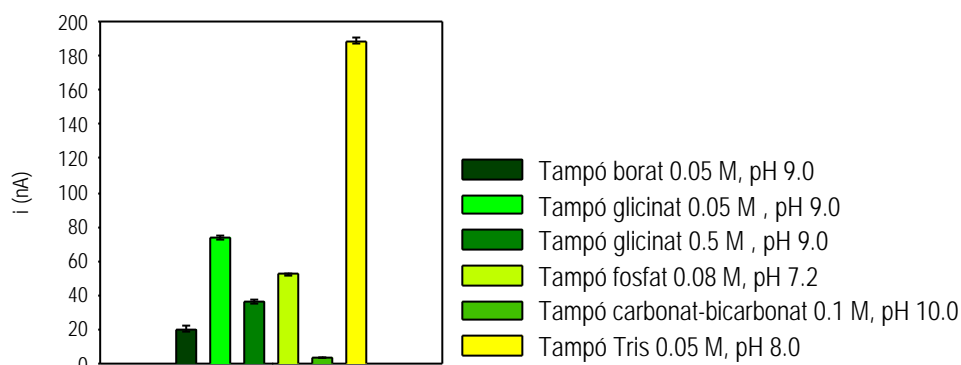


Figura 8.6: Estudi corresponents a l'avaluació de diferents solucions amortidores emprades en la preparació de la solució de treball, quan s'usa com a electrode de treball un biosensor de configuració plana modificat amb un gel de sílice preparat amb una solució de NAD⁺ amb 200 U d'enzim LDH/ml, hidroxietil cel·lulosa al 3 % com a polímer aglutinant i MB com a mediador. L'estudi s'ha basat en la comparació dels valors d'intensitat de corrent obtinguts amb aquests biosensors, quan s'addiciona lactat a cadascuna de les solucions reguladores de pH fins assolir una concentració igual a 0.125 M. Cada valor mostrat al gràfic correspon a la mitjana de 3 valors d'intensitat de corrent obtinguts per a diferents biosensors preparats de la mateixa manera. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm el valor de la desviació estàndard associada. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

8.3.1.2.6 *Increment de la superfície sensora*

De l'optimització de la quantitat d'enzim incorporada al gel de sílice que conté hidroxietil cel·lulosa al 3 %, s'han obtingut biosensors amb una sensibilitat a lactat d'uns 80 μ A/M (vegeu Figura 8.5), mentre que per a l'estudi de la temperatura òptima d'anàlisi, efectuat amb biosensors preparats amb gels de sílice que incorporen la quantitat òptima d'enzim i, en aquest cas, GAFQUAT com a polímer aglutinant, els biosensors resultants han mostrat una sensibilitat a lactat d'uns 90 μ A/M (vegeu Taula 8.1). Per tant, es conclou que ambdós tipus de biosensors, preparats amb hidroxietil cel·lulosa o amb GAFQUAT, mostren sensibilitats a lactat del mateix ordre de magnitud. A més, atès que el valor de sensibilitat per als biosensors amb hidroxietil cel·lulosa correspon als gels de sílice preparats sense lactitol, es dedueix que els resultats obtinguts quan s'incorpora aquest agent estabilitzant han d'ésser pràcticament iguals als obtinguts per als biosensors que incorporen GAFQUAT amb trealosa. Aquests

valors de sensibilitat, però, indiquen que tots els biosensors desenvolupats fins ara, basats en matrius de gel de sílice que incorporen l'enzim LDH, tindrien més aplicacions si fossin més sensibles a lactat. Per aquest motiu, s'ha decidit canviar la configuració dels elèctrodes plans sobre els quals es diposita el gel de sílice, de manera que mostrin una superfície sensora més gran. La Figura 8.7 mostra la comparació de les corbes de calibració obtingudes per a lactat quan s'usen biosensors modificats amb gels de sílice que incorporen GAFQUAT, segons si la configuració de la superfície sensora dels elèctrodes plans emprats és rectangular (24 mm^2) o circular (38 mm^2). L'increment de l'àrea on s'ha dipositat el gel que conté l'enzim LDH, ha permès l'augment de la sensibilitat a lactat des de $81 \mu\text{A/M}$ (RSD= 16 %) fins a $141 \mu\text{A/M}$ (RSD= 14 %), quan es passa de sensors de menor a major superfície sensora. Aquesta diferència és suficient com per continuar l'estudi amb els biosensors que posseeixen una superfície sensora superior.

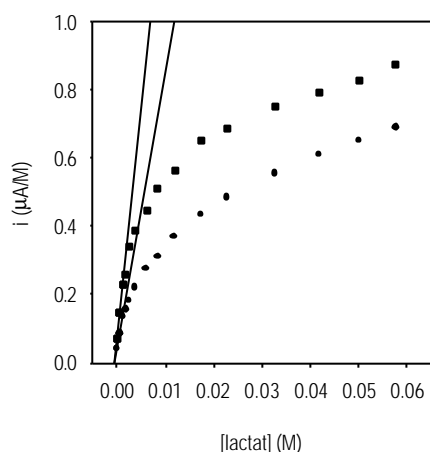


Figura 8.7: Corbes de calibració per a lactat, obtingudes quan s'empren elèctrodes de treball de configuració plana amb diferents àrees de la superfície sensora, 24 mm^2 (cercles) i 38 mm^2 (quadrats). Ambdós tipus de biosensors s'han preparat amb gels de sílice que incorporen l'enzim LDH, el cofactor NAD^+ , el polímer GAFQUAT amb l'agent estabilitzant lactitol i el mediador MB. L'ajust a una recta a la part lineal s'ha fet en l'interval de concentracions de lactat que va de $1.25 \cdot 10^{-4}$ a $1.20 \cdot 10^{-3}$ M. La solució de treball usada ha estat tampó Tris 0.05 M a $\text{pH } 8.0$. Cada corba de calibració correspon a la mitjana de les corbes obtingudes per a 8 elèctrodes diferents preparats seguint el mateix procediment. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V .

8.3.1.2.7 Recobriments protector dels elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

Atès que els biosensors desenvolupats fins ara mostren un interval lineal de resposta a lactat relativament petit, de $1.25 \cdot 10^{-4}$ fins a $1.20 \cdot 10^{-3}$ M, s'ha decidit recobrir els gels de sílice dipositats amb una capa de poliuretà, com a mitjà per a incrementar aquest interval. La Taula 8.2 mostra els

paràmetres de calibració obtinguts quan es treballa amb biosensors basats en matrius de gel de sílice que incorporen GAFQUAT i lactitol, que s'han recobert amb una capa de poliuretà dipositada mitjançant l'ús d'un aerògraf. Els diferents gruixos de les capes de poliuretà s'han controlat en base al volum de solució de poliuretà emprat per a la deposició. S'observa que per a capes primes de poliuretà, la sensibilitat disminueix en relació a l'obtinguda per a un biosensor sense aquest recobriment, possiblement com a conseqüència de la barrera difusional que aquestes capes representen per al lactat que ha d'entrar al gel de sílice. D'altra banda, a mesura que s'augmenta el volum de solució de poliuretà aerografiada, és a dir, a mesura que s'incrementa el gruix de la membrana de poliuretà, la sensibilitat augmenta progressivament. Una possible explicació a aquest fet, es fonamenta en la suposició que la presència de membranes de poliuretà representa una millora de la retenció dels components incorporats al gel de sílice que s'ha imprès sobre els elèctrodes de configuració plana. Aquesta afirmació es troba corroborada per la inspecció visual de tots aquests biosensors preparats amb diferents gruixos de poliuretà. Les fotografies de la Figura 8.8 demostren que la coloració deguda a la presència de grafit i MB incorporats al gel de sílice, és igual per a tots els elèctrodes abans d'ésser emprats, mentre que un cop utilitzats, es fa palesa una millor retenció per als biosensors que posseeixen capes de poliuretà més gruixudes, car mantenen la coloració inicial i, a mesura que disminueix el gruix de la capa de poliuretà, es va perdent progressivament la coloració esmentada. D'altra banda, l'objectiu inicialment plantejat, que feia referència a l'ús de membranes de poliuretà dirigides a incrementar l'interval lineal de resposta, tan sols s'ha aconseguit parcialment, ja que l'augment assolit és mínim ($1.25 \cdot 10^{-4}$ a $2.50 \cdot 10^{-3}$ M).

Taula 8.2: Paràmetres de calibració corresponents a les corbes de calibració per a la determinació de lactat, obtingudes quan s'empren elèctrodes de treball de configuració plana basats en gels de sílice que incorporen enzim LDH, GAFQUAT com a polímer aglutinant, lactitol com a agent estabilitzant, cofactor NAD⁺ i MB com a mediador, que s'han recobert amb diferents volums d'una solució de poliuretà a l'1 % dipositada mitjançant l'ús d'un aerògraf. L'interval de concentracions de lactat avaluat va de $1.25 \cdot 10^{-4}$ a $2.50 \cdot 10^{-3}$ M. La solució de treball usada ha estat també Tris 0.05 M a pH 8.0. Cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals, obtinguts per a diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

VOLUM (ml)	PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
4	34	0.9671	7
8	70	0.9774	9
12	163	0.9984	10
16	247	0.9984	6

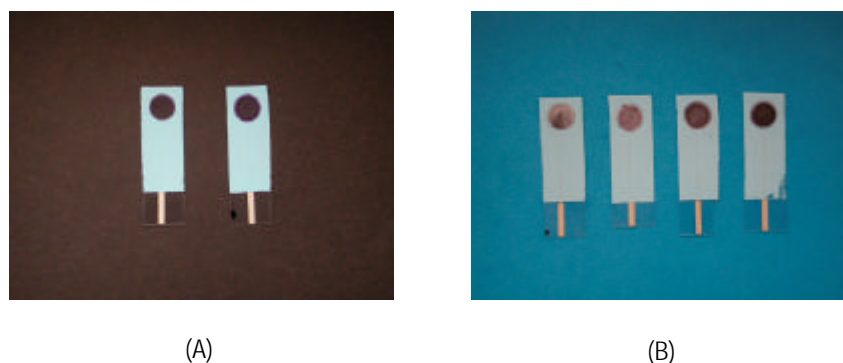


Figura 8.8: Fotografies de diferents biosensors basats en elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen enzim LDH, cofactor NAD^+ , GAFQUAT, lactitol, MB i grafit, recoberts amb membranes de poliuretà de diferents gruixos, (A) abans i (B) després d'ésser emprats. En (A) s'inclouen dos biosensors, un sense (esquerre) i l'altre amb (dreta) recobriment de poliuretà. En (B) tots els biosensors estan preparats amb membranes de poliuretà, que augmenten el seu gruix d'esquerra a dreta.

8.3.1.2.8 *Estudi de les característiques analítiques*

La Taula 8.3 inclou els paràmetres de calibració corresponents a les corbes de calibració per a lactat obtingudes quan s'empren com a elèctrode de treball dos biosensors que s'han preparat seguint tots els paràmetres optimitzats, i que tan sols es diferencien entre ells en el polímer aglutinant i l'agent estabilitzant que han incorporat al gel de sílice, ja sigui GAFQUAT al 50 % amb lactitol, o bé hidroxietil cel·lulosa al 3 % amb trealosa. Ambdós biosensors s'han recobert amb 16 ml de solució de poliuretà a l'1 %, dipositada mitjançant l'ús d'un aerògraf. Els resultats presentats en aquesta taula permeten concloure que el gel de sílice que incorpora GAFQUAT i lactitol possiblement proporciona un ambient més adequat per a l'enzim LDH, fet que es reflexa en unes millors característiques de resposta globals per als biosensors modificats amb aquest tipus de gels.

Finalment, s'ha avaluat l'estabilitat d'emmagatzematge per a dos tipus de biosensors per a lactat, durant aproximadament una setmana, mitjançant el perfil que segueix la sensibilitat per a cadascun d'ells a mesura que passen els dies (vegeu Figura 8.9). S'observa una pèrdua de sensibilitat d'un 36 % per als biosensors preparats amb hidroxietil cel·lulosa al 3 % amb trealosa, sense recobriment de poliuretà, després d'una setmana emmagatzemats en un lloc sec a 4°C. D'altra banda, els biosensors que incorporen GAFQUAT al 50 % amb lactitol i que s'han recobert amb una membrana de poliuretà, han reduït aquesta pèrdua de sensibilitat, per al mateix període de temps, a un 25 %.

Taula 8.3: Característiques de resposta corresponents a les corbes de calibració per a la determinació de lactat, obtingudes quan s'empren dos elèctrodes de treball diferents de configuració plana basats en un gel de sílice que incorpora enzim LDH, cofactor NAD^+ i MB com a mediador, que s'han recobert amb 16 ml d'una solució de poliuretà a l'1 % dipositada mitjançant l'ús d'un aerògraf. La diferència entre ambdós ha estat el polímer i l'agent estabilitzant emprats: GAFQUAT i lactitol per al primer i hidroxietil cel·lulosa i trealosa per al segon, respectivament. L'interval de concentracions de lactat avaluat va de $1.25 \cdot 10^{-4}$ a $2.50 \cdot 10^{-3}$ M. La solució de treball usada ha estat tampó Tris 0.05 M a pH 8.0. Cada valor correspon a la mitjana de 5 valors experimentals, obtinguts per a diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

TIPUS DE BIOSENSOR	PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	LÍMIT DE DETECCIÓ (mM)	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
Modificat amb gel de sílice que incorpora GAFQUAT i lactitol	261	0.11	4
Modificat amb gel de sílice que incorpora hidroxietil cel·lulosa i trealosa	179	0.01	9

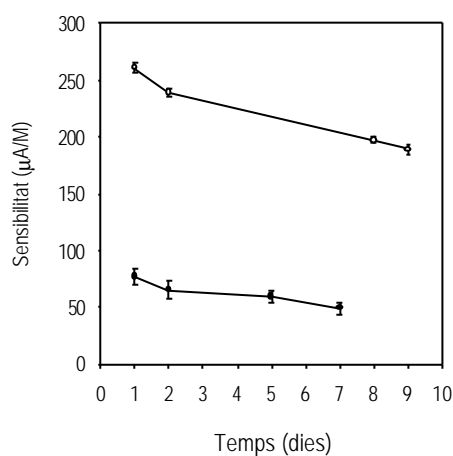


Figura 8.9: Estudi de l'estabilitat d'emmagatzematge dels biosensors basats en elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen enzim LDH, cofactor NAD^+ , grafit i mediador MB. Com a polímer aglutinant i com a agent estabilitzant s'han emprat: GAFQUAT al 50 % i lactitol (cercles blancs) o hidroxietil cel·lulosa i trealosa (cercles negres). Només els biosensors amb GAFQUAT s'han recobert amb una membrana de poliuretà, mitjançant l'ús d'un aerògraf. El volum de solució de poliuretà a l'1 % emprat ha estat igual a 16 ml. La solució de treball usada ha estat tampó Tris 0.05 M a pH 8.0. Cada punt de la gràfica correspon a 3 valors experimentals, obtinguts per a diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm el valor de la desviació estàndard associada. Entre mesures l'elèctrode s'ha emmagatzemat en sec a 4°C . El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

8.3.2 DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPOSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT

8.3.2.1 Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

Les membranes basades en composts de grafit-polisulfona apareixen com a una alternativa atractiva en la cerca d'una matriu adequada per a la incorporació de l'enzim LDH, juntament amb un mediador redox, atesa la seva provada capacitat per a retenir mediadors al seu interior, sense problemes de pèrdues per lixiviació, alhora que ofereixen un ambient en què l'enzim pot trobar certa protecció en front d'una possible desnaturalització.

Taula 8.4: Característiques de resposta corresponents a les corbes de calibració per a la determinació de lactat, obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball biosensors basats en membranes de polisulfona, modificades amb diferents mediadors, que han incorporat l'enzim LDH, de diferents procedències, en la solució aquosa emprada per a la inversió de fases. És en aquesta mateixa solució enzimàtica, amb 545 U/ml, on s'inclou el cofactor NAD⁺, en una concentració 3 mM, incorporat també a un dels biosensors avaluats durant la precipitació de la membrana causada per l'intercanvi de la dimetilformamida per aigua durant la inversió de fases, procés que s'ha efectuat en un temps de 35 minuts. La solució de treball usada ha estat una solució de NAD⁺ 3 mM preparada en tampó fosfat 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.5, excepte per al biosensor que conté el cofactor a la seva configuració, cas en què la cel·la electroquímica s'ha omplert amb la solució amortidora esmentada sense cofactor. L'interval de concentracions de lactat avaluat comença a 1·10⁻⁶ M. Cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals, obtinguts per a diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment.

PROCEDÈNCIA DE L'ENZIM LDH	MEDIADOR REDOX	PRESENCIA DEL COFACTOR NAD ⁺	E _{ap} (V)	INTERVAL LINEAL (M)	PENDENT DE CALIBRACIÓ (μA/M)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
Múscul de conill (M ₄)	MB	A la solució de treball	-0.100	1.0·10 ⁻⁶ – 1.2·10 ⁻⁵	9854	0.9906	2.4
Cor de pollastre (H ₄)	MB	A la solució de treball	-0.100	1.0·10 ⁻⁶ – 1.2·10 ⁻⁵	19206	0.9948	0.5
Cor de pollastre (H ₄)	MB	Incorporat a la membrana	-0.100	1.0·10 ⁻⁶ – 1.0·10 ⁻⁵	4209	0.9937	8.1
Cor de pollastre (H ₄)	3,4-DHB	A la solució de treball	0.300	1.0·10 ⁻⁶ – 2.0·10 ⁻⁵	5546	0.9944	5.6
Cor de pollastre (H ₄)	DCPIP	A la solució de treball	0.120	1.0·10 ⁻⁶ – 1.8·10 ⁻⁵	1924	0.9974	7.4
Cor de pollastre (H ₄)	o-PDA	A la solució de treball	0.275	1.0·10 ⁻⁶ – 1.0·10 ⁻⁵	11062	0.9940	5.2

Ateses les característiques òptimes que mostren les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona, s'ha preparat una sèrie de biosensors per a lactat basats en aquestes membranes, que tan sols difereixen entre ells en el mediador redox que incorporen. De la Taula 8.4, que mostra els paràmetres de calibració obtinguts per a cadascun d'ells, es valida l'ús d'aquestes matrius per al desenvolupament de biosensors per a lactat basats en la incorporació de l'enzim LDH, alhora que es dedueix que els biosensors que incorporen MB com a mediador, són els que presenten una millor sensibilitat a lactat. És per aquest motiu que s'ha decidit continuar l'estudi amb els biosensors que contenen MB a la seva configuració.

8.3.2.2 Estudi comparatiu de la resposta a lactat segons l'isozim emprat: M₄ o H₄

Amb l'objectiu d'estudiar l'efecte que suposa treballar amb enzims LDH de diferents procedències, s'ha treballat amb dos enzims d'origens diferents, un primer de múscul de conill i un segon de cor de pollastre. Ja s'ha explicat a § 8.1 que l'enzim LDH està format per 4 subunitats diferents, que poden ser de dos tipus, H o M, segons si mostren una major afinitat per a reaccionar amb lactat o amb piruvat, respectivament. Atès que interessa un disseny del biosensor basat en membranes de polisulfona amb l'enzim LDH, que afavoreixi la determinació de lactat, s'han preparat dos tipus de biosensors amb una quantitat d'enzim LDH de 545 U/ml, però amb cadascun dels dos enzims LDH esmentats. La mateixa Taula 8.4, que inclou les característiques de resposta per ambdós biosensors, demostra que la resposta mostrada pel biosensor que incorpora l'enzim amb 4 subunitats H, assoleix quasi el doble de sensibilitat que el biosensor que conté l'enzim LDH amb 4 subunitats M, fet que demostra la millor afinitat de l'enzim de cor de pollastre (H₄) pel lactat. Com a resultat d'aquest estudi, s'ha escollit aquest darrer enzim LDH per a continuar el desenvolupament d'un biosensor per a lactat basat en matrius de polisulfona amb enzim LDH. Tanmateix, a la mateixa Taula s'han inclòs els resultats obtinguts per a un biosensor preparat amb aquest enzim, però amb la diferència que també s'ha incorporat el cofactor NAD⁺, mitjançant la solució emprada per a introduir l'enzim durant el procés d'inversió de fases. S'observa com aquest darrer tipus d'elèctrode es caracteritza per presentar un clar empitjorament de la reproductibilitat dels pendents de corbes de calibració per a diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment, alhora que la sensibilitat disminueix notablement en relació als resultats obtinguts quan es treballa amb el cofactor NAD⁺ present a la solució de treball emprada per a fer les determinacions de lactat. No obstant això, la sensibilitat assolida per aquests biosensors és marcadament superior a la que s'havia aconseguit amb els biosensors que contenen l'enzim LDH i el seu cofactor en matrius de gels de sílice. Malgrat tot, el problema d'aquests biosensors continua essent el mateix que ja s'havia trobat per als basats en gels de sílice, és a dir, només permeten un sol ús, car el cofactor NAD⁺ es perd ràpidament per dissolució. Val a dir però, que poden ésser de gran utilitat si s'empenen com a biosensors d'un sol ús, fet que indica que la seva producció massiva mitjançant tecnologia serigràfica serà un pas essencial en el seu desenvolupament.

8.3.2.2.1 Optimització del temps d'inversió de fases

En el procés d'optimització de la metodologia de preparació emprada per als biosensors basats en membranes de polisulfona que incorporen l'enzim LDH, s'ha escollit com a primer paràmetre a estudiar el temps de durada del procés d'inversió de fases en què la membrana de polisulfona que està precipitant estarà en contacte amb la solució enzimàtica. La Taula 8.5, on es presenten els resultats d'aquest estudi, mostra com la màxima sensibilitat s'obté per a un temps d'inversió de fases de 30 minuts. No obstant això, la diferència amb la sensibilitat observada quan el temps d'inversió de fases és de 15 minuts, és suficientment petita com perquè no compensi el fet d'haver de duplicar el temps invertit en aquesta etapa del procés de preparació dels biosensors. Per tant, s'ha decidit aplicar d'ara en endavant temps d'inversió de fases de 15 minuts per a tots els biosensors desenvolupats, basats en membranes de polisulfona.

Taula 8.5: Estudi del temps necessari per a efectuar la inversió de fases, basat en l'avaluació dels paràmetres de calibració corresponents a les corbes de calibració obtingudes per a la determinació de lactat, quan s'empra com a elèctrode de treball diferents còsits de grafit-epoxi recoberts amb membranes de polisulfona, modificades amb grafit, MB i l'enzim LDH. La incorporació de l'enzim s'ha dut a terme amb 200 μ l d'una solució enzimàtica que conté 109 U d'enzim LDH, durant la precipitació de la membrana causada per l'intercanvi de la dimetilformamida per aigua durant la inversió de fases, etapa que s'ha efectuat amb diferents temps de durada. La solució de treball usada ha estat una solució de NAD⁺ 3 mM, preparada en tampó fosfat 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.5. Cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals, calculats a partir de l'ajust de la part lineal de les corbes de calibració, en l'interval de concentracions de lactat que va de $1 \cdot 10^{-6}$ M fins a $9.9 \cdot 10^{-6}$ M, per a diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

TEMPS DE DURADA DE L'ETAPA D'INVERSIÓ DE FASES (min)	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (μ A/M)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
5	7214	0.9931	1.2
10	16289	0.9986	1.2
15	23484	0.9963	1.0
30	25812	0.9964	1.3
40	16409	0.9973	0.6
45	12398	0.9935	1.1
60	13213	0.9929	1.5

8.3.2.2 Optimització de la quantitat d'enzim

Un pas endavant en l'optimització dels biosensors per a lactat basats en membranes de polisulfona, ha estat l'elecció de la quantitat òptima d'enzim LDH present a la solució que s'empra per a realitzar la inversió de fases. La Figura 8.10 recull el perfil de sensibilitats per a diferents biosensors que únicament varien aquesta quantitat d'enzim. Es pot concloure que una quantitat igual a 545 U d'enzim LDH/ml de la solució usada per a la precipitació de la membrana de polisulfona és suficient, atès que els biosensors preparats amb aquesta quantitat d'enzim, assolixen un valor de sensibilitat òptim que sembla estabilitzar-se per a quantitats superiors i que necessita d'un increment molt important de la càrrega enzimàtica per augmentar de forma important.

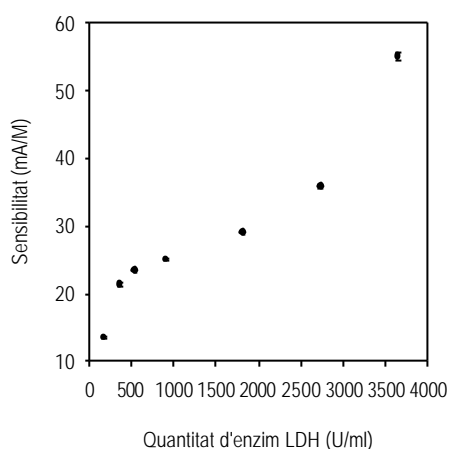


Figura 8.10: Perfil corresponent a l'optimització de la quantitat d'enzim LDH present a la solució aquosa emprada en la inversió de fases que dona lloc a la precipitació de les membranes de polisulfona, en funció de la sensibilitat mostrada per cadascun dels biosensors. Tots els biosensors s'han preparat amb composts de polisulfona que incorporen el mediador MB. Cada punt de la gràfica és el resultat de fer la mitjana de 3 valors de sensibilitat mesurats en l'interval de concentracions de lactat que va de $1.0 \cdot 10^{-6}$ M a $9.9 \cdot 10^{-6}$ M de les corresponents corbes de calibració. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm el valor de la desviació estàndard associada. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

8.3.2.3 Optimització de la solució amortidora emprada

L'optimització de la solució amortidora usada per a la preparació de la solució de treball, així com del seu pH, ha estat una etapa important en el desenvolupament de biosensors que incorporen l'enzim LDH en membranes de polisulfona, car la variació del tipus de tampó i, especialment, del seu pH, poden afectar directament tant a l'activitat enzimàtica com a les característiques del propi mediador de manera que, en aquest darrer cas, poden desplaçar els potencials òptims d'oxidació i reducció i, en definitiva, modificar la seva activitat catalítica. La Figura 8.11, corresponent a la variació de la sensibilitat associada al biosensor per a lactat optimitzat, en funció del tipus de tampó i pH que

s'empren per a la preparació de la solució de treball utilitzada (NAD^+ 3 mM), permet afirmar que l'ús de tampó imidazol 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.0 per omplir la cel·la electroquímica, permet l'obtenció d'una sensibilitat òptima.

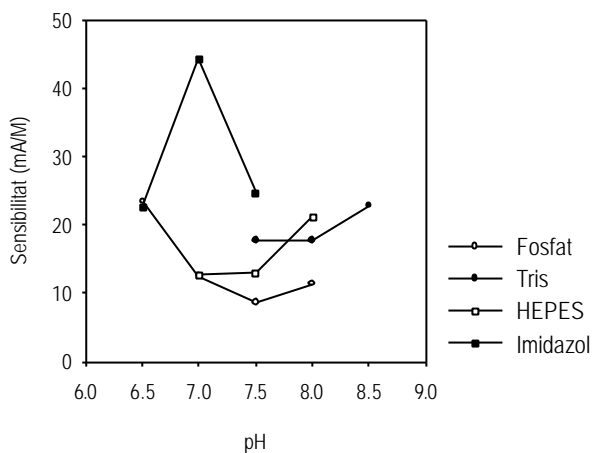


Figura 8.11: Perfil corresponent a l'optimització de la solució amortidora, emprada per a la preparació de la solució de treball, i del seu pH, en funció de la sensibilitat mostrada. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un biosensor basat en una membrana de polisulfona que incorpora el mediador MB i l'enzim LDH present a la solució aquosa emprada en la inversió de fases que dona lloc a la precipitació de la polisulfona. Cada punt de la gràfica és la mitjana de 3 valors de sensibilitat donats pels pendents de les corbes de calibració, en l'interval de concentracions de lactat que va de $1.0 \cdot 10^{-6}$ M a $9.9 \cdot 10^{-6}$ M, obtingudes per a cada solució amortidora emprada en la preparació de la solució de NAD^+ 3 mM corresponent a la solució de treball. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

8.3.2.2.4 Recobriment protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

La Figura 8.12 presenta 3 corbes de calibració successives per al biosensor optimitzat, quan s'empra una solució de NAD^+ 3 mM preparada en tampó imidazol a pH 7.0 com a solució de treball. S'observa com hi ha una progressiva disminució del senyal d'una calibració a la següent, que s'atribueix molt probablement a pèrdues de l'enzim per dissolució.

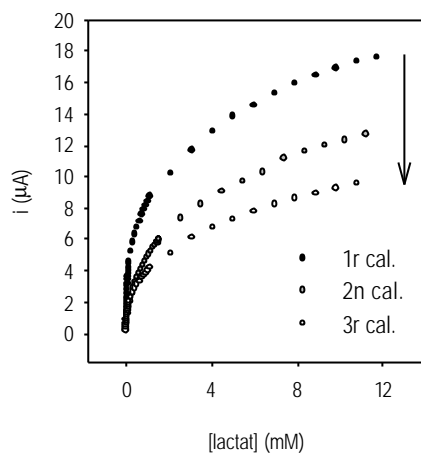


Figura 8.12: Corbes de calibració successives per a lactat obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi recobert amb una membrana de polisulfona amb MB i enzim LDH incorporat durant l'etapa d'inversió de fases que porta a la formació de la membrana. La solució de treball emprada ha estat una solució de NAD^+ 3 mM, preparada en tampó imidazol 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.0. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

A fi de minimitzar aquesta possible llixiviació de l'enzim des del si de la membrana cap a la solució que l'envolta, i aconseguir una bona reproductibilitat entre corbes de calibració successives, s'ha recobert la superfície dels biosensors desenvolupats amb diferents capes protectores: Nafió, acetat de cel·lulosa i 3 poliamides diferents. Les característiques de resposta de tots aquests biosensors, apareixen recollides a la Taula 8.6. S'observa com els biosensors preparats amb les diferents poliamides ofereixen valors de sensibilitat superiors als obtinguts per a biosensors que no inclouen cap recobriment a la seva configuració. Aquest resultat pot ésser interpretat com si la presència d'una capa de poliamida ajudés de forma molt important a la retenció de l'enzim a l'interior de la membrana de polisulfona, retenció que d'altra forma és mínima i, per això, els elèctrodes sense cap capa protectora mostren sensibilitats molt petites. D'altra banda, els biosensors que posseeixen recobriments de Nafió o d'acetat de cel·lulosa no aconsegueixen millorar la retenció de l'enzim al compost de polisulfona, com indica clarament llur valor de sensibilitat, que en aquest cas és inferior a l'obtingut per a un biosensor sense recobriment. Tot això es veu confirmat pels valors de RSD, atès que mentre aquests valors són totalment aleatoris quan es treballa amb capes de poliamida, en el cas de biosensors sense recobriment, com ja s'ha vist, o recoberts amb Nafió o acetat de cel·lulosa, provenen de pèrdues progressives de sensibilitat entre calibracions successives.

L'avaluació dels paràmetres de calibració corresponents als biosensors protegits amb les diferents poliamides, assenyala que el biosensor amb la capa de poliamida preparada amb piperazina, com a precursor, és el que ofereix una major sensibilitat. No obstant això, es considera que els millors resultats són els que proporcionen els biosensors recoberts amb la poliamida que emprava N-(2-aminoetil)-piperazina en la seva síntesi, car la reproductibilitat entre corbes de calibració successives

mostrada és de tan sols un 2 %, valor que confirma una reducció molt important de les pèrdues d'enzim per dissolució.

Per últim, a la mateixa Taula s'inclouen els resultats obtinguts per a elèctrodes que incorporen NAD⁺ a la membrana de polisulfona, en aquest cas recoberts amb una capa de poliamida. Si es comparen aquests resultats amb els obtinguts inicialment per a aquests elèctrodes sense cap recobriment (vegeu Taula 8.4), es confirma un augment destacable de la sensibilitat, tot i que, novament només és possible emprar-los una sola vegada.

Taula 8.6: Característiques de resposta corresponents a diferents biosensors basats en membranes de polisulfona, modificades amb MB i enzim LDH, incorporat en la solució aquosa emprada per a la inversió de fases, i recoberts amb diferents capes protectores. Un dels biosensors avaluats conté el cofactor NAD⁺ a la membrana de polisulfona, espècie que també s'ha incorporat durant la inversió de fases. Com a medi de treball s'ha emprat una solució de NAD⁺ 3 mM preparada en tampó imidazol 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.0, excepte per al biosensor que conté el cofactor a la seva configuració, cas en què la cel·la electroquímica s'ha omplert amb la solució amortidora esmentada. L'interval lineal de concentracions de lactat avaluat va de $1.0 \cdot 10^{-6}$ fins a $1.2 \cdot 10^{-5}$ M. Cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals, obtinguts per a un mateix biosensor, excepte per al biosensor sense recobriment i per al que incorpora NAD⁺ a la seva configuració, casos en què els valors corresponen a la mitjana de 3 valors experimentals obtinguts amb diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment.

RECOBRIMENT PROTECTOR	PRESENCIA DEL COFACTOR NAD ⁺	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A/M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
Sense recobriment	A la solució de treball	44496	0.9976	0.5
Nafió	A la solució de treball	42522	0.9988	84
Acetat de cel·lulosa	A la solució de treball	14339	0.9983	64
Poliàmida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	A la solució de treball	80039	0.9989	2
Poliàmida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	Incorporat a la membrana	14872	0.9975	6
Poliàmida preparada amb piperazina	A la solució de treball	127886	0.9988	9
Poliàmida preparada amb 1,3-fenildiamina	A la solució de treball	46237	0.9980	7

8.3.2.2.5 Estudi de les característiques analítiques

Com a primer paràmetre d'interès per a conèixer detalladament el comportament dels biosensors optimitzats, s'ha estudiat a quin tipus de cinètica enzimàtica responen. La Figura 8.13, corresponent a la representació dels dobles recíprocs de Lineweaver-Burk, en aquest cas l'invers de la concentració de lactat vers l'invers de la intensitat de corrent mesurada, demostra que per a tots els biosensors avaluats, l'ajust a una línia recta és excel·lent, fet que confirma que tots ells segueixen un comportament que respon al model d'una cinètica enzimàtica clàssica tipus Michaelis-Menten. Com a conseqüència és possible calcular, a partir del valor del punt d'intersecció de les rectes obtingudes amb l'eix d'abscisses, els valors de la constant de Michaelis aparent (K_M^{ap}) per a cadascun dels biosensors preparats, valors que s'han inclòs a la Taula 8.7. Aquests valors aporten informació de les propietats de tot el biosensor en conjunt, i no tan sols de l'enzim incorporat. Així, si es comparen els resultats obtinguts segons si els biosensors incorporen o no NAD^+ a la seva configuració, es pot afirmar que la presència del cofactor a la membrana provoca una disminució de la K_M^{ap} , possiblement com a conseqüència d'una millor disponibilitat d'aquesta espècie, car a l'haver-se immobilitzat juntament amb l'enzim LDH, sembla lògic suposar que amb més facilitat es col·locarà a la posició de l'enzim que li pertoca. D'altra banda, quan es comparen aquests valors amb els corresponents per a biosensors recoberts amb algun tipus de capa protectora, es comprova que els valors de K_M^{ap} per a lactat, es veuen molt poc afectats per la presència d'una membrana addicional, fet que porta a pensar que les capes emprades ofereixen per al lactat i per al NAD^+ una resistència a la transferència de masses molt baixa i, per això, la seva presència comporta un increment molt petit de l'interval lineal.

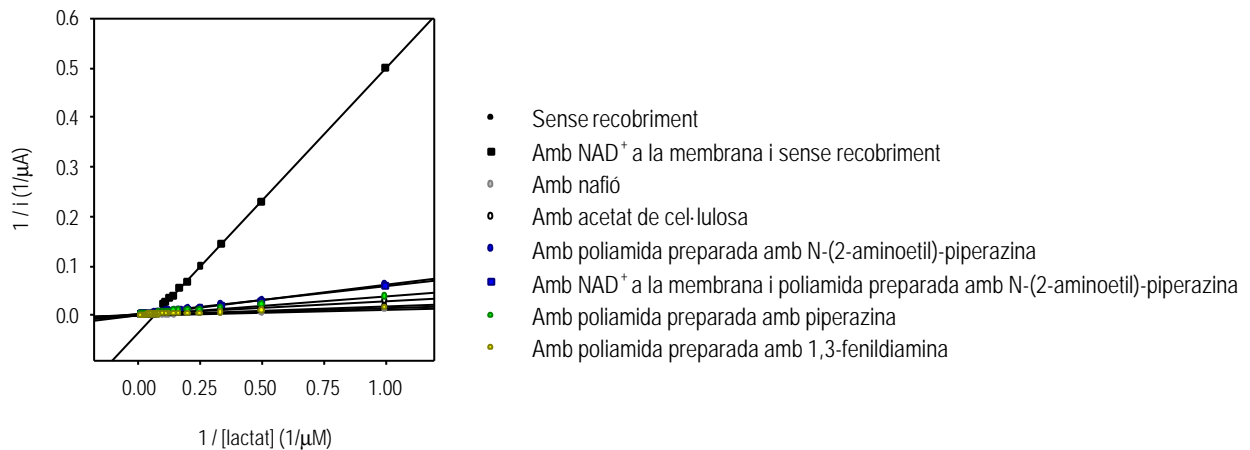


Figura 8.13: Linealització, mitjançant la representació dels dobles recíprocs de Lineweaver-Burk, de les corbes de calibració per a lactat corresponents als paràmetres de calibració presentats a la Taula 8.6.

Taula 8.7: Valors de la constant aparent de Michaelis-Menten, K_M^{app} , calculats a partir de la linealització de Lineweaver-Burk, per a diferents biosensors basats en compòsits de grafit-epoxi recoberts amb membranes de polisulfona que contenen l'enzim LDH i amb diferents recobriments protectors addicionals, quan s'empren per a la determinació de lactat.

RECOBRIMENT PROTECTOR	PRESENCIA DEL COFACTOR NAD ⁺	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	K_M^{app} (μ M)
Sense recobriment	A la solució de treball	0.9990	25
Sense recobriment	Incorporat a la membrana	0.9997	14
Nafió	A la solució de treball	0.9968	37
Acetat de cel·lulosa	A la solució de treball	0.9988	32
Poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	A la solució de treball	0.9980	50
Poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	Incorporat a la membrana	0.9971	33
Poliamida preparada amb piperazina	A la solució de treball	0.9854	23
Poliamida preparada amb 1,3-fenildiamina	A la solució de treball	0.9893	47

També és molt important estudiar la fiabilitat del procés de preparació d'aquests biosensors, atès que no es pot pressuposar l'assoliment de membranes de polisulfona idèntiques, especialment si es considera el fet que la formació de la membrana es duu a terme mitjançant un procediment manual. És per això que s'ha avaluat la reproductibilitat entre biosensors preparats de la mateixa manera (vegeu Taula 8.8). Tots els biosensors basats en membranes de polisulfona que incorporen enzim LDH al seu interior, han mostrat una reproductibilitat molt bona entre biosensors preparats seguint el mateix procediment, paràmetre que empitjora lleugerament quan simultàniament s'ha incorporat també el cofactor NAD⁺ a la membrana. Tanmateix, el recobriment dels biosensors amb una membrana addicional que permeti utilitzar-los durant un període més llarg de temps, dificulta l'obtenció d'una metodologia de preparació reproducible i, per tant, de biosensors reproduïbles. De fet, quan es tracta de membranes de Nafió o d'acetat de cel·lulosa, el procés de preparació emprat és poc reproducible, fet que obligarà en tots els casos a efectuar una calibració inicial per a cadascun dels biosensors preparats, que suposarà un consum inevitable de temps i reactius. En canvi, el procediment molt controlat seguit per a la formació de les diferents capes denses de poliamida, permet obtenir valors de RSD més petits entre biosensors preparats de la mateixa manera, fet que indica que la preparació dels biosensors que incorporen aquest tipus de capes és altament reproducible.

Taula 8.8: Reproductibilitat del procés de preparació de diferents biosensors basats en composts de grafit-epoxi modificats amb membranes de polisulfona que contenen l'enzim LDH, recoberts o no amb diferents capes protectores, quan s'empren per a la determinació de lactat. Cada valor correspon a la desviació estàndard relativa de la sensibilitat de les corbes de calibració obtingudes amb 3 biosensors preparats seguint el mateix procediment.

RECOBRIMENT PROTECTOR	PRESENCIA DEL COFACTOR NAD ⁺	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
Sense recobriment	A la solució de treball	0.5
Sense recobriment	Incorporat a la membrana	0.5
Nafió	A la solució de treball	11
Acetat de cel·lulosa	A la solució de treball	15
Poliàmida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	A la solució de treball	3
Poliàmida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	Incorporat a la membrana	6
Poliàmida preparada amb piperazina	A la solució de treball	2
Poliàmida preparada amb 1,3-fenildiamina	A la solució de treball	5

Finalment, s'ha estudiat l'estabilitat d'emmagatzematge dels biosensors que incorporen capes denses de poliàmida com a recobriments protectors, durant una setmana, període durant el qual els elèctrodes s'han guardat en solució tampó a 4°C. S'ha observat que tots ells perden sensibilitat amb el pas dels dies. Aquestes pèrdues arriben a ser passats 7 dies, de 16, 21 i 44 % respecte de la sensibilitat inicial, per als elèctrodes recoberts amb les poliàmides preparades amb N-(2-aminoetil)-piperazina, 1,3-fenildiamina i piperazina, respectivament.

8.3.2.3 Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador

Amb l'objectiu d'augmentar la sensibilitat mostrada pels biosensors desenvolupats fins ara, basats en membranes de polisulfona amb enzim LDH retingut al seu interior, s'ha incorporat l'enzim Dp, atès el seu demostrat caràcter com a biocatalitzador de l'oxidació mediatitzada del NADH. En primer lloc, s'han avaluat els resultats obtinguts quan l'enzim Dp s'incorpora a la configuració del biosensor mitjançant dues estratègies diferents, ja sigui sòlid al compost de polisulfona prèviament a la seva precipitació o a la solució aquosa que conté l'enzim LDH emprada per a dur a terme la inversió de fases. Els valors corresponents a la sensibilitat inicial mostrada per aquests biosensors, inclosos a la Taula 8.9, confirmen els resultats demostrats a § 7.3.1.6.2, és a dir, que els biosensors preparats mitjançant l'atrapament físic de l'enzim Dp sòlid a la membrana de polisulfona assegura una millor amplificació del senyal a través del procés de bioelectrocatalisi que protagonitza aquest enzim. De tota manera, ja s'ha

vist en els apartats precedents, que els biosensors basats en membranes de polisulfona que incorporen l'enzim LDH necessiten una capa protectora per a evitar pèrdues de l'enzim per dissolució, de manera que els resultats obtinguts només permeten assegurar quina és la millor estratègia d'incorporació de l'enzim Dp a la configuració electròdica, atès que no és possible fer càlculs de reproductibilitat entre corbes de calibració, ja que a les pèrdues de l'enzim LDH s'afegeixen les de l'enzim Dp, de manera que com a resultat s'obtenen disminucions dràstiques del pendent de corbes de calibració successives (vegeu Figura 8.14 (A) i (B)).

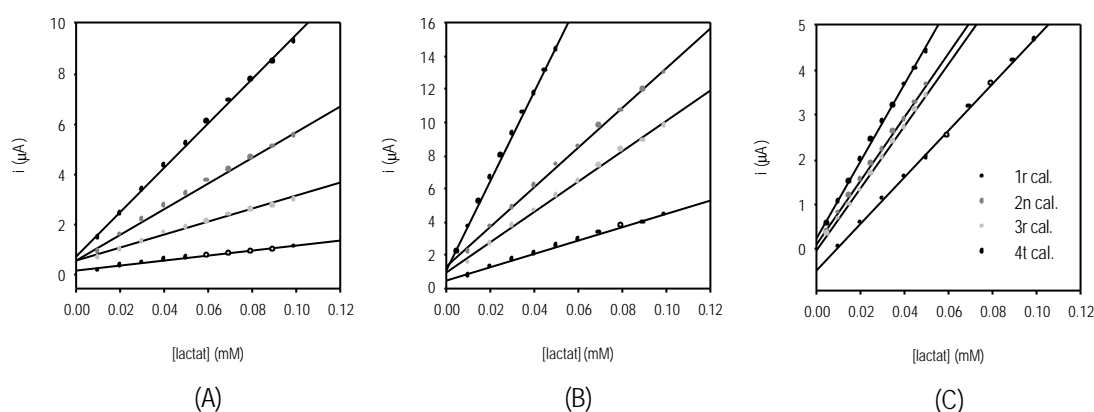


Figura 8.14: Corbes de calibració successives per a lactat obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi modificat amb una membrana de polisulfona que conté els enzims LDH, incorporat durant el procés d'inversió de fases i Dp, incorporat segons dues estratègies diferents: (A) mitjançant la solució aquosa emprada per a la precipitació de la membrana o (B) i (C) liofilitzat al compost inicial de polisulfona prèviament a l'etapa d'inversió de fases que porta a la formació de la membrana. En els casos (A) i (B) els biosensors no posseeixen cap capa protectora, mentre que a (C) el biosensor s'ha recobert amb una capa densa de poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina. Electròlit suport: tampó imidazol 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.0, amb NAD^+ 3 mM. El potencial de treball aplicat ha estat igual a -0.100 V.

8.3.2.3.1 Recobriments protectors dels elèctrodes modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims lactat deshidrogenasa i diaforasa

La Taula 8.9 recull els paràmetres de calibració corresponents als diferents biosensors basats en membranes de polisulfona amb enzim LDH, que han incorporat l'enzim Dp liofilitzat al compost inicial de polisulfona prèviament a la seva precipitació, segons el tipus de capa protectora amb què s'han recobert per intentar evitar o reduir al màxim possible les pèrdues d'ambdós enzims des del si de la membrana cap a la solució de treball. Atès que l'ús de capes denses de poliamida per a la preparació de biosensors que només incorporen l'enzim LDH ha servit per aconseguir una reproductibilitat acceptable entre corbes de calibració successives quan s'empra un mateix biosensor, es confirma que el problema relacionat amb la lixiviació de l'enzim Dp no està totalment solucionat, tal com mostren els

percentatges de pèrdua de sensibilitat inclosos a la Taula 8.9. És més, cal pensar en algun tipus d'interacció desfavorable entre les estratègies d'immobilització emprades per a aquests dos enzims, que possiblement porta a un empitjorament de la retenció d'ambdós, car s'obtenen pèrdues de sensibilitat superiors a les avaluades en presència de només un dels dos enzims. Els biosensors que presenten una capa de poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina semblen ser els que ofereixen un comportament més reproducible entre corbes de calibració successives però, amb tot i això, mostren una pèrdua d'un 18 % de la sensibilitat inicial després de 3 calibracions consecutives (vegeu Figura 8.14 (C)). Per últim, en relació a la fiabilitat del procés de preparació, donada com la reproductibilitat entre biosensors preparats seguint el mateix procediment, s'observa com s'incrementen lleugerament els valors de RSD en comparació als obtinguts per a biosensors que no incorporen l'enzim Dp, possiblement com a conseqüència de la dificultat implícita en la retenció de l'enzim Dp (vegeu Taules 8.8 i 8.9). Com a conseqüència de tots aquests resultats, cal pensar millor en la preparació de biosensors d'un sol ús i, per tant, convé escollir la configuració que ofereixi una sensibilitat òptima, que en aquest cas correspon a la dels biosensors sense cap capa protectora.

Taula 8.9: Característiques de resposta corresponents a diferents biosensors basats en membranes de polisulfona, modificades amb els enzims LDH i Dp, aquest darrer incorporat seguint dues estratègies d'immobilització diferents, i recoberts amb diferents capes protectores. El medi de treball usat ha estat una solució de NAD^+ 3 mM preparada en tampó imidazol 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.0. L'interval lineal de concentracions de lactat avaluat va de $4.0 \cdot 10^{-6}$ fins a $5.0 \cdot 10^{-5}$ M. Cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals de paràmetres associats a corbes de calibració successives per a un mateix biosensor, excepte la reproductibilitat del procés de preparació, que correspon a la mitjana de 3 valors experimentals obtinguts amb diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment. El percentatge corresponent a la pèrdua de sensibilitat s'ha calculat com la pèrdua de pendent de la tercera corba de calibració consecutiva respecte la sensibilitat inicial, és a dir, respecte el pendent de la primera corba de calibració, per a un mateix biosensor.

RECOBRIMENT PROTECTOR	SENSIBILITAT INICIAL ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	PÈRDUA DE SENSIBILITAT (%)	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
<u>Enzim Dp incorporat per inversió de fases</u>				
Sense recobriment	87378	0.9974	70	--
<u>Enzim Dp sòlid a la polisulfona</u>				
Sense recobriment	268745	0.9935	63	7
Nafió	62576	0.9959	24	5
Poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	85314	0.9933	18	4
Poliamida preparada amb piperazina	223874	0.9922	46	5
Poliamida preparada amb 1,3-fenildiamina	176995	0.9983	61	8

8.3.2.4 Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig

Les diferències observades en la comparació dels espectres d'infraroig inclosos a la Figura 8.15 per a membranes de polisulfona amb grafit i MB, sense i amb la incorporació de l'enzim LDH, incorporat durant el procés d'inversió de fases, poden explicar-se en base al tipus de metodologia d'immobilització emprada per a l'enzim i com aquesta afecta a la seva distribució a la membrana. Aquestes diferències es poden resumir en l'aparició d'una nova banda ampla amb pics a 3150 (tensió del N-H dels grups amida) i 2872 (tensió del grup C-H) cm^{-1} , i diversos petits pics nous en l'interval de 1700 a 1600 cm^{-1} , regió on es situen les bandes corresponents al grup carbonil dels enllaços amida típics de l'estructura de les proteïnes (1654 cm^{-1} , tensió dels grups amida). També destaca l'increment dels pics situats a 1078 (C-N) i 612 (N-H amínic) cm^{-1} , tots ells propis d'enllaços amida. La resta de l'espectre resta pràcticament igual a l'espectre que mostra una membrana de polisulfona sense enzims, sense bandes addicionals, ni desplaçaments de bandes. Mentre que com es va exposar a § 7.3.1.6.5, el tipus d'immobilització enzimàtica emprada per a l'enzim Dp, propiciava que aquest enzim es trobés majoritàriament a l'interior del polímer i no a la part més superficial de la membrana, de manera que les mesures de reflectància no eren capaces de detectar la presència d'aquest enzim i, com a resultat, pràcticament no hi havia diferències entre els espectres de membranes que contenien o no enzim Dp, ara la metodologia d'immobilització emprada per a l'enzim LDH, basada en retenir l'enzim durant l'etapa inversió de fases, porta a què quedi part de l'enzim exposat a la superfície de la membrana, a on serà detectat mitjançant les mesures de reflectància. Això pot trobar una explicació lògica en el fet que les interaccions intermoleculares entre el polímer i l'enzim a la membrana es considera que són molt dèbils o, fins i tot, absents.

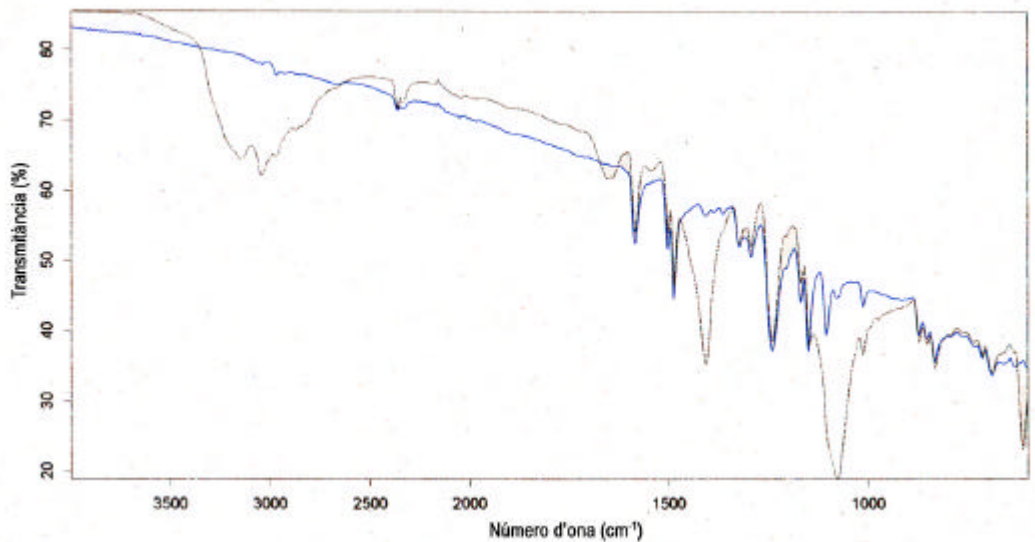


Figura 8.15: Espectres d'absorció en l'infraroig corresponents a diferents membranes de polisulfona: polisulfona amb grafit i MB (línia blava) i polisulfona amb grafit, MB i enzim LDH i (línia negra).

8.3.2.5 Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa

La Figura 8.16 recull els voltamperogrames hidrodinàmics enregistrats en absència i en presència de lactat a la solució de NAD^+ continguda a la cel·la electroquímica, quan s'usa com a elèctrode de treball un dels biosensors per a lactat de configuració plana preparats mitjançant tecnologia serigràfica. S'observa com és possible fer determinacions de lactat amb aquest tipus de biosensors quan s'aplica un potencial de treball de -0.1 V.

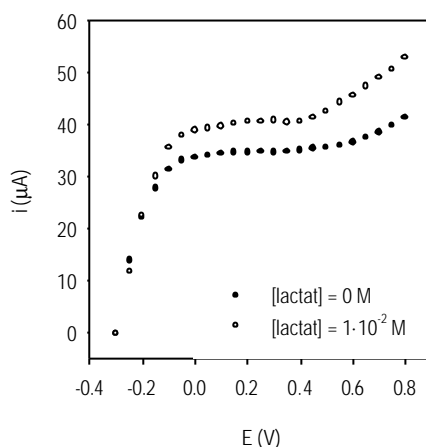


Figura 8.16: Voltamperogrames hidrodinàmics obtinguts quan s'empra com a elèctrode de treball un biosensor de configuració plana basat en una membrana de polisulfona amb grafit i MB que incorpora l'enzim LDH. Els cercles negres corresponen a la solució de treball, mentre que els de color blanc corresponen a la mateixa solució després d'addicionar lactat fins a una concentració de $1 \cdot 10^{-2}$ M. Solució de treball: tampó imidazol 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.0, amb NAD^+ 3 mM.

Les magnituds de les sensibilitats incloses a la Taula 8.10 validen la capacitat dels compòsits de polisulfona per a ésser serigrafats sobre la superfície d'elèctrodes de configuració plana, així com la subsegüent incorporació de l'enzim LDH durant l'etapa d'inversió de fases per a l'obtenció de biosensors plans per a la determinació de lactat. Atès que aquests elèctrodes s'han preparat amb un polímer conductor diferent a l'emprat per a la construcció dels compòsits de grafit-epoxi emprats per a l'optimització realitzada, i a més posseeixen superfícies actives de menor grandària, sembla ésser lògic que els biosensors finals mostrin valors de sensibilitat per a lactat inferiors. D'altra banda, és important remarcar que la reproductibilitat entre corbes de calibració successives obtingudes amb un mateix biosensor, empitjora lleugerament per a tots els tipus de biosensors inclosos a la Taula 8.10. Una possible explicació a aquest fet, es basa en responsabilitzar de la manca de reproductibilitat entre calibracions per a un mateix biosensor a les propietats físiques de la membrana que s'està serigrafant,

car se suposa que aquestes capes són bastant més primes que les dipositades manualment sobre composts de grafit-epoxi, i això pot causar una retenció defectuosa de l'enzim al seu interior. De totes formes, aquests biosensors de configuració plana s'obtenen mitjançant una producció massiva que els hi proporciona el caràcter d'elèctrodes d'un sol ús i, per tant, la manca de reproductibilitat per a corbes de calibració successives no representarà un problema greu, i menys si es té en compte que ara la preparació automàtica permet obtenir biosensors més reproduïbles entre ells que quan es treballava amb una deposició manual.

Taula 8.10: Paràmetres de resposta corresponents a diferents biosensors de configuració plana basats en membranes de polisulfona que incorporen l'enzim LDH, recoberts amb diferents capes protectores. La solució de treball usada ha estat una solució de NAD⁺ 3 mM preparada en tampó imidazol 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.0. Per als biosensors que incorporen capes de poliamida, cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals de pendents obtinguts a partir de corbes de calibració successives per a un mateix biosensor. Per a la resta de biosensors, els valors corresponen a la mitjana de 3 valors experimentals de pendents obtinguts a partir de corbes de calibració realitzades amb diferents biosensors preparats seguint el mateix procediment.

RECOBRIMENT PROTECTOR	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ
Sense recobriment	38048	0.9984
Nafió	8048	0.9937
Acetat de cel·lulosa	16572	0.9933
Poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	37501	0.9969
Poliamida preparada amb piperazina	85024	0.9565
Poliamida preparada amb 1,3-fenildiamina	14407	0.9991

8.4 CONCLUSIONS

De les experiències dutes a terme al present capítol es poden extreure les següents conclusions:

1 S'han desenvolupat biosensors per a lactat que incorporen l'enzim LDH, que han basat el sistema de detecció amperomètrica en el seguiment de l'oxidació del cofactor NADH. Com per a la majoria d'enzims deshidrogenases, aquest tipus de detecció implica una sèrie de problemes relacionats amb la passivació de la superfície electròdica, que cal solucionar amb la incorporació de mediadors redox a la configuració dels biosensors desenvolupats.

2 S'ha demostrat que tant els gels de sílice com les matrius de polisulfona proporcionen un ambient adequat per a la immobilització de l'enzim LDH i, per tant, ambdós poden ésser emprats en el desenvolupament de biosensors per a la determinació de lactat basats en aquest enzim.

3 L'ús d'elèctrodes de configuració plana serigrafiats per a servir de superfície sensora on dipositar membranes basades en gels de sílice, ha permès el desenvolupament de biosensors compactes per a lactat, és a dir, biosensors que incorporen el cofactor NAD⁺ juntament amb l'enzim LDH i el mediador MB, i que poden ésser d'un sol ús, gràcies a que es pot obtenir un gran nombre de biosensors en una sola etapa, mitjançant un procés automatitzat. També s'han preparat altres biosensors que incorporen el cofactor NAD⁺ a la seva configuració, aquest cop basats en membranes de polisulfona. Aquests biosensors mostren valors de sensibilitat a lactat més elevats i permeten fer determinacions de concentracions de lactat més baixes que quan es treballa amb biosensors basats en membranes basades en gels de sílice. De totes formes, ambdós tipus de biosensors, basats en matrius que incorporen el cofactor necessari per a què tingui lloc la reacció enzimàtica, perden aquesta espècie ràpidament per dissolució, atès el caràcter soluble del NAD⁺, fet que els limita a poder ésser emprats només com a elèctrodes d'un sol ús.

4 Pel que fa a les propietats relacionades amb la capacitat de les matrius de gels de sílice i de polisulfona per a formar membranes, ja s'ha esmentat anteriorment que els composts de polisulfona posseeixen la consistència adequada, mentre que els gels de sílice requereixen l'addició d'un compost aglutinant. S'han emprat els polímers GAFQUAT i hidroxietil cel·lulosa que, a més de proporcionar la homogeneïtat necessària als gels de sílice, ajuden a prevenir les fractures típiques d'aquest tipus de materials, alhora que redueixen la capacitat del gel per absorbir aigua i inflar-se com a conseqüència.

5 Malgrat que l'enzim LDH, així com el mediador redox emprat i, en determinats casos, també el cofactor NAD⁺, es poden immobilitzar a les dues matrius avaluades, gels de sílice i polisulfona, s'observa una disminució continuada de la sensibilitat de les corbes de calibració successives, que s'ha atribuït a pèrdues per dissolució d'alguns d'aquests components, fet que impossibilita la reutilització d'un mateix elèctrode per fer varies anàlisis. És per això que s'han estudiat diferents recobriments, essent el poliuretà pel gel de sílice i les poliamides per a la polisulfona, els més adequats. Aquestes membranes incrementen lleugerament l'interval lineal de resposta, mitjançant la limitació que imposen a la transferència de masses. A més, milloren la sensibilitat i la reproductibilitat per ambdós tipus de biosensors. L'explicació a aquest comportament es troba en què aquestes capes protectores actuen com a barrera difusional que, si bé poden dificultar en un cert grau l'entrada de lactat cap a la superfície de l'elèctrode, també dificulten la sortida dels components que formen part de la matriu on es troba l'enzim. Aquest comportament queda reflectit alhora en l'obtenció de valors de K_M^{app} lleugerament superiors als obtinguts en absència de membrana addicional.

6 La incorporació de l'enzim Dp liofilitzat a l'interior de la matriu de polisulfona, que també contindrà l'enzim LDH, ha representat un increment de la sensibilitat per a lactat oferida pels biosensors resultants. No obstant això, els diferents recobriments emprats encara no han permès resoldre els problemes relacionats amb la pèrdua d'aquest enzim per lixiviació.

7 L'estabilitat d'emmagatzematge avaluada durant una setmana, mostra pèrdues de sensibilitat d'un 25 i d'un 16% per a elèctrodes preparats amb gels de sílice i amb polisulfona, respectivament. Per tant, cal adreçar possibles treballs futurs cap a la cerca d'altres agents estabilitzants, a part de la trealosa i el lactitol addicionats als gels de sílice, amb l'objectiu d'incrementar l'estabilitat d'aquests biosensors enzimàtics.

8 Els resultats obtinguts il·lustren que els biosensors basats en membranes de polisulfona que incorporen l'enzim LDH, es preparen mitjançant una metodologia senzilla i reproducible. Aquests biosensors, recoberts amb una capa densa de poliamida, permeten la determinació de lactat a un potencial de treball de tan sols -0.100 V, que ajuda a reduir els problemes de selectivitat causats per la detecció d'espècies interferents, alhora que ofereixen valors elevats de sensibilitat (80 mA/M) i una bona reproductibilitat entre corbes de calibració successives (RSD = 2 %).

9 Finalment, s'ha estudiat la possibilitat de preparar biosensors de configuració plana basats en membranes de polisulfona, mitjançant tecnologia serigràfica. Els resultats obtinguts validen l'adaptació del protocol desenvolupat per a la preparació de biosensors per a lactat amb composts de grafit-epoxi a aquests nous elèctrodes serigrafats. La sensibilitat obtinguda és lleugerament inferior, atès que la superfície sensora dels elèctrodes plans és diferent, tant pel que fa al material com a la grandària. La reproductibilitat entre corbes de calibració successives empitjora notablement, possiblement com a conseqüència de la formació de membranes de menys gruix que no aconsegueixen retenir totalment l'enzim al seu interior. Aquest problema s'ha vist parcialment solucionat per l'aplicació de capes addicionals de poliamida sobre els biosensors preparats, que milloren la reproductibilitat entre corbes de calibració successives a expenses de reduir encara més la sensibilitat. També existeix l'opció d'usar un elèctrode nou per a cada determinació, ja que els biosensors obtinguts de forma automatitzada, han mostrat una bona reproductibilitat en quant a la seva preparació.

10 Els espectres d'infraroig obtinguts s'expliquen en base a la metodologia d'immobilització emprada per a cada enzim. Mentre l'enzim LDH, incorporat en solució durant l'etapa d'inversió de fases, altera l'espectre propi d'una membrana de polisulfona sense enzim, la incorporació de l'enzim Dp no provoca cap modificació. L'explicació es troba en què l'enzim LDH s'incorpora a la membrana mentre aquesta s'està formant, de manera que part de l'enzim queda exposat cap a l'exterior del polímer i, per això és detectat mitjançant mesures de reflectància. En canvi, tal com ja es va veure, l'enzim Dp incorporat com a sòlid al compost inicial de polisulfona prèviament a la seva precipitació, queda majoritàriament retingut a l'interior de la membrana, és a dir, resta invisible a les mesures de reflectància.

8.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ M. Gillis, H. Durliat, M. Comtat. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47** (1996) 11-16
- ² K. Hajizadeh, H. B. Halsall, W. R. Heinman. *Analytica Chimica Acta*, **243** (1991) 23-32
- ³ C. Meyerhoff, F. Bischof, F. J. Mennel. *Biosensors & Bioelectronics*, **8** (1993) 409-414
- ⁴ B. Detry, W. Nullens, M. L. Cao. *European Respiratory Journal*, **11** (1998) 183-187
- ⁵ A. Silber, C. Brauchle, N. Hampp. *Sensors and Actuators*, **B18-19** (1994) 235-239
- ⁶ F. Scheller, N. Siegbahn, B. Danielsson, K. Mosbach. *Analytical Chemistry*, **57** (1985) 1740-1743
- ⁷ J. Bultery, P. R. Pannall. *Clinical Biochemistry*, **20** (1987) 237-239
- ⁸ K. Gawehn. "Lactate Determination with LDH, GTP and NAD". A H. U. Bergmeyer (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie Weinheim and Academic Press. 3a ed. (1984) pp 588-592
- ⁹ J. Nielsen, K. Nikolajsen, J. Villadsen. *Biotechnology and Bioengineering*, **33** (1989) 1127-1134
- ¹⁰ H.-C. Shu, H. Hakson, B. Mattiasson. *Analytica Chimica Acta*, **283** (1993) 727-737
- ¹¹ H.-C. Shu, H. Hakson, B. Mattiasson. *Analytica Chimica Acta*, **300** (1995) 277-285
- ¹² D. B. Pyne, T. Boston, D. T. Martin, A. Logan. *European Journal of Applied Physiology*, **82** (2000) 112-114
- ¹³ J. Kulys, W. Schuhmann, H. L. Schmidt. *Analytical Letters*, **25** (1992) 1011-1024
- ¹⁴ U. Spohn, D. Narasaiah, L. Gorton. *Electroanalysis*, **8** (1996) 507-514
- ¹⁵ U. Spohn, D. Narasaiah, L. Gorton, D. Pfeiffer. *Analytica Chimica Acta*, **319** (1996) 79-90
- ¹⁶ M. Boujtita, M. Chapleau, N. El Murr. *Electroanalysis*, **8** (1996) 485-488
- ¹⁷ J. Wang, Q. Chen, M. Pedrero. *Analytica Chimica Acta*, **304** (1995) 41-46
- ¹⁸ T. Yao, T. Wasa. *Analytica Chimica Acta*, **175** (1985) 301-304
- ¹⁹ M. Montagné, J.-L. Marty. *Analytica Chimica Acta*, **315** (1995) 297-302
- ²⁰ D. Narasaiah, U. Spohn, L. Gorton. *Analytical Letters*, **29** (1996) 181-201
- ²¹ M. Mascini, G. Palleschi. *Selective Electrode Reviews*, **11** (1989) 191-264
- ²² A. E. G. Cass, G. Davis, D. G. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Protkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner. *Analytical Chemistry*, **56** (1984) 667-671
- ²³ P. N. Bartlett, P. Tebbutt, R. G. Whitaker. *Progress in Reaction Kinetics*, **16** (1991) 55-155
- ²⁴ A. Chaubey, K. K. Pande, V. S. Singh, B. D. Malhotra. *Analytica Chimica Acta*, **407** (2000) 97-103
- ²⁵ M. Mascini, S. Fortunati, D. Moscone, G. Palleschi, M. M. Benedetti, P. Fabiatti. *Clinical Chemistry*, **31** (1985) 451-453
- ²⁶ A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox. *Principios de Bioquímica* Barcelona, Ed. Omega. 2a ed. (1993) p 433

- ²⁷ R. A. Cairncross, A. Limbert, L. F. Francis, L. E. Scriven. *Sol-Gel Processing and Applications*. Y. A. Attia (Ed.). New York, Plenum Press (1994) pp 111-118
- ²⁸ K. Ramanathan, M. N. Kamalasanan, B. D. Malhotra, D. R. Pradhan, S. Chandra. *Journal of Sol-gel Science and Technology*, **10** (1997) 309-316
- ²⁹ I. Gill, A. Ballesteros. *Journal of the American Chemical Society*, **120** (1998) 8587-8598
- ³⁰ J. Li, S. N. Tan. *Analytical Letters*, **33** (2000) 1467-1477
- ³¹ S. A. Yamanaka, F. Nishida, L. M. Ellerby, C. R. Nishida. *Chemistry of Materials*, **4** (1992) 495-497
- ³² L. M. Ellerby, C. R. Nishida, F. Nishida, S. A. Yamanaka, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink. *Science Reports*, **255** (1992) 1113-1115
- ³³ S. Sampath, O. Lev. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2015-2021
- ³⁴ J. Li, S. N. Tan, H. Ge. *Analytica Chimica Acta*, **335** (1996) 137-145
- ³⁵ A. N. Watkins, F. S. Ligler. *Analytical Letters*, **33** (2000) 1899-1912
- ³⁶ J. Wang, P. V. A. Pamidi. *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 1171-1175
- ³⁷ B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong. *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 3170-3174
- ³⁸ Y.-D. Kim, C. B. Park, D. S. Clark. *Biotechnology and Bioengineering*, **73** (2001) 331-337
- ³⁹ K. Nakanishi. *Journal of Porous Materials*, **4** (1997) 67-112
- ⁴⁰ B. Gründig, G. Wittstock, U. Rüdell, B. Strehlitz. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **395** (1995) 143-157
- ⁴¹ S. D. Sprules, I. C. Hartley, R. Wedge, J. P. Hart, R. Pittson. *Analytica Chimica Acta*, **329** (1996) 215-221
- ⁴² B. Appleton, T. D. Gibson, J. R. Woodward. *Sensors and Actuators*, **B43** (1997) 65-69
- ⁴³ S. A. Marzouk, V. V. Cosofret, R. P. Buck, H. Yang, W. E. Cascio, S. S. M. Hassan. *ACS Symposium Series (Polymers in Sensors)*, **690** (1998) 66-77
- ⁴⁴ K. Takagi, K. Kano, T. Ikeda. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **445** (1998) 211-219
- ⁴⁵ B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong. *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 3170-3174
- ⁴⁶ J. Li, L. S. Chia, N. K. Goh, S. N. Tan. *Analytica Chimica Acta*, **362** (1998) 203-211
- ⁴⁷ M. D. Petit-Dominguez, H. Shen, W. R. Heineman, C. J. Seliskar. *Analytical Chemistry*, **69** (1997) 703-710
- ⁴⁸ D. A. Nivens, Y. Zhang, S. M. Angel. *Analytica Chimica Acta*, **376** (1998) 235-245
- ⁴⁹ C. McDonagh, B. D. MacCraith, A. K. McEvoy. *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 45-50
- ⁵⁰ A. M. Buckley, M. Greenblatt. *Journal of Chemical Education*, **71** (1994) 599-602
- ⁵¹ S. N. Tan, M. Raci, J. Li. *Chemistry in Australia*, (1997) 2-4
- ⁵² B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 1120A-1127A

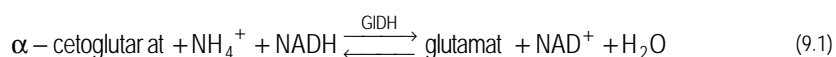
- ⁵³ T. Cass, F. S. Ligler. *Immobilized biomolecules in analysis. A practical approach*. T. Cass, F. S. Ligler (Ed.). New York, Oxford University Press (1998) pp 113-134
- ⁵⁴ A. K. Williams, J. T. Hupp. *Journal of the American Chemical Society*, **120** (1998) 4366-4371
- ⁵⁵ K. J. M. Sandström, J. Newman, A.-L. Sunesson, J.-O. Levin, A. P. F. Turner. *Sensors and Actuators*, **B70** (2000) 182-187
- ⁵⁶ M. M. Collinson, A. R. Howells. *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 702A-709A
- ⁵⁷ X. Wu, M. M. F. Choi, D. Xiao. *Analyst*, **125** (2000) 157-162
- ⁵⁸ P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak, C. M. D. Pandey, I. Tiwari. *Sensors and Actuators*, **B62** (2000) 109-116
- ⁵⁹ B. Lillis, C. Grogan, H. Berney, W. A. Lane. *Sensors and Actuators*, **B68** (2000) 109-114
- ⁶⁰ A. K. Singh, A. W. Flounders, J. V. Volponi, C. S. Ashley, K. Wally. *Biosensors & Bioelectronics*, **14** (1999) 703-713
- ⁶¹ C. Shen, N. M. Kostic. *Journal of the American Chemical Society*, **119** (1997) 1304-1312
- ⁶² D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi. *Chemistry of Materials*, **6** (1994) 1605-1614
- ⁶³ J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park. *Electroanalysis*, **9** (1997) 52-55
- ⁶⁴ I. Pankratov, O. Lev. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **393** (1995) 35-41
- ⁶⁵ J. Wang, D. S. Park, P. V. A. Pamidi. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **434** (1997) 185-189
- ⁶⁶ J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2705-2708
- ⁶⁷ M. Tsionsky, G. Gun, V. Glezer, O. Lev. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 1747-1753
- ⁶⁸ J. Wang, P. V. A. Pamidi, C. Parrado. *Electroanalysis*, **12** (1997) 908-911
- ⁶⁹ J. Li, L. S. Chia, N. K. Goh, S. N. Tan, H. Ge. *Sensors and Actuators*, **B40** (1997) 135-141
- ⁷⁰ S. Bharathi, O. Lev. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **89** (2000) 209-216
- ⁷¹ J. Svitel, M. Stredansky, A. Pizzariello, S. Miertus. *Electroanalysis*, **10** (1998) 591-596

9 DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA

9.1 INTRODUCCIÓ

En un primer estudi, s'ha treballat en el desenvolupament d'un sistema electròdic per a la determinació d'ió amoni. Aquest és un analit d'interès mediambiental, atès que nivells elevats d'aquesta espècie en aigües de riu, poden ésser conseqüència de la seva contaminació d'origen orgànic, ja sigui per residus agrícoles i ramaders o bé per filtracions del clavegueram. L'interès per a la determinació d'ió amoni pot venir també de diversos processos en els quals es veu implicat, malgrat que en aquests casos només serveixi com a indicador de la presència d'altres espècies. Aquest seria el cas de la determinació d'aminoàcids o d'urea, que com es veurà tot seguit per a aquest darrer analit, mitjançant un pas previ d'hidròlisi enzimàtica s'obté una concentració d'ió amoni en solució proporcional a la del substrat de partida.

Durant anys s'han desenvolupat diversos sensors potenciomètrics per a la determinació d'ió amoni, basats en elèctrodes selectius que incorporen nonactina com a ionòfor, és a dir, com a portador mòbil, o en sensors de pH, entre d'altres. Amb l'objectiu d'aconseguir sensors més sensibles i capaços d'arribar a límits de detecció més baixos, s'ha optat per treballar amb detecció amperomètrica, i és per això que s'ha emprat l'enzim *glutamat deshidrogenasa* (GIDH). Aquest enzim permet el desenvolupament de sistemes altament sensibles i selectius, en què la detecció amperomètrica d'ió amoni requereix l'acoblament adequat entre el transductor i la reacció enzimàtica de l'enzim GIDH que implica el consum d'aquest ió.



L'enzim GIDH necessita la presència d'ió amoni i del seu cofactor NADH per convertir el substrat α -cetoglutarat en glutamat. Atesa la reversibilitat d'aquesta reacció de catàlisi, l'enzim GIDH pot ésser útil tant en la determinació d'ió amoni, com en la de glutamat, analit també molt important tant per la seva funció com a neuroexcitador, determinant de certs patrons de comportament (depressió a llarg termini), com pel seu ús com a additiu alimentari per potenciar les aromes (síndrome del restaurant xinès).

A la reacció 9.1 el NADH actua com a donador d'electrons amb l'objectiu de possibilitar l'addició de l'ió amoni al grup carbonil de l' α -cetoglutarat per formar el grup amino del glutamat (aminació reductiva), fet que representa un punt d'enllaç dels metabolismes del C i del N als éssers vius. Com a conseqüència de la seva implicació a un punt clau del metabolisme, aquest enzim esdevé fortament

influenciat per efectes al·lostèrics¹ que regulen la seva activitat. Així, mentre que el ADP (adenosin difosfat) propicia la seva activitat enzimàtica, el GTP (guanosin trifosfat) és un fort inhibidor d'aquesta. En aquest sentit, l'estudi de l'estructura de la GIDH ha fet possible el coneixement d'alguns inhibidors enzimàtics, així com del mecanisme d'inhibició^{2,3} que segueixen. En aquest punt, resulta important la informació obtinguda en relació a l'efecte inhibidor de la urea,⁴ atès que aquest compost pot ésser present en alguns sistemes adreçats a la determinació d'ió amoni, com per exemple, en la hidròlisi de la urea per efecte de l'enzim ureasa que ve detallat més endavant. D'altra banda, l'efecte inhibidor causat per alguns metalls pesants, com el mercuri, i per diversos isoesters de fenotiazines,⁵ incorporats en la composició d'alguns tranquil·litzants, es pot aprofitar per determinar aquestes espècies en funció de la disminució de l'activitat enzimàtica detectada.

L'estructura complexa de l'enzim GIDH procedent de fetge boví correspon a un oligòmer homohexamèric, és a dir, està formada per 6 subunitats idèntiques, amb un pes molecular total de 3360 kDa.

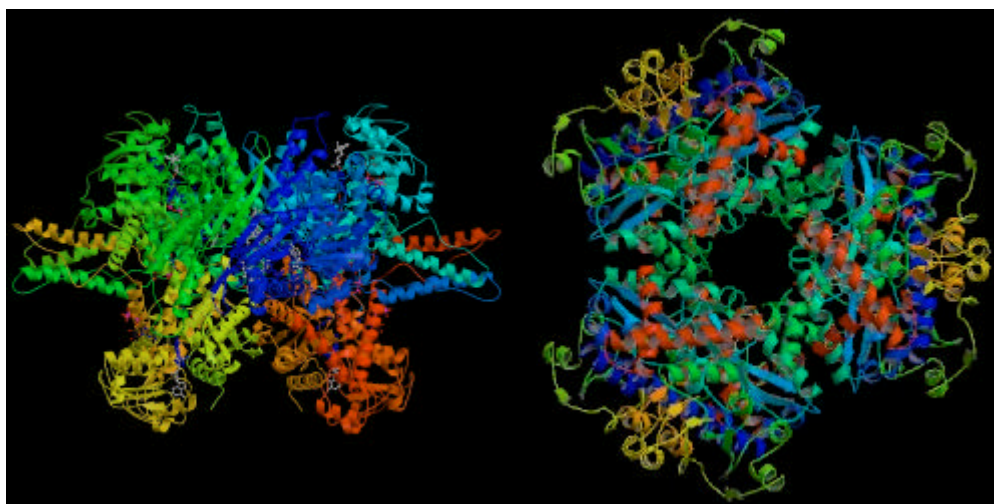


Figura 9.1: Estructures moleculars tridimensionals de l'enzim glutamat deshidrogenasa.

Si bé el seu pes molecular elevat pot facilitar en alguns casos la seva immobilització mitjançant diversos procediments, la seva inestabilitat tèrmica limita el seu ús a unes determinades condicions. Per això s'han avaluat diferents estratègies d'immobilització de l'enzim GIDH sobre la superfície del transductor, amb l'objectiu de cercar els biosensors més sensibles, estables i reproduïbles per a la determinació d'ió amoni.

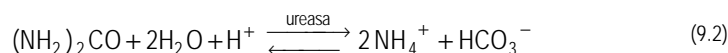
Com a un segon pas en el desenvolupament d'aquest biosensor per a ió amoni, s'ha decidit acoblar una segona reacció enzimàtica que permeti la determinació d'urea. L'anàlisi d'urea és molt important en diferents àrees: química clínica⁶, agricultura, anàlisis d'aliments i de fàrmacs⁷, biotecnologia, assajos de contaminació mediambiental... Existeixen diferents mètodes per a l'anàlisi d'urea, però el més emprat és el basat en la hidròlisi enzimàtica de la urea que té lloc en presència de l'enzim *ureasa*.



Figura 9.2: Estructura molecular tridimensional de l'enzim ureasa.

Aquesta és una reacció molt selectiva, de manera que simplifica molt el tractament de la mostra, fet que facilita una possible posterior automatització. Ara bé, els assajos que empen la reacció de l'enzim ureasa poden basar-se en l'ús de diferents tècniques adreçades a determinar algun dels productes implicats a la reacció⁸, o bé d'alguna propietat química⁹ o física de la solució¹⁰. En uns inicis, aquestes tècniques es basaven principalment en l'ús de procediments espectrofotomètrics, que acostumaven a emprar l'enzim ureasa en solució¹¹. Amb els anys però, es va aprofitar l'acoblament de la reacció catalítica amb diferents transductors, ja fos mitjançant la immobilització de l'enzim en reactors enzimàtics^{12,13} o sobre el mateix transductor, amb l'objectiu de desenvolupar biosensors tèrmics¹⁴, òptics^{15,16}, piezoelèctrics^{17,18}, conductimètrics^{19,20}, amperomètrics^{21,22} i potenciomètrics, ja fossin clàssics^{23,24} o basats en transductors d'efecte de camp (FET)^{25,26}. Els biosensors potenciomètrics han estat els que han atret més atenció, atesa la simplicitat de la seva construcció i la disponibilitat general de la instrumentació necessària per al seu ús. Ara bé, alguns problemes, com la seva resposta lenta, les interferències que representen els ions Na^+ i K^+ quan es treballa amb elèctrodes basats en la detecció de l'ió NH_4^+ i, especialment, la ja esmentada baixa sensibilitat pròpia dels mètodes potenciomètrics, han portat al desenvolupament de diferents elèctrodes amperomètrics per urea. Entre

tots ells, els sistemes basats en l'acoblament de les reaccions dels enzims GIDH i ureasa es mostren com l'opció més interessant.^{21,22} Aquests sistemes consisteixen en la hidròlisi de la urea catalitzada per l'enzim ureasa, reacció de la qual s'allibera NH_4^+ (reacció 9.2) que, segons el que ja s'ha vist per al biosensor d'amoni basat en l'enzim GIDH, reacciona amb α -cetoglutarat en presència de NADH i de l'enzim GIDH. Aquesta seqüència de reaccions es pot seguir mitjançant la mesura de l'oxidació de l'excés de NADH a NAD^+ , tal com ja s'ha fet per al biosensor d'amoni.



A la Figura 2.2 es va mostrar l'esquema del sistema de flux proposat per a la determinació de metalls pesants basat en la inhibició de l'enzim ureasa. L'enzim ureasa es caracteritza per ésser inhibit, entre d'altres espècies, per metalls pesants, fet que s'ha aprofitat en diverses ocasions per al disseny de sistemes per a la determinació d'aquests contaminants.^{27,28} En l'estudi preliminar realitzat, es van emprar dos bioreactors tubulars, un amb ureasa i l'altre amb GIDH, ambdós enzims immobilitzats sobre la paret interna d'un tub de niló, mentre que el sistema de detecció estava format per un transductor de platí. Aquell esquema coincideix amb la seqüència enzimàtica que ara es proposa per al desenvolupament d'un biosensor per a urea. En aquell cas, la presència de dos bioreactors amb enzims separats tenia sentit atès que es pretenia emprar el sistema en base a la inhibició d'un dels dos enzims. Puix que ara l'objectiu és desenvolupar un biosensor per a urea, la tendència habitual adreçada a simplificar els sistemes dirigeix el treball cap a intentar incorporar els dos enzims, GIDH i ureasa, a la configuració d'un mateix elèctrode, que ha de basar el seu sistema de detecció en l'ús de mediadors, en aquest cas, ja siguin electropolimeritzats o incorporats en matrius de polisulfona. La construcció d'aquests biosensors per a amoni i per a urea, és l'objectiu que es planteja per al present capítol.

9.2 EXPERIMENTAL

9.2.1 APARELLS I REACTIUS

9.2.1.1 Aparells

Les mesures d'intensitat de corrent amb aplicació d'un potencial constant s'han realitzat amb l'amperímetre descrit a § 2.2.1.1. L'elèctrode de referència de Ag/AgCl i l'auxiliar de platí emprats també són els esmentats en aquell mateix apartat. Com a elèctrode de treball s'han utilitzat elèctrodes

de configuració convencional modificats, basats en compòsits de grafit-epoxi, i elèctrodes de configuració plana, modificats de la mateixa manera, construïts mitjançant tecnologia serigràfica (*screen printed*) segons la metodologia descrita a § 8.2.3.6. La preparació d'aquests elèctrodes s'ha realitzat amb un sistema d'impressió serigràfica DEK 248.

L'estudi de l'estructura de les membranes de polisulfona amb els enzims GIDH i ureasa mitjançant espectroscòpia d'infraroig, s'ha dut a terme amb l'espectròmetre descrit a § 5.2.1.1.

9.2.1.2 Reactius

Per a la preparació dels compòsits de grafit-epoxi s'han utilitzat els reactius descrits a § 2.2.1.2, mentre que per a la fabricació dels elèctrodes de configuració plana s'han emprat tintes de plata, de grafit i aïllant de la firma comercial Acheson.

Els enzims glutamat deshidrogenasa (GIDH, EC 1.4.1.3) (26 U/mg, liofilitzat), procedent de fetge boví, ureasa (EC 3.5.1.5) de *jack beans*, i diaforasa (Dp, EC 1.8.1.4) d'un extracte de cèl·lules de *Clostridium kluyveri*, la urea i l' α -cetoglutarat han estat subministrats per la casa comercial Sigma. S'ha adquirit una segona solució d'enzim GIDH, de la mateixa procedència però d'una puresa més elevada (53 U/mg, en solució amb 954 U/ml), a la firma Boeringher. La piperazina i la 1,3-fenildiamina provenen de la casa Aldrich i el clorur d'amoni de Panreac. S'ha emprat una membrana de diàlisi, com l'esmentada a § 7.2.1.2 per immobilitzar l'enzim sobre la superfície de l'elèctrode, on també es descriuen els reactius per a la preparació de membranes de Nafió i de poliamida.

La polisulfona, el NADH i els mediadors són els mateixos utilitzats prèviament.

La resta de reactius usats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

9.2.2 DESENVOLUPAMENT DE SISTEMES BIOSENSORS AMB GLUTAMAT DESHIDROGENASA EN SOLUCIÓ PER A LA DETERMINACIÓ D'IÓ AMONI

Inicialment, amb l'objectiu de comprovar l'eficiència de l'enzim GIDH alhora de catalitzar la conversió de l' α -cetoglutarat en glutamat, s'ha incorporat l'enzim en solució a un sistema amperomètric discret. Totes les solucions s'han preparat amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3. Els elèctrodes emprats han estat un compòsit de grafit-epoxi com a elèctrode de treball i els elèctrodes de Ag/AgCl i de platí com a referència i auxiliar, respectivament. La cel·la electroquímica s'ha omplert amb 10 ml de solució que conté NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M i α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M.²⁹ A més, s'han addicionat 58 U d'enzim GIDH. S'aplica un potencial de 0.825 V i un cop s'ha establitzat el sistema, es fan addicions successives de microvolums d'una solució d'ió amoni $1.6 \cdot 10^{-3}$ M.

9.2.2.1 Optimització de la relació entre les concentracions de substrat i de cofactor

Amb la finalitat de poder afirmar que la resposta obtinguda és resultat de la reacció enzimàtica i no de cap altra variable no controlada, s'han realitzat una sèrie d'experiències, que al mateix temps han permès validar la relació entre les concentracions de substrat i cofactor emprades en un primer moment. Per a totes elles s'ha recobert l'elèctrode de treball amb una membrana de diàlisi a fi de poder fer comparacions entre els resultats obtinguts per a cada experiència.

S'ha preparat una solució d' α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i amoni $2.5 \cdot 10^{-3}$ M. S'ha aplicat un potencial de 0.825 V, i després d'esperar l'estabilització del sistema, s'han fet addicions de petits volums d'una solució de NADH $1.6 \cdot 10^{-3}$ M. La repetició d'aquesta experiència, però amb l'ús d'un elèctrode de treball amb aproximadament 1.5 U d'enzim GIDH adsorbides a la seva superfície, ha fet possible constatar l'actuació de l'enzim. Després, s'han efectuat calibracions equivalents, també amb 1.5 U d'enzim sobre la superfície de l'elèctrode, però per a diferents concentracions d'ió amoni ($5 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M i $5 \cdot 10^{-3}$ M) de la solució continguda inicialment a la cel·la electroquímica.

9.2.2.2 Optimització de la quantitat d'enzim

A fi d'obtenir una idea orientativa sobre la quantitat òptima d'enzim que cal dipositar sobre la superfície de l'elèctrode, s'han realitzat calibratges, basats en fer addicions successives d'una solució d'ió amoni $1.6 \cdot 10^{-3}$ M, amb elèctrodes sobre els quals s'han adsorbit diferents quantitats d'enzim GIDH (de 0 a 3 U aproximadament). En tots els casos, la cel·la electroquímica conté inicialment una solució d' α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial aplicat ha estat 0.825 V.

S'ha estudiat l'estabilitat de l'enzim mitjançant calibracions successives d'un dels elèctrodes preparats amb l'enzim adsorbit sobre la seva superfície. A més, a fi d'avaluar l'estabilitat de l'enzim amb el temps un cop retingut a la superfície electròdica mitjançant una membrana de diàlisi, s'han fet calibracions d'un dia per l'altre amb un mateix elèctrode, emmagatzemat en solució durant tota la nit.

9.2.2.3 Incorporació de mediadors electropolimeritzats sobre la superfície del transductor

S'ha realitzat un estudi inicial sobre la viabilitat de l'acoblament entre la reacció enzimàtica de la GIDH i l'oxidació mediatitzada del NADH. Amb aquesta finalitat, s'han adsorbit 20 μ l d'una solució d'o-PDA $1 \cdot 10^{-3}$ M que contenen 1.38 U d'enzim GIDH sobre la superfície d'un compost de grafit-epoxi. S'ha deixat evaporar el dissolvent i s'ha recobert amb una membrana de diàlisi. L'elèctrode resultant s'ha submergit a la solució de treball, que conté el substrat i el cofactor a les concentracions prèviament fixades, amb l'aplicació d'un potencial de 0.400 V i s'ha calibrat amb ió amoni.

Després de confirmar la possibilitat de treballar amb l'enzim i el mediador, ambdós en solució, s'ha passat a estudiar els resultats que s'obtenen quan el mediador s'incorpora al sistema electropolimeritzat sobre la superfície del transductor. S'han seguit dues estratègies: electropolimeritzar

primer el mediador i adsorbir l'enzim sobre la capa polimèrica formada, o bé adsorbir inicialment l'enzim i electropolimeritzar a sobre el mediador.

Pel que fa a la primera estratègia, s'ha electropolimeritzat cadascun dels mediadors sobre la superfície d'un compòsit de grafit-epoxi, segons el procediment optimitzat al Capítol 4, i sobre la pel·lícula polimèrica formada, s'han adsorbit 1.5 U d'enzim GIDH. Després l'elèctrode s'ha recobert amb una membrana de diàlisi i s'ha submergit a la cel·la electroquímica, que conté la solució de treball. Per a cada cas s'ha aplicat el potencial propi del mediador i s'ha calibrat mitjançant addicions d'ió amoni.

Per a la segona estratègia, s'ha electropolimeritzat 3,4-DHB sobre un elèctrode que conté 1.5 U d'enzim prèviament adsorbides. En aquest cas, no s'ha recobert la superfície de l'elèctrode amb una membrana de diàlisi, atès que s'ha considerat que el polímer de mediador actua com a barrera que evita la pèrdua de l'enzim. A fi de discernir que és el que veritablement succeeix quan es tenen l'enzim i el mediador confinats sobre la superfície de l'elèctrode, s'han realitzat calibracions amb aquest elèctrode quan s'apliquen dos potencials diferents, el propi del mediador (0.300 V) i el de l'oxidació directa de NADH (0.825 V).

9.2.3 DESENVOLUPAMENT DE BIOCOMPÒSITS AMB GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'ÍO AMONI

Malgrat la poca estabilitat tèrmica que presenta l'enzim GIDH, a la bibliografia^{30,31,32} apareix descrita la incorporació d'aquest enzim a la matriu d'elèctrodes de pasta de carboni.

9.2.3.1 Preparació dels biocompòsits amb glutamat deshidrogenasa

La preparació dels biocompòsits amb enzim glutamat deshidrogenasa es fonamenta en la metodologia descrita a § 2.2.3.1, si bé un cop mesclats els 3 components, resina epòxica, enduridor i grafit en pols, s'afegeix el percentatge en pes requerit d'enzim liofilitzat. S'han preparat biocompòsits amb els següents percentatges d'enzim: 2 %, 3 % i 4 %. S'ha preparat també un compòsit sense enzim amb la mateixa pasta, amb l'objectiu de poder fer comparacions de resultats amb tota fiabilitat.

9.2.3.2 Avaluació de la resposta a ió amoni

Els biocompòsits de GIDH s'han recobert amb una membrana de diàlisi, a fi d'evitar pèrdues de l'enzim per dissolució i estabilitzar la solució propera a l'elèctrode. Aquests elèctrodes s'han avaluat mitjançant les mesures d'intensitat de corrent que resulten de fer addicions d'una solució d'ió amoni a la mateixa solució de treball emprada en els apartats precedents, quan s'està aplicant un potencial de 0.825 V. S'ha repetit aquesta calibració per a un compòsit sense enzim.

El biocompòsit amb un 4 % d'enzim GIDH s'ha calibrat 3 dies diferents, amb l'objectiu d'avaluar l'estabilitat de l'enzim dins del compòsit amb el temps. Entre calibracions, el compòsit s'ha emmagatzemat en sec a una temperatura de 4°C.

9.2.3.3 Incorporació de mediadors en membranes basades en compòsits de polisulfona

A fi d'incorporar mediadors redox a la configuració electròdica basada en biocompòsits de grafit-epoxi amb GIDH, s'ha escollit l'ús de membranes de polisulfona, que alhora poden representar una barrera a la pèrdua d'enzim des de l'interior del compòsit cap a la solució. S'han recobert els biocompòsits amb un 4 %, un 3 % i un 2 % d'enzim GIDH amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb cadascun dels diferents mediadors estudiats, preparades segons el procediment descrit a § 5.2.4.1. Aquests elèctrodes s'han avaluat mitjançant corbes de calibració successives per a ió amoni, quan s'empra la mateixa solució de treball esmentada prèviament. Per a cada elèctrode s'ha aplicat un potencial de treball obtingut a partir dels voltamperogrames cíclics corresponents, en absència i en presència de NADH.

9.2.4 DESENVOLUPAMENT DE COMPÒSITS AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT EN PRESENCIA DE GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'ÍO AMONI

La retenció de l'enzim GIDH a l'interior de la pel·lícula polimèrica formada durant l'electropolimerització del mediador resulta ésser complexa, atès que la presència de l'enzim a la solució d'electropolimerització, alterarà l'eficiència d'aquest procés.

9.2.4.1 Electropolimerització del mediador en presència de glutamat deshidrogenasa

La presència de l'enzim en solució obliga a treballar amb volums molt petits de solució, degut a l'elevat cost del material enzimàtic. Per això, s'emprarà la mateixa microcel·la que es va descriure a § 7.2.2.5.1 (vegeu Figura 7.5). Com en aquell cas, la xeringa s'omple amb la solució amortidora utilitzada per a cada experiència.

Dels resultats deduïts a § 7.3.1.5.1, es va concloure que el mediador o-PDA és capaç de retenir, durant el seu procés d'electropolimerització, l'enzim glucosa oxidasa. Per aquest motiu, s'ha intentat reproduir el mateix procediment, però amb GIDH enlloc de GOD. S'ha omplert la cel·la amb 200 µl d'una solució 5 mM d'o-PDA en tampó acetat 0.1 M a pH 5.2, amb aproximadament 60 U/ml³³ de l'enzim GIDH i s'ha dut a terme l'electropolimerització mitjançant l'aplicació d'un potencial de 0.650 V durant 15 minuts. Després s'han tornat a realitzar tots els passos descrits, però la solució de treball s'ha preparat amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3. En aquest cas, s'han emprat diferents quantitats d'enzim (30, 150 i 180 U/ml), amb la finalitat de veure com influeix aquest factor en les característiques de

resposta. Per això, s'han realitzat calibratges d'aquests elèctrodes mitjançant addicions d'ió amoni. El potencial de treball ha estat 0.450 V.

També s'han fet proves d'electropolimerització conjunta de l'enzim amb el mediador 3,4-DHB. En aquest cas, inicialment les condicions d'electropolimerització emprades han estat les optimitzades al Capítol 4, corresponents a l'ús d'una solució de 3,4-DHB $1 \cdot 10^{-3}$ M i a l'aplicació d'un potencial de 0.300 V durant 12 minuts. S'ha treballat amb dos tipus d'enzim GIDH amb diferent grau de puresa. Les quantitats assajades amb l'enzim GIDH de menys puresa, corresponent a l'emprat prèviament, han estat 0, 50 i 90 U/ml. I amb la nova solució d'enzim GIDH de puresa més elevada, s'han avaluat les següents quantitats presents a la solució d'electropolimerització: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 i 400 U/ml. A més dels calibratges obtinguts per a tots aquests elèctrodes quan es fan addicions d'ió amoni, també s'ha estudiat la resposta a NADH que presenta l'elèctrode preparat a partir de la solució que conté 50 U/ml de l'enzim de menys puresa respecte a l'obtinguda per a un compost de grafit-epoxi sense modificar i per a un altre amb 3,4-DHB electropolimeritzat a la seva superfície. També s'ha avaluat aquesta resposta a NADH per a tots els elèctrodes preparats amb l'enzim GIDH de més puresa. En tots els casos el potencial de treball aplicat ha estat 0.300 V.

Per últim, s'han estudiat diferents protocols per a la preparació d'aquests elèctrodes, emprant la quantitat d'enzim optimitzada, basats en diferents temps d'electropolimerització del mediador 3,4-DHB sol, en combinació amb diferents temps d'electropolimerització del mediador en presència de l'enzim GIDH. Els resultats obtinguts es comparen amb els corresponents per a un elèctrode amb mediador electropolimeritzat i una segona capa amb l'enzim retingut durant l'electropolimerització de pirrol. Aquest procés d'electropolimerització s'ha realitzat amb l'aplicació d'un potencial de 0.95 V durant 30 minuts quan s'empra una solució de pirrol preparada amb 70 μ l de pirrol en 1 ml de solució amortidora que conté la quantitat d'enzim GIDH òptima.

9.2.5 DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'ÍO AMONI

9.2.5.1 Preparació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa

Els composts basats en grafit-polisulfona amb cadascun dels mediadors estudiats, s'han preparat segons la metodologia descrita a § 5.2.4.1, si bé ara s'ha incorporat també l'enzim GIDH. Amb l'objectiu de què les membranes finals continguin aquest enzim, s'han seguit dues estratègies diferents. La primera estratègia s'ha basat en la mescla de 2 mg de l'enzim GIDH liofilitzat (aproximadament 84 U) a la solució inicial de polisulfona amb grafit i mediador. A continuació s'ha procedit amb la metodologia habitual per a la formació de la membrana sobre la superfície del compost de grafit-epoxi. La segona

estratègia ha incorporat l'enzim a la membrana de polisulfona durant el procediment d'inversió de fases. En aquest cas, enlloc d'aigua bidestil·lada, s'ha emprat una solució aquosa de l'enzim GIDH, d'aproximadament 0.477 U/ μ l, refredada fins a 4 °C, per a la inversió de fases, de manera que l'enzim entra al polímer dissolt en l'aigua que s'ha d'intercanviar per la dimetilformamida per què la polisulfona precipiti. En ambdós casos s'ha escollit 15 minuts com a temps de durada de la inversió de fases, atenent als resultats obtinguts a § 8.3.2.2.1. Un cop la polisulfona ha precipitat per formar la membrana, aquesta es renta amb aigua en abundància, per eliminar les restes de dissolvent, així com l'enzim, el mediador i el grafit que no hagin quedat ben retinguts.

9.2.5.2 Avaluació i optimització de la resposta a ió amoni

Tots els elèctrodes preparats s'han avaluat mitjançant l'obtenció de corbes de calibració consecutives per a ió amoni, quan s'empra la solució de treball descrita anteriorment i s'aplica un potencial de treball que dependrà del mediador incorporat al biosensor.

9.2.5.2.1 Optimització de la quantitat d'enzim

En primer lloc, s'ha optimitzat la quantitat d'enzim GIDH present a la solució emprada per dur a terme el procés d'inversió de fases que porta a la precipitació de la membrana de polisulfona, atès que s'ha comprovat que aquesta estratègia d'incorporació de l'enzim a la polisulfona ofereix els millors resultats. Les quantitats d'enzim avaluades van de 50 a 400 U/ml.

9.2.5.2.2 Optimització de la solució amortidora emprada

S'han estudiat diferents solucions amortidores, així com diferents valors de pH per a aquestes, amb l'objectiu d'obtenir una resposta òptima del biosensor desenvolupat per a ió amoni. Les solucions tampó que s'han provat han estat: tampó fosfat 0.05 M de pH 6.5 a 8.0, tampó Tris 0.05 M de pH 7.5 a 8.5, tampó HEPES 0.05 M de pH 7.0 a 8.0 i tampó imidazol 0.05 M de pH 6.5 a 7.5, tots ells amb KCl 0.05 M.

9.2.5.2.3 Estudi de les característiques analítiques

Un cop obtingut el biosensor que mostra un comportament òptim, s'ha intentat caracteritzar mitjançant l'estudi d'una sèrie de paràmetres que poden aportar informació important en relació a la seva posterior aplicació. Inicialment, s'ha estudiat la seva cinètica enzimàtica, d'on s'han calculat els valors de la constant aparent de Michaelis per a cadascun dels biosensors preparats amb els diferents mediadors. En realitat, tal com ja s'ha descrit prèviament pel fet d'ésser un enzim al·lostèric, resulta ésser més correcte designar aquesta constant com a $K_{0.5}^{app}$. Els valors d'aquest paràmetre poden ajudar a

entendre més acuradament en quin tipus d'ambient es troba l'enzim retingut a la membrana de polisulfona. Amb aquest objectiu, s'ha estudiat el grau de correspondència de les corbes de calibració obtingudes a les d'una cinètica enzimàtica clàssica de tipus Michaelis-Menten, mitjançant l'ajust de la representació de Lineweaver-Burk, és a dir, dels dobles recíprocs (l'invers de la intensitat de corrent vers l'invers de la concentració d'ió amoni).

D'altra banda, a més dels valors de reproductibilitat entre corbes de calibració successives, paràmetre que ja s'ha calculat anteriorment, també interessa saber com de reproducible és el procés de preparació d'aquests biosensors, de manera que s'han efectuat corbes de calibració amb 8 biosensors diferents preparats de la mateixa manera. S'ha utilitzat la desviació estàndard relativa associada als pendents mesurats per a totes les corbes de calibració obtingudes, com a mesura de la reproductibilitat de la metodologia de preparació d'aquests biosensors.

També s'ha estudiat l'estabilitat d'emmagatzematge associada a aquests biosensors durant un període de 8 dies. Amb aquesta finalitat, s'han dut a terme corbes de calibració amb un mateix biosensor, que s'ha emmagatzemat en aigua bidestil·lada a una temperatura de 4°C tot el temps que no s'ha estat usant.

9.2.5.3 Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador

Atès que ja es va demostrar al Capítol 7 que l'enzim Dp catalitza l'oxidació del cofactor NADH, especialment quan s'incorpora com a sòlid en el compòsit de grafit-polisulfona amb MB prèviament a la seva precipitació, s'ha optat per incorporar-lo, seguint aquest procediment, als biosensors per a ió amoni desenvolupats. Els biosensors resultants s'han avaluat mitjançant l'obtenció de corbes de calibració successives per a ió amoni.

9.2.5.3.1 *Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i diaforasa*

A § 7.3.1.6.2 es va comprovar com els biosensors que incorporen l'enzim Dp a les membranes de polisulfona, veuen reduïda la seva sensibilitat entre corbes de calibració successives, possiblement com a conseqüència de pèrdues de l'enzim des del si de la membrana cap a la solució que l'envolta. Atès que aquest comportament es repeteix per als biosensors que a més incorporen l'enzim GIDH, s'ha repetit l'estudi realitzat amb diferents capes protectores adreçades a evitar aquestes pèrdues de l'enzim Dp. S'ha treballat amb biosensors preparats amb membranes basades en un compòsit de grafit-polisulfona amb MB i els enzims Dp, incorporat com a sòlid al compòsit, i GIDH, retingut al polímer durant el procés d'inversió de fases. Aquests biosensors s'han recobert amb 5 µl de Nafió (4:1, aigua:Nafió) o amb una de les 3 capes denses de poliamida preparades segons el procediment descrit a § 7.2.2.6.3, que han emprat diferents amines com a precursor: N-(2-aminoetil)-piperazina, piperazina i

1,3-fenildiamina. De nou l'avaluació dels biosensors finals s'ha basat en l'obtenció de corbes de calibració per a ió amoni, a fi de comparar les sensibilitats associades i, especialment, l'estabilitat d'aquest paràmetre quan s'efectuen corbes de calibració successives.

9.2.5.4 Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig

S'han enregistrat els espectres d'infraroig de membranes de grafit-polisulfona amb MB i amb enzim GIDH, incorporat en la solució emprada per a dur a terme el procediment d'inversió de fases que porta a la precipitació de la membrana. Totes les membranes s'han assecat en un ambient sec durant tot un dia.

9.2.5.5 Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en composts de polisulfona amb MB que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa

Per últim, s'ha volgut adaptar la preparació dels biosensors per a ió amoni desenvolupats, a una producció massiva d'elèctrodes de configuració plana construïts mitjançant tecnologia serigràfica. Sobre la superfície sensora dels elèctrodes serigrafiats, preparats segons la metodologia descrita a § 8.2.3.6, s'ha imprès la membrana basada en composts de polisulfona amb MB. Tot seguit, els elèctrodes s'han submergit en una solució aquosa de l'enzim GIDH, refredada a 4°C, per donar lloc a la inversió de fases, procés en què es forma la membrana per precipitació de la polisulfona. Tot el procediment s'ha realitzat seguint els paràmetres optimitzats anteriorment, però amb les adaptacions necessàries a un procés serigràfic.

Aquests biosensors s'han caracteritzat electroquímicament mitjançant l'obtenció de voltamperogrames hidrodinàmics que cobreixen l'interval de potencial de -0.3 V a 0.8 V. Inicialment, s'ha enregistrat el voltamperograma corresponent a una solució d' α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M preparada en tampó fosfat 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.50. A continuació s'ha obtingut el voltamperograma resultant després d'addicionar una solució d'ió amoni fins assolir una concentració igual a $1 \cdot 10^{-2}$ M.

Per últim, s'han obtingut corbes de calibració successives mitjançant addicions de microvolums de diferents solucions d'ió amoni a la cel·la electroquímica que conté la solució de treball detallada prèviament, quan s'aplica un potencial de treball de -0.1 V. Aquest estudi s'ha repetit amb biosensors als quals se'ls hi ha aplicat una capa protectora addicional de cadascuna de les tres poliamides estudiades anteriorment.

9.2.6 DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN ELS ENZIMS GLUTAMAT DESHIDROGENASA I UREASA PER A LA DETERMINACIÓ D'UREA

9.2.6.1 Preparació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa

A partir del biosensor desenvolupat per a ió amoni que ha mostrat les millors característiques analítiques, s'ha procedit a incorporar l'enzim ureasa a la seva configuració. De nou s'han emprat les dues metodologies descrites per a la incorporació d'enzims a les membranes de polisulfona, és a dir, per mescla de l'enzim liofilitzat al compòsit inicial de polisulfona abans de la seva precipitació, o bé mitjançant l'enzim dissolt a la solució aquosa que s'intercanvia amb la dimetilformamida durant el procediment d'inversió de fases en què precipita la polisulfona. En ambdós casos, s'han variat les quantitats d'enzim ureasa emprades. El temps de durada de la inversió de fases ha estat de 15 minuts.

9.2.6.2 Avaluació i optimització de la resposta a urea

L'avaluació dels elèctrodes preparats ha consistit en corbes de calibració consecutives per a urea, obtingudes quan s'addicionen microvolums de solucions d'urea de diferents concentracions a la cel·la electroquímica que conté una solució de treball amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M preparada en tampó fosfat 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.30. El potencial de treball aplicat dependrà del mediador incorporat al biosensor.

9.2.6.2.1 Optimització de la quantitat d'enzim

S'han realitzat dos processos d'optimització en paral·lel de la quantitat d'enzim ureasa a incorporar a les membranes de polisulfona, segons el tipus d'immobilització emprada. En relació a la incorporació de l'enzim ureasa liofilitzat al compòsit inicial de polisulfona prèviament a la seva precipitació, s'han avaluat quantitats d'enzim que van de 90 a 1060 U/ml de polisulfona. D'altra banda, les quantitats d'enzim ureasa a les solucions aquoses emprades per a la inversió de fases que porta a la precipitació de la polisulfona, han cobert l'interval de 60 a 650 U/ml.

9.2.6.2.2 Optimització de la solució amortidora emprada

Tal com ja es va fer per al biosensor d'ió amoni basat en membranes de polisulfona, s'han avaluat diferents solucions amortidores i diferents valors de pH per a aquestes, per a la preparació de la solució de treball que ha de contenir α -cetoglutarat i NADH, amb l'objectiu de trobar la solució tampó que permeti assolir les característiques analítiques òptimes al biosensor d'urea desenvolupat.

9.2.6.2.3 *Estudi de les característiques analítiques*

S'ha estudiat la reproductibilitat entre 8 biosensors diferents per a la determinació d'urea preparats seguint el procediment que ha permès obtenir les millors característiques de resposta. Aquest paràmetre és de gran interès, car la dificultat per aconseguir membranes quasi idèntiques per a diferents elèctrodes implicaria la necessitat d'haver d'efectuar sempre una corba de calibració prèvia a l'ús de cadascun dels biosensors preparats. Per últim, s'ha dut a terme l'estudi de l'estabilitat d'emmagatzematge mitjançant calibracions periòdiques durant una setmana amb un biosensor per a urea que s'ha mantingut emmagatzemat en solució tampó a 4°C tot el temps que no s'ha utilitzat.

9.2.6.3 *Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador*

Amb l'objectiu d'incrementar la sensibilitat dels biosensors per a urea desenvolupats, s'ha incorporat enzim Dp liofilitzat en el compost inicial de grafit-polisulfona amb MB prèviament a la inversió de fases per a la formació de la membrana que ha de cobrir la superfície electròdica. L'avaluació de la resposta obtinguda s'ha fet en base a l'obtenció de corbes de calibració successives per a urea.

9.2.6.3.1 *Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa, ureasa i diaforasa*

La grandària reduïda de l'enzim Dp, dificulta la seva retenció a l'interior de les membranes basades en composts de polisulfona, motiu que ha portat a que aquestes s'hagin recobert amb una capa densa de poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina. L'avaluació dels biosensors preparats ha consistit en l'obtenció de corbes de calibració successives per a urea, que han permès determinar paràmetres d'interès com la sensibilitat i la reproductibilitat associada, aquest segon com a un bon indicador de l'estabilitat del biosensor estudiat.

9.2.6.4 *Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig*

S'han enregistrat els espectres d'infraroig de membranes de grafit-polisulfona amb MB i amb els enzims GIDH, incorporat en la solució emprada per a dur a terme el procediment d'inversió de fases, i ureasa, incorporat com a sòlid al compost inicial de polisulfona prèviament a la inversió de fases. Totes les membranes s'han assecat en un ambient sec durant tot un dia.

9.2.6.5 Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa

L'últim pas ha estat el desenvolupament de biosensors de configuració plana, construïts mitjançant tecnologia serigràfica, seguint el mateix procediment optimitzat en els apartats anteriors per a l'obtenció de biosensors per a urea basats en membranes de polisulfona. Amb aquest objectiu s'ha imprès una capa de polisulfona amb MB i enzim ureasa sobre la superfície sensora dels elèctrodes construïts segons la metodologia detallada a § 8.2.3.6. A continuació, els elèctrodes s'han submergit ràpidament en una solució aquosa de l'enzim GIDH, refredada a 4°C, que ha provocat la precipitació de la membrana.

La caracterització electroquímica d'aquests biosensors s'ha realitzat mitjançant l'obtenció dels voltamperogrames hidrodinàmics per a una solució d' α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M preparada en tampó fosfat 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.50, abans i després de l'addició d'urea. La concentració final d'urea a la cel·la ha estat $2 \cdot 10^{-2}$ M. L'interval de valors de potencial entre els quals s'han enregistrat els voltamperogrames va de -0.3 V a 0.8 V.

Finalment, s'han efectuat corbes de calibració successives per a urea quan s'empren aquests biosensors sense cap recobriment addicional i també quan es treballa amb biosensors que incorporen diferents capes de poliamida com a protecció per possibles pèrdues dels enzims per dissolució. Les corbes de calibració s'han obtingut mitjançant addicions de microvolums de solucions d'urea a la cel·la electroquímica que conté la solució de treball emprada durant tot l'estudi. El potencial de treball aplicat ha estat -0.1 V.

9.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

9.3.1 *DESENVOLUPAMENT DE SISTEMES BIOSENSORS AMB GLUTAMAT DESHIDROGENASA EN SOLUCIÓ PER A LA DETERMINACIÓ D'ÍO AMONI*

En general, els enzims segueixen la cinètica de Michaelis-Menten, basada en la hipòtesi de l'estat estacionari, segons la qual la concentració del complex enzim-substrat format, es manté pràcticament constant durant el temps que dura la reacció. L'ajust a l'equació cinètica que se'n deriva d'aquesta hipòtesi és possible degut a que la intensitat mesurada, proporcional a la concentració de l'espècie electroactiva que reacciona sobre l'elèctrode, es pot considerar com la velocitat d'oxidació o de reducció d'aquesta espècie i, per tant, esdevé funció de la velocitat de la reacció enzimàtica. D'acord amb aquest tractament, l'activitat enzimàtica és proporcional a la velocitat màxima de la reacció enzimàtica, és a dir, a la intensitat màxima mesurada (I_{max}), mentre que l'afinitat de l'enzim pel substrat ve donada per la concentració de substrat quan la velocitat arriba al 50% del seu valor màxim, valor

que correspon a la constant de Michaelis (K_M). Ara bé, els enzims al·lostèrics representen una excepció a aquest comportament cinètic, atès que la presència de moduladors, ja siguin activadors o inhibidors, modifica les seves propietats cinètiques. És per aquest motiu que, tot i que a la corba de saturació es pot trobar un valor de concentració de substrat per al qual la intensitat correspon a la meitat de la intensitat màxima, no es pot parlar de K_M , sinó que és més correcte designar aquest valor com a $K_{0.5}$. Com a resultat de l'ajust dut a terme amb les dades obtingudes experimentalment, mostrat a la Figura 9.3, el valor obtingut per a $K_{0.5}$ és $1.9 \cdot 10^{-5}$ M. De l'anàlisi d'aquest valor cinètic s'observa l'eficiència de l'enzim GIDH, com a catalitzador de la conversió de l' α -cetoglutarat en glutamat, quan es troba en solució, i la validesa del seguiment amperomètric d'aquesta reacció enzimàtica mitjançant un transductor de grafit-epoxi.

La resposta mesurada s'obté com a una disminució del senyal, atès que l'addició de petites quantitats d'ió amoni a una solució que conté un excés del substrat α -cetoglutarat i de cofactor NADH permet l'avenç de la reacció enzimàtica i, per tant, comporta un consum de NADH, fet que porta a una disminució de la intensitat d'oxidació mesurada.

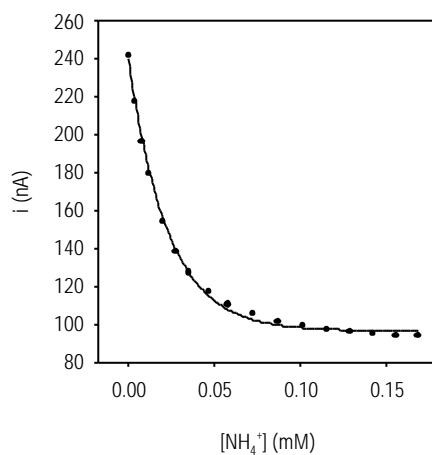
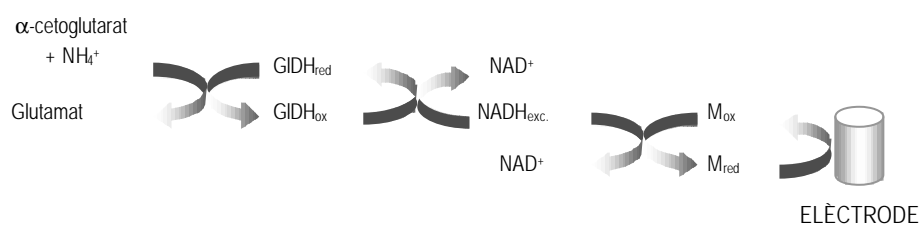


Figura 9.3: Ajust cinètic per a una calibració d'ió amoni quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M, NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M i 58 U d'enzim GIDH. Interval de concentracions d'ió amoni avaluat: de $4 \cdot 10^{-6}$ M fins a $1.7 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat 0.825 V.

9.3.1.1 Optimització de la relació entre les concentracions de substrat i de cofactor

L'estudi de les corbes de calibració obtingudes mitjançant addicions successives d'una solució de NADH, quan es varia la concentració d'ió amoni contingut a la solució, amb un elèctrode que té enzim a la seva superfície, permet avaluar la validesa de la relació de les concentracions de substrat i cofactor utilitzada des d'un inici. Per a tots els casos amb enzim, les primeres addicions de NADH no donen cap senyal, degut a que aquest cofactor es consumeix durant la reacció enzimàtica. Ara bé, s'arriba a una concentració de NADH determinada, que depèn de la concentració inicial d'ió amoni, a partir de la qual l'excés de NADH que ja no es veurà implicat en el procés de catàlisi enzimàtica, comença a oxidar-se electroquímicament. Per tant, aquesta concentració fixa la concentració mínima de NADH necessària perquè no representi cap limitació per al desenvolupament de l'activitat enzimàtica i es pugui fer el seguiment a través de la detecció amperomètrica del cofactor. A la Figura 9.4 es pot veure com la concentració de NADH a partir de la qual s'obté resposta electroquímica és més gran com més gran és la concentració inicial d'ió amoni. A més, per a una quantitat d'enzim d'aproximadament 1.5 U, es confirma la idoneïtat de l'ús d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M quan la d' α -cetoglutarat és $2.5 \cdot 10^{-3}$ M atès que, per a l'interval de concentracions d'ió amoni dins del qual es treballarà (inferiors a $1 \cdot 10^{-3}$ M), s'observa com es comença a mesurar intensitat de corrent a partir d'una concentració de NADH de l'ordre de $2 \cdot 10^{-4}$ M, per tant, aquesta concentració serà suficient.

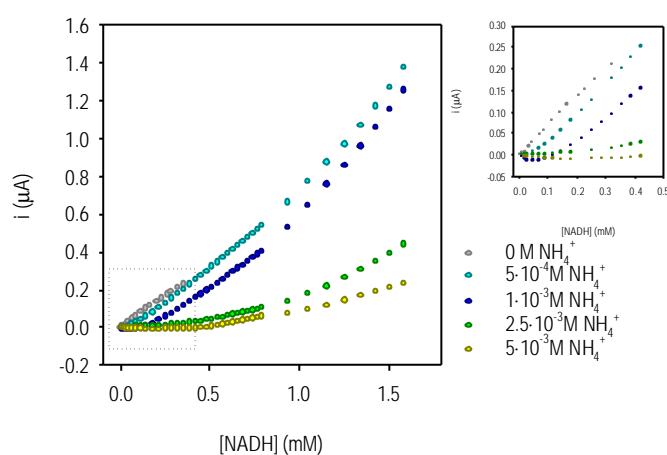


Figura 9.4: Estudi de la relació òptima de les concentracions de substrat (α -cetoglutarat) i cofactor NADH basat en les corbes de calibració obtingudes a partir d'addicions successives de NADH. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un compost de grafit-epoxi amb 1.5 U d'enzim GIDH retingudes sobre la seva superfície mitjançant una membrana de diàlisi. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i diferents concentracions de NH_4^+ ($5 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M, $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i $5 \cdot 10^{-3}$ M). L'interval de concentracions de NADH avaluat va de $1 \cdot 10^{-5}$ M fins a $1.6 \cdot 10^{-3}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat 0.825 V.

9.3.1.2 Optimització de la quantitat d'enzim

A la Figura 9.5 estan representades les corbes de calibració que corresponen a elèctrodes que contenen diferents quantitats d'enzim dipositat a la seva superfície. La diferència observada entre les corbes de calibració obtingudes per a un elèctrode sense enzim i per a elèctrodes amb diferents quantitats d'enzim GIDH dipositades sobre la seva superfície, quan es calibren ambdós mitjançant addicions successives d'una solució d'ió amoni, confirma l'efecte catalític d'aquest enzim quan es troba en una solució que conté α -cetoglutarat, ió amoni i el seu cofactor. A més, es pot afirmar que una quantitat equivalent a 1.9 U és suficient per obtenir la resposta màxima a les condicions de treball fixades. L'ajust cinètic de les dades experimentals obtingudes per a aquesta quantitat d'enzim GIDH dona una $K_{0.5}$ igual a $1.9 \cdot 10^{-5}$ M, valor que coincideix amb l'obtingut quan es té un excés d'enzim en solució. Aquest fet valida l'ús d'un compost de grafit-epoxi amb l'enzim retingut a la seva superfície mitjançant una membrana de diàlisi com a detector amperomètric d'ió amoni, fet que sembla ésser raonable atès que l'enzim es troba en solució.

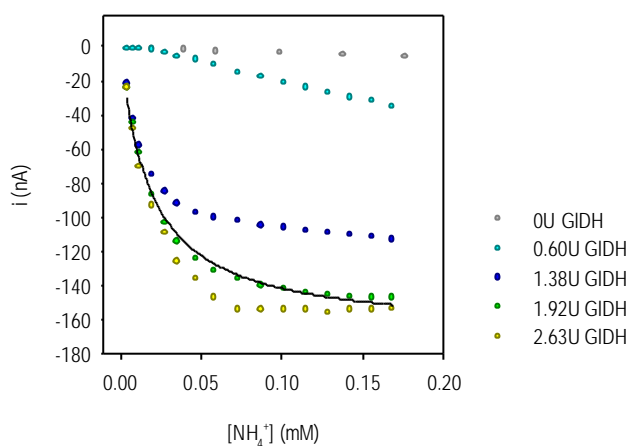


Figura 9.5: Optimització de la quantitat d'enzim GIDH dipositada sobre la superfície d'un compost de grafit-epoxi, utilitzat com a elèctrode de treball, basada en l'obtenció de corbes de calibració per a NH_4^+ . La línia contínua correspon a l'ajust cinètic de la corba de calibració obtinguda amb la quantitat òptima d'enzim. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. L'interval de concentracions d'ió amoni avaluat va de $4 \cdot 10^{-6}$ M fins a $1.7 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat 0.825 V.

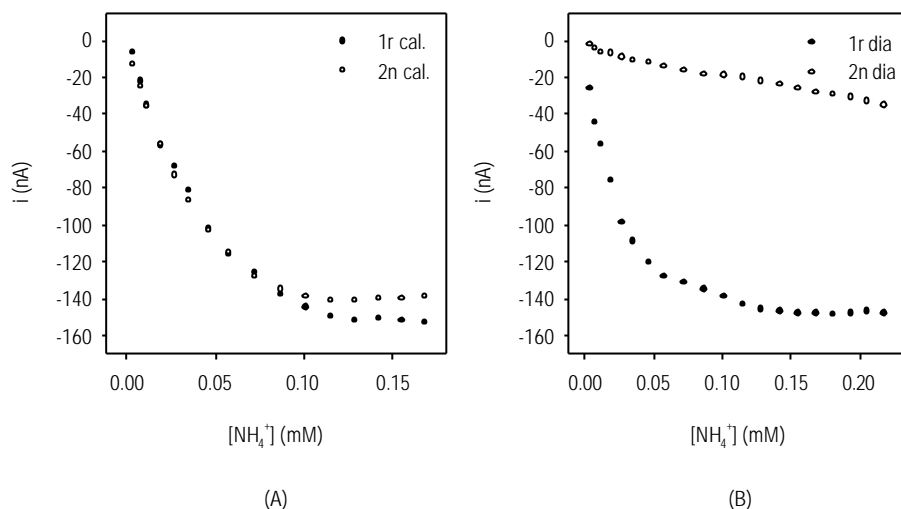


Figura 9.6: Estudi de la reproductibilitat de biosensors d'ió amoni efectuat (A) el mateix dia i (B) en diferents dies. L'enzim, (A) 1.37 U i (B) 2.63 U, es troba retint sobre la superfície d'un compost de grafit-epoxi mitjançant una membrana de diàlisi. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. L'interval de concentracions d'ió amoni avaluat va de $4 \cdot 10^{-6}$ M fins a (A) $1.7 \cdot 10^{-4}$ M i (B) $2.2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat 0.825 V.

A la Figura 9.6(A), queda palès el bon comportament dels electrodes preparats amb enzim retint a la superfície sensora mitjançant una membrana de diàlisi, ja que calibracions successives d'un mateix elèctrode mostren característiques de resposta comparables. D'altra banda, l'estabilitat de l'enzim esdevé reduïda notablement amb el pas del temps, com ho demostra la Figura 9.6(B), on apareixen dues corbes de calibració, per a un mateix elèctrode, obtingudes en dies diferents. Aquesta inestabilitat de l'enzim amb el temps, descrita a la bibliografia, porta a plantejar la possibilitat d'afegir algun agent estabilitzant (glicerol, dextrà, lactitol,...).^{31,32}

9.3.1.3 Incorporació de mediadors electropolimeritzats sobre la superfície del transductor

La corba de calibració de la Figura 9.7 confirma la possibilitat de mesurar amperomètricament la concentració d'ió amoni mitjançant la reacció enzimàtica amb l'enzim GIDH, quan aquest es troba en solució, a través de l'oxidació mediatitzada del NADH amb o-PDA adsorbida, atès que el valor de $K_{0.5}$ ($2.6 \cdot 10^{-5}$ M) obtingut de l'ajust cinètic de les dades experimentals no difereix significativament del que es mostra a la Figura 9.5 per a una quantitat d'enzim adsorbit d'aproximadament 1.38 U.

Tal com mostra la Figura 9.8, el següent pas ha estat la deposició de l'enzim sobre la capa polimèrica del mediador electropolimeritzat per donar electrodes que ofereixen unes bones característiques de resposta per a tots els mediadors estudiats.

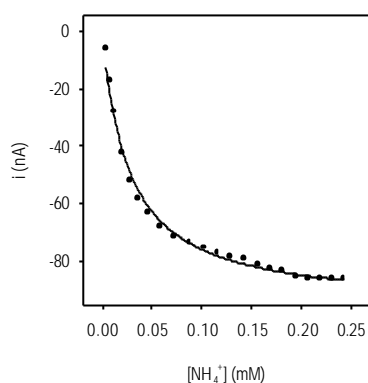


Figura 9.7: Ajust cinètic per a una calibració d'ió amoni quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi sobre el qual s'han dipositat 20 μ l d'o-PDA 1 mM i 1.38 U d'enzim GIDH. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. L'interval de concentracions d'ió amoni avaluat va de $4 \cdot 10^{-6}$ M fins a $2.4 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat 0.400 V.

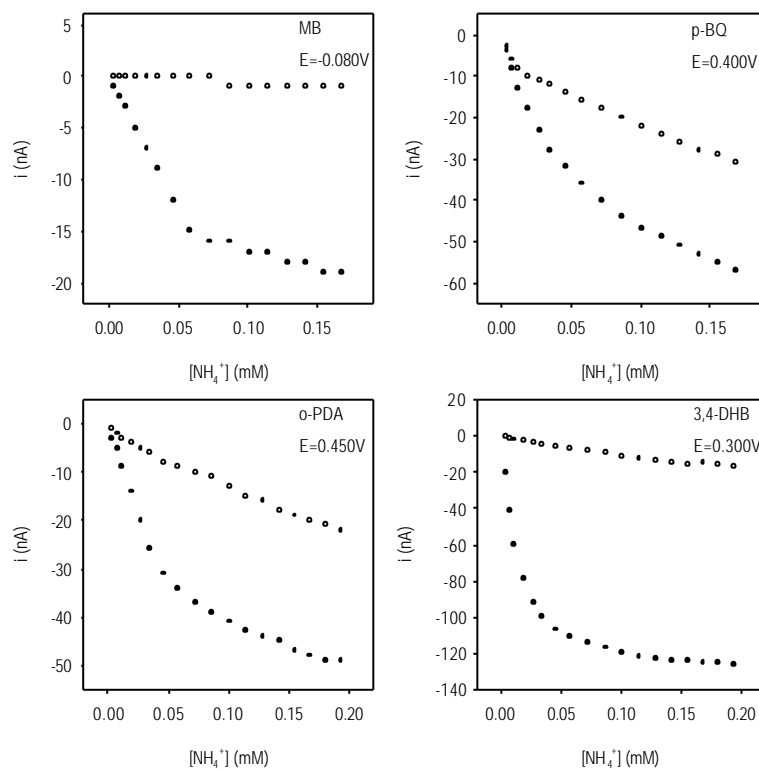


Figura 9.8: Corbes de calibració per a l'ió amoni obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi amb mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície, sense enzim (○) i amb aproximadament 1.50 U d'enzim GIDH retengudes sobre la pel·lícula polimèrica de mediador mitjançant una membrana de diàlisi (●). Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. A cada gràfica s'indica el mediador electropolimeritzat i el potencial de treball aplicat.

A diferència dels resultats anteriors, el procediment invers, que consisteix en primer adsorbir l'enzim i després electropolimeritzar el mediador a sobre, no permet determinar ió amoni mitjançant la reacció catalítica a través de l'oxidació del mediador. A la Figura 9.9 apareixen representades les mesures d'intensitat obtingudes amb un elèctrode amb enzim prèviament adsorbit i 3,4-DHB electropolimeritzat a sobre, quan s'aplica un potencial de 0.300 V, corresponent al potencial òptim del mediador, i després de 0.825 V, propi de la detecció de NADH sense mediador.

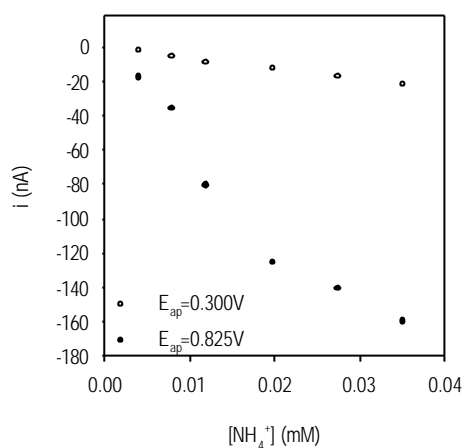


Figura 9.9: Corbes de calibració per a ió amoni obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un compòsit de grafit-epoxi amb aproximadament 1.5 U d'enzim GIDH prèviament adsorbides i amb 3,4-DHB electropolimeritzat a sobre. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. L'interval de concentracions d'ió amoni avaluat va de $4 \cdot 10^{-6}$ M fins a $3.5 \cdot 10^{-5}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat primer 0.300 V i després 0.825 V.

La comparació de les dues corbes de calibració obtingudes, indica que la metodologia emprada en aquest cas per preparar l'elèctrode no és vàlida, fet que es pot atribuir a una distribució inadequada dels components que formen part de la configuració electròdica estudiada. Aquesta suposició es fonamenta en la interpretació dels resultats experimentals mostrats a la Figura 9.9, on es pot observar, per una banda, l'efectivitat de la reacció enzimàtica, atesa la disminució del senyal mesurat a 0.825 V, i per una altra, el bon funcionament de la reacció d'oxidació del NADH a través del mediador, ja que es manté el senyal mesurat a 0.300 V. La diferència observada entre ambdues gràfiques fa pensar en què, si bé una petita quantitat de NADH aconsegueix travessar el polímer de mediador sense canviar el seu estat d'oxidació, majoritàriament el NADH reacciona amb el mediador a fi de reduir-lo i oxidar-se ell a NAD⁺. Després aquest mediador es reoxida sobre la superfície de l'elèctrode contribuint en un percentatge molt elevat al senyal global obtingut, al qual cal afegir un valor d'intensitat més petit degut a l'oxidació directa de NADH sobre la superfície electròdica, reacció que no és viable a 0.300 V. Aleshores, mentre no s'afegeix ió amoni, el senyal mesurat es manté constant, tant si es treballa a

0.300 V com a 0.825 V. Ara bé, l'addició d'ió amoni fa possible l'avenç de la reacció enzimàtica de manera que, atès que el NADH es troba en excés, la petita quantitat de NADH que aconsegueix travessar el polímer de mediador sense reaccionar amb ell, es consumeix en la reacció enzimàtica. Si el potencial de treball és 0.825 V s'observa una disminució del senyal, deguda al consum enzimàtic del NADH que es troba disponible per ésser oxidat sobre la superfície de l'elèctrode. En canvi, si el potencial de treball és 0.300 V, el NADH que arriba a la superfície de l'elèctrode no és detectat i, per tant, encara que la reacció enzimàtica sigui efectiva, consumint-se com a conseqüència part d'aquest NADH, el senyal mesurat només serà degut a l'oxidació de NADH a través del mediador. Per tot això, una configuració basada en el contacte directe de la mostra (que conté NADH) amb una capa polimèrica de mediador que cobreix l'enzim, porta a què la reacció principal sigui l'oxidació de NADH a través del mediador, mentre que la quantitat de NADH disponible per reaccionar enzimàticament és mínima. Així, amb l'aplicació d'un potencial que permeti seguir directament l'oxidació de NADH això no representarà un problema, atès que per molt gran que sigui el valor de la intensitat deguda a la reoxidació del mediador, es mesuren pèrdues de senyal relatives que es poden seguir amb precisió. Però si el potencial aplicat no permet seguir l'oxidació de NADH directament, només es tindrà resposta a causa de l'oxidació de NADH a través del mediador i, per tant, encara que hi hagi reacció enzimàtica, no serà possible detectar el consum enzimàtic de NADH.

9.3.2 DESENVOLUPAMENT DE BIOCÒMPÒSITS AMB GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'ÍO AMONI

9.3.2.1 Preparació dels biocòmpòsits amb glutamat deshidrogenasa

En base a la comparació duta a terme amb els còmpòsits sense enzim preparats paral·lelament als tres biocòmpòsits amb enzim glutamat deshidrogenasa, es pot afirmar que han curat correctament i que la seva superfície no mostra aparentment cap alteració relacionada amb possibles pèrdues d'enzim.

9.3.2.2 Avaluació de la resposta a ió amoni

La Figura 9.10(A) mostra com varia la resposta amperomètrica en funció de la quantitat d'enzim GIDH present als biocòmpòsits quan s'addiciona ió amoni a una solució que conté α -cetoglutarat i NADH. Com es pot observar, a mesura que augmenta la quantitat d'enzim s'obté una major sensibilitat, essent màxima per a un biocòmpòsit que conté un 4 % d'enzim GIDH. No obstant això, s'ha pogut comprovar una forta dependència d'aquesta resposta amb la temperatura, fet que es confirma a la bibliografia.^{31,32} Aquesta inestabilitat, associada a uns canvis notables de sensibilitat per a petites variacions de la temperatura ambient, no ha fet possible l'avaluació de la pèrdua d'enzim per dissolució. Per aquest motiu, s'ha intentat reproduir al màxim les condicions de temperatura a fi de poder comparar corbes de calibració i, per tant, poder avaluar l'estabilitat dels biocòmpòsits. Els resultats així obtinguts, en dies diferents, es mostren a la Figura 9.10(B), on l'elèctrode de treball és un biocòmpòsit que conté un 4 %

d'enzim. S'observa com la reproductibilitat d'aquest tipus de sensors limita el seu ús en la utilització posterior.

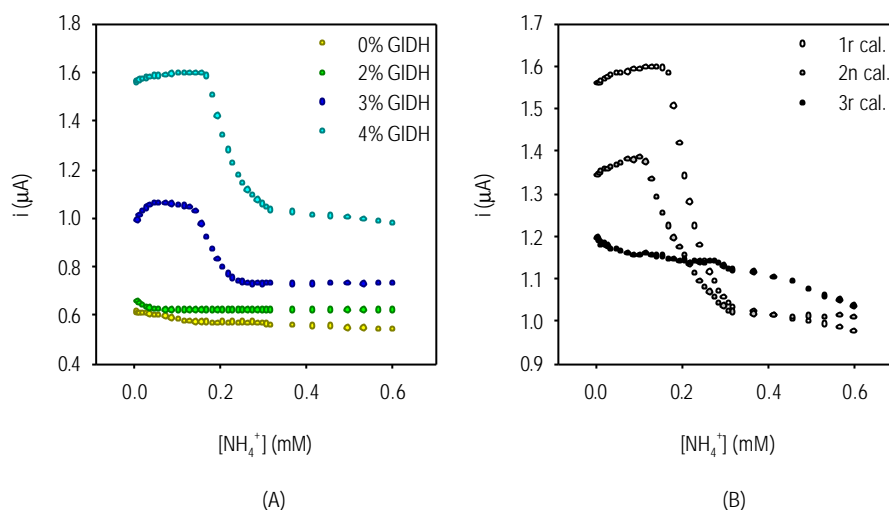


Figura 9.10: Corbes de calibració per a ió amoni obtingudes quan s'empra com a electrode de treball (A) diversos biocompòsits amb diferents percentatges d'enzim GIDH i (B) un mateix biocompòsit amb un 4 % d'enzim GIDH, en diferents dies. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat 0.825 V.

9.3.2.3 Incorporació de mediadors en membranes basades en compòsits de polisulfona

La Figura 9.11 mostra corbes de calibració successives obtingudes amb els diferents biocompòsits amb GIDH, recoberts amb membranes de polisulfona que contenen cadascun dels mediadors avaluats. S'observa clarament com per a tots els casos el senyal inicial és superior per als biocompòsits amb un percentatge més elevat d'enzim GIDH. Tanmateix, es fa palesa una disminució progressiva del senyal entre corbes de calibració consecutives, fet que demostra la inviabilitat d'aquest tipus de biosensors per a poder ésser emprats de manera reproducible. La Taula 9.1 recull els pendents corresponents a la zona lineal de les corbes mostrades a la Figura 9.11, que confirmen les afirmacions fetes.

També s'ha intentat protegir els biocompòsits amb GIDH de les pèrdues d'enzim per lixiviació mitjançant altres recobriments, com ara capes denses de poliamida, polisulfona sense mediadors o Nafió, però per a tots els casos s'ha continuat observant una clara disminució de la sensibilitat obtinguda per a corbes de calibració successives.

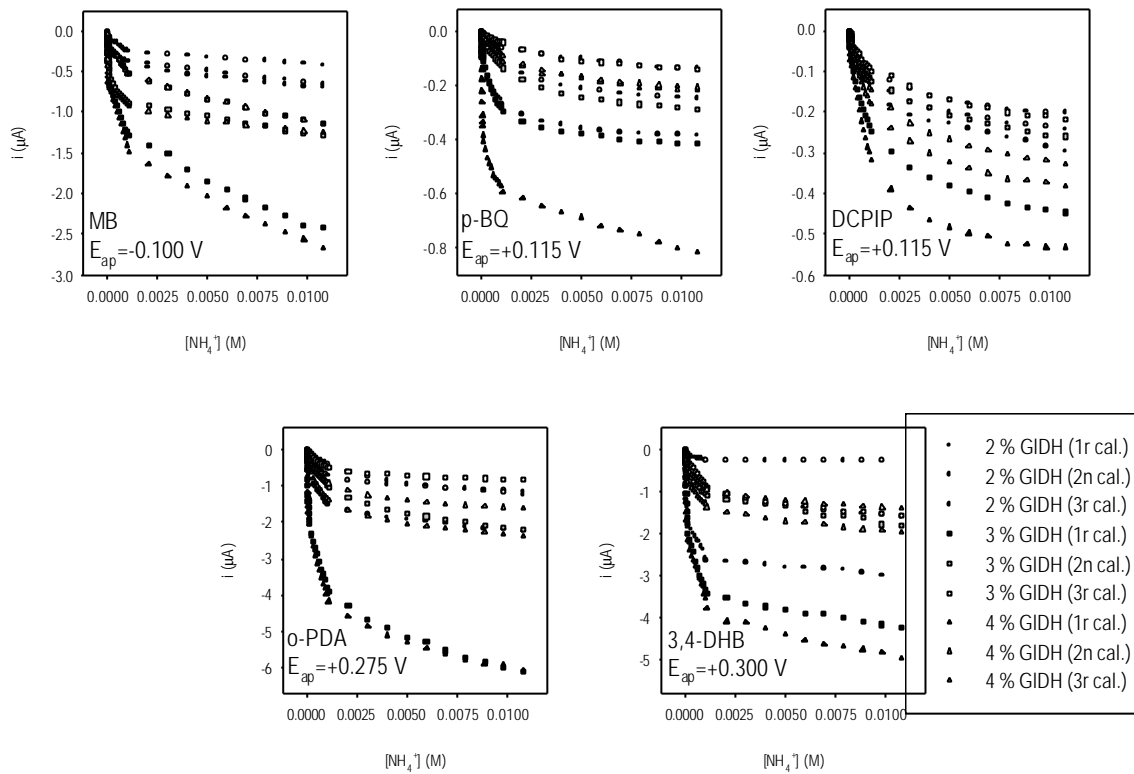


Figura 9.11: Corbes de calibració per a ió amoni obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball diversos biocompositos amb diferents percentatges d'enzim GIDH, 2 % (cercles), 3 % (quadrats) i 4 % (triangles), recoberts amb membranes basades en compostos de polisulfona-grafit que incorporen cadascun dels diferents mediadors estudiats. L'ordre consecutiu de les 3 corbes de calibració realitzades amb cada biocomposit ve marcat pel color dels símbols: negre (1a corba), gris (2a corba) i blanc (3a corba). Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat l'indicat a cada gràfica.

Taula 9.1: Paràmetres de calibració corresponents a les corbes de calibració per a la determinació d'ió amoni, quan s'empra com a elèctrode de treball biocompòsits amb diferents percentatges d'enzim GDH recoberts amb membranes de polisulfona amb diferents mediadors.

MEDIADOR	E_{ap} (mV)	PENDENT DE CALIBRACIÓ (nA/M)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ
MB	-100	2%: -2433 / -1732 / -751	0.9919 a 0.9983
		3%: -6186 / -3717 / -971	
		4%: -6959 / -4844 / -1598	
p-BQ	115	2%: -742 / -244 / -107	0.9926 a 0.9999
		3%: -1012 / -336 / -131	
		4%: -3651 / -474 / -202	
DCPIP	115	2%: -561 / -260 / -222	0.9901 a 0.9972
		3%: -656 / -364 / -269	
		4%: -767 / -438 / -301	
o-PDA	275	2%: -6826 / -2506 / -729	0.9918 a 0.9966
		3%: -19214 / -3364 / -1164	
		4%: -19702 / -4486 / -2672	
3,4-DHB	300	2%: -14947 / -3836 / -1636	0.9932 a 0.9985
		3%: -19229 / -5601 / -2812	
		4%: -21150 / -7992 / -4388	

9.3.3 DESENVOLUPAMENT DE COMPÒSITS AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT EN PRESÈNCIA DE GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'ÍO AMONI

Com ja es va poder observar al Capítol 7, l'electropolimerització d'un mediador en presència d'enzim, esdevé un procés complex, influenciat per molts factors, fet que dificulta el disseny d'una metodologia vàlida dirigida en aquest sentit. L'enzim sembla ésser un destorb en el procés d'electropolimerització del mediador, mentre que el mediador, per la seva banda, no afavoreix l'optimització de l'activitat enzimàtica.

9.3.3.1 Electropolimerització del mediador en presència de glutamat deshidrogenasa

De l'avaluació dels resultats mostrats a la Figura 9.12 per a elèctrodes amb o-PDA i amb 3,4-DHB electropolimeritzats en presència de diferents quantitats de l'enzim GIDH de menys puresa, s'observa com la resposta augmenta per a elèctrodes preparats a partir de solucions amb quantitats menors d'enzim.

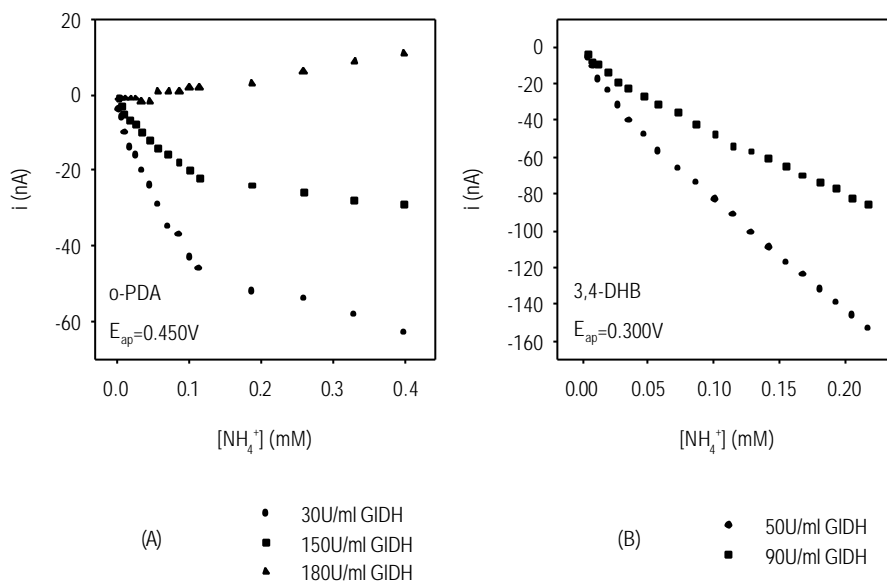


Figura 9.12: Estudi de l'efecte que provoca l'electropolimerització d'un mediador en presència de l'enzim GIDH, basat en l'obtenció de corbes de calibració per a ió amoni quan s'utilitza com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi sobre la superfície del qual s'ha electropolimeritzat (A) o-PDA i (B) 3,4-DHB, en presència de diferents quantitats d'enzim GIDH. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat està indicat a cada gràfica.

Això es podria interpretar de diverses formes, bé perquè la quantitat d'enzim necessària per a una activitat enzimàtica del 100% fos mínima, fet que evitaria problemes de saturació de la superfície sensora amb material proteic que podria dificultar la conducció, o bé perquè la presència d'enzim dificultés l'electropolimerització del mediador. Ara bé, aquests dubtes s'expliquen amb la Figura 9.13, corresponent a les corbes de calibració obtingudes en base a mesures d'intensitat de corrent resultants d'addicionar NADH directament a una solució en què es troba submergit un elèctrode de treball preparat de forma diferent per a cada cas, ja sigui sense mediador ni enzim, amb mediador electropolimeritzat o amb mediador electropolimeritzat en presència d'enzim. La sensibilitat obtinguda per a un elèctrode amb 3,4-DHB electropolimeritzat en presència de GIDH, situada entre un valor màxim de sensibilitat que correspon a l'elèctrode amb mediador únicament i un mínim propi d'un

elèctrode sense mediador ni enzim a la seva superfície, es pot interpretar com a resultat d'una electropolimerització deficient, causada per la presència al medi de reacció de l'enzim i de la resta de components que l'acompanyen al liofilitzat emprat.

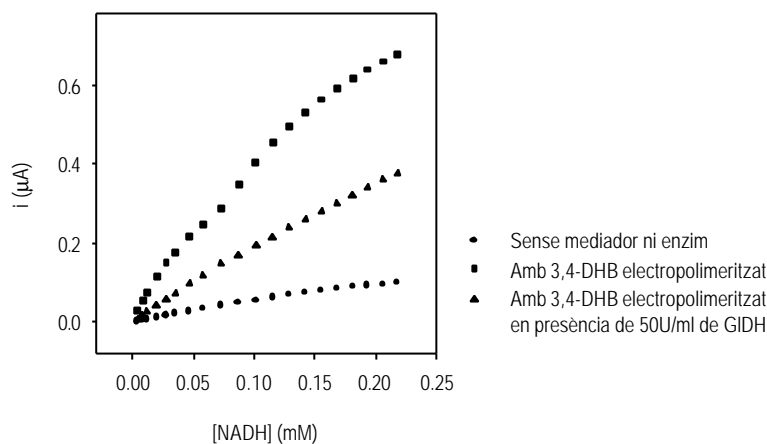


Figura 9.13: Estudi de la resposta a NADH obtinguda quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi (●) sense mediador ni enzim, (■) amb 3,4-DHB electropolimeritzat sobre la seva superfície i (▲) amb 3,4-DHB electropolimeritzat en presència de 50 U/ml d'enzim GIDH. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3. El potencial de treball aplicat ha estat 0.3 V.

De fet, quan es treballa amb una solució d'enzim GIDH de més puresa, els resultats obtinguts difereixen notablement dels obtinguts prèviament. La Figura 9.14(A) mostra les sensibilitats de les corbes de calibració obtingudes per a ió amoni, quan es treballa amb elèctrodes preparats amb diferents quantitats d'enzim GIDH de més puresa a la solució emprada en el procés d'electropolimerització del mediador 3,4-DHB. S'observa com s'obté un màxim quan s'empren solucions de 3,4-DHB amb 250 U d'enzim GIDH / ml, mentre que quantitats inferiors i superiors d'enzim han donat sensibilitats més petites. Alguns treballs duts a terme amb l'electropolimerització d'altres mediadors, com per exemple amb diferents diaminobenzens, en presència de diferents enzims deshidrogenases, presenten un manteniment de la intensitat de corrent per a quantitats d'enzim superiors a l'òptima³⁴. Ara bé, en aquest cas s'ha suposat que el propi enzim o les impureses que l'acompanyen, malgrat que s'ha emprat una solució d'enzim força pura, afecten negativament en el procés d'electropolimerització del mediador, fet que podria justificar la disminució progressiva de la sensibilitat assolida a mesura que augmenta la quantitat d'enzim. És per això que posteriorment s'han avaluat com a quimiosensors per a NADH els elèctrodes preparats. La Figura 9.14(B), que recull els resultats de les calibracions per a NADH, mostra un perfil en què s'obtenen valors de sensibilitat que disminueixen progressivament quan augmenta la quantitat d'enzim present a la solució d'electropolimerització fins arribar a 250 U d'enzim GIDH / ml, punt en què apareix una disminució molt sobtada de la sensibilitat i que correspon a l'òptim trobat anteriorment. Aquest fet corrobora la hipòtesi

de l'existència de deficiències en l'electropolimerització del mediador quan són presents quantitats elevades d'enzim, que acaben donant lloc a biosensors amb una activitat electrocatalítica inferior. Un cop fixada la quantitat òptima d'enzim GIDH en 250 U/ml, es van estudiar diferents protocols de preparació d'aquests elèctrodes, basats en diferents etapes d'electropolimerització en presència i en absència d'enzim GIDH. Tanmateix, els resultats es van comparar amb els obtinguts per a un elèctrode preparat amb 3,4-DHB electropolimeritzat i una segona capa de polipirrol amb enzim GIDH retingut a l'interior d'aquest polímer conductor. La Taula 9.2 recull les sensibilitats trobades per a tots aquests elèctrodes. S'observa com la sensibilitat millora quan es prepara un elèctrode en dues etapes d'electropolimerització, possiblement com a conseqüència d'una millora en l'activitat electrocatalítica del mediador degut al fet que es té una primera capa de mediador electropolimeritzat sense enzim. De totes formes, a partir de les sensibilitats obtingudes queda palès que l'enzim GIDH queda millor atrapat a l'interior del polipirrol que a les capes de 3,4-DHB, atès que en aquest cas s'assoleix una sensibilitat quasi 5 vegades superior. A més, cal afegir com a avantatge addicional que el polipirrol és potencialment útil per a prevenir la lixiviació de mediador,³⁵ fet que encara contribueix més a la millora de la sensibilitat observada. De totes formes, el problema d'aquests biosensors és el seu temps de vida, car tots ells perden quasi tota la seva activitat catalítica després de la primera corba de calibració.

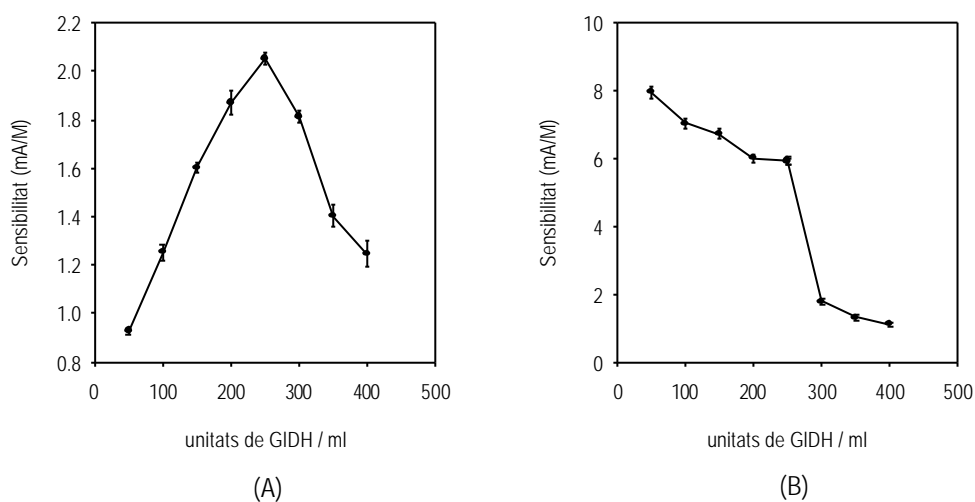


Figura 9.14: Representació de les sensibilitats a ió amoni (A) i a NADH (B) en front de la quantitat d'enzim GIDH present a la solució emprada per a l'electropolimerització del mediador 3,4-DHB sobre la superfície d'un elèctrode basat en un compost de grafit-epoxi emprat com a elèctrode de treball. Cada punt correspon a la mitjana de 3 valors de sensibilitat, mesurats en l'interval de concentracions lineal de les corbes de calibració obtingudes per a cada elèctrode, comprés entre $4 \cdot 10^{-6}$ i $3 \cdot 10^{-4}$ M. Ambdues gràfiques inclouen barres d'error calculades com a \pm la desviació estàndard associada. El potencial de treball aplicat ha estat en ambdós casos 0.300 V.

Taula 9.2: Paràmetres de calibració extrets de les corbes de calibració per a la determinació d'ió amoni, quan s'empra com a elèctrode de treball diferents composts de grafit-epoxi, recoberts amb mediador electropolimeritzat (3,4-DHB), amb l'enzim GIDH retintut a l'interior del mateix polímer de mediador o en una capa de polipirrol. Els temps d'electropolimerització per a la formació de cada capa venen especificats entre parèntesi. Cada resultat mostrat correspon a la mitjana de 3 valors experimentals obtinguts per a 3 elèctrodes diferents que s'han preparat seguint el mateix procediment. El potencial de treball aplicat ha estat 0.300 V.

DISPOSICIÓ DE LES DIFERENTS CAPES	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A/M}$)	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
3,4-DHB + GIDH (12 min)	2051	1.31
3,4-DHB (6 min) / 3,4-DHB + GIDH (6 min)	2555	0.64
3,4-DHB (3 min) / 3,4-DHB + GIDH (6 min) / 3,4-DHB (3 min)	830	1.79
3,4-DHB (6 min) / pirrol + GIDH (30 min)	12119	0.85

9.3.4 DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'ÍO AMONI

9.3.4.1 Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa

Inicialment s'han comparat la sensibilitat i la reproductibilitat que porta associada aquest paràmetre, per a biosensors preparats amb membranes de grafit-polisulfona amb MB i enzim GIDH, incorporat com a sòlid al compost inicial, o en solució aquosa durant el procediment d'inversió de fases. Els resultats mostrats a la Taula 9.3, extrets de la part lineal de les corbes de calibració per a ió amoni que s'inclouen a la Figura 9.15, demostren que per a l'enzim GIDH la millor estratègia d'immobilització és la que incorpora l'enzim durant la inversió de fases duta a terme amb la solució aquosa enzimàtica. A la mateixa Taula apareixen els valors de sensibilitat i reproductibilitat per als biosensors, que incorporen la resta de mediadors estudiats, preparats mitjançant l'estratègia òptima d'incorporació de l'enzim GIDH. De la mateixa manera que per als biosensors amb MB, aquests paràmetres s'han extret de les corbes de calibració mostrades a la Figura 9.15. Per a tots els biosensors avaluats, el temps de resposta corresponent al període de temps que va des de que s'addiciona un microvolum de solució d'ió amoni fins que l'increment d'intensitat de corrent arriba a un màxim, ha estat inferior a 30 segons, fet que confirma la possibilitat de poder implementar aquests biosensors en sistemes de flux que requereixen una resposta ràpida per a poder fer mesures en continu en temps relativament curts.

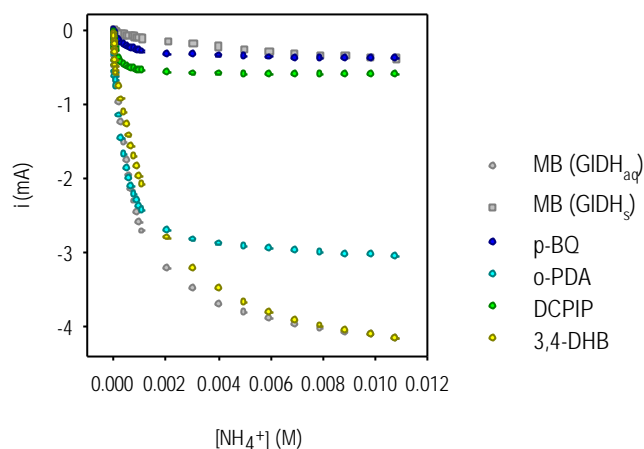


Figura 9.15: Corbes de calibració per a l'ió amoni quan s'empra com a elèctrode de treball diferents biosensors basats en membranes de polisulfona, modificades amb diferents mediadors, que han incorporat l'enzim GIDH mitjançant dues estratègies diferents: en la solució aquosa emprada per a la inversió de fases (cercles) o liofilitzat al compost inicial de polisulfona prèviament a la seva precipitació (quadrats). Els potencials de treball aplicats han estat: -0.100 V per MB, $+0.115$ V per p-BQ, $+0.275$ V per o-PDA, $+0.115$ V per DCPIP i $+0.300$ V per 3,4-DHB. S'han inclòs barres d'error que corresponen a \pm la desviació estàndard associada.

Taula 9.3: Paràmetres de calibració extrets de les corbes de calibració per a la determinació d'ió amoni que es mostren a la Figura 9.15, obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un biosensor basat en composts de grafit-epoxi recoberts amb membranes de polisulfona que contenen diferents mediadors redox i enzim GIDH que s'ha incorporat seguint dues estratègies diferents. Cada resultat mostrat correspon a la mitjana de 3 valors experimentals. La solució continguda a la cel·la electroquímica correspon a una solució d' α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M preparada en tampó fosfat 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.3. Les concentracions d'ió amoni avaluades cobreixen l'interval de $1 \cdot 10^{-5}$ M a $1 \cdot 10^{-4}$ M.

MEDIADOR	E_{ap} (mV)	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu A/M$)	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
<u>Enzim GIDH incorporat com a sòlid al compost inicial de polisulfona</u>			
MB	-100	280	16
<u>Enzim GIDH incorporat a la solució aquosa emprada per a la inversió de fases</u>			
MB	-100	7000	1.3
p-BQ	+115	1170	6
o-PDA	+275	7690	5
DCPIP	+115	2870	9
3,4-DHB	+300	6410	8

El biosensor que conté el mediador MB a la membrana de polisulfona i que ha incorporat l'enzim GIDH durant el procediment d'inversió de fases, s'ha escollit per a continuar el treball d'optimització d'aquests biosensors per a la determinació d'ió amoni, car ofereix una sensibilitat elevada, alhora que la reproductibilitat dels pendents per a corbes de calibració successives és excel·lent.

9.3.4.1.1 *Optimització de la quantitat d'enzim*

La Figura 9.16 mostra el perfil de les sensibilitats obtingudes per a biosensors per a ió amoni basats en el mediador MB i la incorporació de l'enzim GIDH en solució durant la precipitació de la polisulfona, que únicament es diferencien en la quantitat d'enzim que s'ha emprat en la solució aquosa amb què s'ha efectuat la inversió de fases. En base a aquests resultats s'ha escollit com a biosensor amb unes millors característiques, el preparat amb 150 U/ml, atès que aquesta quantitat d'enzim proporciona una sensibilitat òptima que s'incrementa només lleugerament amb quantitats molt més grans d'enzim.

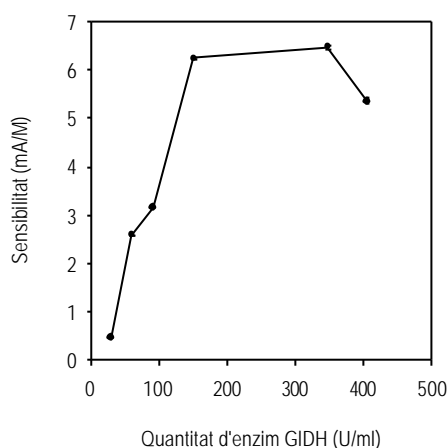


Figura 9.16: Perfil corresponent a l'optimització de la quantitat d'enzim GIDH present a la solució aquosa emprada en la inversió de fases que dona lloc a la precipitació de les membranes de polisulfona, en funció de la sensibilitat mostrada per cadascun dels biosensors. Tots els biosensors s'han preparat amb còmposits de polisulfona que incorporen el mediador MB. Cada punt de la gràfica és el resultat de fer la mitjana de 3 valors de sensibilitat mesurats en l'interval de concentracions d'ió amoni que va de $1 \cdot 10^{-5}$ M a $9 \cdot 10^{-5}$ M de les corresponents corbes de calibració. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm la desviació estàndard associada. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

9.3.4.1.2 *Optimització de la solució amortidora emprada*

Segons els resultats mostrats a la gràfica de sensibilitats per a un biosensor per a ió amoni optimitzat, segons el tipus i el pH de la solució amortidora emprada per a la preparació de la solució de treball,

s'ha escollit la solució d'imidazol a pH 7.0 amb KCl 0.05 M com a tampó òptim, atès que permet assolir uns paràmetres de calibració òptims (vegeu Figura 9.17).

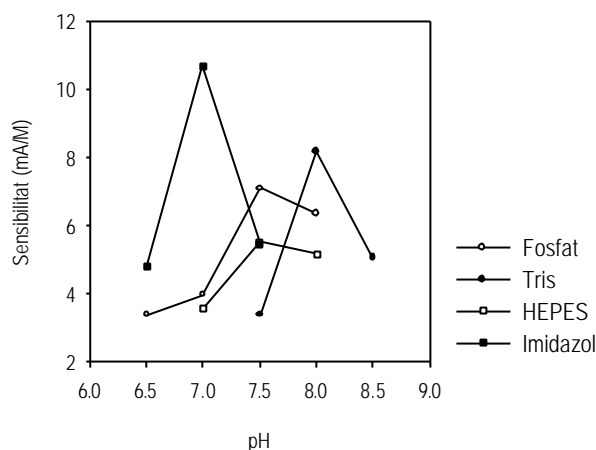


Figura 9.17: Perfil corresponent a l'optimització de la solució amortidora, emprada per a la preparació de la solució de treball, i del seu pH, en funció de la sensibilitat mostrada. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un biosensor recobert amb una membrana de polisulfona que incorpora el mediador MB i l'enzim GIDH present a la solució aquosa emprada en la inversió de fases que dona lloc a la precipitació de la polisulfona. Cada punt de la gràfica és la mitjana de 3 valors de sensibilitat donats pels pendents de les corbes de calibració, en l'interval de concentracions d'ió amoni que va de $1 \cdot 10^{-5}$ M a $9 \cdot 10^{-5}$ M, obtingudes per a cada solució de treball emprada. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

9.3.4.1.3 Estudi de les característiques analítiques

Segons les corbes de calibració incloses a la Figura 9.15, sembla ésser que tots els biosensors emprats segueixen un comportament que s'ajusta al model d'una cinètica enzimàtica clàssica tipus Michaelis-Menten. Aquesta suposició es veu corroborada amb la representació dels dobles recíprocs de Lineweaver-Burk, que en tots els casos han mostrat rectes amb coeficients de correlació excel·lents, que confirmen un comportament cinètic tipus Michaelis-Menten (vegeu Figura 9.18). Els valors de $K_{0.5}^{ap}$ corresponents a cadascun dels biosensors avaluats, mostrats a la Taula 9.4, s'han calculat a partir del valor del punt d'intersecció de les rectes obtingudes, quan es representa l'invers de la intensitat de corrent vers l'invers de la concentració d'ió amoni, amb l'eix d'abscisses. Aquests valors no representen una propietat intrínseca de l'enzim, sinó que ofereixen informació de les propietats associades a tot el biosensor enzimàtic en conjunt. Com era d'esperar, s'obtenen valors de $K_{0.5}^{ap}$ més grans que els obtinguts quan es treballa amb l'enzim en solució³⁶, ja sigui com a conseqüència dels canvis conformacionals que pateix l'enzim quan es troba a un medi hidrofòbic³⁷ o de l'existència d'una hipotètica barrera difusional elevada a la interfase elèctrode-solució³⁸, factors que porten a una pèrdua d'afinitat entre l'enzim i el substrat que, en definitiva, és responsable d'una disminució de l'eficiència

catalítica del sensor en vers l'analit. Quan es comparen els valors de $K_{0,5}^{ap}$ per als elèctrodes basats en membranes de polisulfona amb MB que incorporen l'enzim GIDH directament com a sòlid al compost de polisulfona inicial, o bé a la solució aquosa emprada per a la inversió de fases, sembla lògic que s'obtingui un valor més gran amb el primer tipus de biosensors, atès que quan la polisulfona precipita, és més fàcil que bloquegi part de l'enzim liofilitzat present al compost. En canvi, quan s'incorpora durant la inversió de fases, se suposa que l'enzim en solució entra a la membrana mentre aquesta està precipitant, de manera que trobarà un ambient més adequat, sense tantes restriccions, que li permetrà tenir una certa mobilitat. En quant a les diferències entre els valors de $K_{0,5}^{ap}$ per a la resta d'elèctrodes preparats amb diferents mediadors, aquestes són molt més petites i possiblement són degudes a la diferent eficiència de la capacitat de mediació que posseeix cadascun d'aquests mediadors.

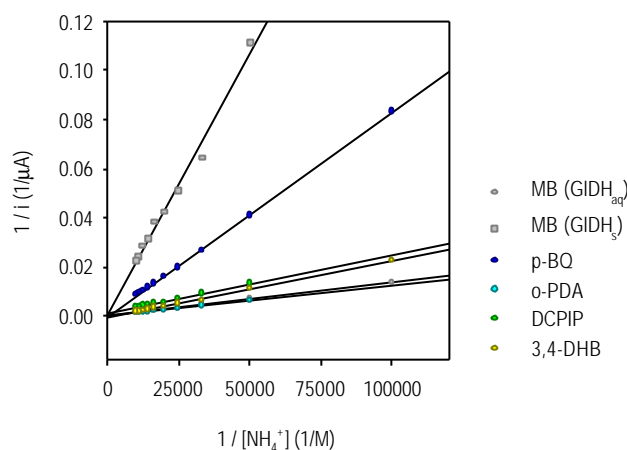


Figura 9.18: Linealització de les corbes de calibració per a ió amoni representades a la Figura 9.15, mitjançant la representació dels dobles recíprocs de Lineweaver-Burk.

De l'avaluació de paràmetres com la sensibilitat, la reproductibilitat i els valors de $K_{0,5}^{ap}$ obtinguts per als biosensors preparats amb membranes de polisulfona amb diferents mediadors que incorporen l'enzim GIDH durant l'etapa d'inversió de fases, s'ha pogut concloure que el biosensor que ha mostrat les millors característiques per a la determinació d'ió amoni és el que incorpora MB al compost de polisulfona. Aquest biosensor mostra una dependència lineal amb la concentració d'ió amoni en l'interval de $1.0 \cdot 10^{-6}$ a $6.9 \cdot 10^{-4}$ M. Esdevé d'especial interès conèixer la fiabilitat del procés de preparació d'aquest tipus d'elèctrodes, i per això s'ha avaluat la reproductibilitat de la sensibilitat associada a corbes de calibració obtingudes amb 8 biosensors diferents, basats en membranes de polisulfona amb MB i enzim GIDH, preparats seguint el mateix procediment. El resultat s'ha expressat

com a una desviació estàndard relativa, que ha estat d'un 8 %, valor suficientment petit com per confirmar la validesa del mètode de preparació emprat.

Taula 9.4: Valors de la constant aparent $K_{0.5^{AP}}$, calculats a partir de la linealització de Lineweaver-Burk, per a diferents biosensors basats en composts de grafit-epoxi recoberts amb membranes de polisulfona que contenen diferents mediadors redox i enzim GIDH, incorporat seguint dues estratègies diferents, quan s'empren per a la determinació d'ió amoni.

MEDIADOR	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	$K_{0.5^{AP}}$ (mM)
<u>Enzim GIDH incorporat com a sòlid al compost inicial de polisulfona</u>		
MB	0.9871	7.34
<u>Enzim GIDH incorporat a la solució aquosa emprada per a la inversió de fases</u>		
MB	0.9992	1.21
p-BQ	0.9987	0.31
o-PDA	0.9993	1.56
DCPIP	0.9992	2.16
3,4-DHB	0.9979	0.24

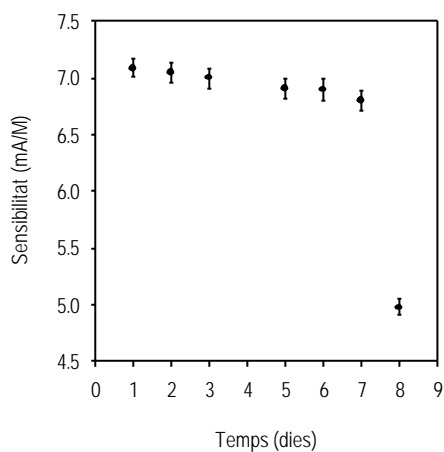


Figura 9.19: Estudi de l'estabilitat d'emmagatzematge dels biosensors basats en membranes de grafit-polisulfona modificades amb el mediador MB, que han incorporat l'enzim GIDH durant l'etapa d'inversió de fases, basat en l'avaluació de la seva sensibilitat a ió amoni durant un període de 8 dies. Cada punt de la gràfica correspon a la mitjana dels valors de sensibilitat obtinguts per a 3 corbes de calibració successives. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm la desviació estàndard associada. Entre mesures l'electrode s'ha emmagatzemat en aigua bidestil·lada a 4°C.

Per últim, s'ha avaluat l'estabilitat d'emmagatzematge d'aquests biosensors (vegeu Figura 9.19). Durant els 7 primers dies, els biosensors que s'han emmagatzemat en aigua bidestil·lada a 4°C, pràcticament no han mostrat pèrdues de sensibilitat (menys d'un 3%). Ara bé, en el 8è dia, apareix una disminució sobtada d'aquest paràmetre, de quasi bé un 30%. Aquest fet pot indicar que l'enzim no troba les membranes de polisulfona com un ambient totalment òptim, de manera que potser caldria pensar en algun tipus d'additiu, com ara algun agent estabilitzador de l'enzim. Cal, però, remarcar que aquests biosensors mantenen la seva sensibilitat quasi constant durant tota una setmana.

9.3.4.2 Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador

La incorporació de l'enzim Dp liofilitzat al compost inicial de polisulfona amb MB prèviament a la formació de la membrana, procés durant el qual s'incorpora el segon enzim, és a dir, l'enzim GIDH, ha permès obtenir biosensors amb una sensibilitat per a la determinació d'ió amoni més elevada que quan es treballa amb els biosensors equivalents però sense enzim Dp. La sensibilitat obtinguda és en tots els casos superior a 10000 $\mu\text{A}/\text{M}$, valor clarament superior als 7000 $\mu\text{A}/\text{M}$ que s'obtenien sense emprar l'enzim Dp com a biocatalitzador de l'oxidació del cofactor NADH. El problema però, és que tal com es pot observar a la Figura 9.20, es confirma una disminució de la sensibilitat de corbes de calibració successives que, en base als resultats exposats a § 7.3.1.6.2, és atribuïble a la pèrdua de l'enzim Dp per dissolució des del si de la membrana de polisulfona cap a la solució que l'envolta, car ja es va demostrar que tant el mediador com l'enzim GIDH queden perfectament retinguts al polímer format.

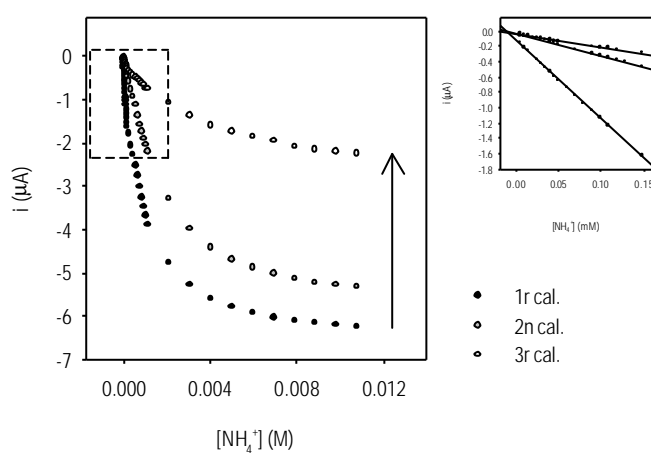


Figura 9.20: Corbes de calibració successives per a ió amoni obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi recobert amb una membrana de polisulfona amb MB i enzim Dp liofilitzat que ha incorporat l'enzim GIDH durant l'etapa d'inversió de fases que porta a la formació de la membrana. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

9.3.4.2.1 Recobriment protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i diaforasa

Tal com ja es va fer per als quimiosensors per a la determinació de NADH basats en membranes de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporaven l'enzim Dp com a biocatalitzador del procés d'oxidació, s'han recobert els biosensors per a ió amoni desenvolupats que alhora incorporen aquest biocatalitzador, amb diferents capes protectores, adreçades a intentar evitar o reduir al màxim possible les pèrdues de l'enzim Dp per lixiviació. Les capes avaluades han estat Nafió i 3 poliamides diferents, segons l'amina emprada com a precursor. La Taula 9.5 inclou les sensibilitats corresponents a la part lineal de la primera corba de calibració per a ió amoni quan s'empra com a elèctrode de treball diferents biosensors que únicament es diferencien en la capa protectora que s'ha incorporat a la seva configuració. Tanmateix es dona la reproductibilitat, calculada com la desviació estàndard associada a la sensibilitat obtinguda per a corbes de calibració consecutives, de manera que serveix com a un bon indicador de l'eficiència de les capes protectores en la seva tasca de reduir les pèrdues d'enzim Dp per dissolució.

Taula 9.5: Paràmetres de calibració corresponents a les corbes de calibració per a la determinació d'ió amoni, efectuades amb electrodes de treball basats en composts de grafit-epoxi coberts amb una primera membrana de polisulfona amb MB i enzim Dp liofilitzat, en què s'ha incorporat l'enzim GIDH durant el procediment d'inversió de fases, i una segona capa protectora per a evitar pèrdues de l'enzim Dp. La sensibilitat, fixada com el pendent de calibració, correspon a la primera corba de calibració obtinguda per a cadascun dels biosensors avaluats, mentre que la reproductibilitat s'ha calculat com la RSD per a la sensibilitat de 3 corbes de calibració consecutives. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. S'ha avaluat la concentració d'ió amoni en l'interval de $1 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

RECOBRIMENT PROTECTOR	PENDENT DE CALIBRACIÓ (μ A/M)	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
Sense recobriment	16900	8
Nafió	460	8
Poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	1140	1
Poliamida preparada amb piperazina	2570	3
Poliamida preparada amb 1,3-fenildiamina	5410	15

S'observa com les capes de Nafió i la poliamida preparada amb 1,3-fenildiamina no aconsegueixen millorar els resultats que s'obtenen en absència de capa protectora, és a dir, quan s'està perdent el biocatalitzador entre calibracions. En canvi, les poliamides preparades amb N-(2-aminoetil)-piperazina i

piperezina, ofereixen una millor protecció en vers la lixiviació de l'enzim Dp, atès que amb elles s'assoleix una molt bona reproductibilitat de la sensibilitat per a calibracions successives. Una possible explicació a aquests resultats rau en les diferents propietats físiques de les membranes de Nafió en relació a les capes denses de poliamida. Sembla lògic pensar que les capes denses poden oferir una millor retenció de l'enzim a l'interior del polímer de polisulfona que les membranes poroses, com és el cas de les membranes de Nafió, que degut a la presència de porus per on l'enzim pot passar, presenten una eficiència inferior a l'hora d'evitar les pèrdues d'enzim. No obstant això, totes les capes protectores estudiades redueixen la sensibilitat del biosensor tan dràsticament que la seva presència fa que no compensi la incorporació de l'enzim Dp a la seva configuració, atès que els biosensors sense aquest enzim han demostrat ésser més sensibles a ió amoni.

9.3.4.3 Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig

A la Figura 9.21 es comparen els espectres d'infraroig corresponents a membranes de polisulfona amb grafit i MB, amb i sense la incorporació de l'enzim GIDH, incorporat durant el procés d'inversió de fases. Aquests resultats demostren que la metodologia d'immobilització emprada determina el tipus d'espectre obtingut. Ja es va veure a § 7.3.1.6.5 que la incorporació de l'enzim Dp, addicionat com a sòlid al compost inicial de polisulfona abans de la formació de la membrana, no modificava l'espectre obtingut per a una membrana sense aquest enzim, car el tipus d'immobilització provocava que la major part de l'enzim quedés retingut a l'interior del polímer i no a la superfície. En canvi ara, la presència de l'enzim GIDH sí modifica l'espectre corresponent a membranes sense enzim. El fet que la membrana amb enzim GIDH mostri un espectre que difereix notablement de l'espectre per a una membrana de polisulfona sense més components, es creu que és degut a què la immobilització de l'enzim per inversió de fases deixa molt més enzim a la superfície de la membrana, a on sí serà detectat mitjançant aquestes mesures de reflectància. En relació a l'espectre per a una membrana sense enzim, quan la membrana incorpora enzim GIDH a l'espectre destaquen una nova banda ampla amb pics situats a 3200 (tensió del N-H dels grups amida) i a 2872 (tensió dels grups C-H) cm^{-1} , i dos nous pics petits a la regió situada entre 1700 i 1600 cm^{-1} , corresponent a la zona de pics que generalment s'assignen als enllaços típics de l'estructura terciària de les proteïnes (1657 i 1638 cm^{-1} , tensió del carbonil de l'amida). També destaca l'increment important dels pics situats a 1406 (N-H aromàtic), 1074 (C-N) i 611 (N-H amínic) cm^{-1} , tots ells propis d'enllaços amida. En quant a la resta de l'espectre, val a dir que la comparació amb el propi espectre de la polisulfona no permet detectar bandes addicionals, ni desplaçaments de bandes, fet que es pot interpretar com a indicador de què les interaccions intermoleculares entre el polímer i l'enzim a la membrana són molt dèbils o, fins i tot, es podrien considerar absents.

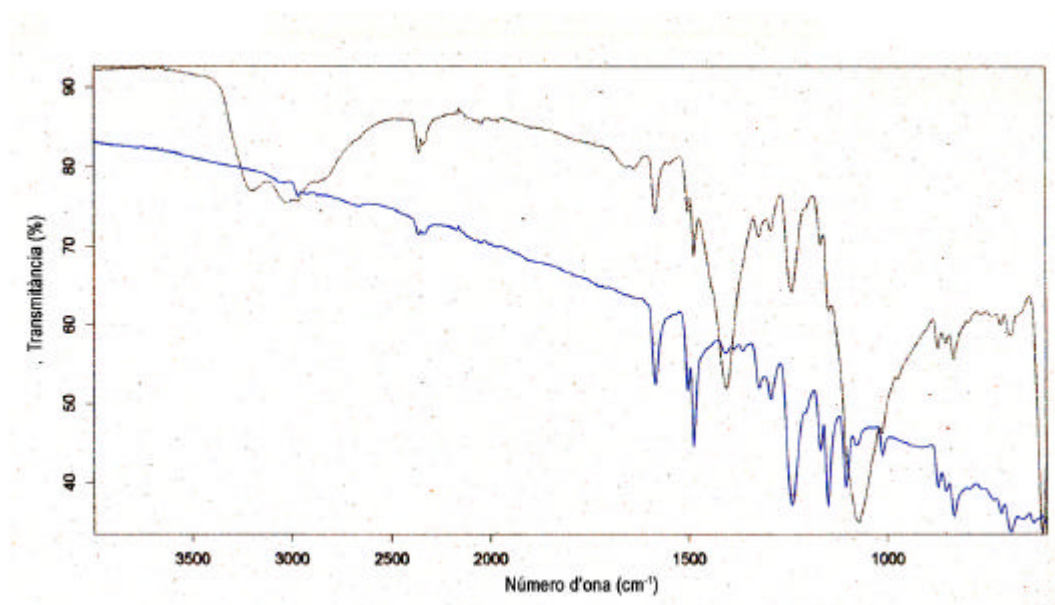


Figura 9.21: Espectres d'absorció en l'infraroig corresponents a diferents membranes de polisulfona: polisulfona amb grafit i MB (línia blava) i polisulfona amb grafit, MB i enzim GIDH (línia negra).

9.3.4.4 Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa

La Figura 9.22 correspon als voltamperogrames hidrodinàmics enregistrats en absència i en presència d'ió amoni a la solució de treball, quan s'usa un dels biosensors per a ió amoni de configuració plana preparats mitjançant tecnologia serigràfica. Aquests voltamperogrames confirmen la possibilitat d'emprar aquest tipus de biosensors per fer determinacions d'ió amoni amb l'aplicació d'un potencial de treball de -0.1 V.

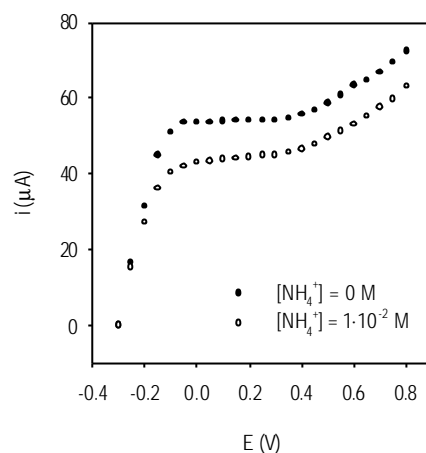


Figura 9.22: Voltamperogrames hidrodinàmics obtinguts quan s'empra com a elèctrode de treball un biosensor de configuració plana basat en una membrana de polisulfona amb grafit i MB que incorpora l'enzim GIDH. Els cercles negres corresponen a la solució de treball, mentre que els de color blanc corresponen a la mateixa solució després d'addicionar ió amoni fins a una concentració de $1 \cdot 10^{-2}$ M. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M.

La Taula 9.6 recull els paràmetres de calibració obtinguts per a biosensors de configuració plana amb membranes de polisulfona amb enzim GIDH sobre la seva superfície sensora. Els resultats mostrats indiquen que és possible adaptar la preparació dels biosensors per a ió amoni prèviament desenvolupats, a una producció massiva d'elèctrodes de configuració plana construïts mitjançant tecnologia serigràfica. La sensibilitat obtinguda per a biosensors sense cap recobriment protector és lleugerament inferior a la que oferien els biosensors basats en compòsits de grafit-epoxi, fet que sembla ésser lògic atenent a que ambdós tipus d'elèctrodes s'han construït amb polímers conductors diferents i posseeixen superfícies actives de diferent grandària, essent més petita la superfície activa dels elèctrodes de configuració plana. La presència d'una capa protectora de poliamida, fàcilment aplicable sobre aquest tipus d'elèctrodes, redueix encara més la sensibilitat, degut a la barrera difusional que representa. Val a dir però, que en els casos de les poliamides preparades amb N-(2-aminoetil)-piperazina i 1,3-fenildiamina, els valors de reproductibilitat assolits entre corbes de calibració successives són molt bons. Pel que fa al biosensor sense recobriment, mostra una pèrdua de sensibilitat molt marcada per a corbes de calibració consecutives, de manera que és més recomanable l'ús d'un biosensor per a cada determinació, car la reproductibilitat entre biosensors preparats de la mateixa manera ve donada per un 4 % de RSD. Una possible explicació a l'empitjorament notable de la reproductibilitat entre corbes de calibració successives per als biosensors sense capa protectora en comparació als resultats obtinguts quan es treballa amb biosensors de configuració convencional, podria ser que ara la membrana és força més prima que quan es preparava de forma manual, fet que pot portar a que l'enzim trobi molt més fàcil la seva sortida cap a la solució de treball.

Taula 9.6: Paràmetres de resposta de les corbes de calibració per a la determinació d'ió amoni, obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball diferents biosensors de configuració plana basats en membranes de polisulfona que incorporen l'enzim GIDH, recoberts amb diferents capes protectores. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. S'ha avaluat la concentració d'ió amoni en l'interval de $3.3 \cdot 10^{-6}$ a $3.3 \cdot 10^{-5}$ M. Cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals obtinguts a partir de corbes de calibració successives per a un mateix biosensor. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

RECOBRIMENT PROTECTOR	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
Sense recobriment	6018	0.9969	34
Poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	1214	0.9905	0.9
Poliamida preparada amb piperazina	4672	0.9907	29
Poliamida preparada amb 1,3-fenildiamina	5283	0.9980	0.9

9.3.5 DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN ELS ENZIMS GLUTAMAT DESHIDROGENASA I UREASA PER A LA DETERMINACIÓ D'UREA

9.3.5.1 Preparació i validació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa

En primer lloc, s'han preparat biosensors per a urea basats en l'elèctrode desenvolupat en l'apartat precedent per a la determinació d'ió amoni, que han incorporat l'enzim ureasa segons dues metodologies diferents: liofilitzat al compòsit inicial de polisulfona abans de la seva precipitació, o bé dissolt a la solució aquosa que s'empra per a la inversió de fases en què es forma la membrana. A la Figura 9.23 es mostra la part lineal de les corbes de calibració obtingudes per a ambdós tipus d'elèctrodes, per a unes quantitats d'enzim ureasa determinades: 224 U/ml de compòsit per al primer tipus de biosensor i 317 U/ml de solució per al segon. La sensibilitat corresponent a cadascun dels biosensors desenvolupats oscil·la entre 2200 i 2400 $\mu\text{A}/\text{M}$, de manera que en base a aquests resultats no és possible decidir quina de les dues metodologies d'immobilització permet obtenir biosensors amb unes millors característiques de resposta. A més, en ambdós casos s'obté una bona reproductibilitat dels pendents per a tres corbes de calibració successives, fet que valida les dues estratègies d'immobilització per a la preparació de biosensors per a urea.

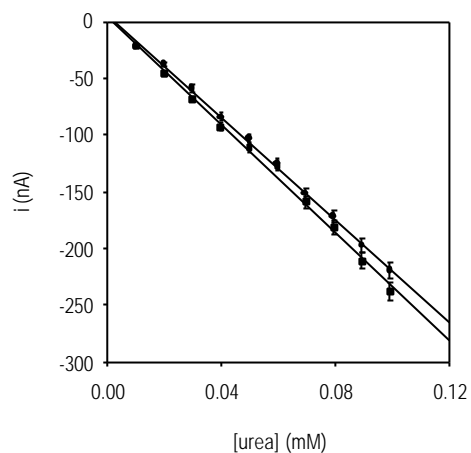


Figura 9.23: Corbes de calibració per a urea obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi recobert amb una membrana de polisulfona amb MB, enzim GIDH, incorporat durant l'etapa d'inversió de fases que porta a la formació de la membrana, i enzim ureasa, incorporat seguint dues estratègies diferents: en solució durant l'etapa d'inversió de fases, o com a sòlid mesclat al compost inicial abans de la seva precipitació. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. S'inclouen barres d'error corresponents a \pm la desviació estàndard associada. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

9.3.5.1.1 *Optimització de la quantitat d'enzim*

Atès que les sensibilitats que ofereixen els biosensors, preparats segons les dues estratègies d'immobilització de l'enzim ureasa, són molt semblants, s'ha decidit continuar l'etapa d'optimització de la quantitat d'enzim per ambdós tipus de biosensors. La Figura 9.24 mostra el perfil de les sensibilitats obtingudes per a aquests biosensors, basats en el mediador MB i en els enzims GIDH, incorporat en solució durant la precipitació de la polisulfona, i ureasa. Tots ells s'han preparat amb diferents quantitats d'enzim ureasa, ja sigui sòlid al compost o en solució durant la inversió de fases. S'observa com, en general, s'obtenen millors resultats quan es preparen els biosensors mitjançant la incorporació de l'enzim ureasa liofilitzat al compost inicial de polisulfona i, concretament, és el biosensor preparat amb 780 U/ml de polisulfona el que ha presentat una sensibilitat més elevada per a la determinació d'urea.

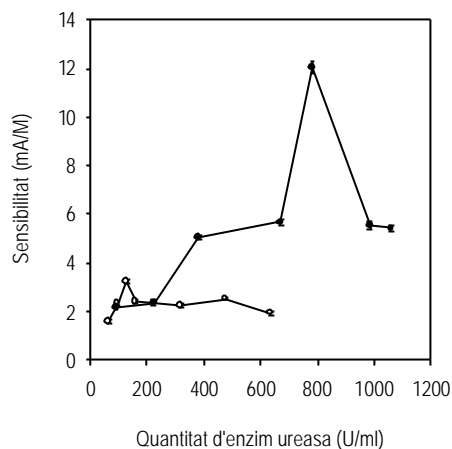


Figura 9.24: Perfil corresponent a l'optimització de la quantitat d'enzim ureasa present a la solució aquosa emprada en la inversió de fases que dona lloc a la precipitació de les membranes de polisulfona (cercles blancs) o com a sòlid al compost inicial de polisulfona prèviament a la seva precipitació (cercles negres), en funció de la sensibilitat mostrada per cadascun dels biosensors. Tots els biosensors s'han preparat amb composts de polisulfona que incorporen el mediador MB i l'enzim GIDH durant l'etapa d'inversió de fases. Cada punt de la gràfica és el resultat de fer la mitjana de 3 valors de sensibilitat mesurats en l'interval de concentracions d'urea que va de $1 \cdot 10^{-5}$ M a $1 \cdot 10^{-4}$ M de les corresponents corbes de calibració. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm la desviació estàndard associada. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

9.3.5.1.2 Optimització de la solució amortidora emprada

De l'avaluació dels resultats inclosos a la Figura 9.25 per al biosensor per a urea que ha mostrat una major sensibilitat, quan s'utilitza omplint la cel·la electroquímica amb una solució de treball preparada amb diferents tipus de solució amortidora amb diferents valors de pH, es pot concloure que de nou és la solució d'imidazol amb KCl 0.05 M a pH 7.0 el també escollit com a òptim, atès que mostra les millors característiques de resposta.

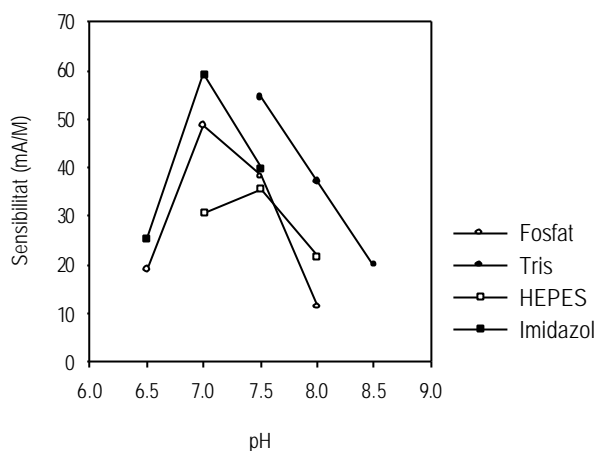


Figura 9.25: Perfil corresponent a l'optimització de la solució amortidora, emprada per a la preparació de la solució de treball, i del seu pH, en funció de la sensibilitat mostrada. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un biosensor recobert amb una membrana de polisulfona que incorpora el mediador MB i els enzims GlDH, present a la solució aquosa emprada en la inversió de fases que dona lloc a la precipitació de la polisulfona, i ureasa, incorporat com a sòlid al compost de polisulfona inicial. Cada punt de la gràfica és la mitjana de 3 valors de sensibilitat donats pels pendents de les corbes de calibració, en l'interval de concentracions d'ió amoni que va de $1 \cdot 10^{-5}$ M a $1 \cdot 10^{-4}$ M, obtingudes per a cada solució de treball emprada. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

9.3.5.1.3 Estudi de les característiques analítiques

La Figura 9.26 inclou la representació de 4 corbes de calibració successives per a urea, obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball el biosensor per a urea optimitzat en els apartats anteriors. Aquesta gràfica demostra l'elevada sensibilitat ($62300 \mu\text{A/M}$), així com l'excel·lent reproductibilitat entre pendents de corbes de calibració consecutives ($\text{RSD} = 2.9\%$), que s'assoleixen amb aquest biosensor.

Atesa la importància que representa el fet de conèixer en quina mesura el procés de preparació d'aquests biosensors és suficientment reproducible, s'ha calculat la reproductibilitat dels pendents obtinguts amb 8 elèctrodes preparats seguint el mateix procediment. S'ha obtingut un valor de RSD igual a 7.3% , que valida el procés de preparació emprat.

Per últim, s'han realitzat calibracions periòdiques durant una setmana, a fi d'avaluar l'estabilitat d'emmagatzematge per a aquest tipus de biosensors, quan s'emmagatzemen en solució amortidora a 4°C mentre no s'estan usant. El resultat ha estat una disminució progressiva de la sensibilitat durant tot aquest període de temps, fins arribar a una pèrdua d'un 37% de la sensibilitat inicial.

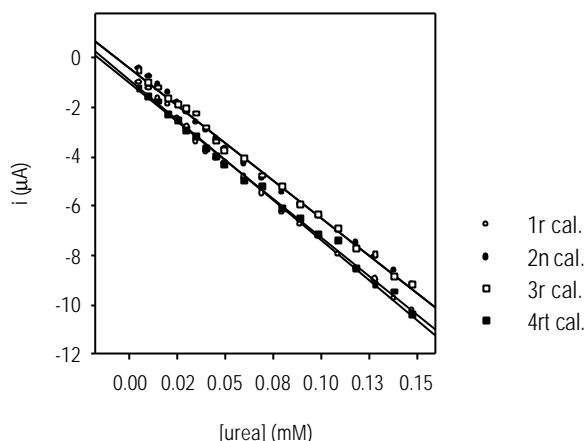


Figura 9.26: Corbes de calibració successives per a urea obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi recobert amb una membrana de polisulfona amb MB i els enzims GIDH, incorporat durant l'etapa d'inversió de fases que porta a la formació de la membrana, i ureasa, incorporat com a sòlid al compost inicial de polisulfona abans de la seva precipitació. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

9.3.5.2 Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador

De la mateixa manera que a § 9.3.4.2, la Figura 9.27(A) fa palesa una disminució molt important de la sensibilitat entre corbes de calibració successives quan es treballa amb un biosensor per a urea que incorpora enzim Dp, a més dels enzims GIDH i ureasa. Tanmateix, cal destacar que en aquest cas la presència d'enzim Dp a la configuració del biosensor no aconsegueix incrementar la sensibilitat ni tan sols per a la primera corba de calibració efectuada.

9.3.5.2.1 *Recobriments protectors dels elèctrodes modificats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa, ureasa i diaforasa*

A fi de reduir les pèrdues d'enzim Dp des del si de la membrana de polisulfona cap a la solució que l'envolta, possiblement degudes a la grandària d'aquest enzim que no és suficient com per a quedar perfectament retingut a l'interior polimèric, s'han recobert les membranes que el contenen amb una capa densa de poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina, atès que aquest precursor és el que va formar les capes protectores que millor reproductibilitat van donar per als biosensors per a ió amoni que incorporen enzim Dp com a biocatalitzador de l'oxidació de NADH. En aquest cas però, aquesta capa no tan sols redueix la sensibilitat, com és lògic amb aquest tipus de recobriments, sinó que a més no ha estat capaç de retenir l'enzim Dp a la polisulfona, a diferència del que succeïa per als

biosensors d'amoni (vegeu Figura 9.27(B)). Una possible explicació podria ser que en aquest tipus de biosensor, l'enzim Dp ha de compartir espai amb l'enzim ureasa dins del compost de polisulfona, fet que probablement encara dificulta més la seva retenció.

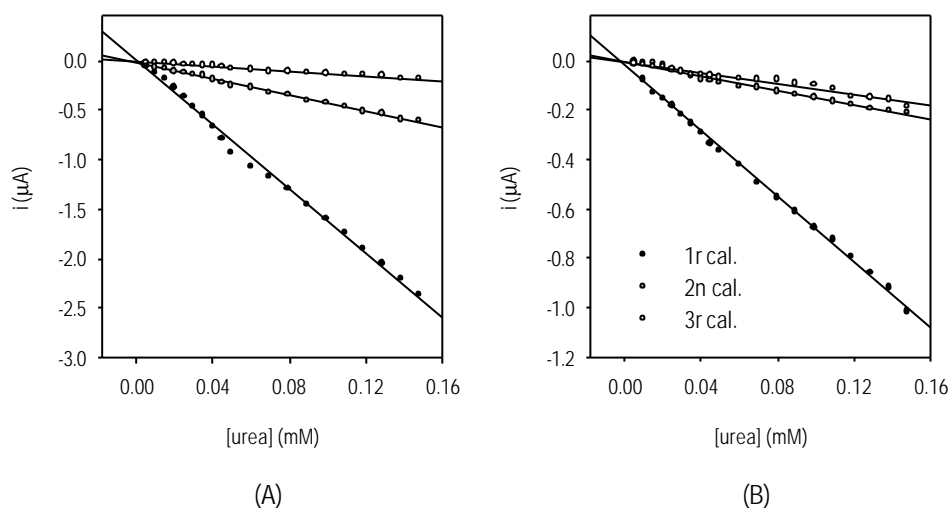


Figura 9.27: Corbes de calibració successives per a urea obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi recobert amb una membrana de polisulfona amb MB i els enzims GIDH, incorporat durant l'etapa d'inversió de fases que porta a la formació de la membrana, i ureasa i Dp, incorporats com a sòlid al compost inicial de polisulfona abans de la seva precipitació, sense capa protectora (A) i amb un recobriments basat en una capa densa de poliamida (B). Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

9.3.5.3 Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig

La Figura 9.28 inclou els espectres d'infraroig corresponents a membranes de polisulfona amb grafit i MB, que a més incorporen l'enzim GIDH, durant el procés d'inversió de fases, o bé l'enzim ureasa, addicionat com a sòlid al compost inicial de polisulfona abans de la formació de la membrana, o bé ambdós enzims alhora. De nou, la metodologia d'immobilització emprada és un punt clau per a explicar els espectres obtinguts. Si es comparen tots aquests espectres, s'observa com a l'espectre corresponent a la membrana que conté l'enzim ureasa destaca l'existència d'una banda en la regió que va de 1700 a 1600 cm^{-1} , corresponent a la zona d'absorcions dels enllaços típics de l'estructura terciària de les proteïnes, tal com succeeix per l'espectre corresponent a una membrana que incorpora l'enzim GIDH. Malgrat que l'estratègia d'immobilització emprada per l'enzim ureasa ha estat la mateixa que per a l'enzim Dp, ara l'espectre sí apareix modificat a diferència del que succeïa per a una membrana amb l'enzim Dp, on la presència d'aquest enzim a la superfície de la membrana era tan petita que no modificava els pics ja existents ni en feia aparèixer de nous. Per tant, esdevé necessari buscar una explicació a les diferències observades en les anàlisis dels espectres obtinguts. Una possible

justificació pot trobar-se en el fet que l'enzim ureasa posseeix un pes molecular de 480000 Da, és a dir, es tracta d'un enzim molt més voluminós que l'enzim Dp, de manera que sembla coherent pensar que possiblement la nova banda que apareix a l'espectre d'infraroig és deguda a part de l'enzim retingut durant la precipitació de la polisulfona, que ha quedat parcialment exposat, de manera que no està totalment amagat a l'interior polimèric, alhora que no es pot perdre per lixiviació quan es renta l'elèctrode.

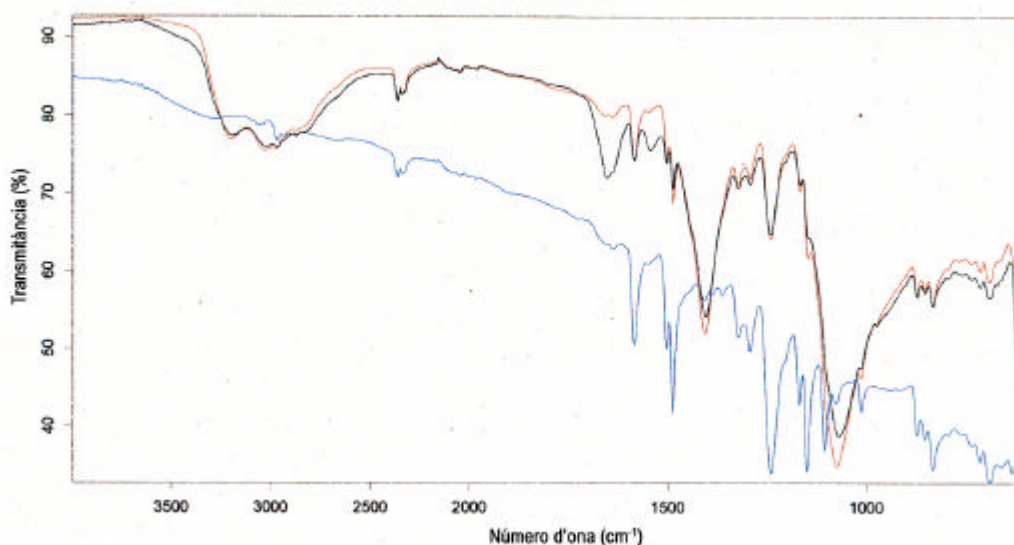


Figura 9.28: Espectres d'absorció en l'infraroig corresponents a diferents membranes de polisulfona: polisulfona amb grafit, MB i enzim GIDH (línia vermella), polisulfona amb grafit, MB i enzim ureasa (línia blava) i polisulfona amb grafit, MB i enzims GIDH i ureasa (línia negra).

9.3.5.4 Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa

La Figura 9.29 inclou els voltamperogrames hidrodinàmics obtinguts per a un dels biosensors per a urea preparats mitjançant tecnologia serigràfica, abans i després d'addicionar urea a la solució de treball, fins assolir una concentració igual a $2 \cdot 10^{-2}$ M. S'observa com és possible treballar amb un potencial de -0.1 V per a fer determinacions d'urea quan s'empra aquest tipus de biosensors.

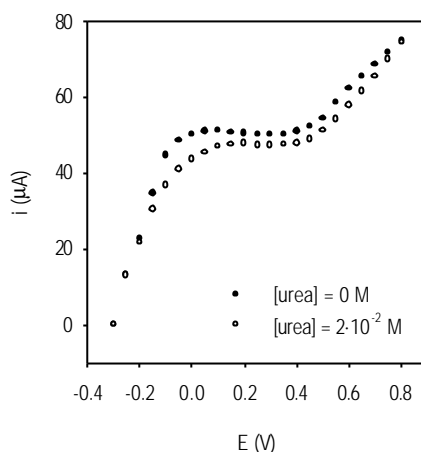


Figura 9.29: Voltamperogrames hidrodinàmics obtinguts quan s'empra com a elèctrode de treball un biosensor de configuració plana basat en una membrana de polisulfona amb grafit i MB que incorpora els enzims GIDH i ureasa. Els cercles negres corresponen a la solució de treball, mentre que els de color blanc corresponen a la mateixa solució després d'addicionar urea fins a una concentració igual a $2 \cdot 10^{-2}$ M. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M.

Finalment, s'ha validat la preparació dels biosensors per a urea desenvolupats mitjançant tecnologia serigràfica amb l'obtenció dels resultats inclosos a la Taula 9.7. L'obtenció d'un valor de sensibilitat inferior per als nous biosensors, s'explica en base a la diferència existent entre el tipus de polímer conductor emprat per a la seva construcció i la superfície activa d'aquests biosensors. En quant a la reproductibilitat per a corbes de calibració successives, empitjora notablement per als biosensors de configuració plana, possiblement com a conseqüència de la formació de capes de polisulfona de menys gruix, que pot ser que no retinguin tan bé l'enzim com ho feien les membranes dipositades manualment. De totes formes, la reproductibilitat associada a la preparació, fixada pel valor de RSD calculat per als pendents de corbes de calibració obtingudes amb diferents biosensors preparats de la mateixa manera, és tan sols d'un 4 %, de manera que es planteja la possibilitat de treballar amb una elevada fiabilitat, mitjançant l'ús d'un biosensor nou per a cada determinació. D'altra banda, també s'ha plantejat recobrir els biosensors serigratiats amb una capa de poliamida addicional. En aquest cas, la presència d'una capa densa redueix dràsticament la sensibilitat respecte al valor obtingut per a biosensors que no incorporen cap recobriments protector. S'observa com les poliamides preparades amb N-(2-aminoetil)-piperazina i amb piperazina mostren una bona reproductibilitat entre calibracions successives, però a expenses de la ja esmentada reducció de la seva sensibilitat a urea.

Taula 9.7: Paràmetres de resposta corresponents a les corbes de calibració per a la determinació d'urea, obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball diferents biosensors de configuració plana basats en membranes de polisulfona que incorporen els enzims GIDH i ureasa, recoberts amb diferents capes protectores. Solució de treball: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. S'ha avaluat la concentració d'urea en l'interval de $3.3 \cdot 10^{-6}$ a $9.9 \cdot 10^{-5}$ M. Cada valor correspon a la mitjana de 3 valors experimentals obtinguts a partir de corbes de calibració successives per a un mateix biosensor. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V.

RECOBRIMENT PROTECTOR	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
Sense recobriment	46627	0.9925	24
Poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	14715	0.9922	4
Poliamida preparada amb piperazina	7064	0.9952	4
Poliamida preparada amb 1,3-fenildiamina	11713	0.9961	8

9.4 CONCLUSIONS

Dels estudis realitzats en aquest capítol s'obtenen les següents conclusions:

- 1 El treball amb l'enzim GIDH, quan s'empra un sistema de detecció amperomètric, com per a la majoria de deshidrogenases, presenta una sèrie de dificultats associades totes elles al sobrepotencial implícit en els processos redox dels seus cofactors, que provoca problemes de passivació de la superfície, alhora que implica sensibilitats relativament baixes i límits de detecció elevats.
- 2 La possibilitat de què l'activitat catalítica de l'enzim GIDH es vegi regulada per diversos moduladors, en base a les seves propietats al·lostèriques, no permet ajustar la seva cinètica a la descrita per Michaelis-Menten. No obstant això, la viabilitat d'ajustar les dades experimentals a una determinada corba permet trobar un valor de concentració de substrat que proporciona una intensitat igual a la meitat de la intensitat màxima ($I_{\text{màx}}/2$). Aquest valor correspon a $K_{0.5}$, a fi de diferenciar-ho de la K_M associada a la cinètica de Michaelis-Menten. Així, el valor de $K_{0.5}$ obtingut quan l'enzim es troba en solució ha estat de $1.9 \cdot 10^{-5}$ M. Aquest valor confirma l'eficiència de l'enzim GIDH com a catalitzador de la reacció de l' α -cetoglutarat amb l'ió amoni per donar glutamat, fet que valida l'ús dels composts de grafit-epoxi com a transductors usats per seguir amperomètricament la reacció esmentada.
- 3 Si el seguiment de la reacció enzimàtica de la GIDH es porta a terme en base a l'oxidació de NADH, s'observa la necessitat d'un excés de NADH quan la reacció s'utilitza per a determinar l'ió amoni, atès

que a fi que la reacció tingui lloc, aprofitant la màxima activitat catalítica, es requereix una concentració mínima de cofactor. D'altra banda, les concentracions d' α -cetoglutarat i de cofactor fixen l'interval de concentracions d'ió amoni dins del qual es podrà treballar.

4 A mesura que augmenta la quantitat d'enzim retinguda sobre la superfície del compòsit, s'observa com la I_{\max} va creixent (en valor absolut) fins arribar a assolir un valor màxim, mentre que la $K_{0.5}$ es manté pràcticament constant.

5 Si bé la presència d'enzim retingut sobre la superfície d'un compòsit, mitjançant una membrana de diàlisi, permet fer varies calibracions successives sense una pèrdua significativa d'activitat catalítica, l'ús d'aquest mateix elèctrode en dies consecutius mostra una reducció de més del 85% de l'activitat enzimàtica. Aquesta inestabilitat de l'enzim amb el temps, descrita a la bibliografia, porta a pensar en la possibilitat d'afegir algun agent estabilitzant.

6 El valor de $K_{0.5}$ obtingut quan s'utilitza un elèctrode amb GIDH i o-PDA retinguts ambdós sobre la superfície d'un compòsit, mitjançant una membrana de diàlisi, confirma el bon acoblament de la reacció enzimàtica amb l'oxidació mediatitzada de NADH, atès que no difereix significativament de l'associat a un sistema equivalent sense mediador en solució.

7 De la mateixa manera, també s'observa un bon acoblament de la reacció enzimàtica amb l'oxidació de NADH, a través d'un mediador, quan s'electropolimeritza prèviament el mediador sobre la superfície del compòsit i, posteriorment, es reté l'enzim mitjançant una membrana de diàlisi. Si bé els quatre mediadors assajats, MB, p-BQ, o-PDA i 3,4-DHB, mostren una resposta diferenciada quan hi ha enzim, es pot concloure que l'elèctrode amb 3,4-DHB mostra les millors característiques, atès que mostra una major estabilitat de la resposta i permet assolir una sensibilitat superior a l'obtinguda per als altres mediadors.

8 D'altra banda, l'adsorció prèvia de l'enzim seguida de l'electropolimerització de 3,4-DHB no permet obtenir una resposta adequada per dur a terme el seguiment de la reacció enzimàtica a través del mediador. L'obtenció d'un senyal més gran al potencial de treball propi de l'oxidació de NADH en absència de mediador, fa suposar que la distribució basada en la retenció de l'enzim sobre la superfície de l'elèctrode, per part de la capa polimèrica de mediador, només permet fer un seguiment de la reacció a través d'un potencial adequat per detectar l'oxidació directa de NADH sobre la superfície de l'elèctrode. Això és degut a què el senyal mesurat està constituït majoritàriament per la intensitat que s'obté de l'oxidació de NADH a través del mediador, de manera que les disminucions de la concentració de NADH provocades pel consum enzimàtic d'aquest, només es poden detectar amb precisió si el NADH que aconsegueix travessar la pel·lícula polimèrica de mediador sense reaccionar amb ell, és susceptible d'ésser oxidat directament sobre la superfície de l'elèctrode al potencial de treball.

9 Malgrat que els biocompòsits de GIDH mostren unes característiques físiques acceptables, la seva resposta esdevé fortament afectada per petites variacions de temperatura, fet que dificulta l'estudi de la pèrdua enzimàtica. Dels biocompòsits amb diferents percentatges de GIDH avaluats, el que incorpora

un 4% d'enzim ha mostrat la major sensibilitat. Ara bé, s'observa com la seva activitat decreix més d'un 30% en quatre dies i esdevé pràcticament nul·la en poc més de 10 dies. Aquest fet fa palesa la necessitat d'incorporar algun tipus d'estabilitzant al compòsit a fi de mantenir l'enzim en un entorn més adequat per desenvolupar la seva activitat enzimàtica.

10 El recobriment dels biocompòsits amb enzim GIDH mitjançant diferents capes protectores, com polisulfones, poliamides o Nafió, no aconsegueix evitar les pèrdues d'enzim per lixiviació. En el cas dels biocompòsits recoberts amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona, amb diferents mediadors al seu interior, s'ha demostrat un bon acoblament entre la reacció enzimàtica i l'oxidació mediatitzada del NADH. Els biosensors preparats amb el biocompòsit amb un 4 % d'enzim GIDH, corresponent al percentatge d'enzim més elevat de tots els estudiats, ha mostrat la sensibilitat més elevada, si bé la reproductibilitat obtinguda per a corbes de calibració successives per a tots els biosensors desenvolupats no ha permès en cap cas assegurar una estabilitat suficient per a poder-ne fer un ús continuat.

11 L'electropolimerització de mediadors en presència d'enzim GIDH, depèn en gran mesura de la puresa de l'enzim emprat. Quan es treballa amb un enzim de poca puresa, té lloc una electropolimerització deficient, com a conseqüència de la presència al medi de reacció del propi enzim juntament amb altres components que l'acompanyen. En canvi, quan es parteix d'un preparat enzimàtic de puresa elevada, s'obté un perfil de sensibilitat, en funció de la quantitat d'enzim, diferent en què apareix un màxim que correspon a la quantitat d'enzim que encara permet una electropolimerització del mediador correcta, mentre que per a quantitats d'enzim superiors ja s'observen deficiències en aquest procés, degudes a la pròpia presència de l'enzim.

D'altra banda, la configuració basada en la realització de l'electropolimerització en dues etapes consecutives, en absència i en presència d'enzim respectivament, ofereix el biosensor amb les millors característiques de resposta, possiblement com a conseqüència d'una millora en la mediació de l'oxidació del NADH, atès que en aquest cas s'inclou una primera capa de mediador sense enzim que mostra una activitat electrocatalítica òptima. No obstant això, si es compara la retenció de l'enzim al polímer de mediador amb la seva retenció a una capa de polipirrol, aquest darrer procediment resulta ésser més efectiu, car dona biosensors amb sensibilitats molt més elevades. Ara bé, l'estabilitat associada a tots aquests biosensors, basats en diferents configuracions que incorporen mediador electropolimeritzat o capes de polipirrol, és molt pobre degut a pèrdues de l'enzim que no troba aquests polímers com a matrius adequades per a la seva retenció.

12 Els biosensors per a ió amoni basats en membranes de polisulfona amb mediador i enzim GIDH són els que han mostrat les millors característiques analítiques, amb sensibilitats elevades, bones reproductibilitats i temps de resposta curts, inferiors a 30 segons. Aquests biosensors han mostrat valors de $K_{0.5}^{AP}$ superiors a l'obtingut quan es treballa amb l'enzim GIDH en solució, atès que hi ha una pèrdua d'afinitat entre l'enzim i el substrat deguda possiblement a canvis conformacionals de l'enzim, provocats per la presència d'un medi hidrofòbic, o bé a la barrera difusional que es veu incrementada per la presència de la membrana de polisulfona. D'entre tots els biosensors estudiats l'òptim, en base

als valors de sensibilitat i reproductibilitat associada, ha estat el que conté MB com a mediador i, en quant a l'estratègia d'immobilització de l'enzim GIDH, els millors resultats s'han obtingut amb els biosensors que han incorporat l'enzim GIDH a la membrana de polisulfona durant el procés d'inversió de fases, mitjançant l'intercanvi de la dimetilformamida, emprada com a dissolvent del compost inicial de polisulfona, per la solució aquosa que conté l'enzim. Aquests biosensors són els que han mostrat un valor de $K_{0,5}^{AP}$ inferior, fet que fa palesa una millor afinitat entre l'enzim i el substrat, possiblement com a conseqüència de què aquesta metodologia d'immobilització no imposa tantes restriccions a l'enzim que, per tant, tindrà més mobilitat. Per últim, en quant a l'estabilitat d'emmagatzematge, s'ha comprovat que es perd menys d'un 3 % de la sensibilitat inicial durant una setmana, temps després del qual s'observa una disminució sobtada.

13 La incorporació de l'enzim Dp liofilitzat al compost inicial de polisulfona, prèviament a la seva precipitació, catalitza l'oxidació del NADH, fet que es demostra amb l'increment notable de la sensibilitat per a aquests biosensors. No obstant això, l'enzim es perd per dissolució, de manera que s'ha optat per recobrir aquests biosensors amb diferents capes protectores. L'ús de poliamides preparades amb N-(2-aminoetil)-piperazina i piperazina, pel fet d'ésser capes denses, permet una retenció de l'enzim més eficaç, que es veu reflectida en una millora de la reproductibilitat associada als pendents de corbes de calibració successives. Ara bé, el seu ús no és recomanable car disminueixen la sensibilitat, fins al punt d'obtenir valors per aquest paràmetre inferiors als obtinguts en absència d'enzim Dp.

14 Els biosensors per a urea desenvolupats a partir dels biosensors per a ió amoni optimitzats, basats en membranes de polisulfona, han mostrat una sensibilitat i una reproductibilitat associada òptimes, especialment quan la metodologia d'immobilització de l'enzim ureasa ha consistit en la seva incorporació com a sòlid al compost inicial de polisulfona amb MB, abans de la formació de la membrana. L'estudi de l'estabilitat d'emmagatzematge d'aquests biosensors durant una setmana, ha mostrat una pèrdua progressiva de la seva sensibilitat, de manera que caldrà cercar alguna estratègia per augmentar aquesta estabilitat, com ara mitjançant l'addició d'algun tipus d'agent estabilitzant.

15 La incorporació d'enzim Dp a la configuració del biosensor per a urea optimitzat, no aconsegueix augmentar la sensibilitat, probablement com a resultat de les pèrdues notables d'enzim cap a la solució, que ara es veuen afavorides pel fet que l'enzim ureasa competeix amb l'enzim Dp pel mateix espai al compost de polisulfona. En aquest cas, el recobriment amb una capa densa de poliamida no ha ajudat a millorar la retenció de l'enzim Dp.

16 S'ha validat la capacitat per a preparar els dos tipus de biosensors optimitzats, per a la determinació d'ió amoni i d'urea, mitjançant tecnologia serigràfica. La sensibilitat mostrada pels biosensors que no incorporen cap recobriment protector ha estat lleugerament inferior en ambdós casos, com a conseqüència de les diferències entre el tipus i la grandària de la superfície activa dels elèctrodes convencionals i els de configuració plana. A més, la reproductibilitat associada a corbes de calibració successives per a aquests biosensors s'ha vist afectada de manera notable, possiblement pel fet d'obtenir ara de forma automatitzada membranes d'un gruix inferior a les preparades manualment, fet que pot veure's reflectit en una sortida facilitada de l'enzim des de la membrana cap a la solució que hi

ha en contacte amb el biosensor. L'aplicació de capes denses de poliamida a aquests elèctrodes és un procés senzill que, en la majoria de casos, ha portat a l'obtenció de valors de reproductibilitat per a corbes de calibració successives molt bons, si bé la seva condició de barreres difusionals encara redueix més la sensibilitat a ió amoni o a urea, segons quin sigui el biosensor usat. Per últim, s'ha obtingut una bona reproductibilitat entre corbes de calibració per a diferents biosensors, sense recobriments protector, preparats seguint el mateix procediment (RSD= 4 %), que ha permès l'ús d'un biosensor nou per a cada determinació.

17 Els espectres d'infraroig obtinguts corroboren el tipus d'immobilització emprada per a cada enzim, així com la influència que té aquesta sobre l'efecte que rep l'enzim de l'ambient en què es troba. L'enzim GIDH, incorporat en solució durant l'etapa d'inversió de fases, modifica l'espectre corresponent a una membrana equivalent sense enzim, atès que penetra a la membrana mentre s'està formant, fet que porta a què una part important de l'enzim quedi exposada a la superfície i, per tant, aparegui a l'espectre d'infraroig obtingut per reflectància. D'altra banda, l'enzim ureasa, immobilitzat seguint la mateixa estratègia que l'enzim Dp, a diferència d'aquest, sí que modifica l'espectre corresponent a la membrana de polisulfona sense enzim, atès que el seu elevat pes molecular i, especialment, el seu volum considerable, fan que la quantitat d'enzim exposat a la superfície de la membrana sigui important, alhora que aquest queda millor retingut i, per tant, li és més difícil desprendre's de la membrana.

9.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ P. E. Peterson, T. J. Smith. *Structure with Folding & Design*, **7** (1999) 769-782
- ² S. K. Saha, H. F. Fisher. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1431** (1999) 261-265
- ³ S. K. Saha, S. J. Maniscalco, H. F. Fisher. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1382** (1998) 8-12
- ⁴ L. V. Karabashian, S. A. Agadzhanian, K. V. Danoian, R. A. Kazarian. *Bioorganica Khimiya*, **15** (1989) 32-39
- ⁵ T. Ghous, A. Townshend. *Analytica Chimica Acta*, **387** (1999) 47-51
- ⁶ P. Thavarungkul, H. Hakanson, O. Holst, B. Mattiasson. *Biosensors & Bioelectronics*, **6** (1991) 101-107
- ⁷ M. Danhof, D. D. Breimer. *Clinical Pharmacokinetics*, **3** (1978) 39-57
- ⁸ J. L. Orsonneau, C. Massoubre, M. Cabanes, P. Lustenberger. *Clinical Chemistry*, **38** (1992) 619-623
- ⁹ D. Kirstein, L. Kirstein, F. Scheller. *Biosensors*, **1** (1985) 117-130
- ¹⁰ R. E. Adams, P. W. Carr. *Analytical Chemistry*, **50** (1978) 944-950
- ¹¹ W. D. Neithercut, A. M. el-Nujumi, K. E. McColl. *Journal of Clinical Pathology*, **46** (1993) 462-464
- ¹² L. Gorton, L. Ogren. *Analytica Chimica Acta*, **130** (1981) 45-53
- ¹³ C.-S. Rui, H.-I. Ogawa, K. Sonomoto, Y. Kato. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57** (1993) 191-194
- ¹⁴ B. Xie, B. Danielsson. *Analytical Letters*, **29** (1996) 1921-1932
- ¹⁵ C. Stamm, K. Seiler, W. Simon. *Analytica Chimica Acta*, **282** (1993) 229-237
- ¹⁶ R. Koncki, G. J. Mohr, O. S. Wolfbeis. *Biosensors & Bioelectronics*, **10** (1995) 653-659
- ¹⁷ Y. Xu, C. Lu, Y. Hu, L. Nie, S. Yao. *Analytical Letters*, **29** (1996) 1069-1073
- ¹⁸ D. Liu, A. Yin, K. Chen, K. Ge, L. Nie, S. Yao. *Analytical Letters*, **28** (1995) 1323-1337
- ¹⁹ N. F. Sheppard Jr., D. J. Mears, A. Guiseppi-Elie. *Biosensors & Bioelectronics*, **11** (1996) 967-979
- ²⁰ G. A. Zhylyak, S. V. Dzyadevich, Y. I. Korpan, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya. *Sensors and Actuators*, **B24-25** (1995) 145-148
- ²¹ G. G. Guilbault, M. L. Seo. *Talanta*, **41** (1994) 1029-1033
- ²² P. Bertocchi, D. Compagnone, G. Palleschi. *Biosensors & Bioelectronics*, **11** (1996) 1-10
- ²³ G. Palleschi, M. Mascini, E. Martinez-Fàbregas, S. Alegret. *Analytical Letters*, **21** (1988) 1115-1129
- ²⁴ J. M. C. S. Magalhaes, A. A. S. C. Machado. *Talanta*, **47** (1998) 183-1
- ²⁵ N. Kazanskaya, A. Kukhtin, M. Manenkova, N. Reshetilov, L. Yarysheva, O. Arzhakova, A. Volynskii, N. Bakeyev. *Biosensors & Bioelectronics*, **11** (1996) 253-261
- ²⁶ V. Volotovskiy, N. Kim. *Electroanalysis*, **10** (1998) 61-63

- ²⁷ C. Preininger, O. Wolfbeis. *Biosensors & Bioelectronics*, **11** (1996) 981-990
- ²⁸ V. Volotovskiy, Y. J. Nam, N. Kim. *Sensors and Actuators*, **B42** (1997) 233-237
- ²⁹ A. K. Abass, J. P. Hart, D. C. Cowell, A. Chappell. *Analytica Chimica Acta*, **373** (1998) 1-8
- ³⁰ L. Gorton. *Electroanalysis*, **7** (1995) 23-45
- ³¹ N. Pasco, C. Jeffries, Q. Davies, A. J. Downard, A. D. Roddick-Lanzilotta, L. Gorton. *Biosensors & Bioelectronics*, **14** (1999) 171-178
- ³² C. Jeffries, N. Pasco, K. Baronian, L. Gorton. *Biosensors & Bioelectronics*, **12** (1997) 225-232
- ³³ S. Yabuki, F. Mizutani, M. Asai. *Biosensors & Bioelectronics*, **6** (1991) 311-315
- ³⁴ A. Curulli, I. Carelli, O. Trischitta, G. Palleschi. *Biosensors & Bioelectronics*, **12** (1997) 1043-1055
- ³⁵ H. Zhao, Y. Yuan, S. Adeloju, G. G. Wallace. *Analytica Chimica Acta*, **472** (2002) 113-121
- ³⁶ H. Kusakabe, Y. Midorikawa, T. Fujishima, A. Kuninaka, H. Yoshino. *Agricultural Biological Chemistry*, **47** (1983) 1323-1328
- ³⁷ F. Scheller, F. Schubert. Physico-chemical, biochemical and technological fundamentals of biosensors: immobilisation effects in biosensors. A: *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol 11, Biosensors*. Amsterdam, Elsevier (1992) pp 53-56
- ³⁸ H.-C. Shu, B. Mattiasson, B. Persson, L. Gorton, S. Sahani, L. Geng, L. Bouguislavsky, T. Skotheim. *Biotechnology and Bioengineering*, **46** (1995) 270-279

**PART IIB. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS
AMPEROMÈTRICS BASATS EN ENZIMS OXIDASES**

PART IIB. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN ENZIMS OXIDASES

Els enzims oxidases posseeixen un cofactor electroquímicament actiu, fortament enllaçat a la seva estructura, que pot ser de tipus flavina, com és el cas dels cofactors FAD o FMN, o bé un grup que conté un ió coure. La característica principal d'aquest tipus d'enzims, és que tots ells utilitzen l'oxigen molecular com a agent per a dur a terme la reoxidació que tanca el cicle catalític en què hi participen. Segons la capacitat de l'enzim per cedir 2 o 4 electrons a la molècula d'oxigen, el producte final que s'obté és peròxid d'hidrogen o aigua. Ja es va comentar que el seguiment electroquímic de les reaccions basades en enzims oxidases es pot fer mitjançant la mesura de la disminució de l'oxigen present a la solució, o bé en base a l'oxidació, i en alguns casos a la reducció, del peròxid d'hidrogen format, determinacions que impliquen una sèrie de limitacions.

Habitualment, per a la majoria d'enzims oxidases, la detecció es basa en la determinació del peròxid d'hidrogen, sempre que aquest aparegui com a producte. És per aquest motiu que al següent capítol s'inclou el desenvolupament d'un biosensor amperomètric per a la determinació de glucosa, com a un exemple de biosensor compacte basat en enzims oxidases, que aprofita el quimiosensor obtingut anteriorment per a la determinació de peròxid d'hidrogen basat en matrius de xerogel amb caràcter catalític. Si bé és cert que l'assoliment de sistemes que assegurin una bona transferència electrònica entre el peròxid d'hidrogen i la superfície electròdica, mitjançant espècies que catalitzen el procés, és de vital importància, queda ara per desenvolupar una etapa crítica, que correspon a la immobilització de l'enzim a la mateixa matriu que conté les espècies que catalitzen la transferència electrònica, de manera que aquesta mostri un ambient adequat per a l'enzim i que, alhora presenti una porositat que eviti les pèrdues de l'enzim per lixiviació. Per aconseguir aquestes característiques s'han comparat diferents protocols per a la immobilització de l'enzim, amb l'objectiu de dissenyar un model amb un comportament analític òptim, que pugui ésser aplicat per al desenvolupament de biosensors basats en altres enzims oxidases.

10 DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN L'ENZIM GLUCOSA OXIDASA

10.1 INTRODUCCIÓ

La determinació de glucosa ha estat, i encara és, d'importància cabdal en els camps biotecnològic i mèdic, especialment per al tractament i control de la diabetis.¹

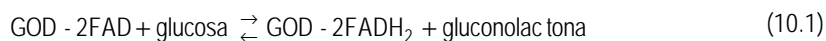
La disponibilitat, el relatiu baix cost, l'especificitat, l'elevada activitat i la bona estabilitat de l'enzim glucosa oxidasa (GOD), així com la importància comercial d'obtenir sensors per a glucosa, han estat responsables de què aquest hagi estat l'enzim més emprat per al desenvolupament de biosensors. Sovint s'ha utilitzat per a la preparació de proves d'una determinada configuració electròdica per, posteriorment, ésser substituït per enzims oxidases que impliquen altres analits d'interès. Això és degut a que l'ampli coneixement que es té del seu comportament, basat en els nombrosos estudis duts a terme, ha permès que serveixi com a model per a il·lustrar les limitacions que pot presentar cada tipus de biosensor basat en aquest enzim, fet que ajuda a saber com resoldre aquests problemes i, així, poder aplicar la mateixa configuració a biosensors amperomètrics basats en altres enzims oxidases.



Figura 10.1: Estructura molecular tridimensional de l'enzim glucosa oxidasa.

L'enzim GOD més freqüentment emprat és l'extret del fong *Aspergillus Niger*, i correspon a una flavoproteïna dimèrica que té un pes molecular de 160 kDa i que conté enllaçades dues molècules idèntiques del cofactor FAD, una a cada monòmer, sense cap tipus d'interacció entre elles.² Atès que

aquestes no es poden dissociar completament de l'enzim, és més correcte parlar de grups prostètics, que poden ésser reduïts de forma reversible per donar FADH₂. El procés enzimàtic que té lloc, està constituït per dues reaccions en equilibri:³



El centre actiu de l'enzim GOD, amb els dos grups FAD, es troba profundament amagat a l'interior de l'estructura glicoproteica, a uns 13 Å de la superfície,^{4,5} de manera que esdevé necessària la presència d'un acceptor d'electrons que participi en la transferència electrònica entre aquests grups prostètics i la superfície electròdica, car una transferència electrònica directa és difícilment assolible. L'acceptor d'electrons natural que usen tots els enzims oxidases és l'oxigen dissolt a la solució de treball. En aquest cas, com ja s'ha vist en general per als enzims oxidases, el seguiment de la concentració de glucosa es pot fer, tant en base a la variació de la concentració d'oxigen dissolt,⁶ com de l'oxidació o reducció del peròxid d'hidrogen que es forma com a resultat de la cessió, per part de l'enzim GOD, de dos electrons a la molècula d'oxigen. El seguiment en funció del consum d'oxigen s'ha dut a terme mitjançant la reducció electroquímica d'aquesta molècula, que en la majoria de casos no ha permès la detecció de petites concentracions de glucosa. Les causes d'aquesta limitació es troben en el gran excés d'oxigen present, la variació de la seva concentració en fluids biològics i, per últim, que la seva detecció té lloc a un potencial que és suficient per reduir el peròxid d'hidrogen format.⁷ A fi d'evitar aquests problemes, freqüentment els biosensors amperomètrics de glucosa basen el seu sistema de detecció en la determinació de la concentració de peròxid d'hidrogen que, d'altra banda, requereix sobrepotencials elevats que redueixen notablement la selectivitat a glucosa i alhora la sensibilitat, com a conseqüència de l'elevat soroll que apareix quan es mesura el corrent anòdic. Aquestes limitacions acostumen a ésser superades amb l'ús d'espècies amb característiques catalítiques, com per exemple mediadors d'oxidació-reducció,^{8,9} alguns metalls^{10,11} o diversos polímers conductors^{12,13} entre d'altres, que aconsegueixen velocitats de transferència electrònica més elevades entre el peròxid d'hidrogen i la superfície electròdica, o el que és el mateix, entre el centre actiu de l'enzim i el transductor.

Però el que realment representa una etapa crucial en el desenvolupament dels biosensors enzimàtics, és la immobilització de l'enzim, en aquest cas concret en una matriu que a més ha de contenir l'espècie catalítica necessària, sense que es produeixin pèrdues de cap dels dos components incorporats, car aquestes pèrdues determinaran l'estabilitat a llarg termini dels biosensors desenvolupats. De fet, actualment l'estudi de nous "sistemes químics integrats" que es caracteritzen per estar constituïts per sistemes heterogenis de multifases que contenen diferents components, cadascun amb una funció específica, és una àrea d'interès creixent. I és aquí on es troba inclòs el disseny molecular de les superfícies electròdiques que configuren els biosensors.

Ja s'ha parlat anteriorment de la idoneïtat dels gels de sílice com a matrius per a la incorporació d'enzims sobre la superfície electròica, atès que presenten característiques tan importants com una certa inèrcia química, una bona estabilitat mecànica i la possibilitat d'ésser modificats de manera química o biològica.¹⁴ A més, el control de la seva porositat permet assolir la difusió adequada de reactius i productes a través de la matriu, alhora que ajuda a evitar la sortida de l'enzim i de les espècies catalítiques retingudes. Els gels de sílice han estat emprats àmpliament en el desenvolupament de biosensors per a glucosa.^{15,16,17,18} Existeixen diferents configuracions possibles alhora de dissenyar aquest tipus de biosensors per a glucosa, basades en l'aplicació del gel com a una capa prima,^{19,20} que podrà ésser incorporada al biosensor mitjançant tècniques serigràfiques,^{21,22} en diferents multicapes,^{23,24} per exemple de tipus sandvitx,^{25,26,27,28} o bé en la modificació del volum del transductor amb gel mesclat amb grafit com a material que aporta la conductivitat.^{29,30} A més, a fi d'aconseguir les propietats desitjades, ja siguin físiques o químiques, per al gel usat en la modificació, s'han preparat composts mitjançant la incorporació d'altres components^{31,32}. Cada configuració presenta certs avantatges i inconvenients que cal avaluar per a cada situació concreta. Així, per exemple, les capes primes acostumen a patir problemes de pèrdues de l'enzim per dissolució, mentre que quan es vol modificar el cos del transductor amb el gel de sílice, la resposta sol ésser més lenta, alhora que el cost de preparació és superior, car el contingut d'enzim s'incrementa. Un altre punt que afecta a totes les configuracions possibles en major o menor grau, és l'exposició de l'enzim GOD a les condicions extremes que implica la formació d'un gel de sílice, és a dir, a catalitzadors, bàsics o àcids, i al solvent emprat, habitualment metanol o etanol, que poden causar una desnaturalització parcial de l'enzim.³³

10.2 EXPERIMENTAL

10.2.1 APARELLS I REACTIUS

10.2.1.1 Aparells

Les mesures electroquímiques de tipus amperomètric, s'han efectuat amb un potenciostat Autolab PGSTAT20 (Eco Chemie, Holanda) a una cel·la voltamètrica de 15 ml de volum (VC2, BAS, U.S.). Tots els experiments s'han realitzat amb un sistema convencional de tres elèctrodes, en què l'elèctrode de treball ha estat un elèctrode de platí (1.6 mm de diàmetre, BAS), el de referència un elèctrode de Ag/AgCl/3 M KCl (BAS) i l'auxiliar un fil de platí (BAS).

10.2.1.2 Reactius

L'enzim glucosa oxidasa de tipus X-S (GOD, EC 1.1.3.4) procedent d'*Aspergillus niger*, la β -D(+)-glucosa, el glutaraldehyd al 25 % i la proteïna de sèrum boví (BSA) han estat subministrats per la casa comercial Sigma. Les membranes de policarbonat, d'un gruix de 10 μ m s'han adquirit a la firma Nucleopore (Cambridge, MA). L'acetat de polivinil amb residus d'estiril piridini (PVA-SbQ), que polimeritza mitjançant una iniciació fotoquímica, s'ha comprat a la casa Toyo Gosei Kogyo (Chiba, Japó). El PVA-SbQ posseeix graus de polimerització i de saponificació de 1700 i 88, respectivament. El percentatge de contingut sòlid en pes és de 13.0 ± 0.5 i el contingut de SbQ en percentatge molar és 1.32 ± 0.05 . Altres reactius usats ja han estat especificats en capítols anteriors.

La resta de reactius emprats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

S'ha preparat una solució stock de glucosa 0.2 M 24 hores abans d'ésser emprada, per donar temps a què es produeixi el procés de mutarrotació.

10.2.2 DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN BIOSENSOR PER A LA DETERMINACIÓ DE GLUCOSA BASAT EN MEMBRANES AMB COMPÒSITS DE XEROGELS AMB METALLS QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUCOSA OXIDASA

10.2.2.1 Preparació dels elèctrodes coberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen GOD

Prèviament a la preparació dels biosensors, s'ha dut a terme el poliment físic de l'elèctrode de treball amb Al_2O_3 sobre una tela de llana, després s'ha mantingut 3 minuts a un bany sotmès a l'ultrasons i, finalment, s'ha rentat amb abundant aigua bidestil·lada i amb etanol. Tots els biosensors desenvolupats han incorporat a la seva configuració una membrana de xerogel modificat amb metalls (Ce, Zn i Fe), responsable de catalitzar el procés de detecció basat en l'oxidació de peròxid d'hidrogen, mitjançant l'assoliment d'una transferència electrònica efectiva. S'han avaluat tres configuracions diferents, segons l'estratègia d'immobilització emprada per a l'enzim GOD. Totes elles han emprat gels de sílice que s'han dipositat sobre la superfície electròdica d'un elèctrode de platí. La primera configuració ha consistit en la deposició de 10 μ l d'un dels compòsits amb xerogel modificat amb algun metall, sintetitzat segons el procediment descrit a § 6.2.3.1, però amb la diferència que ha incorporat l'enzim GOD durant aquesta síntesi. La segona s'ha basat en l'aplicació de 10 μ l d'un dels compòsits amb xerogel modificat amb algun metall i, a continuació, un cop s'ha deixat el temps suficient per a què s'assequés, es fa una segona deposició, però en aquest cas d'una alíquota de 10 μ l d'una solució aquosa de l'enzim GOD. Per últim, s'ha assajat una tercera configuració, preparada per la deposició consecutiva de dues membranes. La membrana interior, que estarà en contacte amb la superfície electròdica, correspon a 10 μ l del compòsit amb xerogel modificat amb metalls, mentre que l'exterior,

dipositada un cop s'ha assecat la primera, s'ha aplicat mitjançant la deposició de 10 μl de gel de sílice que conté enzim GOD. Aquest darrer gel de sílice, preparat segons el procediment descrit a § 7.2.3.1.1, però amb la incorporació de l'enzim GOD enlloc de l'enzim HRP, s'ha diluït amb aigua al 50 % i s'ha escalfat, prèviament a la incorporació d'un 4 % de PEG i de l'enzim, per a eliminar l'etanol i així evitar que aquest pugui afectar a l'estabilitat de l'enzim. En tots els casos, la quantitat de gel o de solució aquosa dipositada, ambdues amb enzim GOD, ha correspost a un equivalent de 200 U d'enzim. Un cop dipositades totes les membranes, cal deixar que s'evaporin els diferents dissolvents en un ambient sec. Tanmateix, amb fins comparatius, s'han preparat també biosensors per a glucosa basats en una primera membrana de xerogel modificat amb ceri, sobre la qual s'ha dipositat una segona membrana de PVA-SbQ, compost que polimeritza quan s'irradia amb llum ultraviolada de 365 nm.^{34,35,36,37} Un cop dipositada la mescla que conté enzim GOD, PVA-SbQ al 24 % i BSA al 10% sobre la capa de xerogel, es guarda l'elèctrode a un recipient segellat saturat de vapors de glutaraldehid per a que tingui lloc el procés d'assecat durant 12 hores a una temperatura de 4°C. Passat aquest temps, s'exposa la membrana durant una hora a una font de radiació UV de 365 nm, situada a una distància de 10 cm aproximadament. Durant aquest procés de polimerització té lloc l'atrapament de l'enzim GOD, que es trobava dissolt a l'aliquota dipositada. Finalment, com a recobriment protector per a possibles pèrdues d'enzim per dissolució, s'han recobert aquest tipus de biosensors amb una membrana de policarbonat, mitjançant l'ús d'una junta tòrica per a la correcta fixació de la membrana sobre la superfície electròdica.

10.2.2.2 Estudi de la resposta amperomètrica a glucosa

S'han avaluat les característiques analítiques dels biosensors desenvolupats per a la determinació de glucosa. S'ha aplicat un potencial de 0.65 V a una cel·la electroquímica que contenia 15 ml de tampó fosfat 0.05M i KCl 0.05M a pH 6.9 en agitació continua. Un cop estabilitzat el senyal mesurat, s'han començat a addicionar microvolums de solucions de glucosa de diferent concentració (0.01 o 0.1 M) i s'han enregistrat els canvis d'intensitat de corrent corresponents a la resposta amperomètrica.

Finalment, s'ha avaluat l'estabilitat d'emmagatzematge dels biosensors desenvolupats durant un període de temps de dos mesos, mitjançant mesures puntuals d'intensitat de corrent per a addicions de glucosa fins a una concentració 0.1 mM. Els biosensors estudiats s'han mantingut emmagatzemats en sec a 4°C.

10.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

10.3.1 DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN BIOSENSOR PER A LA DETERMINACIÓ DE GLUCOSA BASAT EN MEMBRANES AMB COMPÒSITS DE XEROGELS AMB METALLS QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUCOSA OXIDASA

10.3.1.1 Preparació i avaluació dels elèctrodes coberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen GOD

De les tres primeres configuracions avaluades (vegeu Figura 10.2), només la tercera, és a dir, la basada en dues membranes dipositades successivament, una primera de xerogel modificat amb metalls, i una segona de gel de sílice amb enzim GOD retintut al seu interior, ha permès preparar biosensors per a la determinació de glucosa suficientment estables com per a fer possible l'obtenció de corbes de calibració per a glucosa. Possiblement, a la configuració basada en l'ús d'una sola membrana de xerogel modificat amb metalls i amb l'enzim GOD, aquest biocatalitzador rep l'efecte de la presència de metalls a la mateixa matriu en què es troba immobilitzat, fet que pot provocar la seva desnaturalització, alhora que també pot ésser afectat pel dissolvent metanol que ha estat emprat i encara és present a la matriu de sílice. D'altra banda, la segona configuració consistent en l'adsorció de l'enzim GOD sobre la membrana de xerogel modificat amb metalls prèviament dipositada, tampoc permet l'obtenció d'un biosensor estable per a glucosa probablement com a conseqüència de la desorció de l'enzim, que fàcilment es pot perdre per dissolució un cop es submergeix l'elèctrode a la solució de treball. El quart tipus de biosensors, basat en tres membranes, una primera de xerogel modificat amb ceri, una segona del polímer fotocurable PVA-SbQ que conté l'enzim GOD al seu interior, i una tercera de policarbonat, també ha mostrat una estabilitat suficient com per a ésser emprat en la determinació de glucosa.

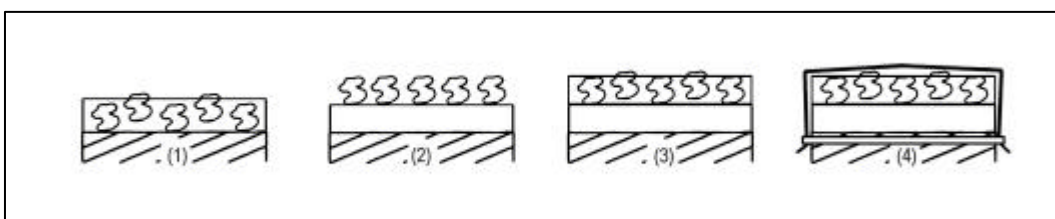
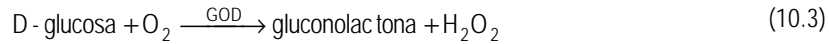


Figura 10.2: Diferents configuracions electròdiques emprades en el desenvolupament de biosensors per a glucosa basats en xerogels modificats amb metalls: (1) atrapament de l'enzim GOD en un compost basat en xerogels modificats amb metalls, (2) adsorció de l'enzim GOD sobre composts basats en xerogels modificats amb metalls, (3) atrapament de l'enzim GOD en un gel de sílice sense etanol aplicat sobre composts basats en xerogels modificats amb metalls i (4) atrapament de l'enzim GOD en un polímer fotocurable (PVA-SbQ) aplicat sobre composts basats en xerogels modificats amb metalls, amb una membrana de policarbonat que protegeix les dues membranes dipositades.

10.3.1.2 Estudi de la resposta amperomètrica a glucosa

Tots els biosensors desenvolupats han basat el seguiment de la reacció enzimàtica mitjançant l'oxidació del peròxid d'hidrogen que s'obté com a producte:



La Figura 10.3 mostra les corbes de calibració obtingudes quan s'empra el biosensor preparat amb una primera capa de xerogel modificat amb ceri i una segona de polímer PVA-SbQ amb enzim GOD retintut al seu interior. S'observa com quan es protegeix el biosensor amb una membrana de policarbonat, s'assoleix una molt bona reproductibilitat entre pendents de corbes de calibració successives (RSD = 0.5 %) un cop s'ha arribat a un estat estable, que s'obté després de la segona corba de calibració efectuada. En canvi, si s'intenta treballar sense el recobriment de policarbonat, la sensibilitat disminueix marcadament, alhora que esdevé impossible efectuar més d'una corba de calibració consecutiva. Aquest comportament troba la seva explicació en una suposada pèrdua de l'enzim GOD des de l'interior del polímer fotocurable, quan no s'afegeix una capa protectora per a evitar-ho.

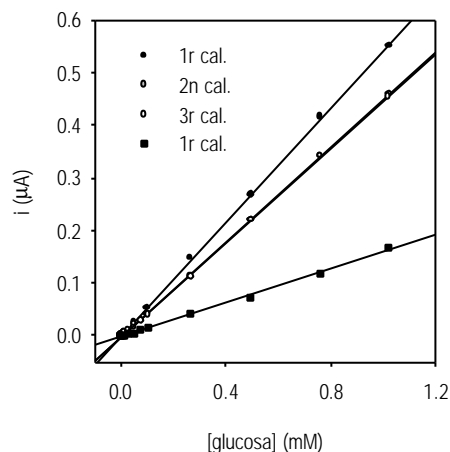


Figura 10.3: Corbes de calibració per a glucosa, obtingudes quan s'empren biosensors basats en una primera membrana de xerogel modificat amb ceri i una segona membrana d'un polímer fotocurable (PVA-SbQ) que conté l'enzim GOD retintut al seu interior, recoberts (cercles) o no (quadrats) amb una membrana addicional de policarbonat. El potencial aplicat ha estat 0.65 V.

D'altra banda, la Figura 10.4 mostra el registre que s'obté quan s'empra un biosensor basat en una primera capa de xerogel modificada amb ferro i una segona de gel de sílice, sense etanol, que incorpora l'enzim GOD, quan s'efectuen addicions de diferents volums d'una solució de glucosa. L'increment de la intensitat de corrent causat per l'oxidació del peròxid d'hidrogen format a la reacció

enzimàtica, s'observa clarament per a cada addició de glucosa, alhora que esdevé palesa una ràpida estabilització d'aquest senyal que permet fer addicions amb un espai de temps molt reduït entre elles.

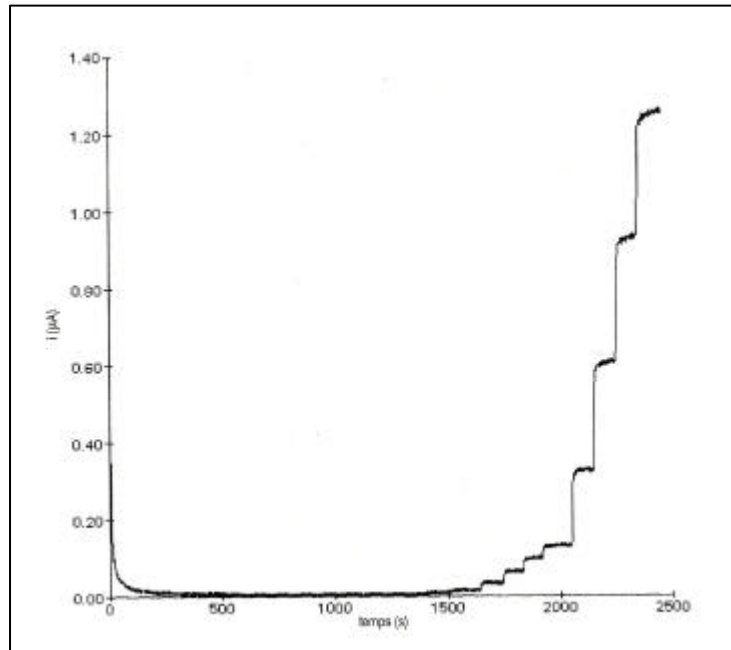


Figura 10.4: Registre obtingut per a addicions de diferents microvolums d'una solució de glucosa, quan s'empra un biosensor basat en una primera membrana de xerogel modificat amb ferro i una segona de gel de sílice, sense etanol, que incorpora l'enzim GOD al seu interior. El potencial de treball aplicat és 0.65 V.

La Figura 10.5 recull les corbes de calibració obtingudes amb aquest biosensor i amb els biosensors equivalents, basats en la mateixa configuració, amb l'única diferència del metall que modifica el xerogel dipositat, inicialment, sobre la superfície de l'elèctrode de platí. Els paràmetres de calibració corresponents a aquestes corbes, així com els obtinguts per al primer biosensor avaluat que incorporava l'enzim retingut al polímer PVA-SbQ, es troben recollits a la Taula 10.1. Val a dir que, en general, tots els biosensors basats únicament en membranes de gels de sílice, mostren un millor comportament que el trobat per al biosensor que reté l'enzim al polímer PVA-SbQ, atès que ofereixen sensibilitats més elevades i intervals lineals més amplis. D'aquesta observació es dedueix que l'enzim GOD troba en el gel de sílice un ambient més adequat per a la seva immobilització que en el polímer PVA-SbQ, ja sigui perquè és més semblant al seu medi natural i, per tant, l'enzim pot mantenir millor la seva configuració sense desnaturalitzar-se, o bé perquè queda millor retingut, sense pèrdues de l'enzim per lixiviació. De fet, és per aquestes possibles pèrdues de l'enzim per dissolució que els biosensors basats en la immobilització de l'enzim en el polímer fotocurable, incorporen una membrana

adicional de policarbonat que, en principi, pot ésser responsable de l'obtenció de sensibilitats inferiors per a glucosa, tot i que no es pot avaluar amb total fiabilitat, ja que en absència d'aquesta capa la pèrdua d'enzim és tan important que la sensibilitat es veu dràsticament reduïda, alhora que esdevé impossible obtenir una segona corba de calibració.

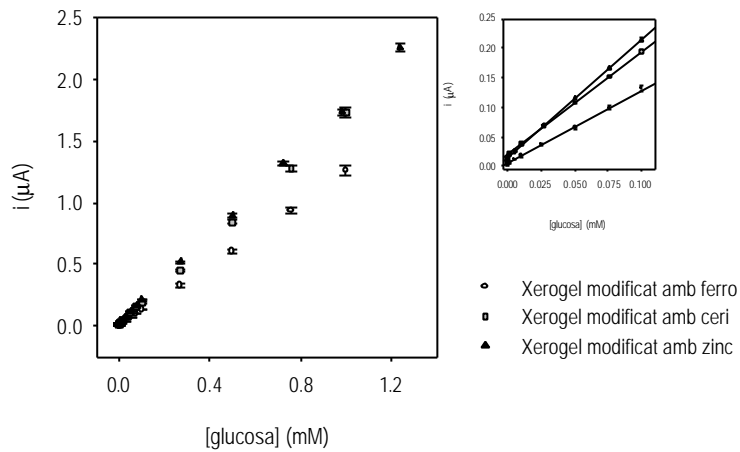


Figura 10.5: Corbes de calibració per a glucosa, obtingudes quan s'empren biosensors basats en una primera membrana de xerogel modificat amb diferents metalls i una segona membrana de gel de sílice, sense etanol, que conté l'enzim GOD retingut al seu interior. Cada corba de calibració correspon a la mitjana de 3 valors experimentals. S'han inclòs barres d'error calculades com a \pm la desviació estàndard associada. El potencial aplicat ha estat 0.65 V.

Finalment, s'ha avaluat l'estabilitat d'emmagatzematge per als 3 biosensors que contenen l'enzim GOD a una membrana de gel de sílice, quan aquests es guarden en sec a 4°C durant un període de dos mesos. Els resultats obtinguts indiquen que el manteniment de la intensitat de corrent mesurada inicialment per als biosensors amb una primera capa de xerogel modificat amb ceri, zinc i ferro, ha estat igual a un 95, 94 i 92 %, respectivament.

Taula 10.1: Característiques de resposta corresponents a les corbes de calibració per a la determinació de glucosa, obtingudes quan s'empra com a elèctrode de treball diferents biosensors basats en una primera membrana de xerogel modificat amb diferents metalls, i una segona membrana que incorpora l'enzim GOD, ja sigui a una capa d'un polímer fotocurable (PVA-SbQ), o bé retingut a una membrana d'un gel de sílice sense etanol. Cada valor mostrat prové de la mitjana de 3 valors experimentals, excepte la reproductibilitat que correspon a la desviació estàndard relativa calculada a partir 5 valors d'intensitat de corrent mesurats quan la concentració de glucosa al medi és igual a 0.1 mM. El potencial aplicat ha estat 0.65 V.

METALL QUE MODIFICA EL XEROGEL	INTERVAL LINEAL (M)	MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu\text{A}/\text{M}$)	LÍMIT DE DETECCIÓ (μM)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
<u>Enzim GOD atrapat a una capa de polímer PVA-SbQ</u>					
Ce	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	450	9	0.9996	5
<u>Enzim GOD retingut a una membrana de gel de sílice sense etanol</u>					
Ce	$5 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	1690	3	0.9993	2
Zn	$4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	1780	2	0.9994	4
Fe	$8 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	1240	6	0.9996	3

10.4 CONCLUSIONS

Les conclusions deduïdes a partir dels resultats presentats en aquest capítol han estat:

- 1 D'entre les diferents configuracions electròdiques estudiades per al desenvolupament d'un biosensor per a glucosa basat en una primera membrana de xerogel modificat amb metalls, només han demostrat ésser estables les que incorporen l'enzim en una segona membrana addicional, ja sigui d'un polímer fotocurable (PVA-SbQ) o d'un gel de sílice sense etanol.
- 2 Els biosensors que incorporen l'enzim al polímer PVA-SbQ, requereixen la incorporació d'una membrana addicional de policarbonat, que evita les pèrdues de l'enzim per lixiviació, des de l'interior del polímer cap a la solució.
- 3 Les matrius de gel de sílice són adequades per a la immobilització de l'enzim GOD, fet que esdevé palès amb els paràmetres de resposta a glucosa obtinguts, que són òptims quan es parla de biosensors que basen la seva configuració en una primera membrana amb propietats catalítiques, i una segona que reté l'enzim GOD a un gel de sílice al qual se li ha evaporat prèviament l'etanol per a què aquest no alteri l'estructura proteica de l'enzim.

4 A més d'assolir una bona sensibilitat, uns amplis intervals lineals de resposta i una excel·lent reproductibilitat entre determinacions de glucosa consecutives, els tres biosensors basats en la retenció de l'enzim GOD a l'interior d'un gel de sílice sense etanol, han mostrat una elevada estabilitat d'emmagatzematge durant els 2 mesos en què s'han avaluat.

10.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ U. Fischer, K. Rebrin, T. V. Woedtke, P. Abel. *Hormonal Metabolism Research*, **26** (1994) 515-522
- ² J. H. Pazur, K. Kleppe. *Biochemistry*, **3** (1964) 578-583
- ³ G. W. J. Harwood, C. W. Pouton. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **18** (1996) 163-191
- ⁴ W. Schuhmann. *Mikrochimica Acta*, **121** (1995) 1-29
- ⁵ H. J. Hecht, D. Schomburg, H. Kalisz, R. D. Schmid. *Biosensors & Bioelectronics*, **8** (1993) 197-203
- ⁶ X. Wu, M. M. F. Choi, D. Xiao. *Analyst*, **125** (2000) 157-162
- ⁷ Y. Nakabayashi, A. Omayu, S. Yagi, K. Nakamura, J. Motonaka. *Analytical Sciences*, **17** (2001) 945-950
- ⁸ K. Kano, T. Ikeda. *Analytical Sciences*, **16** (2000) 1013-1021
- ⁹ I. Willner, E. Katz, B. Willner. *Electroanalysis*, **9** (1997) 965-977
- ¹⁰ Y. Ikariyama, S. Yamauchi, T. Yukiashi, H. Ushioda. *Journal of the Electrochemical Society*, **136** (1989) 702-706
- ¹¹ K. W. Johnson. *Sensors and Actuators*, **B5** (1991) 85-89
- ¹² Y. Degani, A. Heller. *Journal of the American Chemical Society*, **111** (1989) 2357-2358
- ¹³ N. C. Foulds, C. R. Lowe. *Analytical Chemistry*, **60** (1988) 2473-2478
- ¹⁴ X. Yang, L. Hua, H. Gong, S. N. Tan. *Analytica Chimica Acta*, **478** (2003) 67-75
- ¹⁵ J. Wang, D. S. Park, P. V. A. Pamidi. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **434** (1997) 185-189
- ¹⁶ B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong. *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 3170-3174
- ¹⁷ S. Bharathi, O. Lev. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **89** (2000) 209-216
- ¹⁸ P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak. *Sensors and Actuators*, **B60** (1999) 83-89
- ¹⁹ Z. Liu, B. Liu, M. Zhang, J. Kong, J. Deng. *Analytica Chimica Acta*, **392** (1999) 135-141
- ²⁰ U. Künzelmann, H. Böttcher. *Sensors and Actuators*, **B38-39** (1997) 222-228
- ²¹ Y. Guo, A. R. Guadalupe. *Sensors and Actuators*, **B46** (1998) 213-219
- ²² J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2705-2708
- ²³ T. Matsumoto, A. Ohashi, N. Ito, H. Fujiwara, Y. Matsumoto. *Biosensors & Bioelectronics*, **16** (2001) 271-276
- ²⁴ T. Matsumoto, A. Ohashi, N. Ito. *Analytica Chimica Acta*, **462** (2002) 253-259
- ²⁵ J. Li, L. S. Chia, N. K. Goh, S. N. Tan. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **460** (1999) 234-241
- ²⁶ J. Li, L. S. Chia, N. K. Goh, S. N. Tan, H. Ge. *Sensors and Actuators*, **B40** (1997) 135-141
- ²⁷ U. Narang, P. N. Prasad, F. V. Bright, K. Ramanathan, N. D. Kumar, B. D. Malhotra, M. N. Kamalasanan, S. Chandra. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 3139-3144

-
- ²⁸ B. Wang, J. Zhang, S. Dong. *Biosensors & Bioelectronics*, **15** (2000) 397-402
- ²⁹ M. Tsionsky, G. Gun, V. Glezer, O. Lev. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 1747-1753
- ³⁰ S. Sampath, O. Lev. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2015-2021
- ³¹ T. Yao, K. Takashima. *Biosensors & Bioelectronics*, **13** (1998) 67-73
- ³² X. Chen, Y. Hu, G. S. Wilson. *Biosensors & Bioelectronics*, **17** (2002) 1005-1013
- ³³ U. Künzelmann, H. Böttcher. *Sensors and Actuators*, **B39** (1997) 222-228
- ³⁴ K. Ichimura. *Journal of Polymer Science*, **22** (1984) 2817-2828
- ³⁵ C. G. Tsiafoulis, M. I. Prodromidis, M. I. Karayannis. *Biosensors & Bioelectronics*, **20** (2004) 620-627
- ³⁶ J.-C. Chen, J.-C. Chou, T.-P. Sun, W.-Y. Chung, S.-K. Hsiung. *Chemical Sensors*, **17(B)** (2001) 336-338
- ³⁷ A. P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault. *Biosensors & Bioelectronics*, **19** (2003) 131-135

**PART III. IMPLEMENTACIÓ DELS SENSORS DESENVOLUPATS EN
SISTEMES DE FLUX**

PART III. IMPLEMENTACIÓ DELS SENSORS DESENVOLUPATS EN SISTEMES DE FLUX

Els sistemes d'injecció en flux (FIA) ofereixen un control més acurat de les condicions de treball que els sistemes discrets equivalents. Com a conseqüència, l'adaptació a un sistema de flux d'una determinada estratègia d'anàlisi permet fer mesures amb un grau de precisió i exactitud més elevat, alhora que representa la seva automatització.

Els biosensors electroquímics posseeixen una sèrie de propietats que propicien la seva implementació com a detectors en sistemes FIA, com per exemple la seva excel·lent selectivitat, l'elevada sensibilitat, la bona reproductibilitat i els curts temps de resposta que els fan totalment compatibles amb aquest tipus de sistemes. De fet, el disseny de la cel·la electroquímica que ha de formar part del sistema de flux i especialment del detector, és un punt essencial en el desenvolupament d'un sistema FIA. Així, alguns dissenys emprats inclouen elèctrodes *wall-jet*, tubulars o plans serigrafiats. Els elèctrodes *wall-jet* permeten un disseny adequat, car mostren unes bones característiques hidrodinàmiques, a més d'una elevada sensibilitat. És per això que aquest tipus d'elèctrodes acostuma a trobar-se en una gran varietat de sistemes de flux que tenen aplicacions *on-line*. No obstant això, cada vegada s'empren menys a favor dels elèctrodes tubulars, atesa la simplicitat amb que aquests es construeixen. El problema però, prové del control estricte que cal dur a terme en relació al diàmetre i l'amplada de la part activa de l'elèctrode que ha de quedar exposada a la solució que està fluint.

Però el principal problema, comú a tots els elèctrodes usats en sistemes de flux, és la passivació que pateixen les seves superfícies quan s'exposen a un flux continuat. Malgrat que aquesta passivació pot solucionar-se mitjançant diverses aproximacions, cal pensar en aquelles més fàcilment aplicables al tipus de sistema amb què s'està treballant. Així, per exemple, el poliment amb paper de vidre de la superfície electròdica no sembla ésser l'estratègia més pràctica quan es treballa en flux. També s'ha treballat amb diferents tipus de partícules que contenen algun component actiu immobilitzat a la seva superfície, com per exemple un enzim, que poden ésser renovades mitjançant protocols ben definits. L'inconvenient en aquests casos és que el mode d'operació es complica de forma considerable. En aquest context, apareixen els elèctrodes serigrafiats de configuració plana com a sensors intercanviables que es poden implementar de manera senzilla en sistemes de flux. La seva producció massiva permet l'obtenció de biosensors electroquímics reproduïbles amb un baix cost, de forma simple, ràpida i versàtil. Per tant, per a moltes aplicacions aquests elèctrodes són els més adequats per a ésser emprats com a detectors en sistemes de flux, atès que ofereixen la possibilitat d'ésser intercanviats amb molta freqüència.

11 IMPLEMENTACIÓ A UN SISTEMA DE FLUX DE QUIMIOSENSORS AMPEROMÈTRICS PER A LA DETERMINACIÓ DE NADH

11.1 INTRODUCCIÓ

La tècnica FIA, adreçada a automatitzar les diferents etapes del procés analític, presenta una sèrie d'avantatges que, com a resultat de la versatilitat de disseny que ofereix, juntament amb l'optimització de les nombroses variables implicades, es poden concretar en un control més exhaustiu del sistema d'anàlisi emprat. Aquest control és cabdal quan es vol oferir un elevat grau de fiabilitat en el seguiment de la concentració d'un determinat analit. En aquest sentit, la implementació de sistemes de detecció electroquímics a sistemes de flux passa per l'estudi de diferents configuracions^{1,2,3,4} dels elèctrodes que s'empraran com a detectors.

En base a l'experiència que té el grup en relació al treball amb sistemes de flux, s'han plantejat 3 possibles configuracions dels elèctrodes: convencional, tubular i plana. En general, els elèctrodes de configuració convencional, preparats manualment, són més freqüentment emprats en sistemes discrets durant les primeres etapes del seu desenvolupament, car la seva preparació senzilla permet construir una gran varietat de prototips, necessaris per a aconseguir finalment un sensor amb un comportament òptim. A més, aquests elèctrodes presenten problemes hidrodinàmics quan s'implementen en sistemes de flux, degut a què el disseny de la cel·la provoca una elevada dispersió de la solució que flueix al seu través, de manera que no aconsegueix mantenir el flux laminar al seu interior, fet que provoca una disminució de la reproductibilitat. Una altra opció són els elèctrodes tubulars, especialment dissenyats per ésser utilitzats en sistemes de flux, però no s'aconsegueixen resultats tan reproduïbles com per a les altres configuracions, ateses les dificultats tècniques implícites per a dur a terme les modificacions de la seva superfície electròdica, i per això només s'utilitzaran com a elèctrodes auxiliars. Per últim, l'ús d'elèctrodes de configuració plana, fàcilment implementables en sistemes de flux, no tan sols simplifica el disseny de la cel·la electroquímica del sistema FIA, sinó que alhora mostra altres avantatges molt importants (facilitat de canvi, producció massiva, etc.). Tanmateix, les estratègies de preparació dels sensors desenvolupats amb elèctrodes convencionals es poden adaptar sense masses complicacions a aquest tipus d'elèctrodes.

Són moltes les publicacions que descriuen millores notables per a sistemes que impliquen l'oxidació del cofactor NADH quan es treballa amb elèctrodes de configuració plana respecte a altres tipus d'elèctrodes. *Silver et al.*⁵ van aconseguir amb l'ús d'un elèctrode d'or de capa gruixuda (*thick-film*)⁶ reduir notablement el sobrepotencial necessari associat al procés d'oxidació de NADH efectuat sobre un elèctrode convencional d'or. De la mateixa manera, *Yoon et al.*⁷ van obtenir resultats comparables amb la substitució d'un elèctrode de grafit de configuració convencional per un de capa gruixuda. És per tot això que l'ús d'elèctrodes serigrafats es planteja com una bona opció per al desenvolupament de quimiosensors per a NADH que han d'actuar com a detectors en sistemes FIA.

La tecnologia serigràfica ha permès desenvolupar sensors plans que es caracteritzen per una àmplia versatilitat de possibles dissenys de la configuració electròdica, una clara tendència cap a la miniaturització, un baix cost i un elevat grau de reproductibilitat entre elèctrodes, que són resultat de la possibilitat que ofereixen d'ésser preparats mitjançant una producció massiva.^{8,9} Aquesta darrera propietat és especialment interessant quan es volen solucionar problemes com la passivació de la superfície electròdica o les pèrdues continuades d'algun dels components de la superfície activa del sensor, car fa possible l'intercanvi periòdic de l'elèctrode de treball emprat en els casos més desfavorables.

La preparació de sensors mitjançant aquesta tecnologia es pot dur a terme per dues vies diferents, segons si es basa en la deposició de múltiples capes que incorporen diferents components, com grafit, catalitzadors, mediadors, enzims o agents estabilitzants entre d'altres, o bé, si tots aquests components es troben integrats a una única capa. Aquesta darrera estratègia ofereix una major simplicitat que redueix el temps necessari per a dur-se a terme.¹⁰ Habitualment, es comença per configuracions simples, que van incorporant components en diferents etapes, i s'intenta després assolir el millor comportament analític mitjançant l'obtenció de sensors el més compactes possible.

En aquest capítol s'inclou l'adaptació del procés de preparació dels quimiosensors per a la determinació de NADH desenvolupats prèviament amb elèctrodes convencionals, al procés que cal seguir quan s'empen elèctrodes serigrafiats de configuració plana com a transductors. El punt crític quan es desenvolupa aquest tipus de sensors, és l'assoliment d'una adherència adequada de la capa activa sobre la superfície del transductor. També és molt important aconseguir una retenció sense pèrdues de l'espècie activa que s'ha incorporat, en aquest cas, diferents mediadors redox, car el sotmetiment a un flux continuat afavoreix clarament aquestes pèrdues.

11.2 EXPERIMENTAL

11.2.1 APARELLS I REACTIUS

11.2.1.1 Aparells

El sistema de flux utilitzat és igual al descrit a § 2.2.1.1. En aquest sistema les mesures d'intensitat de corrent amb aplicació d'un potencial constant s'han dut a terme amb l'amperímetre usat en tots els casos esmentats prèviament. L'elèctrode de referència emprat també és l'utilitzat en els capítols precedents. Com a elèctrode auxiliar s'ha utilitzat un compost de grafit-epoxi de configuració tubular construït segons el procediment descrit a § 2.2.3.1.

La construcció d'elèctrodes mitjançant tecnologia serigràfica (*screen printed*) requereix l'ús d'un equip de serigrafia (*screen printer*). S'han emprat dos equips diferents, un semiautomàtic de Marprint 350

Marbay, S.L. (Barcelona), i un totalment automàtic de la casa DEK (Regne Unit), model DEK 248. Aquests equips inclouen màscares de monofilament, construïdes en poliamida (200 x 400 mm², malla 110 fils-cm⁻¹, 70 µm de gruix), i metàl·liques, segons la capa a dipositar.

11.2.1.2 Reactius

Per a la construcció dels compòsits preparats mitjançant tecnologia serigràfica amb l'equip semiautomàtic s'han utilitzat els mateixos reactius emprats en la construcció dels compòsits de configuració convencional, detallats a § 2.2.1.2. També s'ha usat ciclohexanona subministrada per la casa Merck, amb l'objectiu d'ajustar la viscositat de la pasta. D'altra banda, per a la construcció dels elèctrodes serigrafiats mitjançant l'equip automàtic, s'han utilitzat les tintes de la casa Acheson detallades a § 8.2.1.2. L'elèctrode indicador de platí s'ha construït amb un fragment rectangular de placa de platí implementat sobre un suport de fibra de vidre, mitjançant una resina de plata conductora. Sobre aquest mateix suport de fibra de vidre (80 x 120 mm²) s'han serigrafiat els elèctrodes de configuració plana basats en el compòsit conductor de grafit. La placa de platí, el suport de fibra de vidre, la resina de plata conductora i l'epoxi diacrilat, emprat per aïllar les connexions de la solució, apareixen descrits a § 2.2.1.2.

La polisulfona, el NADH i els mediadors són els mateixos descrits anteriorment.

La resta de reactius usats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

11.2.2 DISSENY I AVALUACIÓ DE TRANSDUCTORS DE CONFIGURACIÓ PLANA COM A ELÈCTRODES DE TREBALL D'UN SISTEMA DE FLUX AMB DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DE NADH

S'han construït elèctrodes de platí i de grafit de configuració plana amb l'objectiu d'estudiar la passivació que presenten quan s'empren com a elèctrodes de treball en un sistema de flux amb detecció amperomètrica de NADH.

11.2.2.1 Construcció de transductors de platí i de grafit de configuració plana

Per a la construcció de l'elèctrode de platí de configuració plana s'ha seguit el procediment descrit a § 2.2.2.1.

D'altra banda, els elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi construïts mitjançant tecnologia serigràfica (*screen-printing process*) s'obtenen com a resultat de la deposició d'una capa gruixuda, en aquest cas de pasta de grafit-epoxi, sobre un suport sòlid.¹¹

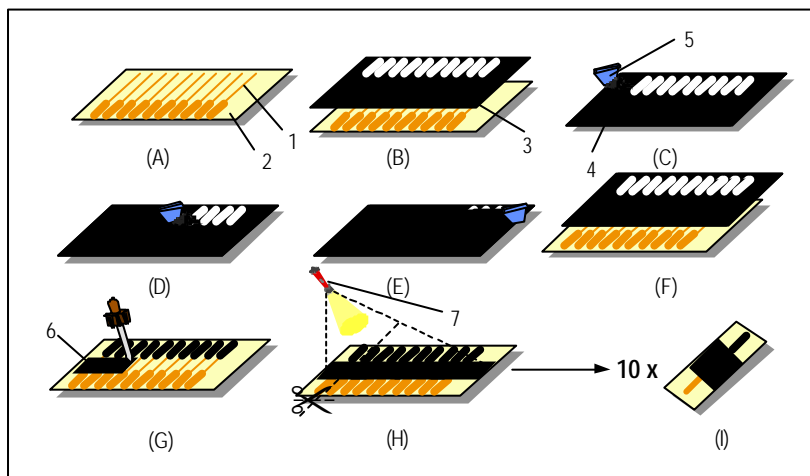


Figura 11.1: Procés de construcció de sensors per tecnologia serigràfica. (A) Pistes conductores de coure (1) fotolitografiades sobre el substrat de fibra de vidre (2); (B) Col·locació de la màscara (3); (C-E) Procés d'impressió basat en estendre una resina de grafit-epoxi (4) sobre els extrems de les pistes de coure, mitjançant una paleta de poliuretà (5); (F) Retirada de la màscara; (G) Deposició de la resina epòxica encapsulant (6) a fi d'aïllar les connexions; (H) Exposició a la llum ultraviolada (7) i tallat; (I) Elèctrode de configuració plana construït mitjançant tecnologia serigràfica (*screen printed*).

Per a la construcció d'aquests transductors, inicialment, s'han gravat 10 pistes de coure de $1 \times 30 \text{ mm}^2$ sobre el suport de fibra de vidre, amb el mateix procés fotolítogràfic emprat en la construcció de l'elèctrode de platí pla. A continuació, s'ha preparat la pasta de grafit-epoxi, tal com es descriu a § 2.2.3.1 per als transductors de configuració convencional o tubular basats en composts de grafit-epoxi. Un cop la pasta està ben homogeneïtzada, s'addicionen petits volums de ciclohexanona (aproximadament $200 \mu\text{l/g}$ de compost), amb l'objectiu d'assolir la viscositat necessària per al següent pas. S'encaixa la màscara de monofilament construïda en poliamida a sobre del suport de fibra de vidre de manera que només deixi descobert un dels extrems de les 10 pistes de coure fotolitografiades (vegeu Figura 11.1). Es col·loca la pasta a un dels extrems dels 10 forats que té la màscara i amb l'ajut d'una paleta de poliuretà que incorpora la màquina serigràfica semiautomàtica, s'imprimeixen els 10 elèctrodes alhora. El procés de curat consisteix en mantenir la capa impresa a 40°C durant una setmana. Finalment, les pistes de coure es cobreixen amb una capa aïllant (Ebecril 600) que polimeritza amb l'exposició a la llum UV. Els elèctrodes obtinguts presenten una superfície sensora de $4.0 \times 6.0 \text{ mm}^2$.

Tal com descriu C.A. Galán,¹² els transductors basats en composts de grafit-epoxi construïts mitjançant tecnologia serigràfica requereixen un procés d'activació, a fi d'assolir un grau acceptable de reproductibilitat. Si bé aquesta activació es pot dur a terme amb un poliment manual, en aquest cas s'ha optat per aplicar un tractament electroquímic,¹³ basat en aplicar 1.6 V durant 10 minuts en una

cel·la electroquímica que conté una solució de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.24 mM, a la que s'han submergit el transductor serigrafat, com a elèctrode de treball, i els elèctrodes de referència i auxiliar emprats en tots els sistemes discrets descrits anteriorment.

Per últim, els elèctrodes de configuració plana basats en tintes de grafit, també construïts mitjançant tecnologia serigràfica amb l'equip automàtic DEK, s'han obtingut seguint el procediment descrit a § 8.2.3.6. Aquests elèctrodes, a diferència dels preparats amb composts de grafit-epoxi, no requereixen cap etapa d'activació, de manera que un cop finalitzat el procés de curat, ja estan llestos per a poder ésser emprats.

11.2.2.2 Caracterització electroquímica

Per a caracteritzar electroquímicament la resposta a NADH dels transductors plans de platí i de grafit-epoxi construïts, es fa ús de la voltamperometria lineal. En ambdós casos, el circuit amperomètric està format per 3 elèctrodes: un elèctrode de treball (primer, l'elèctrode de platí i, després, el de grafit-epoxi, construïts prèviament), un elèctrode de referència de Ag/AgCl i un elèctrode auxiliar comercial de platí.

S'omple la cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i es realitzen voltamperogrames lineals entre 0.2 V i 1.0 V. Tot seguit es canvia el contingut de la cel·la per una solució de NADH $1.5 \cdot 10^{-4}$ M, preparada amb la mateixa solució amortidora, i es repeteixen els voltamperogrames lineals. La velocitat d'escombrat ha estat de $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Els voltamperogrames lineals obtinguts permeten fixar el potencial òptim d'oxidació de NADH per als dos elèctrodes emprats.

11.2.2.3 Avaluació de la resposta a NADH en un sistema de flux

Inicialment, a fi de decidir si el comportament dels dos tipus d'elèctrodes de configuració plana construïts, basats en compost de grafit-epoxi o en tintes de grafit, és comparable, s'han realitzat mesures amperomètriques mitjançant addicions de microvolums d'una solució de NADH 1.6 mM a una cel·la electroquímica que conté 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3. En ambdós casos el potencial de treball aplicat per a dur a terme l'oxidació del NADH ha estat 0.825 V.

A continuació es fan mesures de la intensitat d'oxidació de NADH sobre la superfície dels elèctrodes de platí i de grafit-epoxi, emprats com a elèctrode de treball en dues experiències paral·leles. Amb aquest objectiu s'efectuen injeccions successives de solucions de NADH de diferents concentracions, sobre una solució portadora desairejada de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5, amb la finalitat de poder fer un estudi comparatiu de la resposta d'ambdós elèctrodes vers l'oxidació de NADH. Aquest estudi es repeteix l'endemà per veure quina és la pèrdua de senyal que experimenten ambdós elèctrodes d'un dia per l'altre. Les concentracions de les solucions de NADH emprades cobreixen l'interval de $2 \cdot 10^{-5}$ M a $2 \cdot 10^{-4}$ M. El volum d'injecció escollit és de $100 \mu\text{l}$ i el cabal s'ha fixat en

0.9 ml·min⁻¹. El sistema de flux monocanal utilitzat (vegeu Figura 11.2) inclou els 3 elèctrodes prèviament esmentats (treball, auxiliar i referència), essent l'auxiliar un compost de grafit-epoxi de configuració tubular. El potencial de treball ha estat 0.825 V en ambdós casos.

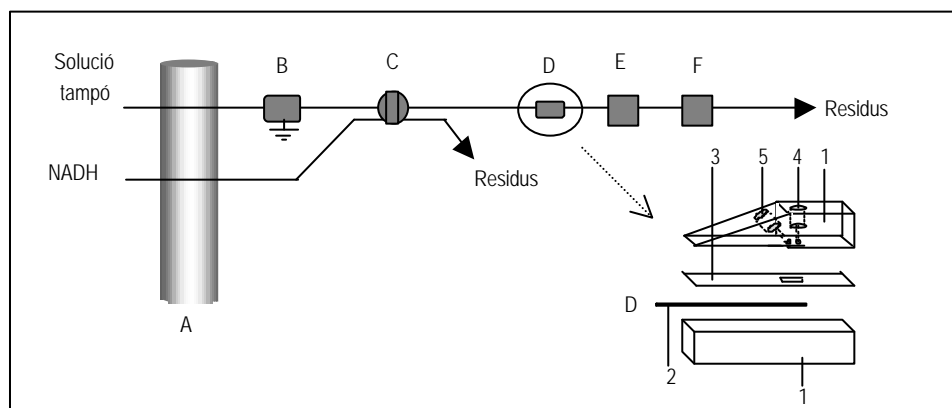


Figura 11.2: Sistema FIA monocanal emprat per a la detecció amperomètrica de NADH. (A) Bomba peristàltica; (B) Elèctrode de presa de terra; (C) Vàlvula d'injecció; (D) Elèctrode indicador de platí o de grafit-epoxi de configuració plana; (E) Elèctrode auxiliar; (F) Elèctrode de referència. També es mostra l'esquema de la cel·la dissenyada per integrar els elèctrodes de configuració plana en un sistema de flux: (1) Bloc de metacrilat; (2) Elèctrode de configuració plana; (3) Membrana de silicona perforada; (4) Entrada del flux; (5) Sortida del flux.

11.2.3 AVALUACIÓ EN UN SISTEMA DE FLUX D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT A LA SUPERFÍCIE SENSORA

Amb l'objectiu de reduir els problemes de passivació associats als elèctrodes de configuració plana assajats en un sistema de flux dissenyat per a detectar l'oxidació de NADH, s'ha escollit treballar amb els transductors plans basats en composts de grafit-epoxi, a fi de poder incorporar al sistema els mediadors estudiats mitjançant el procés d'electropolimerització, prèviament optimitzat per a elèctrodes basats en el mateix tipus de composts.

11.2.3.1 Electropolimerització del mediador sobre la superfície d'un transductor de configuració plana

Atès que els transductors emprats estan basats en el mateix tipus de composts sobre els quals es van optimitzar els processos d'electropolimerització per a cadascun dels mediadors estudiats (MB, p-BQ, DCPIP, o-PDA i 3,4-DHB), s'han utilitzat els mateixos procediments, canviant únicament l'elèctrode de treball de configuració convencional per un elèctrode serigrafat (vegeu § 4.2.6.1).

11.2.3.2 Caracterització electroquímica

Amb l'objectiu de comprovar l'electropolimerització dels diferents mediadors sobre la superfície dels transductors plans serigrafiats s'ha emprat la tècnica de la voltamperometria cíclica. El sistema amperomètric emprat està format per l'elèctrode pla de grafit-epoxi amb el mediador electropolimeritzat a la seva superfície, com a elèctrode de treball, i els mateixos elèctrodes de referència i auxiliar emprats a § 2.2.1.1.

Inicialment, es realitzen voltamperogrames cíclics, per a cada un dels elèctrodes preparats, quan la cel·la electroquímica només conté tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i després quan s'ha addicionat NADH fins assolir una concentració de $5 \cdot 10^{-4}$ M. La velocitat d'escombrat ha estat de $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Com en estudis precedents, els voltamperogrames cíclics obtinguts permeten fixar el potencial òptim d'oxidació de NADH per als elèctrodes preparats amb mediador electropolimeritzat a la seva superfície.

11.2.3.3 Estudi de la resposta a NADH

Quan es realitzen mesures en flux cal considerar dos paràmetres molt importants alhora de poder conèixer quin comportament seguirà el sistema. Aquests dos paràmetres són, per una banda la *repetitivitat*, relacionada amb injeccions successives d'una solució de concentració coneguda, i l'altre és la *reproductibilitat*, l'avaluació de la qual resulta ésser molt valuosa, atès que és un indicador molt útil de com varia la sensibilitat de l'elèctrode en estudi al llarg del temps.

Amb l'objectiu d'obtenir la informació necessària per avaluar aquests dos paràmetres, s'han dut a terme, per a cada un dels elèctrodes en estudi, injeccions successives de solucions de NADH de diferent concentració, en un interval de $1 \cdot 10^{-5}$ M a $5 \cdot 10^{-4}$ M. En el cas del mediador o-PDA s'han repetit aquestes injeccions per a una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M en dies consecutius, a fi de veure com afecta el pas del temps als elèctrodes preparats i així poder comparar amb la pèrdua de senyal observada per a un elèctrode de configuració plana sense mediador quan s'utilitza en dies successius per determinar NADH.

També s'han realitzat calibracions consecutives amb aquests mateixos elèctrodes, mitjançant injeccions de solucions de NADH de concentracions creixents. Per a cada cas s'ha aplicat el potencial fixat a partir dels voltamperogrames obtinguts a § 11.2.3.2 i s'ha emprat un volum d'injecció de $100 \mu\text{l}$.

11.2.3.4 Estudi de la dinàmica de resposta

Amb la finalitat d'assegurar l'obtenció d'una resposta màxima, s'han provat diferents volums d'injecció per a cadascun dels elèctrodes assajats. L'experiència s'ha dut a terme mitjançant injeccions d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M sobre la solució portadora desairejada, que fixa la línia de base, amb cada

un dels volums d'injecció següents: 50 μl , 100 μl , 200 μl , 250 μl , 400 μl , 500 μl , 750 μl , 900 μl , 1000 μl i 1400 μl . El cabal emprat s'ha mantingut igual a 0.9 ml·min⁻¹ per a tots els casos.

Els registres gràfics obtinguts han permès avaluar el temps de resposta, paràmetre que ve definit com el temps que passa des que s'inicia la resposta fins que s'assoleix el 95 % de la resposta màxima. Amb l'objectiu d'obtenir resultats comparables, els valors corresponents al temps de resposta per a tots els quimiosensors avaluats s'han calculat a partir dels registres obtinguts amb un volum d'injecció de 100 μl .

11.2.3.5 Estudi de l'eficiència dels mediadors electropolimeritzats

Finalment, a fi de comprovar el predomini de la reacció mediatitzada per sobre de l'oxidació directa de NADH sobre la superfície del compòsit de grafit-epoxi, s'han emprat els volums d'injecció optimitzats per a cada mediador a fi de dur a terme injeccions successives d'una solució de NADH 2·10⁻⁴ M per a cada un dels elèctrodes amb mediador electropolimeritzat a la seva superfície, amb l'aplicació dels corresponents potencials de treball fixats mitjançant la tècnica de voltamperometria, i per a un elèctrode també serigrafat però sense mediador, amb l'aplicació d'aquests mateixos potencials.

11.2.4 AVALUACIÓ EN UN SISTEMA DE FLUX D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH PREPARAT AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB MEDIADORS

Com a una segona alternativa per a eliminar la passivació dels elèctrodes implementats a un sistema de flux dissenyat per a la determinació de l'oxidació de NADH, s'ha decidit treballar amb elèctrodes basats en la deposició de membranes de compòsits de grafit-polisulfona modificats amb mediadors, sobre transductors plans construïts amb tintes de grafit, mitjançant l'adaptació del protocol de preparació emprat al Capítol 5 per al desenvolupament d'aquest tipus de quimiosensors amb elèctrodes convencionals.

11.2.4.1 Preparació dels elèctrodes de configuració plana amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb mediadors

S'ha emprat la metodologia seguida a § 5.2.4.1 per a la preparació dels compòsits basats en polisulfona modificats amb els diferents mediadors estudiats (MB, p-BQ, DCPIP, o-PDA i 3,4-DHB). La deposició d'aquests compòsits com a membrana sobre la superfície dels transductors de configuració plana preparats amb tintes de grafit, s'ha dut a terme serigràficament, amb l'ús de la mateixa màscara metàl·lica utilitzada per a imprimir la capa corresponent a la tinta de grafit. Tot seguit es duu a terme el procés d'inversió de fases, que consisteix en submergir ràpidament el lot de 36 elèctrodes en aigua

bidestil·lada a 4°C, durant uns minuts. Per últim, els elèctrodes recoberts amb membranes de polisulfona són rentats amb abundant aigua bidestil·lada per eliminar possibles restes de DMF.

11.2.4.2 Caracterització electroquímica

A fi de conèixer els potencials òptims d'oxidació del NADH per a cada quimiosensor desenvolupat segons el mediador que incorpora a la membrana de polisulfona, s'enregistra per a cadascun d'aquests quimiosensors un primer voltamperograma cíclic quan s'omple la cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3 i un segon voltamperograma cíclic un cop s'ha addicionat NADH fins assolir una concentració igual a $1.5 \cdot 10^{-5}$ M.

11.2.4.3 Estudi de la resposta a NADH

De nou, a fi d'obtenir la informació necessària per avaluar la repetitivitat, entre injeccions successives, i la reproductibilitat, entre corbes de calibració consecutives, s'han dut a terme, per a cada un dels elèctrodes en estudi, injeccions successives de solucions de NADH de diferent concentració, en un interval de $1 \cdot 10^{-5}$ M a $5 \cdot 10^{-4}$ M i s'han obtingut corbes de calibració consecutives, mitjançant injeccions de solucions de NADH de concentracions creixents. El potencial aplicat per a cada elèctrode ha correspost al fixat pels voltamperogrames obtinguts a § 11.2.4.2. En tots els casos, el volum d'injecció usat ha estat de 100 µl.

Tanmateix, s'ha avaluat l'estabilitat d'emmagatzematge a fi de conèixer el grau de confiança amb què es poden emprar aquests quimiosensors per a fer mesures en diferents dies. Aquest paràmetre s'ha calculat a partir de la variabilitat entre els pendents de les corbes de calibració obtingudes per a diferents sensors, un nou cada dia, pertanyents a un mateix lot. Ara bé, per a poder donar un resultat significatiu, cal estudiar primer la variabilitat entre mesures quan es treballa amb diferents elèctrodes d'un mateix lot. S'han realitzat 3 injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M amb cadascun dels quimiosensors avaluats, procés que s'ha repetit amb 4 elèctrodes d'un mateix lot. Un cop conegut el valor de la RSD associada a la sensibilitat per als 4 sensors preparats al mateix temps i avaluats el mateix dia, ja es pot calcular l'estabilitat d'emmagatzematge com la reproductibilitat entre els valors de sensibilitat per a diferents elèctrodes d'un mateix lot, que s'han emprats per a l'obtenció de corbes de calibració en diferents dies.

11.2.4.4 Estudi de la dinàmica de resposta

Amb aquests quimiosensors també s'ha realitzat l'estudi de la resposta obtinguda quan s'injecten diferents volums d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M sobre la solució portadora desairejada. Els volums d'injecció emprats i el cabal aplicat han estat els mateixos que a § 11.2.3.4.

El temps de resposta, entès com el temps necessari per assolir el 95 % de la resposta màxima, s'ha extret de nou dels registres gràfics obtinguts per a cadascun dels quimiosensors desenvolupats quan s'utilitza un volum d'injecció de 100 µl.

11.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

11.3.1 *DISSENY I AVALUACIÓ DE TRANSDUCTORS DE CONFIGURACIÓ PLANA COM A ELÈCTRODES DE TREBALL D'UN SISTEMA DE FLUX AMB DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DE NADH*

11.3.1.1 **Construcció de transductors de platí i de grafit de configuració plana**

Si bé els transductors de configuració plana basats en compòsits de grafit-epoxi o en tintes de grafit originàriament s'associen a dispositius d'un sol ús, obtinguts mitjançant una producció massiva, en aquest cas es pretén dur a terme un ús continuat d'aquests, atès que als nostres laboratoris s'ha comprovat el bon funcionament d'aquests elèctrodes durant un període de temps superior a un dia quan es duen a terme mesures continuades.¹⁴ No obstant això, s'ha de tenir present que serà necessari efectuar calibracions successives amb els elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi, perquè tot i que el temps de vida d'un dispositiu sense activar, emmagatzemat en sec i a temperatura ambient, es considera superior a 6 mesos, aquest comportament no es fa extensible un cop ja s'ha manipulat l'elèctrode. En canvi, els elèctrodes basats en tintes de grafit no presenten aquest inconvenient, car no necessiten ésser activats prèviament a la seva utilització. D'altra banda, també s'ha de tenir en compte que per ambdós tipus d'elèctrodes existeix un 3 % de desviació estàndard relativa entre els pendents associats als diferents dispositius que formen part d'un mateix lot.¹⁵

11.3.1.2 **Caracterització electroquímica**

A la Figura 11.3 apareixen els voltamperogrames lineals corresponents a una solució de NADH $1.5 \cdot 10^{-4}$ M quan s'empra com a elèctrode de treball, primer un elèctrode de platí, i després un elèctrode basat en un compòsit de grafit-epoxi, ambdós de configuració plana. S'observa com el potencial òptim per a l'oxidació de NADH és aproximadament igual a 0.825 V en ambdós casos.

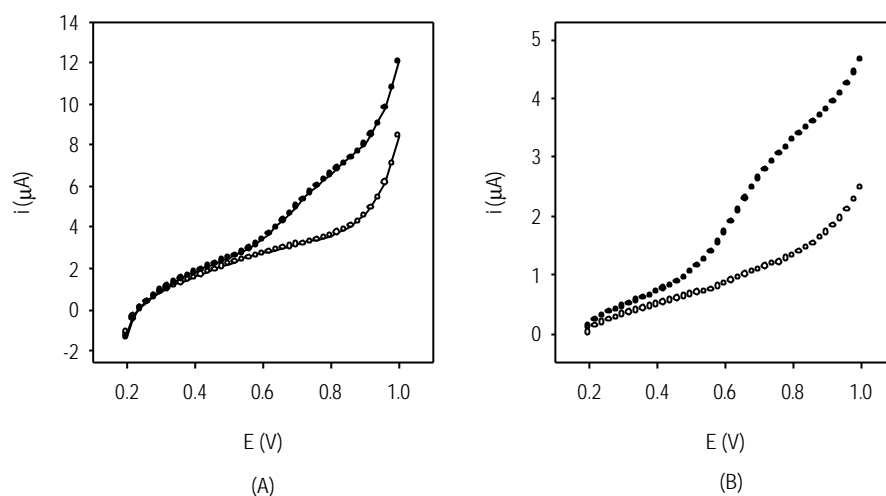


Figura 11.3: Voltamperogrames lineals corresponents a una solució de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 abans (○) i després d'afegir NADH (●) fins a assolir una concentració igual a $1.5 \cdot 10^{-4}$ M. L'elèctrode de treball emprat ha estat (A) un elèctrode de platí i (B) un compost de grafit epoxi, ambdós de configuració plana. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

11.3.1.3 Avaluació de la resposta a NADH en un sistema de flux

Com a mesura de treball s'ha utilitzat la diferència entre el valor màxim d'intensitat assolit després de cada injecció i el valor de la línia base (donat per la intensitat que s'obté amb el pas de la solució portadora), observada als registres gràfics de cadascun dels elèctrodes de treball avaluats.

Els valors de sensibilitat corresponents a les primeres corbes de calibració per a NADH obtingudes quan s'utilitza com a elèctrode de treball diferents elèctrodes de configuració plana basats en composts de grafit-epoxi o en tintes de grafit, demostren que ambdós tipus de sensors poden ésser emprats indistintament, atès que la reproductibilitat dels pendents de les corbes de calibració obtingudes amb 5 sensors de cada tipus és d'un 4 %, mentre que el valor que s'obté per a sensors d'un mateix lot és d'un 3 % en ambdós casos. La sensibilitat a NADH que ofereixen aquests dos tipus d'elèctrodes és d'uns $900 \mu\text{A}/\text{M}$.

Amb l'objectiu de determinar l'efecte de la passivació que provoca l'oxidació del NADH sobre els elèctrodes, s'ha realitzat un estudi de la repetitivitat, realitzat amb l'elèctrode de platí i, en aquest cas, amb els elèctrodes de configuració plana basats en composts de grafit-epoxi. Així, a la Figura 11.4 es mostren les mesures obtingudes com a resultat d'injeccions successives de solucions de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. Els resultats d'aquest estudi queden recollits a la Taula 11.1.

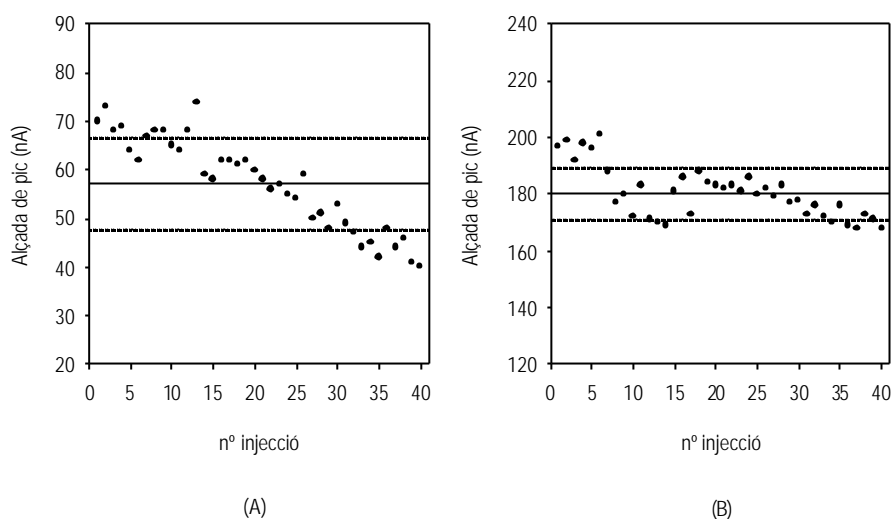


Figura 11.4: Estudis de la repetitivitat del senyal en un sistema de flux quan es fan 40 injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M, sobre una solució portadora (tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5) desairejada. Com a elèctrode de treball s'ha emprat (A) un elèctrode pla de platí i (B) un compost de grafit-epoxi també de configuració plana. El potencial aplicat ha estat 0.825 V. En ambdós casos, la línia sòlida representa la mitjana, mentre que les línies de punts corresponen a la suma i la resta de la desviació estàndard.

A la Taula 11.1 queda palès el fet que el compost de grafit-epoxi presenta una major sensibilitat que el transductor de platí. A més, en base a la disminució de l'alçada de pics consecutius que s'observa i als valors de RSD, es pot afirmar que si bé ambdós elèctrodes mostren una pèrdua de senyal com a conseqüència de la passivació de la seva superfície, l'elèctrode basat en un compost de grafit-epoxi sembla no veure's tan afectat per aquest fet. Això coincideix amb estudis precedents duts a terme al grup que descriuen una major passivació d'un elèctrode de platí que d'un de grafit-epoxi, ambdós de configuració plana.¹⁶

D'altra banda, a la Figura 11.5 s'observa clarament com ambdós elèctrodes experimenten una pèrdua d'intensitat en dies successius que fa poc recomanable el seu ús com a elèctrodes de treball en un sistema de flux per a la determinació amperomètrica de NADH. Mentre que l'elèctrode basat en un compost de grafit-epoxi perd aproximadament el 40 % del senyal obtingut per a una concentració de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M entre dies consecutius, aquesta pèrdua d'intensitat arriba a ésser d'un 60 % per a un elèctrode pla de platí.

Taula 11.1: Avaluació de la repetitivitat d'injeccions successives de solucions de NADH de diferent concentració en un sistema de flux, quan s'utilitza com a elèctrode de treball un elèctrode de platí o de grafit-epoxi, ambdós de configuració plana. Les condicions de treball són les descrites a la Figura 11.4.

ELÈCTRODE DE CONFIGURACIÓ PLANA	[NADH] (M)	Nº INJECCIONS	MITJANA (nA)	RSD (%)
PLATÍ	$2 \cdot 10^{-5}$	10	12.1	5
	$4 \cdot 10^{-5}$	10	21.3	5
	$6 \cdot 10^{-5}$	10	26.1	6
	$8 \cdot 10^{-5}$	10	32.1	4
	$1 \cdot 10^{-4}$	10	37.6	3
	$2 \cdot 10^{-4}$	40	57.3	17
GRAFIT-EPOXI	$2 \cdot 10^{-5}$	10	23.6	5
	$4 \cdot 10^{-5}$	10	45.3	3
	$6 \cdot 10^{-5}$	10	65.9	3
	$8 \cdot 10^{-5}$	10	82.5	2
	$1 \cdot 10^{-4}$	10	102.7	2
	$2 \cdot 10^{-4}$	40	180.4	6

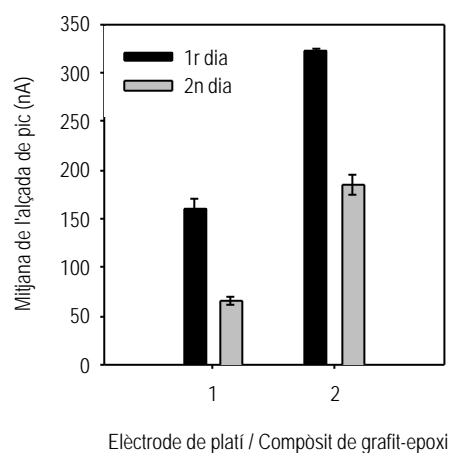


Figura 11.5: Estudi comparatiu del senyal obtingut per a NADH en un sistema de flux en dies consecutius, quan s'empra com a elèctrode de treball (1) un elèctrode de platí i (2) un compost de grafit-epoxi, ambdós de configuració plana. Les condicions de treball són les esmentades prèviament per a la Figura 11.4. Per a cada barra s'inclou l'error calculat com a \pm la desviació estàndard de la mitjana obtinguda per a $n=20$.

11.3.2 AVALUACIÓ EN UN SISTEMA DE FLUX D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT A LA SUPERFÍCIE SENSORA

11.3.2.1 Caracterització electroquímica

A partir dels voltamperogrames representats a la Figura 11.6 per a cadascun dels elèctrodes serigrafats amb mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície, s'han fixat els potencials òptims de treball per a la determinació de NADH. Els valors d'aquests potencials apareixen recollits a la Taula 11.2.

Cal destacar que, per la majoria dels mediadors assajats, aquests valors de potencial no difereixen molt dels obtinguts per als elèctrodes convencionals.

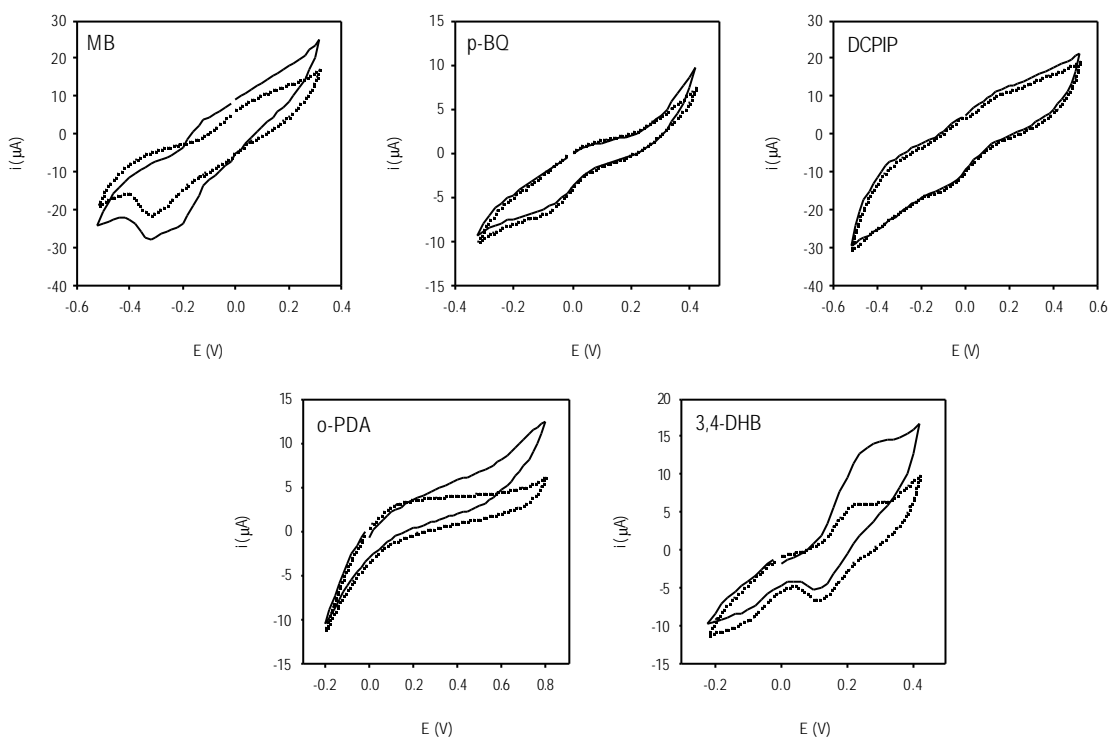


Figura 11.6: Voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'utilitza com a elèctrode de treball un elèctrode de configuració plana, basat en un compost de grafit-epoxi, amb diferents mediadors electropolimeritzats sobre la seva superfície. Inicialment la cel·la electroquímica conté també fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 (línia de punts), mentre que el voltamperograma representat per una línia contínua a tots els gràfics correspon a una solució de NADH $5 \cdot 10^{-4}$ M. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Taula 11.2: Potencials òptims d'oxidació de NADH deduïts dels voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'empren, com a elèctrode de treball, compòsits de grafit-epoxi de configuració plana amb diferents mediadors electropolimeritzats sobre la seva superfície.

MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT	E_{ap} (mV)
MB	100
p-BQ	325
DCPIP	320
o-PDA	450
3,4-DHB	300

11.3.2.2 Estudi de la resposta a NADH

La resposta a NADH mostrada per aquests sensors s'ha avaluat a partir de les corbes de calibració obtingudes quan s'injecten diferents solucions de NADH de concentració coneguda. Cada punt de la corba de calibració, que correspon a una concentració determinada, és la mitjana calculada per a 7 injeccions successives. La Taula 11.3 permet comparar les sensibilitats dels sensors en funció del mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície. Així s'observa com per als mediadors o-PDA i 3,4-DHB s'obtenen les millors sensibilitats, atesos els valors de pendent de la part lineal de les corbes de calibració que mostren.

Taula 11.3: Paràmetres de les corbes de calibració per a NADH obtingudes amb cadascun dels elèctrodes preparats amb els diferents mediadors electropolimeritzats sobre la superfície electròdica. S'han injectat solucions de NADH per a cobrir l'interval de concentracions que va des de $1 \cdot 10^{-5}$ M fins a $5 \cdot 10^{-4}$ M. Cada punt de la corba de calibració correspon a la mitjana de 7 injeccions successives d'una solució de NADH d'una concentració determinada.

MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT	E_{ap} (mV)	PENDENT ($\mu A/M$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ
MB	100	96 ± 29	0.9742
p-BQ	325	79 ± 8	0.9967
DCPIP	320	73 ± 13	0.9909
o-PDA	450	152 ± 12	0.9970
3,4-DHB	300	263 ± 17	0.9969

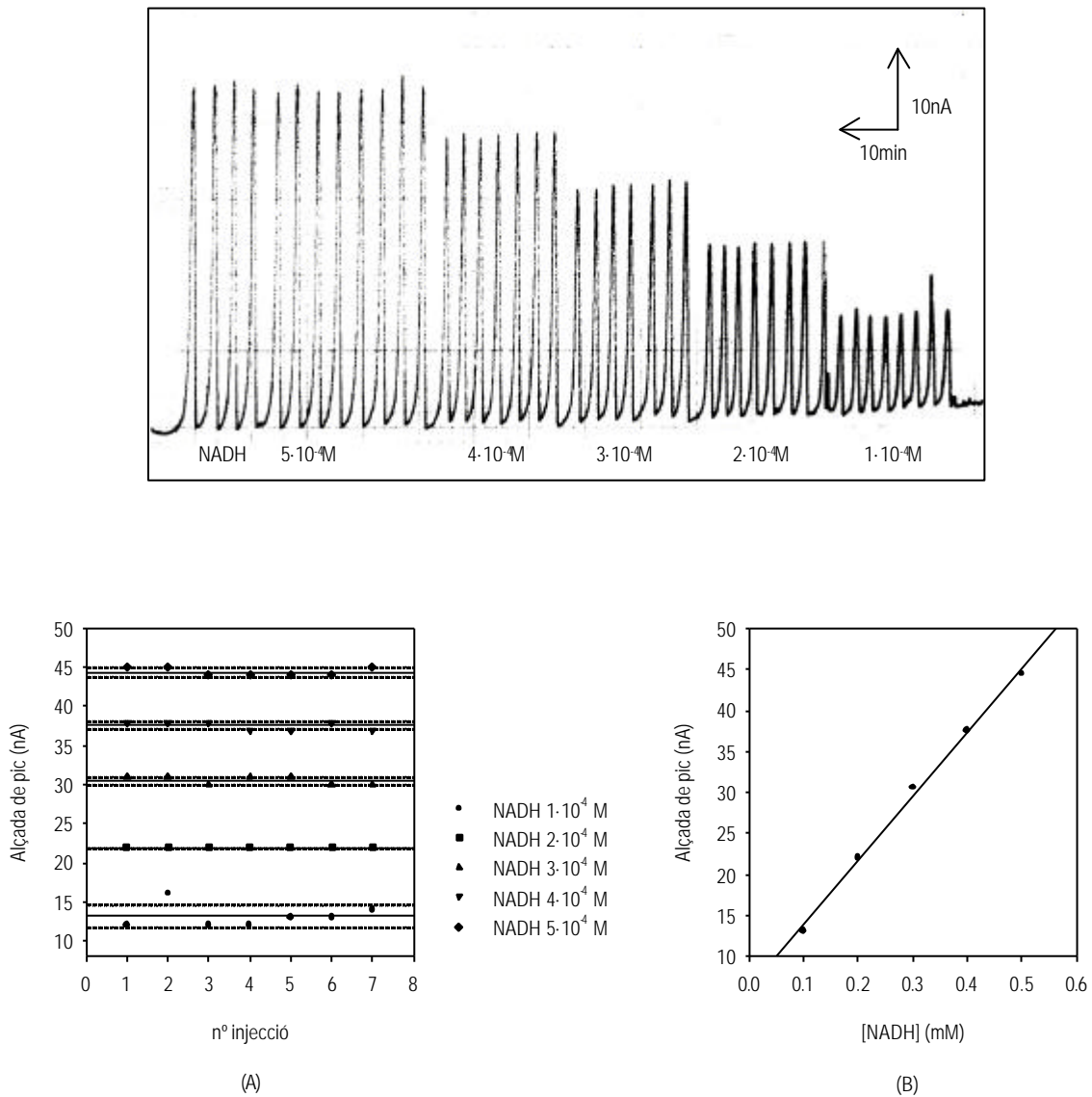


Figura 11.7: Registre gràfic obtingut mitjançant injeccions successives de solucions de NADH de diferent concentració en un sistema de flux quan l'electrode de treball és un compost de grafit-epoxi de configuració plana amb p-BQ electropolimeritzada sobre la seva superfície. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. El potencial de treball ha estat 0.325 V. Volum d'injecció: 100 μl . Cabal: 0.9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. (A) Estudi de la repetitivitat de l'alçada de pics successius ($n=7$) per a cada una de les concentracions injectades. La línia sòlida representa la mitjana, mentre que les línies de punts corresponen a la suma i la resta de la desviació estàndard. (B) Corba de calibració obtinguda a partir de la mitjana corresponent al senyal dels pics associats a cadascuna de les concentracions de NADH.

Com a exemple, a la Figura 11.7 apareixen representades totes les dades associades a l'obtenció de la corba de calibració per a un elèctrode amb p-BQ electropolimeritzada a la seva superfície. La representació de l'alçada dels pics que es mostren al registre gràfic, per a cadascuna de les concentracions de NADH, esdevé un bon indicador visual de la dispersió que presenten aquestes mesures. De la mateixa manera, la representació de la mitjana d'aquests valors en funció de la concentració de les solucions de NADH injectades, dibuixa la corba de calibració corresponent, els paràmetres de la qual s'inclouen a la Taula 11.3.

Ara bé, atès que el principal problema associat a la determinació de NADH és la pèrdua de senyal deguda a la passivació de la superfície de l'elèctrode, s'ha estudiat la repetitivitat per a cadascun dels mediadors electropolimeritzats sobre la superfície sensora, mitjançant injeccions successives d'una solució de NADH d'una determinada concentració. Així, a la Figura 11.8 es pot veure la distribució gràfica de les mesures obtingudes per a 20 injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M, corresponents als elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi de configuració plana amb o-PDA i amb 3,4-DHB, ambdós electropolimeritzats sobre la superfície electròdica. La Taula 11.4 recull els paràmetres estadístics corresponents a la repetitivitat per als diferents mediadors estudiats.

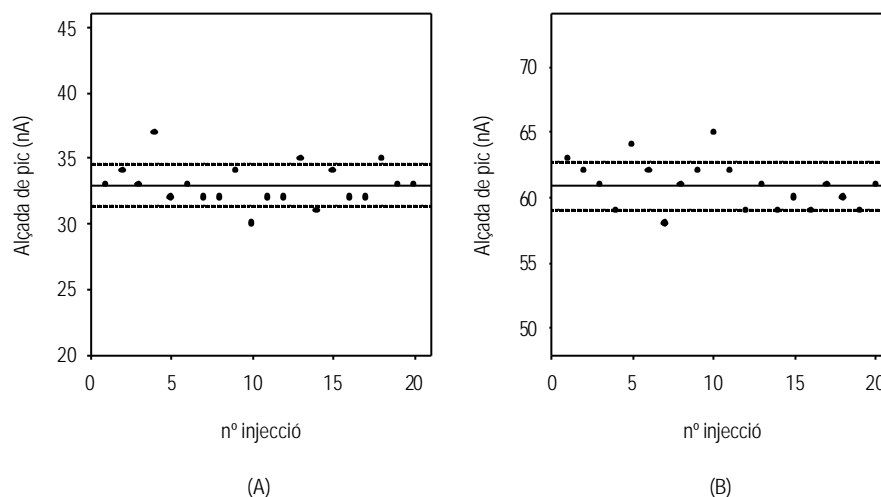


Figura 11.8: Estudis de la repetitivitat del senyal en un sistema de flux quan es fan 20 injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M, sobre una solució portadora (tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5) desairejada. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un elèctrode basat en un compòsit de grafit-epoxi de configuració plana amb (A) o-PDA i (B) 3,4-DHB electropolimeritzats sobre la seva superfície. El potencial aplicat ha estat (A) 0.450 V i (B) 0.300 V. En ambdós casos, la línia sòlida representa la mitjana, mentre que les línies de punts corresponen a \pm la desviació estàndard. Volum d'injecció: 100 μ l. Cabal: 0.9 ml·min⁻¹.

Taula 11.4: Paràmetres estadístics calculats a partir de les mesures d'intensitat obtingudes per a injeccions successives d'una solució de NADH, de diferent concentració per a cada cas, quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi de configuració plana amb cadascun dels mediadors estudiats electropolimeritzat sobre la seva superfície. Els resultats presentats per als mediadors o-PDA i 3,4-DHB s'han obtingut a partir dels valors que es mostren a la Figura 11.8. Les condicions de treball són les descrites en aquella mateixa Figura, excepte el volum d'injecció per al MB que ha estat de 1400 μ l.

MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT	E_{ap} (mV)	[NADH] (M)	Nº INJECCIONS	MITJANA (nA)	RSD (%)
MB	100	$5 \cdot 10^{-4}$	6	38	4
p-BQ	325	$2 \cdot 10^{-4}$	12	45	1
DCPIP	320	$5 \cdot 10^{-4}$	12	41	3
o-PDA	450	$2 \cdot 10^{-4}$	20	33	5
3,4-DHB	300	$2 \cdot 10^{-4}$	20	61	3

Segons les dades recollides en aquesta Taula es pot afirmar que tots els mediadors assajats aconseguen millorar lleugerament la RSD respecte als resultats obtinguts amb un elèctrode de grafit-epoxi sense mediador (RSD= 6 %, n= 40) quan es fan injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. Si bé aquesta reducció es mínima en alguns casos (o-PDA), la diferència fonamental es troba en el fet que en el cas de l'elèctrode sense mediador el valor de RSD s'atribueix a una pèrdua continuada de senyal (vegeu Figura 11.4), mentre que en el cas dels elèctrodes amb mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície, aquest valor de RSD es deu a oscil·lacions aleatòries de l'alçada de pic, tal com es pot observar a la Figura 11.8. Per aquest motiu, els elèctrodes amb mediador electropolimeritzat presenten millors característiques per fer mesures en continu en un sistema de flux que els elèctrodes sense mediador. A més, aquesta afirmació es veu recolzada pel fet que els elèctrodes sense mediador presenten una pèrdua de senyal d'un 40 % entre dies consecutius (vegeu Figura 11.5), mentre que a la Figura 11.9 es pot observar com aquesta pèrdua de senyal no es fa palesa quan s'utilitza, en dies successius, un mateix elèctrode amb el mediador o-PDA electropolimeritzat sobre la seva superfície.

Finalment, la comparació de corbes de calibració successives, com les que es poden veure a la Figura 11.10 per a un elèctrode amb o-PDA electropolimeritzada, permet avaluar la reproductibilitat de la sensibilitat, paràmetre que aporta la informació necessària a fi de conèixer el comportament d'un sensor quan s'utilitza per efectuar diferents anàlisis. A la Taula 11.5 es recullen els resultats obtinguts per a la resta de mediadors.

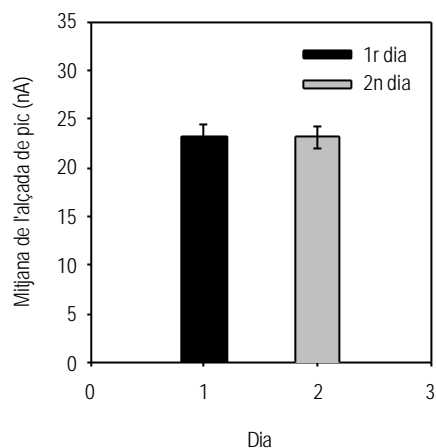


Figura 11.9: Estudi comparatiu del senyal obtingut per a NADH en un sistema de flux per dies consecutius, quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode de configuració plana basat en un compost de grafit-epoxi amb o-PDA electropolimeritzada sobre la seva superfície. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. El potencial de treball ha estat 0.450 V. Volum d'injecció: 100 μ l. Cabal: 0.9 ml·min⁻¹. Per a cada barra s'indica l'error com a \pm la desviació estàndard de la mitjana obtinguda per quan n= 10.

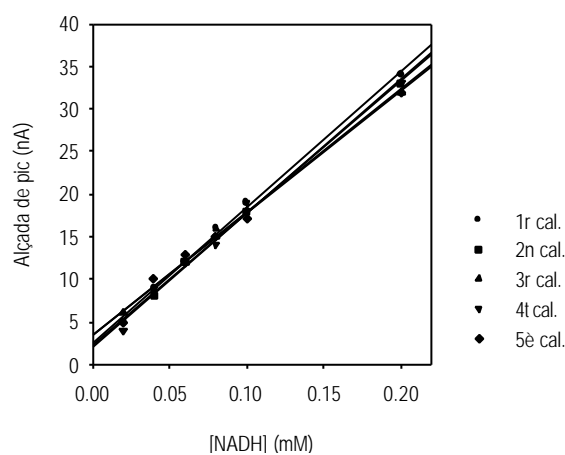


Figura 11.10: Corbes de calibració successives obtingudes mitjançant injeccions de solucions de NADH de diferent concentració en un sistema de flux. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un compost de grafit-epoxi de configuració plana amb o-PDA electropolimeritzada sobre la seva superfície. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. El potencial de treball aplicat ha estat 0.450 V. Volum d'injecció: 100 μ l. Cabal: 0.9 ml·min⁻¹.

Taula 11.5: Paràmetres estadístics calculats a partir de la representació de n corbes de calibració successives obtingudes amb sensors que incorporen a la seva configuració cadascun dels mediadors estudiats, mitjançant la seva electropolimerització sobre la superfície de l'elèctrode.

MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT	E_{ap} (mV)	n	MITJANA DEL PENDENT ($\mu A/M$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
MB	100	4	96	0.9763 a 0.9935	1
p-BQ	325	5	80	0.9963 a 0.9964	3
DCPIP	320	4	75	0.9821 a 0.9958	3
o-PDA	450	5	152	0.9953 a 0.9992	5
3,4-DHB	300	5	264	0.9956 a 0.9986	2

Les dades mostrades a la Taula 11.5 indiquen que l'ús continuat de compòsits de configuració plana amb mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície per a la determinació de NADH en sistemes de flux porta associada una bona reproductibilitat, atès que no s'observa una pèrdua continuada de senyal, tal com succeïa amb elèctrodes de les mateixes característiques però sense mediador.

11.3.2.3 Estudi de la dinàmica de resposta

L'estudi de la dinàmica de resposta aporta informació sobre la dispersió que cada tipus d'elèctrode provoca en el sistema de flux. Una baixa dispersió proporciona temps de residència baixos i, per tant, augmenta la freqüència d'anàlisi. La Figura 11.11 correspon a un dels registres obtinguts durant el procés d'optimització dels volums d'injecció per a cadascun dels elèctrodes estudiats, a fi d'assolir la màxima resposta. L'augment progressiu del volum d'injecció implica un increment de la intensitat de corrent mesurada, alhora que també provoca temps de resposta més llargs. És per aquest motiu, que cal considerar com a volum d'injecció òptim aquell que ofereixi un compromís entre un pic d'intensitat de corrent alt i un temps de resposta acceptable. Sovint s'empra com a paràmetre útil per a optimitzar el volum d'injecció, el quocient entre la intensitat màxima (i_{max}) i l'amplada corresponent a la meitat de l'alçada màxima ($W_{1/2}$) per a cada pic de resposta ($i_{max}/W_{1/2}$). Cal tenir en compte però, que la dinàmica de resposta observada depèn de les condicions en què s'efectuen les anàlisis. La Taula 11.6 inclou, per a cada sensor avaluat, els volums d'injecció optimitzats segons el valor del quocient $i_{max}/W_{1/2}$ que, per tant, mostren un compromís entre una intensitat de corrent elevada i un temps de resposta curt, quan s'injecta una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M.

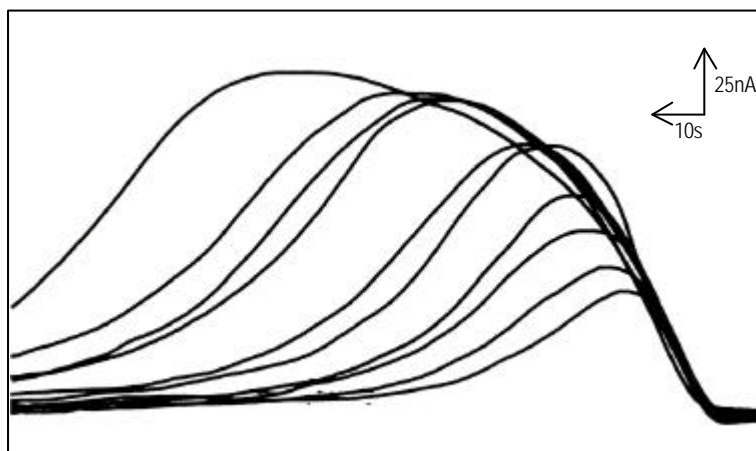


Figura 11.11: Dinàmica de resposta per a injeccions de NADH d'un elèctrode, basat en un compost de grafit-epoxi, de configuració plana amb 3,4-DHB electropolimeritzat sobre la seva superfície. Registre de la variació de l'alçada de pic (nA) quan s'injecten diferents volums d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M sobre una solució portadora desairejada de fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. Els volums d'injecció emprats han estat els descrits a § 11.2.3.4. Cabal: $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Taula 11.6: Volums d'injecció òptims escollits en base a les característiques dinàmiques de resposta presentades als registres gràfics obtinguts per a cadascun dels mediadors assajats electropolimeritzats sobre la superfície d'un elèctrode de grafit-epoxi de configuració plana, que han permès calcular els quocients de $i_{\text{màx}}/W_{1/2}$ per a cada volum d'injecció assajat. Les condicions experimentals són les descrites a la Figura 11.11. Els càlculs s'han fet per a $n=2$.

MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT	VOLUM D'INJECCIÓ ÒPTIM (μL)
MB	900
p-BQ	750
DCPIP	750
o-PDA	900
3,4-DHB	750

Malgrat aquests resultats, a fi de poder comparar la dinàmica de resposta dels sensors desenvolupats, s'ha escollit treballar amb els registres obtinguts quan s'empra un volum d'injecció de $100 \mu\text{l}$ per a tots ells per a determinar i poder comparar els temps de resposta que mostren. Els resultats obtinguts es troben recollits a la Taula 11.7.

Taula 11.7: Característiques dinàmiques de resposta extretes dels registres gràfics obtinguts per a cada un dels mediadors assajats electropolimeritzats sobre la superfície d'un elèctrode de grafit-epoxi de configuració plana. S'ha avaluat el temps de resposta al $t_{95\%}$. Les condicions experimentals són les descrites a la Figura 11.11. Volum d'injecció: 100 μl . Els càlculs s'han fet per a $n=2$.

MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT	TEMPS DE RESPOSTA (s)
MB	30 ± 1
p-BQ	12 ± 1
DCPIP	22 ± 3
o-PDA	13 ± 0
3,4-DHB	18 ± 0

S'observa com tots els elèctrodes de configuració plana amb mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície presenten, quan s'empra un volum d'injecció de 100 μl , temps de resposta ($t_{95\%}$) que oscil·len entre els 10 i els 30 s. Quan el mediador electropolimeritzat és el MB, s'obté la resposta més lenta per a la mediatització de la reacció d'oxidació de NADH.

11.3.2.4 Estudi de l'eficiència dels mediadors electropolimeritzats

Finalment, a la Taula 11.8 s'evidencia l'actuació del mediador electropolimeritzat com a espècie responsable del procés d'electrocatalisi, atès que els resultats obtinguts en presència de mediador electropolimeritzat milloren, en tots els casos, els obtinguts amb elèctrodes serigrafiats sense mediador, avaluats en les mateixes condicions experimentals (mateixos valors de potencial aplicat i de volum d'injecció).

Taula 11.8: Estudi comparatiu dels valors d'alçada de pic, mesurats en nA, obtinguts com a resultat d'injeccions ($n=5$) d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M a un sistema de flux, quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode de configuració plana inicialment sense mediador i posteriorment amb mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície. El volum d'injecció ha estat l'optimitzat prèviament per a cada mediador, fent-se servir el mateix per als blancs corresponents. Cabal: $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

E_{ap} (mV)	ELÈCTRODE DE TREBALL SERIGRAFIAT					
	BLANC	MB	p-BQ	DCPIP	o-PDA	3,4-DHB
100	0.2 ± 0.5	18.6 ± 0.6				269 ± 8
300	3 ± 0					
320	4.4 ± 0.6			19.6 ± 0.6		
325	4.6 ± 0.6		37.4 ± 0.6			
450	30 ± 3				42 ± 3	

11.3.3 AVALUACIÓ EN UN SISTEMA DE FLUX D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH PREPARAT AMB MEMBRANES BASEDES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB MEDIADORS

11.3.3.1 Caracterització electroquímica

Els voltamperogrames representats a la Figura 11.12 per a cadascun dels elèctrodes serigrafats amb membranes de polisulfona, que incorporen els diferents mediadors avaluats, permeten fixar els potencials òptims de treball per a la determinació de NADH. Els valors d'aquests potencials apareixen recollits a la Taula 11.9.

Taula 11.9: Potencials òptims d'oxidació de NADH deduïts dels voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'empren, com a elèctrode de treball, elèctrodes de configuració plana basats en tintes de grafit, modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen diferents mediadors redox.

MEDIADOR INCORPORAT A LA MEMBRANA DE POLISULFONA	E_{ap} (mV)
MB	-100
p-BQ	175
DCPIP	150
o-PDA	300
3,4-DHB	350

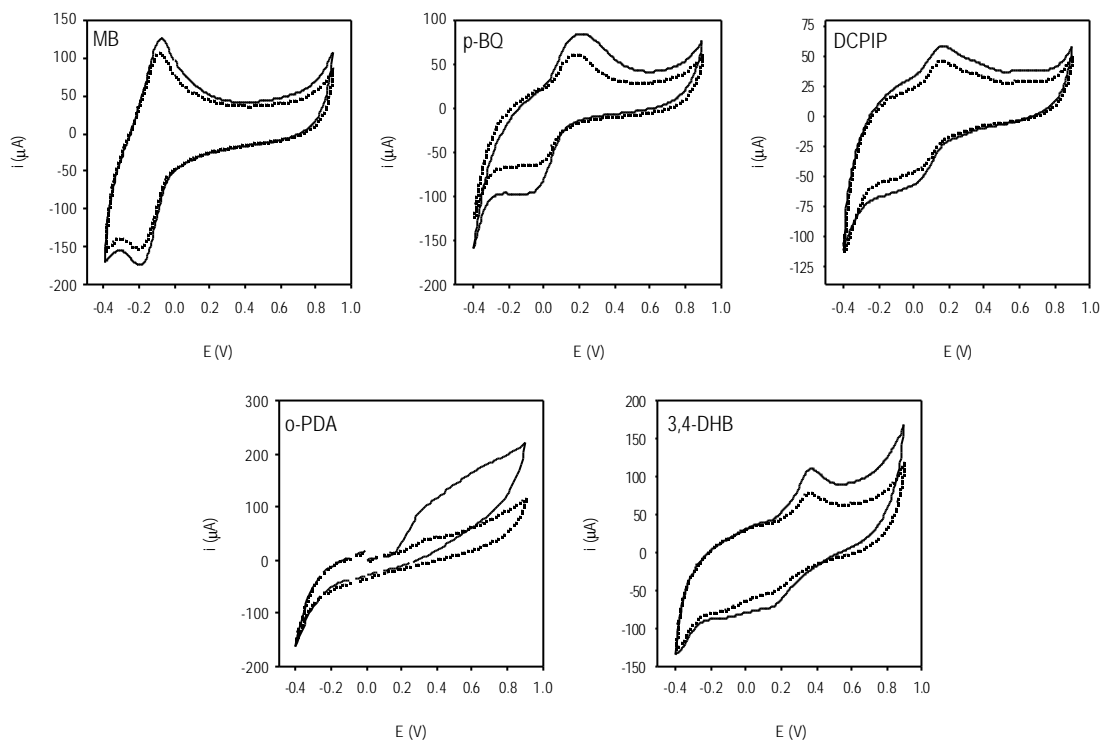


Figura 11.12: Voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'utilitza com a elèctrode de treball un elèctrode de configuració plana, basat en tintes de grafit, modificat amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona que incorpora un mediador redox. Inicialment la cel·la electroquímica conté tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 (línia de punts), mentre que el voltamperograma representat per una línia contínua a tots els gràfics correspon a una solució de NADH $1.5 \cdot 10^{-5}$ M. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Aquests resultats mostren que per a tots els quimiosensors avaluats basats en elèctrodes de configuració plana, excepte per al que incorpora MB com a mediador a l'interior de la membrana de polisulfona, els potencials òptims de treball fixats són superiors als emprats quan es treballava amb elèctrodes convencionals modificats amb el mateix tipus de membranes (vegeu § 5.3.3.3). Aquest efecte pot ésser degut al canvi de configuració dels elèctrodes, o bé al canvi de material usat com a transductor, és a dir, compost de grafit-epoxi o tinta de grafit. Ambdós efectes, per separat o conjuntament, han donat com a resultat una disminució de l'eficiència de la transferència electrònica, que queda reflectida en un augment del potencial que cal aplicar per a poder oxidar el cofactor NADH.

11.3.3.2 Estudi de la resposta a NADH

De la mateixa manera que es va fer per als quimiosensors amb mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície, s'ha avaluat la resposta a NADH mostrada pels elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes de grafit-polisulfona, que incorporen diferents mediadors, mitjançant corbes

de calibració obtingudes quan s'injecten solucions de NADH de concentració coneguda. La Taula 11.10 inclou els valors de sensibilitat obtinguts quan s'empren aquests quimiosensors per a la determinació de NADH. S'observa com els quimiosensors que incorporen MB són els més sensibles a NADH.

Taula 11.10: Paràmetres de les corbes de calibració per a NADH obtingudes amb cadascun dels elèctrodes recoberts amb membranes de grafit-polisulfona que incorporen diferents mediadors. S'han injectat concentracions de NADH des de $1 \cdot 10^{-5}$ M fins a $5 \cdot 10^{-4}$ M. Cada punt de la corba de calibració correspon a la mitjana de 7 injeccions successives d'una solució de NADH d'una concentració determinada.

MEDIADOR INCORPORAT A LA MEMBRANA DE POLISULFONA	E_{ap} (mV)	PENDENT (μ A/M)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ
MB	-100	1009 ± 38	0.9985
p-BQ	175	753 ± 24	0.9977
DCPIP	150	761 ± 27	0.9982
o-PDA	300	640 ± 21	0.9949
3,4-DHB	350	727 ± 25	0.9965

La Figura 11.13 mostra la representació de les dades obtingudes amb el quimiosensor preparat amb un elèctrode de configuració plana recobert amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona modificat amb MB, a partir de les quals s'han extret els valors inclosos a la Taula 11.10. S'observa com la dispersió de l'alçada dels pics per a cadascuna de les concentracions de NADH avaluades, és bastant petita, fet que permetrà interpolar a la corba de calibració corresponent, per a determinar una concentració problema de NADH amb un elevat grau de fiabilitat.

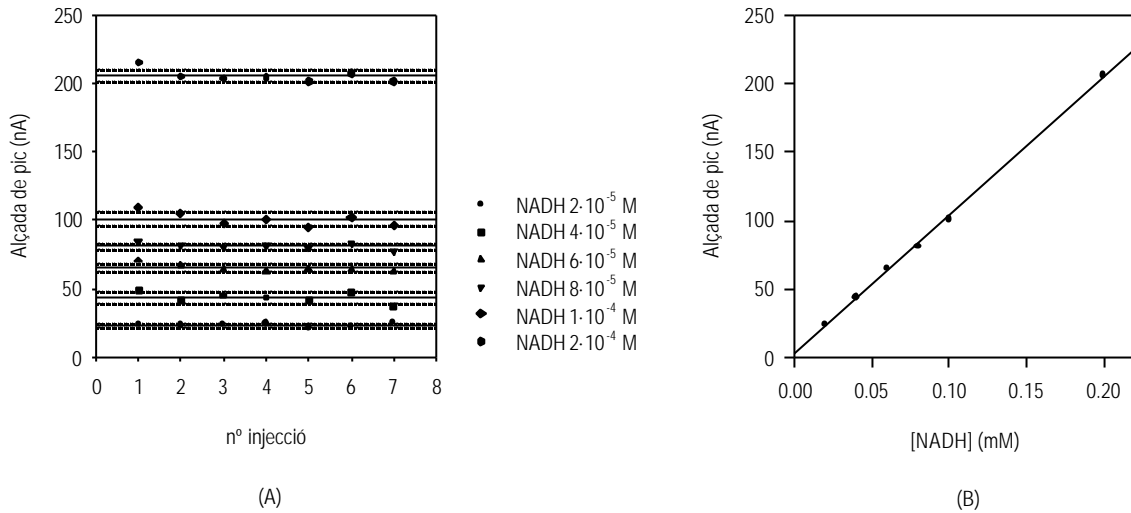


Figura 11.13: Dades obtingudes mitjançant injeccions successives de solucions de NADH de diferent concentració en un sistema de flux quan l'elèctrode de treball és un elèctrode de configuració plana recobert amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona que incorpora MB. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. El potencial de treball ha estat -0.100 V. Volum d'injecció: 100 μ l. Cabal: 0.9 ml·min⁻¹. (A) Estudi de la repetitivitat de l'alçada de pics successius ($n=7$) per a cadascuna de les concentracions injectades. La línia sòlida representa la mitjana, mentre que les línies de punts corresponen a \pm la desviació estàndard. (B) Corba de calibració obtinguda a partir de la mitjana corresponent al senyal dels pics associats a cadascuna de les concentracions de NADH.

De totes formes, atès que l'objectiu principal d'aquest estudi és demostrar que l'aplicació en sistemes de flux dels quimiosensors desenvolupats permet determinar la concentració de NADH injectada sense problemes de pèrdues de senyal degudes a la passivació de la superfície de l'elèctrode que sovint va associada a l'oxidació del NADH, s'ha estudiat la repetitivitat per a injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode de configuració plana recobert amb una membrana de grafit-polisulfona amb cadascun dels mediadors estudiats. La Figura 11.14 correspon a la representació gràfica d'aquesta repetitivitat per als elèctrodes de configuració plana que incorporen els mediadors o-PDA i 3,4-DHB a la membrana de grafit-polisulfona que recobreix la seva superfície electròdica. La Taula 11.11 inclou els paràmetres estadístics corresponents a l'estudi de la repetitivitat mostrat en aquesta figura, així com els corresponents als quimiosensors preparats amb la resta de mediadors avaluats.

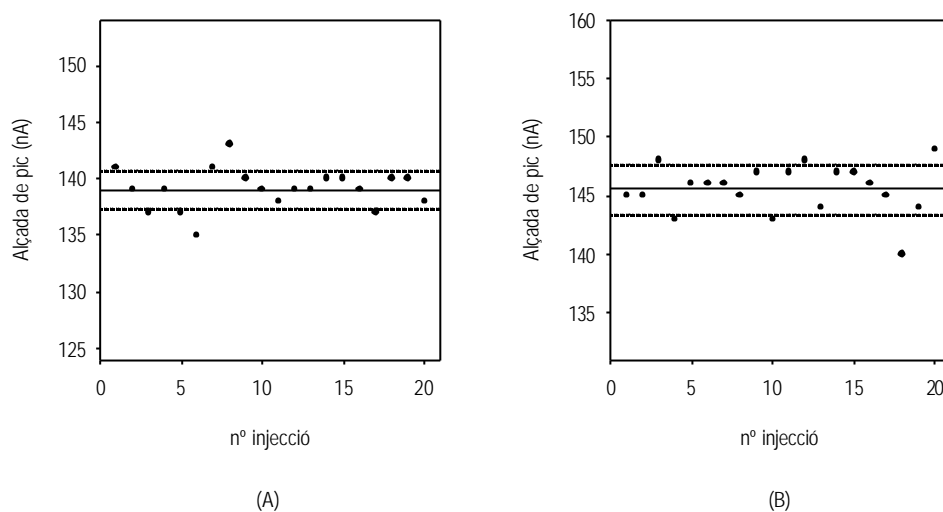


Figura 11.14: Estudis de la repetitivitat del senyal en un sistema de flux quan es fan 20 injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M, sobre una solució portadora (tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5) desairejada. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un elèctrode de configuració plana amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona amb (A) o-PDA i (B) 3,4-DHB dipositada sobre la seva superfície sensora. El potencial aplicat ha estat (A) 0.300 V i (B) 0.350 V. En ambdós casos, la línia sòlida representa la mitjana, mentre que les línies de punts corresponen a \pm la desviació estàndard. Volum d'injecció: 100 μ l. Cabal: 0.9 ml·min⁻¹.

Taula 11.11: Paràmetres estadístics calculats a partir de les mesures d'intensitat obtingudes per a 20 injeccions successives ($n=20$) d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M, quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode de configuració plana recobert amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona, que incorpora cadascun dels mediadors estudiats. Els resultats presentats per als mediadors o-PDA i 3,4-DHB s'han obtingut a partir dels valors que es mostren a la Figura 11.14. Les condicions de treball són les descrites en aquella mateixa figura.

MEDIADOR INCORPORAT A LA MEMBRANA DE POLISULFONA	E_{ap} (mV)	MITJANA (nA)	RSD (%)
MB	-100	206	1
p-BQ	175	151	2
DCPIP	150	159	1
o-PDA	300	139	1
3,4-DHB	350	146	1

Els valors de RSD, recollits a la Taula 11.11, associats a la repetitivitat assolida per aquest tipus de sensors en ésser implementats a un sistema de flux per a la determinació de NADH, són

remarcablement baixos. Aquest fet, combinat amb la representació gràfica de la dispersió d'aquestes mesures que esdevé clarament aleatòria, confirma un comportament excel·lent per a fer mesures en continu, basat en l'absència de passivació de la superfície electròdica que, com a conseqüència, fa possible la determinació de concentracions de NADH amb una elevada precisió. Aquest tipus de quimiosensors representen, per tant, una clara millora en relació als sensors que incorporen els mediadors electropolimeritzats sobre la seva superfície (vegeu Taula 11.4).

Anteriorment ja s'ha vist que un altre paràmetre molt important per a la caracterització dels sensors emprats per a la determinació de NADH en sistemes de flux, és la reproductibilitat entre corbes de calibració successives, atès que proporciona informació valuosa sobre el comportament d'un sensor a mesura que passa el temps. La Figura 11.15 mostra aquest estudi per a un elèctrode de configuració plana recobert amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona amb o-PDA. La variació de la sensibilitat quan s'efectuen anàlisis successives extreta d'aquesta figura, així com les dades corresponents als quimiosensors equivalents preparats amb la resta de mediadors, queden recollides a la Taula 11.12.

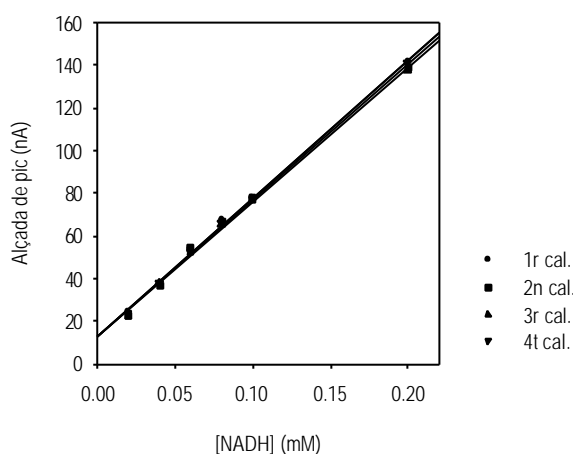


Figura 11.15: Corbes de calibració successives obtingudes mitjançant injeccions de solucions de NADH de diferent concentració en un sistema de flux. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un elèctrode de configuració plana modificat amb una membrana de grafit-polisulfona que incorpora o-PDA. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. El potencial de treball aplicat ha estat 0.300 V. Volum d'injecció: 100 μ l. Cabal: 0.9 ml·min⁻¹.

Taula 11.12: Paràmetres estadístics calculats a partir de la representació de 4 corbes de calibració successives obtingudes amb els quimiosensors preparats amb elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona, que incorporen cadascun dels mediadors estudiats.

MEDIADOR INCORPORAT A LA MEMBRANA DE POLISULFONA	E_{ap} (mV)	MITJANA DEL PENDENT ($\mu A/M$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
MB	-100	1035	0.9992 a 0.9995	1.5
p-BQ	175	751	0.9965 a 0.9994	0.7
DCPIP	150	769	0.9984 a 0.9995	0.7
o-PDA	300	640	0.9965 a 0.9985	1.3
3,4-DHB	350	695	0.9956 a 0.9972	0.4

Les dades recollides a la Taula 11.12 mostren una reproductibilitat excel·lent per als quimiosensors desenvolupats que fa possible el seu ús continuat per a la determinació de NADH en sistemes de flux. De fet, la incorporació dels mediadors en aquestes membranes de polisulfona permet obtenir quimiosensors amb un comportament més reproducible al llarg del temps que els basats en mediadors electropolimeritzats sobre la seva superfície. Aquesta millora pot atribuir-se al fet que durant la preparació dels quimiosensors amb mediador electropolimeritzat, una quantitat important de mediador s'adsorbeix sobre la superfície electròdica, de manera que influirà directament en les característiques electroquímiques finals del sensor. En canvi, els elèctrodes preparats amb polisulfona, inicialment poden presentar certa quantitat de mediador adsorbit que no ha quedat atrapat a la membrana durant la seva formació, però que en gran mesura serà eliminat en el rentat previ a la seva utilització. Així, la quantitat de mediador que pot restar adsorbit a la membrana de polisulfona serà menyspreable en front de la gran quantitat de mediador fortament retingut a l'interior polimèric. Una altra hipòtesi es basa en un millor contacte entre el mediador i el grafit per als compòsits de polisulfona en relació a quan es treballa amb el mediador electropolimeritzat, fet que es reflectiria en una menor passivació de la superfície electròdica i, per tant, en una millor reproductibilitat associada a la sensibilitat.

Tanmateix, a fi de conèixer la confiança amb què es pot emprar aquest tipus d'elèctrodes per a fer mesures en diferents dies, resta avaluar l'estabilitat d'emmagatzematge. Aquest paràmetre s'ha calculat a partir de les corbes de calibració obtingudes en diferents dies, quan s'empren diferents elèctrodes d'un mateix lot, és a dir, cada dia s'avalua un dels sensors que han estat preparats al mateix temps. Com a pas previ per a poder avaluar aquest paràmetre, esdevé necessari conèixer la variabilitat que apareix quan es fan mesures amb diferents elèctrodes que pertanyen a un mateix lot. La Taula 11.13 inclou aquesta variabilitat per als elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de polisulfona preparats amb els diferents mediadors assajats. Aquests valors s'han calculat a partir dels

valors d'intensitat de corrent mesurats per a injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M quan s'empren 4 elèctrodes d'un mateix lot. Atès que tots els mediadors segueixen un mecanisme de catàlisi heterogènia que porta a què la intensitat de corrent sigui proporcional a l'àrea de la superfície electròdica, així com al recobriment assolit pel mediador, es dedueix que les variacions d'aquests dos paràmetres entre elèctrodes diferents, degudes a limitacions intrínseques al procés de construcció dels sensors, incrementaran notablement la variabilitat dels elèctrodes d'un mateix lot. Ara bé, el fet que la quantitat de mediador continguda a la membrana de grafit-polisulfona sigui suficientment gran com per assegurar que les petites variacions del recobriment assolit pel propi mediador no indueixin canvis importants del senyal mesurat, pot interpretar-se com el motiu pel qual s'obtenen valors de reproductibilitat força satisfactoris per als sensors que provenen d'un mateix lot. Un cop coneguda la variabilitat inherent al fet de canviar d'elèctrode per a obtenir corbes de calibració de NADH, ja es pot passar a avaluar l'estabilitat d'emmagatzematge, de manera que s'ha calculat la sensibilitat per a diferents elèctrodes d'un mateix lot en diferents dies, i tal com es mostra a la Figura 11.16, només els elèctrodes preparats amb p-BQ i DCPIP mostren una clara pèrdua de sensibilitat durant els primers 15 dies que no és atribuïble a la pròpia variabilitat dins d'un mateix lot.

Taula 11.13: Avaluació de la variabilitat associada a la resposta mesurada per a 4 elèctrodes que pertanyen a un mateix lot. Per a cadascun d'ells s'ha calculat la mitjana de la intensitat de corrent corresponent a 3 injeccions successives d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. Volum d'injecció: 100 μ l. Cabal: 0.9 ml·min⁻¹. Els quimiosensors avaluats s'han preparat amb elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en còmposits de grafit-polisulfona, que incorporen cadascun dels mediadors estudiats, dipositades sobre la seva superfície sensora.

MEDIADOR INCORPORAT A LA MEMBRANA DE POLISULFONA	E_{ap} (mV)	MITJANA (nA)	RSD (%)
MB	-100	217	5
p-BQ	175	151	9
DCPIP	150	159	4
o-PDA	300	144	8
3,4-DHB	350	146	6

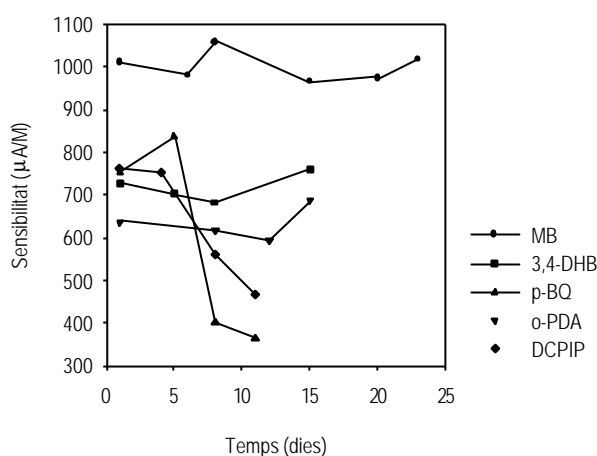


Figura 11.16: Avaluació de la variabilitat associada a les sensibilitats de les corbes de calibració obtingudes en diferents dies per a sensors que pertanyen a un mateix lot, com a paràmetre indicador de l'estabilitat d'emmagatzematge, corresponent als sensors basats en electrodes de configuració plana recoberts amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona amb els diferents mediadors assajats. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. Els potencials de treball aplicats han estat els indicats a la Taula 11.12 per a cadascun dels mediadors incorporats. Volum d'injecció: 100 μ l. Cabal: 0.9 ml·min⁻¹.

11.3.3.3 Estudi de la dinàmica de resposta

La Figura 11.17(A) correspon al registre gràfic de la resposta obtinguda quan s'injecten diferents volums d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M per a un quimiosensor basat en un elèctrode de configuració plana cobert amb una membrana d'un compost de grafit-polisulfona que, en aquest cas, incorpora MB. De nou s'observa com augmenta el pic d'intensitat de corrent a mesura que s'incrementa el volum de solució injectat. Per tant, les característiques requerides per a cada sistema en concret, determinaran el volum d'injecció òptim a emprar. La Figura 11.17(B) exemplifica com s'han determinat els temps de resposta dels sensors a partir dels registres gràfics obtinguts amb cadascun d'ells quan s'injecta una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. Els valors obtinguts s'inclouen a la Taula 11.14.

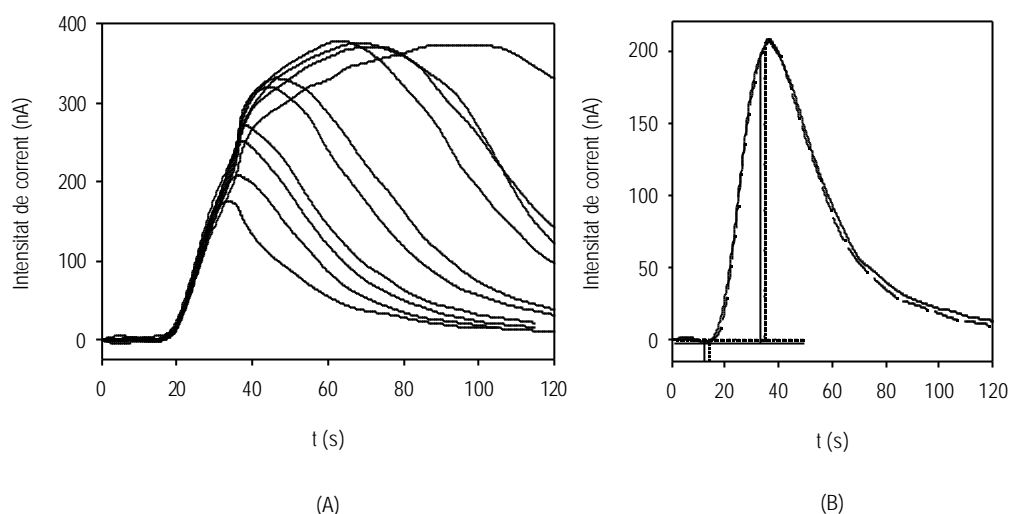


Figura 11.17: Dinàmica de resposta per a injeccions de NADH d'un elèctrode de configuració plana, modificat amb una membrana d'un compost de grafit-polisulfona amb MB dipositada sobre la seva superfície sensora. (A) Registre de la variació de l'alçada de pic (nA) quan s'injecten diferents volums d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. Els volums d'injecció emprats han estat els descrits a § 11.2.3.4. (B) Registre de la variació de l'alçada de pic (nA) quan s'injecten $100 \mu\text{l}$ d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M, sobre el qual s'indica com s'ha determinat el temps de resposta al $t_{95\%}$. L'estudi s'ha fet per a $n = 2$. Solució portadora desairejada: fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. Cabal: $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Taula 11.14: Característiques dinàmiques de resposta extretes dels registres gràfics obtinguts per a cada un dels mediadors assajats incorporats a la membrana de grafit-polisulfona dipositada sobre la superfície d'un elèctrode de configuració plana. S'ha avaluat el temps de resposta com a $t_{95\%}$. Les condicions experimentals són les descrites a la Figura 11.17. Volum d'injecció: $100 \mu\text{l}$. Els càlculs s'han fet per a $n = 2$.

MEDIADOR INCORPORAT A LA MEMBRANA DE POLISULFONA	TEMPS DE RESPOSTA (s)	INTENSITAT DE CORRENT MÀXIMA (nA)	RSD (%)
MB	17 ± 1	123	2
p-BQ	19 ± 2	105	2
DCPIP	26 ± 2	93	2
o-PDA	20 ± 1	73	6
3,4-DHB	20 ± 1	74	3

S'observa com tots els elèctrodes de configuració plana amb membranes de grafit-polisulfona, que incorporen els diferents mediadors estudiats a la seva configuració, posseeixen temps de resposta

(95%) molt semblants, quan s'empra un volum d'injecció de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M de 100 μ l. Per a aquest tipus de quimiosensors, el que incorpora MB com a mediador ha estat el que ha presentat una intensitat de corrent més elevada amb l'aplicació d'un potencial de treball de tan sols -0.1 V, alhora que ha mostrat la resposta més ràpida, assolint el 95 % de la intensitat de corrent màxima en aproximadament 17 s. Aquest conjunt de característiques confirmen el bon comportament d'aquests sensors i, en conjunt, dels sensors basats en membranes de polisulfona amb mediadors, quan són implementats en sistemes de flux, mostrant com ja s'ha vist uns valors òptims de sensibilitat, reproductibilitat associada a aquesta sensibilitat i repetitivitat entre injeccions consecutives. A més, cal afegir com a avantatge addicional, el fet de poder ésser preparats mitjançant una producció massiva, fet que representa un gran avenç en front del temps necessari, aproximadament de 30 minuts, de preparació de només un sol sensor que incorpori el mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície.

11.4 CONCLUSIONS

D'aquest capítol es pot concloure:

- 1 La versatilitat pel que fa al disseny de diferents configuracions per als transductors basats en compòsits o tintes de grafit facilita la seva implementació en sistemes de flux.
- 2 Si bé a la bibliografia es fa esment de la reducció del sobrepotencial necessari per a la determinació de NADH quan s'utilitza un elèctrode de capa gruixuda (d'or o de grafit), en el cas dels compòsits de grafit-epoxi preparats mitjançant tecnologia serigràfica no s'ha observat pràcticament cap variació del potencial associat vers al requerit per un elèctrode de configuració convencional. Aquest fet pot ésser degut a que la disminució del sobrepotencial pròpia dels elèctrodes de capa gruixuda s'atribueix a l'obtenció d'una superfície rugosa i irregular, amb una estructura constituïda per un nombre elevat de microelèctrodes que augmenten la relació senyal/soroll, característica implícita en els compòsits de grafit-epoxi emprats. És per aquest motiu que el pas d'una configuració cilíndrica a una plana per a aquest tipus de compòsits no representarà canvis substancials del sobrepotencial necessari. Tanmateix, els elèctrodes de configuració plana basats en tintes de grafit han demostrat presentar un comportament comparable als elèctrodes equivalents basats en compòsits de grafit-epoxi.
- 3 De la comparació de dos elèctrodes de configuració plana, un de platí i un altre basat en un compòsit de grafit-epoxi, s'observa com el darrer presenta una major sensibilitat vers la detecció de NADH. D'altra banda, ambdós elèctrodes esdevenen afectats per pèrdues apreciables de sensibilitat amb el pas del temps que fan inviable el seu ús continuat en sistemes de flux per a la determinació de NADH.
- 4 Els elèctrodes de configuració plana basats en compòsits de grafit-epoxi permeten dur a terme els processos d'electropolimerització del mediador de forma equiparable a l'emprada per als elèctrodes convencionals. Així, els potencials de treball fixats per a cadascun dels mediadors electropolimeritzats

sobre aquests elèctrodes no difereixen significativament dels obtinguts quan s'electropolimeritzen sobre elèctrodes convencionals. En canvi, els elèctrodes de configuració plana basats en tintes de grafit, recoberts amb membranes de grafit-polisulfona que incorporen mediadors al seu interior, mostren potencials de treball en general superiors als dels corresponents elèctrodes convencionals basats en compòsits de grafit-epoxi. Possiblement la diferència en el material transductor és el que provoca que ara el procés d'oxidació del NADH a través dels mediadors no es vegi tan afavorit. D'altra banda, per ambdós tipus de sensors, s'ha detectat una disminució de la sensibilitat, possiblement deguda a la reducció de la superfície de contacte amb la solució de treball.

5 L'obtenció de valors d'intensitat de corrent més elevats per als elèctrodes de configuració plana amb mediador, electropolimeritzat o incorporat en membranes de polisulfona sobre la seva superfície, que per a un elèctrode de les mateixes característiques però sense mediador, quan s'aplica per tots 3 el mateix potencial de treball, confirma que l'oxidació de NADH, per als elèctrodes modificats, té lloc de forma mediatitzada mitjançant un procés d'electrocatalisi.

6 L'estudi de la repetitivitat en un sistema de flux per als elèctrodes de configuració plana amb mediador electropolimeritzat o incorporat en membranes de polisulfona, ha donat com a resultat valors de desviació estàndard relativa inferiors a l'obtingut per a un mateix elèctrode però sense mediador. Si bé aquesta reducció no és significativa per a alguns dels mediadors electropolimeritzats, s'ha comprovat a partir de la representació de l'alçada de pics successius, i de l'avaluació de la resposta en dies consecutius, que per a tots els elèctrodes amb mediador la RSD es deu a oscil·lacions aleatòries del senyal, mentre que per a un elèctrode sense mediador s'observa una clara tendència cap a la pèrdua de senyal.

7 La representació de corbes de calibració successives per a elèctrodes de configuració plana amb mediador electropolimeritzat i, especialment, per a aquells que incorporen els mediadors a l'interior de membranes de grafit-polisulfona, fa evident la possibilitat d'utilitzar aquests elèctrodes com a elèctrode de treball en sistemes de flux per a la determinació de NADH de forma continuada, atès que no s'observa en aquests casos la pèrdua de sensibilitat característica en la determinació de NADH no mediatitzada. La millora de la reproductibilitat per als sensors basats en membranes de polisulfona respecte als que incorporen els mediadors electropolimeritzats pot ésser deguda a que, si bé en ambdós casos pot haver-hi certa quantitat de mediador adsorbit que alterarà l'estabilitat del sensor, aquesta quantitat és menyspreable quan es treballa amb sensors amb membranes de polisulfona amb mediador, car el contingut en mediador és tan gran que les petites variacions causades per la desorció del mediador que s'hagi pogut adsorbir no seran significatives. A més, també es creu que el contacte entre el grafit i el mediador millora per a les membranes de polisulfona, atès que contenen ambdós components al seu interior, fet que ajuda a disminuir la passivació i, per tant, en definitiva el que s'observa és una millor reproductibilitat entre corbes de calibració.

8 L'electropolimerització de mediador sobre la superfície d'un elèctrode de configuració plana basat en un compòsit de grafit-epoxi o la seva incorporació en membranes de polisulfona dipositades sobre elèctrodes de configuració plana basats en tintes de grafit, redueix el temps de resposta en tots els

casos estudiats, per als quals s'obtenen valors de $t_{95\%}$ d'entre 10 i 30 s, inferiors als 50 s associats a un elèctrode sense mediador. Aquesta millora de les característiques dinàmiques de resposta quan s'empren elèctrodes amb mediador es pot associar al fet que el mediador està facilitant el procés d'oxidació de NADH.

9 Els quimiosensors preparats amb elèctrodes de configuració plana basats en tintes de grafit, que incorporen els mediadors a l'interior de membranes de polisulfona dipositades sobre la seva superfície sensora, posseeixen un conjunt de característiques que els fan adequats per a ésser implementats en sistemes de flux adreçats a la determinació del cofactor NADH. D'entre aquestes característiques destaca l'absència de pèrdues de mediador per dissolució, així com de passivació de la superfície sensora. A més, com a avantatge addicional, es preparen de forma ràpida i senzilla, fet que fa possible la seva producció massiva mitjançant una darrera capa dipositada serigràficament.

11.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ H. Gunasingham, B. Fleet. *Analytical Chemistry*, **55** (1983) 1409-1414
- ² S. A. M. Marzouk, C. X. Xu, B. R. Cosofret, R. P. Buck, S. S. M. Hassan, M. R. Neuman, R. H. Sprinkle. *Analytica Chimica Acta*, **363** (1998) 57-65
- ³ M. Boujtita, M. Boitard, N. E. Murr. *Biosensors & Bioelectronics*, **14** (1999) 545-553
- ⁴ A. J. Killard, S. G. Zhang, H. J. Zhao, R. John, E. I. Iwuoha, M. R. Smyth. *Analytica Chimica Acta*, **400** (1999) 109-119
- ⁵ A. Silver, C. Bräuchle, N. Hampp. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **390** (1995) 83-89
- ⁶ M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret. *Sensors and Actuators*, **B69** (2000) 153-163
- ⁷ H. C. Yoon, H-S. Kim. *Analytica Chimica Acta*, **336** (1996) 57-65
- ⁸ C. A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret. A Yang and Ngo (Eds.). *Biosensors and Their Applications*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers (1999) pp 299-309
- ⁹ M. Álvarez-Icaza, U. Bilitewski. *Analytical Chemistry*, **65** (1993) 525A-533A
- ¹⁰ M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret. *Sensors and Actuators*, **B69** (2000) 153-163
- ¹¹ C. A. Galán. *Desarrollo de Sensores Químicos por Tecnología Thick-Film*. Treball de Recerca (Màster de Química). Universitat Autònoma de Barcelona (1995) pp 43-67
- ¹² C. A. Galán. *Desarrollo de Sensores Químicos y Biosensores por Tecnología Thick-Film*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (1996) pp 85
- ¹³ M. Albareda. *Desenvolupament de Biosensors per Tecnologia Planar per a l'anàlisi de Pesticides*. Treball de Recerca (Màster en Química). Universitat Autònoma de Barcelona (1999) pp 52-54
- ¹⁴ S. Solé. *Desenvolupament de sistemes biosensors enzimàtics i immunològics basats en un suport magnètic renovable*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (2000) p 109
- ¹⁵ C. A. Galán. *Desarrollo de Sensores Químicos y Biosensores por Tecnología Thick-Film*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (1996) pp 71-102
- ¹⁶ S. Solé. *Desenvolupament de sistemes biosensors enzimàtics i immunològics basats en un suport magnètic renovable*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (2000) p 232

12 IMPLEMENTACIÓ A UN SISTEMA DE FLUX DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT, AMONI I UREA

12.1 INTRODUCCIÓ

Cada vegada és més important disposar de mètodes que permetin fer determinacions automàtiques, ràpides i precises de determinats substrats enzimàtics d'interès en laboratoris clínics, mediambientals o de control d'aliments. La tècnica FIA acoblada a biosensors enzimàtics amb detecció amperomètrica, emprats com a detectors, pot proporcionar aquestes característiques car l'elevada especificitat de les reaccions enzimàtiques, combinada amb la sensibilitat que ofereixen els sistemes amperomètrics de transducció del senyal, permeten determinar diferents substrats en medis que corresponen a una mescla de molts altres components.¹ A més, atès que la detecció amperomètrica és un fenomen basat en reaccions que tenen lloc sobre la superfície electròdica, el volum de reacció no influeix en la sensibilitat, de manera que en funció del disseny del sistema es podran fer determinacions amb volums de mostra molt petits.²

La immobilització dels enzims i l'assoliment d'una mediació eficient de la transferència electrònica, ambdós relacionats amb la construcció i el comportament d'un biosensor respectivament, són dos dels factors més importants quan es vol dissenyar un sistema de flux que ha d'incorporar un biosensor amperomètric com a detector.³ Les característiques mostrades pels biosensors per a amoni, urea o lactat desenvolupats en capítols anteriors amb elèctrodes convencionals, en relació a aquestes propietats, els mostren com a uns detectors adequats per a ésser implementats en sistemes de flux per a fer el seguiment de la concentració de certs analits en fluids biològics, mostres procedents de processos biotecnològics o aigües residuals.

Els biosensors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa, seran de gran utilitat en sistemes de flux per a fer seguiments *on-line* de la concentració de lactat en diferents mostres, com per exemple en sang, on el resultat aportarà informació valuosa sobre diverses patologies, ja siguin insuficiències respiratòries o malalties cardíques o hepàtiques, o en mostres preses en els reactors de diversos processos biotecnològics adreçats cap a l'obtenció de productes làctics o vins.⁴ Per la seva banda, els sistemes de flux basats en la determinació d'ió amoni són de gran utilitat per al monitoreig d'aquesta espècie, tant en mostres mediambientals com en mostres procedents d'alguns processos biotecnològics.⁵ Tanmateix, la incorporació d'altres enzims que donen com a producte de la seva reacció ió amoni, permet fer el seguiment de la concentració d'un ampli ventall d'espècies, com és el cas dels biosensors per a urea, analit d'interès clínic com a indicador de la funció renal, que incorporen l'enzim ureasa a la configuració electròdica.⁶ A més, la inhibició de cadascun dels enzims emprats en la construcció dels diferents biosensors, permet la determinació de diversos inhibidors. Per exemple, la

inhibició de l'enzim glutamat deshidrogenasa, fa possible el seguiment de la concentració en sang de certs medicaments antipsicòtics com la *clorpromazina*.⁷ L'enzim ureasa es caracteritza per ser fortament inhibit per metalls pesants, fet que ha portat a estudiar la seva incorporació en sistemes de flux per a la determinació d'aquest tipus de contaminants en aigües.⁸

Tanmateix, per a tots ells ja s'ha adaptat el protocol de preparació per a l'obtenció de biosensors basats en elèctrodes de configuració plana construïts mitjançant tecnologia serigràfica, que ofereixen alguns avantatges addicionals a l'hora d'ésser incorporats com a detectors a un sistema FIA. Ja s'ha destacat que alguns d'aquests avantatges són la versatilitat de configuracions, la possibilitat de miniaturització i la simplicitat i baix cost de la seva construcció que, en definitiva, són factors responsables de fer possible la seva producció massiva.⁹

Cal tenir present que el sotmetiment dels biosensors emprats com a detectors a un flux continuat els hi exigeix certs requeriments addicionals, com són l'estabilitat mecànica de la superfície electròdica quan s'estan aplicant unes condicions hidrodinàmiques vigoroses, atès que aquestes poden portar a pèrdues de l'enzim o dels mediadors per dissolució,^{10,11,12} o uns temps de resposta suficientment curts com per permetre una velocitat de mostreig adequada.¹³

En aquest capítol s'inclouen els resultats obtinguts quan s'implementen a un sistema de flux els biosensors basats en matrius de polisulfona per a la determinació de lactat, ió amoni o urea, prèviament desenvolupats.

12.2 EXPERIMENTAL

12.2.1 APARELLS I REACTIUS

12.2.1.1 Aparells

El sistema de flux usat correspon al descrit a § 2.2.1.1. S'ha emprat l'amperímetre detallat en tots els capítols anteriors per a fer les mesures d'intensitat de corrent quan s'aplica un potencial constant. L'elèctrode de referència i el compost de grafit-epoxi de configuració tubular emprat com a elèctrode auxiliar, han estat els descrits a § 11.2.1.1.

La construcció dels elèctrodes de treball mitjançant tecnologia serigràfica (*screen printed*) s'ha dut a terme amb un equip de serigrafia totalment automàtic DEK 248 (DEK, Regne Unit) i diferents màscares de monofilament, construïdes en poliamida (200 x 400 mm², malla 110 fils·cm⁻¹, 70 µm de gruix), o metàl·liques, segons la capa a dipositar.

12.2.1.2 Reactius

Per a la construcció dels elèctrodes serigrafiats s'han emprat les tintes de la casa Acheson detallades a § 8.2.1.2.

La polisulfona, el NADH i els mediadors són els mateixos descrits anteriorment.

La resta de reactius usats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

12.2.2 DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A LACTAT, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA

Les característiques de resposta mostrades pels biosensors de lactat basats en membranes de polisulfona, desenvolupats al Capítol 8, juntament amb la possibilitat d'adaptar de forma fàcil la seva preparació a una producció massiva de biosensors de configuració plana mitjançant tecnologia serigràfica, han adreçat els estudis cap a la seva implementació a un sistema FIA.

12.2.2.1 Preparació i avaluació de la resposta a lactat d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa, implementats a un sistema de flux

A § 8.2.3.6 apareix detallada la metodologia emprada per a la preparació dels biosensors per a lactat de configuració plana que han d'anar implementats com a detectors del sistema FIA utilitzat.

Atès que aquests biosensors quedaran exposats a un flux continuat, convé assegurar que no hi haurà passivació de la seva superfície ni pèrdues de cap dels components que formen part de la seva membrana sensora. Per una banda, ja va quedar demostrat al capítol anterior que les membranes de polisulfona són capaces de retenir eficientment els diferents mediadors redox assajats quan s'exposen a un flux continuat, alhora que no esdevenen afectades per la passivació que podria resultar de l'adsorció d'espècies que es troben a la solució que flueix contínuament sobre la seva superfície. No obstant això, és necessari demostrar ara el comportament d'aquests biosensors en vers les possibles pèrdues d'enzim per dissolució des de la membrana de polisulfona cap al flux de la solució portadora. És per aquest motiu que, primerament, a fi d'avaluar la repetitivitat, s'han realitzat injeccions successives de solucions de lactat de concentracions que van des de $5 \cdot 10^{-5}$ fins a $2 \cdot 10^{-2}$ M. Tanmateix, també s'ha avaluat la reproductibilitat entre corbes de calibració consecutives, mitjançant injeccions successives de solucions de lactat de concentracions creixents.

Com a darrer paràmetre a estudiar, s'ha avaluat l'estabilitat d'emmagatzematge a fi de conèixer el grau de confiança amb què es poden emprar aquests biosensors per a fer mesures de la concentració de

lactat durant un determinat període de temps. Aquest paràmetre s'ha calculat a partir de la variabilitat entre els pendents de les corbes de calibració obtingudes per a diferents biosensors, un nou cada dia, pertanyents a un mateix lot. Ara bé, per a poder donar un resultat significatiu, ja es va veure al capítol anterior que cal calcular primer la reproductibilitat entre els pendents obtinguts quan es treballa amb diferents elèctrodes d'un mateix lot. S'han obtingut corbes de calibració per a lactat amb 4 elèctrodes d'un mateix lot amb l'objectiu de conèixer la reproductibilitat de la sensibilitat per als 4 biosensors preparats al mateix temps i avaluats el mateix dia. Un cop conegut aquest paràmetre, ja es pot calcular l'estabilitat d'emmagatzematge com la reproductibilitat entre els valors de sensibilitat per a diferents elèctrodes d'un mateix lot, que s'han emprat per a l'obtenció de corbes de calibració en diferents dies.

Atès que ja s'havien observat pèrdues de l'enzim lactat deshidrogenasa, incorporat en aquest tipus de biosensors basats en membranes de polisulfona, per als estudis realitzats amb sistemes discrets (vegeu § 8.3.2.5), s'ha optat per dur a terme tots els experiments descrits anteriorment, amb biosensors que no incorporin cap recobriments addicional i amb biosensors que s'hagin recobert amb una capa densa de poliamida, preparada amb el precursor N-(2-aminoetil)-piperazina segons el procediment descrit a § 7.2.2.6.3.

En tots els casos el potencial aplicat ha estat -0.1 V i el volum d'injecció usat ha estat de $100 \mu\text{l}$.

12.2.3 DESENVOLUPAMENT DE BIOCENSORS PER A IÓ AMONI, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA

Un cop desenvolupat un biosensor per a ió amoni que presenta unes característiques òptimes per a ésser emprat en la determinació d'aquesta espècie en mostres reals, s'ha dut a terme la seva implementació a un sistema FIA, amb l'objectiu de demostrar la seva capacitat per a actuar com a detector en un sistema de flux.

12.2.3.1 Preparació i avaluació de la resposta a ió amoni d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa, implementats a un sistema de flux

Els biosensors de configuració plana que han d'anar implementats com a detectors del sistema FIA dissenyat per a la determinació d'ió amoni, s'han preparat segons la metodologia descrita a § 9.2.5.6.

Com ja s'ha fet per als biosensors de lactat, cal estudiar les possibles pèrdues d'enzim per dissolució des de la membrana de polisulfona cap al flux de la solució portadora. És per això que s'ha avaluat per a un mateix biosensor, la repetitivitat entre injeccions successives de cadascuna de les concentracions d'ió amoni estudiades, i la reproductibilitat entre corbes de calibració consecutives, mitjançant injeccions successives de solucions d'ió amoni de concentracions creixents. Aquest darrer paràmetre

també s'ha estudiat amb biosensors protegits amb una capa densa de poliamida, preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina segons la metodologia descrita a § 7.2.2.6.3. L'interval de concentracions d'ió amoni avaluat va de $5 \cdot 10^{-5}$ fins a $2 \cdot 10^{-2}$ M.

També s'ha calculat la reproductibilitat entre els pendents de les corbes de calibració obtingudes amb diferents biosensors que formen part d'un mateix lot. Aquest valor s'emprarà com a referència a fi d'avaluar l'estabilitat d'emmagatzematge d'aquests biosensors durant un determinat període de temps, atès que aquest paràmetre s'ha calculat com la variabilitat entre els pendents extrems de les corbes de calibració obtingudes per a diferents biosensors, un nou cada dia, pertanyents a un mateix lot.

El potencial aplicat ha estat -0.1 V i el volum d'injecció usat ha estat de $100 \mu\text{l}$.

12.2.4 DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A UREA, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN ELS ENZIMS GLUTAMAT DESHIDROGENASA I UREASA

Ateses les característiques de resposta a urea mostrades pels biosensors desenvolupats, basats en membranes de polisulfona, i la senzilla adaptació del seu procés de preparació per a la construcció de biosensors de configuració plana mitjançant tecnologia serigràfica, s'ha procedit a la implementació d'aquests darrers a un sistema FIA, a fi d'estudiar el seu comportament com a detector en un sistema de flux.

12.2.4.1 Preparació i avaluació de la resposta a urea d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa, implementats a un sistema de flux

S'ha seguit la metodologia descrita a § 9.2.6.5 per a dur a terme la preparació dels biosensors per a urea de configuració plana que han d'anar implementats com a detectors del sistema FIA emprat.

De la mateixa manera que s'ha fet per als biosensors d'ió amoni, s'ha dut a terme l'estudi de la repetitivitat, entre injeccions successives d'una mateixa concentració d'urea, i de la reproductibilitat, entre corbes de calibració consecutives, tant per a un mateix elèctrode com per a elèctrodes diferents, pertanyents a un mateix lot. Aquest darrer paràmetre serveix com a referència a l'hora de determinar l'estabilitat d'emmagatzematge, que s'obté com a resultat de la variació del pendent de corbes de calibració per a diferents elèctrodes, que formen part del mateix lot, obtingudes en dies diferents durant el temps en què s'ha realitzat l'estudi. Les concentracions d'urea avaluades cobreixen l'interval que va de $5 \cdot 10^{-5}$ fins a $2 \cdot 10^{-2}$ M. El potencial de treball aplicat i el volum d'injecció emprat han estat -0.1 V i $100 \mu\text{l}$, respectivament.

12.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

12.3.1 DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A LACTAT, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA

12.3.1.1 Avaluació de la resposta a lactat d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa, implementats a un sistema de flux

La Figura 12.1 mostra les corbes de calibració per a lactat obtingudes quan al sistema FIA usat s'implementen els biosensors en estudi, sense recobriments protector o amb una capa addicional de poliamida. Cada punt de les corbes de calibració correspon a la mitjana de 6 injeccions successives d'una mateixa concentració de lactat. Queda palesa la linealitat de la resposta a lactat en l'interval de concentracions que va de $5 \cdot 10^{-5}$ M fins a $1 \cdot 10^{-3}$ M per ambdós tipus de biosensors, alhora que s'observa un increment de la sensibilitat quan el biosensor incorpora una capa de recobriments protector addicional. Això sembla indicar que la poliamida és responsable d'una millor retenció de l'enzim LDH de manera que, com a conseqüència, el biosensor presenta una major activitat enzimàtica que permet obtenir valors de sensibilitat superiors, malgrat que aquesta capa també provoca l'alentiment de la difusió del substrat cap a la membrana de polisulfona on es troba retingut l'enzim.

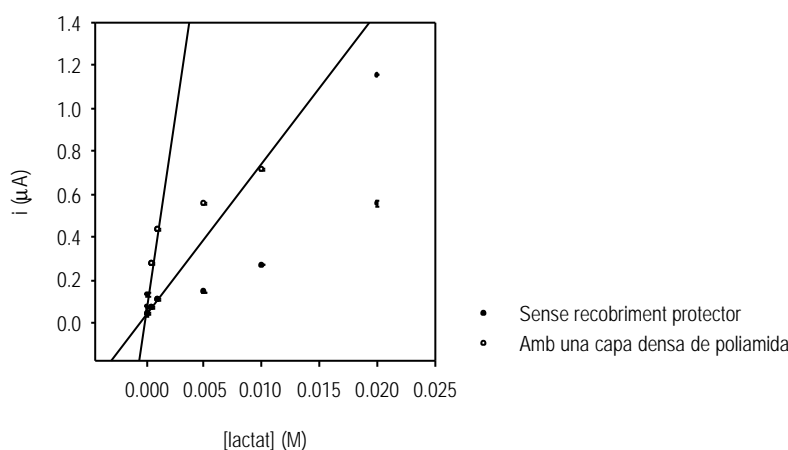


Figura 12.1: Corbes de calibració obtingudes quan s'empra com a detector del sistema FIA un biosensor de configuració plana basat en una membrana de grafit-polisulfona amb MB i enzim LDH, sense recobriments protector o amb una capa addicional de poliamida, preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina. Cada punt correspon a la mitjana de 6 injeccions successives d'una mateixa concentració de lactat. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm la desviació estàndard associada. Solució portadora desairejada: solució de NAD^+ 3 mM preparada en tampó imidazol 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.0. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V. El volum d'injecció emprat ha sigut de $100 \mu\text{l}$. Cabal: $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

La Taula 12.1 recull els valors emprats per a la representació de les corbes de calibració de la figura anterior, juntament amb la RSD associada a cada valor, paràmetre que permet avaluar la repetitivitat entre injeccions successives. Queda demostrat que la presència de la capa densa de poliamida implica un guany significatiu de la repetitivitat obtinguda, possiblement com a conseqüència de la millora en la retenció de l'enzim a l'interior del polímer, que alhora permet obtenir valors més grans d'intensitat de corrent per a una mateixa concentració de lactat.

Taula 12.1: Desviació estàndard relativa (RSD) associada al senyal obtingut per a 6 injeccions successives ($n=6$) d'una solució de lactat, de diferent concentració per a cada cas, quan s'empra com a elèctrode de treball un biosensor de configuració plana amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona, que incorpora MB i l'enzim LDH, dipositada sobre la seva superfície sensora, amb o sense una capa addicional de poliamida. Les condicions de treball han estat les descrites a la Figura 12.1.

RECOBRIMENT PROTECTOR	[LACTAT] (M)	MITJANA (nA)	RSD (%)
Sense recobriment	$5 \cdot 10^{-5}$	37	13
	$1 \cdot 10^{-4}$	44	10
	$5 \cdot 10^{-4}$	73	5
	$1 \cdot 10^{-3}$	105	3
	$5 \cdot 10^{-3}$	143	1.4
	$1 \cdot 10^{-2}$	269	0.6
	$2 \cdot 10^{-2}$	557	3
Poliamida preparada amb N-(2-aminoetil)- piperazina	$5 \cdot 10^{-5}$	75	6
	$1 \cdot 10^{-4}$	132	4
	$5 \cdot 10^{-4}$	273	1.5
	$1 \cdot 10^{-3}$	436	0.5
	$5 \cdot 10^{-3}$	555	0.2
	$1 \cdot 10^{-2}$	716	0.5
	$2 \cdot 10^{-2}$	1155	0.2

El següent paràmetre avaluat ha estat la reproductibilitat entre corbes de calibració consecutives. La Figura 12.2 mostra les corbes de calibració successives obtingudes amb un mateix elèctrode, sense cap recobriment protector (A) o amb una capa addicional de poliamida (B). Els paràmetres corresponents a aquestes corbes de calibració es recullen a la Taula 12.2, on queda palesa una millora notable de la RSD, associada als valors de sensibilitat, en comparació als resultats que s'obtenien amb

aquests mateixos biosensors quan eren usats com a elèctrodes de treball en sistemes discrets (vegeu § 8.3.2.5). En aquesta mateixa taula apareixen els paràmetres de calibració per a corbes de calibració obtingudes amb diferents biosensors que provenen d'un mateix lot. En aquest cas, el valor de RSD associat a la sensibilitat aporta informació de la reproductibilitat del procés de preparació de cada tipus de biosensor de manera que, atesos els valors obtinguts, es pot afirmar que és possible emprar biosensors pertanyents a un mateix lot, sense necessitat d'obtenir per a tots els casos una corba de calibració prèvia.

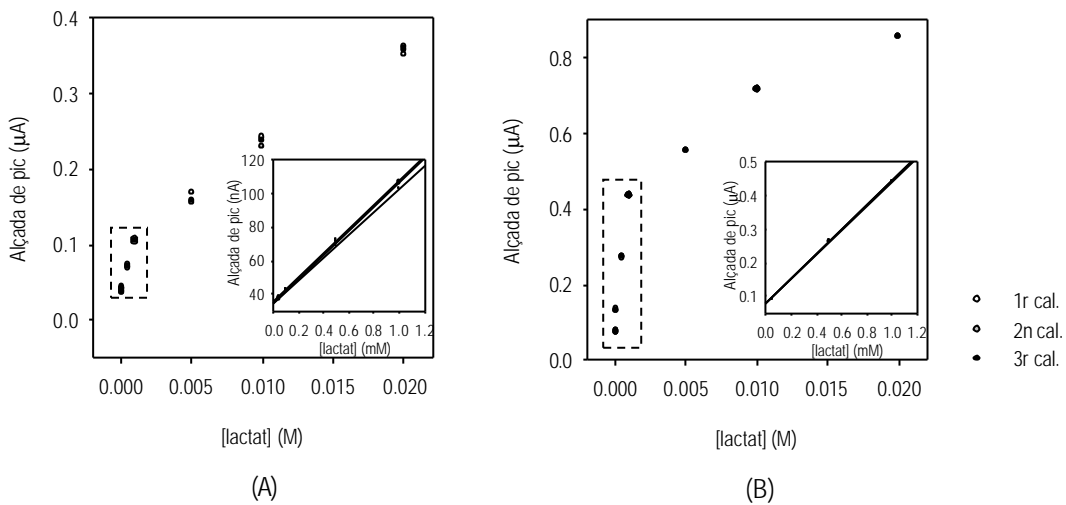


Figura 12.2: Corbes de calibració successives obtingudes mitjançant injeccions de solucions de lactat de diferent concentració en un sistema de flux. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un elèctrode de configuració plana modificat amb una membrana de grafit-polisulfona que incorpora MB i LDH, dipositada sobre la seva superfície sensora, sense recobriment protector (A) i amb una capa addicional de poliamida (B). Solució portadora desairejada: solució de NAD^+ 3 mM preparada en tampó imidazol 0.05 M amb KCl 0.05 M a pH 7.0. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V. El volum d'injecció emprat ha sigut de 100 μl . Cabal: 0.9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

S'observa una reducció important de la sensibilitat obtinguda amb aquests biosensors en comparació als resultats que mostraven quan es van avaluar en sistemes discrets. Una possible explicació es recolza en el fet que, a un sistema FIA, els fenòmens de transport de masses són diferents a la convecció que té lloc a la solució quan es treballa amb sistemes discrets.

Taula 12.2: Paràmetres de calibració obtinguts per a corbes de calibració successives ($n= 3$) efectuades amb un mateix biosensor, i per a corbes de calibració corresponents a diferents biosensors ($N= 4$) d'un mateix lot. Com a elèctrode de treball implementat al sistema FIA s'han emprat biosensors de configuració plana amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona, que incorporen MB i l'enzim LDH, dipositades sobre la superfície sensora, amb o sense un recobriment protector addicional. Les condicions de treball han estat les descrites a la Figura 12.2.

CORBES DE CALIBRACIÓ (n) / BIOSENSORS (N)	RECOBRIMENT PROTECTOR	MITJANA DEL PENDENT ($\mu\text{A/M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
n = 3 / N = 1	Sense recobriment	71	0.9989 a 0.9995	3
	Poliàmida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	364	0.9993 a 0.9994	0.3
n = 1 / N = 4	Sense recobriment	68	0.9991 a 0.9999	4
	Poliàmida preparada amb N-(2-aminoetil)-piperazina	368	0.9988 a 0.9991	2

Finalment, s'ha estudiat l'estabilitat d'emmagatzematge pels dos tipus de biosensors per a lactat usats, amb i sense recobriment de poliàmida, durant una setmana, mitjançant l'avaluació de la sensibilitat mostrada cada dia per 3 biosensors nous, guardats en sec a 4°C. Els resultats han mostrat pèrdues de sensibilitat de 9 i 16 % del valor inicial per als biosensors sense recobriment i amb una capa addicional de poliàmida, respectivament.

12.3.2 *DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A IÓ AMONI, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA*

12.3.2.1 *Avaluació de la resposta a ió amoni d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa, implementats a un sistema de flux*

La corba de calibració representada a la Figura 12.3 mostra la linealitat de la resposta a ió amoni en l'interval de concentracions que va de $5 \cdot 10^{-5}$ M fins a $2 \cdot 10^{-2}$ M. Aquesta corba de calibració s'ha representat amb els resultats inclosos a la Taula 12.3, on també apareixen els valors de RSD associats

a l'alçada de pic mesurada per a cada concentració d'amoni, paràmetre que serveix com a indicador per a avaluar la repetitivitat obtinguda per a injeccions successives d'una mateixa concentració d'amoni.

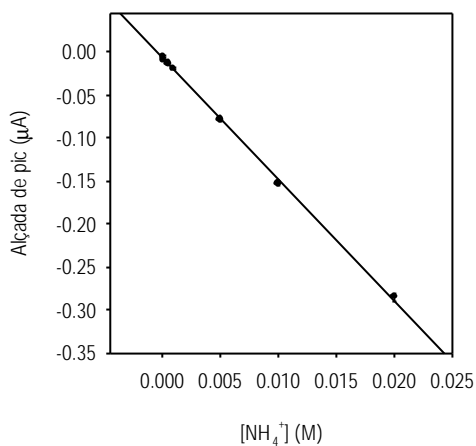


Figura 12.3: Corba de calibració obtinguda quan s'empra com a detector del sistema FIA un biosensor de configuració plana basat en una membrana de grafit-polisulfona amb MB i enzim GIDH. Cada punt correspon a la mitjana de 6 injeccions successives d'una mateixa concentració d'ió amoni. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm la desviació estàndard associada. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. Potencial de treball aplicat: -0.100 V. Volum d'injecció: $100 \mu\text{l}$. Cabal: $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Taula 12.3: Desviació estàndard relativa (RSD) del senyal obtingut per a 6 injeccions successives ($n=6$) de solucions d'ió amoni, de diferent concentració per a cada cas, quan s'empra com a elèctrode de treball un biosensor de configuració plana amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona, que incorpora MB i l'enzim GIDH, dipositada sobre la seva superfície sensora. Les condicions de treball han estat les descrites a la Figura 12.3.

$[\text{NH}_4^+]$ (M)	MITJANA (nA)	RSD (%)
$5 \cdot 10^{-5}$	4.5	12
$1 \cdot 10^{-4}$	9	5
$5 \cdot 10^{-4}$	13	4
$1 \cdot 10^{-3}$	19	4
$5 \cdot 10^{-3}$	79	3
$1 \cdot 10^{-2}$	153	1.9
$2 \cdot 10^{-2}$	285	1.6

La Figura 12.4 mostra la reproductibilitat entre corbes de calibració consecutives obtingudes quan s'empra un mateix biosensor per a ió amoni com a detector del sistema FIA. Els paràmetres d'aquestes corbes de calibració apareixen recollits a la Taula 12.4, juntament als calculats a partir de les corbes de calibració obtingudes quan s'empra un biosensor nou cada vegada. De nou es comprova com la sensibilitat és inferior a l'obtinguda quan es treballa amb el mateix tipus de biosensors però en sistemes discrets, possiblement a causa dels diferents fenòmens de transport de masses que tenen lloc a ambdós sistemes. S'observa una millora molt important de la reproductibilitat de la sensibilitat obtinguda quan es fan calibracions successives amb un mateix biosensor en relació als resultats que s'obtenien quan es treballava amb el mateix tipus de biosensors en sistemes discrets. També s'ha avaluat aquest paràmetre amb biosensors recoberts amb una capa de poliamida. La presència d'una membrana addicional no representa cap millora de la reproductibilitat, alhora que alenteix la difusió del substrat cap a la membrana de polisulfona, fet que es veu reflectit en una disminució considerable de la sensibilitat ($7 \mu\text{A/M}$). Per tant, sembla que la retenció de l'enzim *GIDH* al polímer de polisulfona, ja és suficientment bona per als biosensors sense capa protectora, fet que queda palès amb el valor de la RSD, associada a la sensibilitat, mostrat pels biosensors sense capa de poliamida. D'altra banda, la variabilitat mostrada per diferents biosensors d'un mateix lot és suficientment petita com per poder intercanviar-los sense necessitat de fer una calibració inicial cada vegada que s'implementa un biosensor nou al sistema de flux.

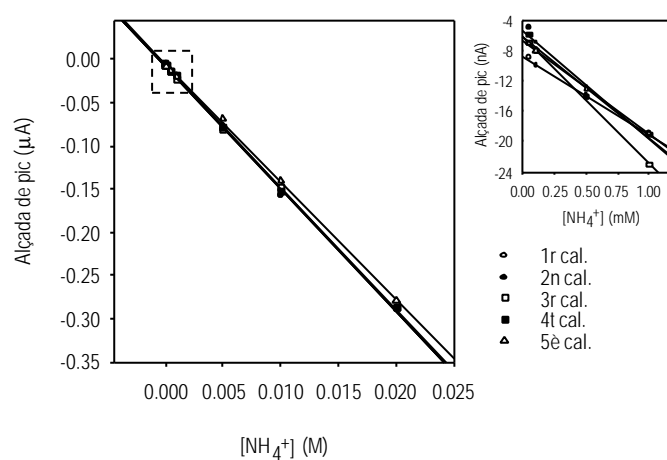


Figura 12.4: Corbes de calibració successives obtingudes mitjançant injeccions de solucions d'ió amoni de diferent concentració en un sistema de flux. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un elèctrode de configuració plana modificat amb una membrana de grafit-polisulfona que incorpora MB i *GIDH*, dipositada sobre la seva superfície sensora. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V. El volum d'injecció emprat ha sigut de $100 \mu\text{l}$. Cabal: $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Taula 12.4: Paràmetres de calibració obtinguts per a corbes de calibració successives (n= 5) efectuades amb un mateix biosensor, i per a corbes de calibració corresponents a diferents biosensors (N= 4) d'un mateix lot. Com a elèctrode de treball implementat al sistema FIA s'han emprat biosensors de configuració plana amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona, que incorporen MB i l'enzim GDH, dipositades sobre la superfície sensora. Les condicions de treball han estat les descrites a la Figura 12.4.

CORBES DE CALIBRACIÓ (n) / BIOSENSORS (N)	MITJANA DEL PENDENT ($\mu\text{A/M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
n = 5 / N = 1	14	0.9985 a 0.9998	1.9
n = 1 / N = 4	14	0.9980 a 0.9997	4

L'estabilitat d'emmagatzematge, avaluada mitjançant l'obtenció de 3 corbes de calibració successives efectuades cada dia amb un biosensor nou, guardat en sec a 4°C, permet concloure que la pèrdua de sensibilitat observada és quasi menyspreable, car ha estat d'un 4 %, percentatge que coincideix amb el valor de RSD de les sensibilitats corresponents a les corbes de calibració per a biosensors d'un mateix lot.

12.3.3 DESENVOLUPAMENT DE BIODIAGNÒSTICS PER A UREA, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN ELS ENZIMS GLUTAMAT DESHIDROGENASA I UREASA

12.3.3.1 Avaluació de la resposta a urea d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa, implementats a un sistema de flux

La Figura 12.5 correspon a la corba de calibració per a urea que resulta de representar les dades recollides a la Taula 12.5 per a un biosensor de configuració plana implementat al sistema FIA emprat. S'observa com la resposta a urea és lineal en l'interval de concentracions que va de $5 \cdot 10^{-5}$ M fins a $1 \cdot 10^{-3}$ M. El límit inferior coincideix amb l'obtingut per a ió amoni, fet que sembla ésser lògic atès que depèn bàsicament del transductor. En canvi, el límit superior és menor a l'obtingut per a ió amoni, fet que pot relacionar-se amb la dependència d'aquest paràmetre amb l'activitat de l'enzim, de manera que permet concloure que cal cercar una millor immobilització enzimàtica en aquest cas. Tanmateix, la Taula 12.5 recull els valors de RSD de les mesures d'intensitat obtingudes per a cada concentració d'urea, que demostren una bona repetitivitat entre injeccions consecutives d'una mateixa solució.

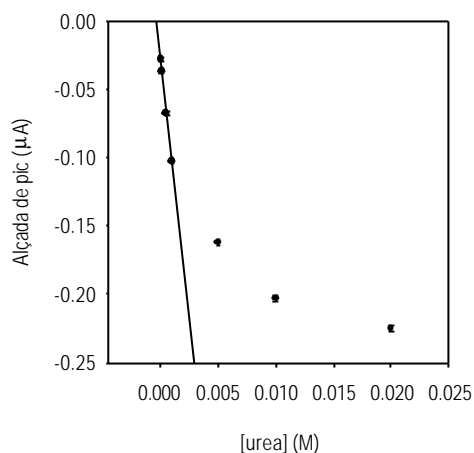


Figura 12.5: Corba de calibració obtinguda quan s'empra com a detector del sistema FIA un biosensor de configuració plana basat en una membrana de grafit-polisulfona amb MB i els enzims GIDH i ureasa. Cada punt correspon a la mitjana de 6 injeccions successives d'una mateixa concentració d'urea. Les barres d'error incloses s'han calculat com a \pm la desviació estàndard associada. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. Potencial de treball aplicat: -0.100 V. Volum d'injecció: $100 \mu\text{l}$. Cabal: $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Taula 12.5: Desviació estàndard relativa (RSD) de la intensitat de corrent mesurada per a 6 injeccions successives ($n=6$) de solucions d'urea, de diferent concentració per a cada cas, quan s'empra com a elèctrode de treball un biosensor de configuració plana modificat amb una membrana basada en un compost de grafit-polisulfona, que conté MB i els enzims GIDH i ureasa. Les condicions de treball han estat les descrites a la Figura 12.5.

[urea] (M)	MITJANA (nA)	RSD (%)
$5 \cdot 10^{-5}$	28	6
$1 \cdot 10^{-4}$	38	3
$5 \cdot 10^{-4}$	69	2
$1 \cdot 10^{-3}$	105	1.8
$5 \cdot 10^{-3}$	164	1.4
$1 \cdot 10^{-2}$	204	1.1
$2 \cdot 10^{-2}$	227	0.8

Si bé no es van observar pèrdues de sensibilitat significatives quan es treballava en sistemes discrets amb biosensors per a urea desenvolupats amb elèctrodes de configuració convencional, sí que és cert que els biosensors equivalents basats en elèctrodes de configuració plana avaluats també en sistemes

discrets, mostraven un empitjorament notable de la reproductibilitat entre corbes de calibració successives. La Figura 12.6 permet comprovar que la implementació en flux d'aquests darrers biosensors aconsegueix millorar la reproductibilitat assolida en sistemes discrets, fins i tot per sobre de la mostrada pels biosensors de configuració convencional. Els paràmetres de calibració de les corbes de calibració representades a la Figura 12.6, així com els corresponents a corbes de calibració obtingudes per a diferents biosensors pertanyents a un mateix lot, apareixen recollits a la Taula 12.6. Una vegada més destaca la disminució de la sensibilitat quan es passa de sistemes discrets a sistemes FIA amb un mateix tipus de biosensor emprat com a elèctrode de treball.

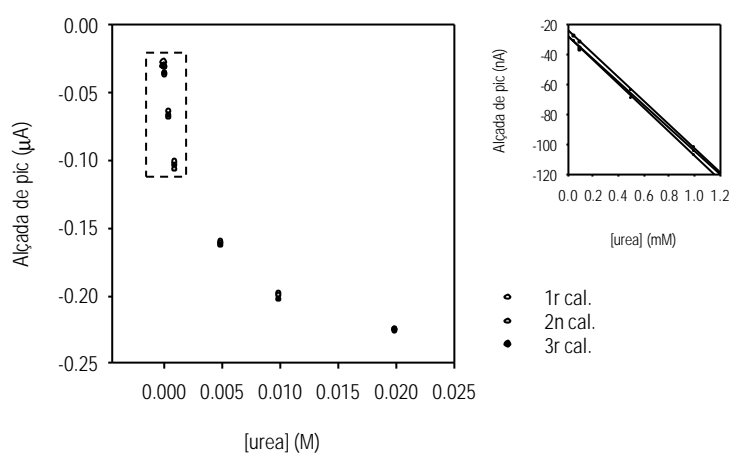


Figura 12.6: Corbes de calibració successives obtingudes mitjançant injeccions de solucions d'urea de diferent concentració en un sistema de flux. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un elèctrode de configuració plana modificat amb una membrana de grafit-polisulfona que incorpora MB i els enzims GIDH i ureasa. Solució portadora desairejada: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5, amb α -cetoglutarat $2.5 \cdot 10^{-3}$ M i NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat -0.100 V. El volum d'injecció emprat ha sigut de $100 \mu\text{l}$. Cabal: $0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Taula 12.6: Paràmetres de calibració obtinguts per a corbes de calibració successives ($n=3$) efectuades amb un mateix biosensor, i per a corbes de calibració corresponents a diferents biosensors ($N=4$) d'un mateix lot. Com a elèctrode de treball implementat al sistema FIA s'han emprat biosensors de configuració plana amb membranes basades en còmposits de grafit-polisulfona, que incorporen MB i els enzims GIDH i ureasa, dipositades sobre la superfície sensora. Les condicions de treball han estat les descrites a la Figura 12.6.

CORBES DE CALIBRACIÓ (n) / BIOSENSORS (N)	MITJANA DEL PENDENT ($\mu\text{A}/\text{M}$)	COEFICIENT DE CORRELACIÓ	REPRODUCTIBILITAT (RSD, %)
$n = 3 / N = 1$	78	0.9981 a 0.9989	1.8
$n = 1 / N = 4$	77	0.9980 a 0.9988	3

La bona reproductibilitat entre corbes de calibració obtingudes per a diferents biosensors d'un mateix lot, validen l'ús dels biosensors desenvolupats com a elèctrodes d'un sol ús, o el que encara és més interessant, com a elèctrodes d'ús diari que poden ésser intercanviats sense la necessitat de fer una calibració cada vegada que s'implementa un biosensor nou. Ara bé, per a què això sigui del tot factible, resta conèixer els resultats de l'avaluació de l'estabilitat d'emmagatzematge. S'ha comprovat que al llarg d'una setmana, els biosensors que formen part d'un mateix lot, perden fins a un 11 % de la seva sensibilitat inicial, valor que justifica la cerca d'algun tipus d'agent estabilitzant que pugui ésser incorporat a la configuració dels biosensors desenvolupats.

12.4 CONCLUSIONS

D'aquest capítol es poden treure les següents conclusions:

- 1 S'ha fet palès el bon comportament dels biosensors desenvolupats per a lactat, ió amoni i urea, quan són implementats a un sistema FIA, atesos els amplis intervals de concentració que ofereixen una resposta lineal i els valors obtinguts per als paràmetres de repetitivitat, entre injeccions successives d'una mateixa concentració d'analit, i reproductibilitat, entre corbes de calibració consecutives.
- 2 Els temps de resposta que mostren els tres tipus de biosensors emprats com a detectors del sistema FIA quan s'injecten volums de 100 μ l de solució de cadascun dels analits d'interès, no supera en cap cas els 30 segons.
- 3 Els valors de sensibilitat obtinguts per a tots els biosensors estudiats en flux, han estat inferiors als corresponents per als mateixos biosensors però integrats en sistemes discrets, fet que s'atribueix a les diferències existents entre els fenòmens de transport de masses que tenen lloc a la solució per ambdós tipus de sistemes.
- 4 La bona reproductibilitat entre corbes de calibració corresponents a biosensors que pertanyen a un mateix lot, valida l'ús d'aquests tres tipus de biosensors com a elèctrodes d'un sol ús o, fins i tot, d'ús diari amb la possibilitat d'ésser intercanviats sense la necessitat de realitzar calibracions prèvies per a cadascun d'ells. Aquesta característica és reflex de la precisió que permet assolir la tecnologia serigràfica per a la preparació de tots aquests biosensors.
- 5 Excepte per al biosensor d'ió amoni, l'estabilitat d'emmagatzematge avaluada durant un període de temps d'una setmana, ha demostrat que hi ha una pèrdua continuada de sensibilitat. Aquest fet porta a pensar en la necessitat de cercar algun tipus d'agent estabilitzant que contribueixi a mantenir l'activitat enzimàtica inicial d'aquests biosensors.

12.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ F. Mizutani, Y. Sato, Y. Hirata, S. Yabuki. *Biosensors & Bioelectronics*, **13** (1998) 809-815
- ² D. Niwa, R. Kurita, Z. Liu, T. Horiuchi, K. Torimitsu. *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 949-955
- ³ G. W. John Harwood, C. W. Pouton. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **18** (1996) 163-191
- ⁴ A. Chaubey, K. K. Pande, B. D. Malhotra. *Analytical Sciences*, **19** (2003) 1477-1480
- ⁵ M. Trojanowicz, T. Krawczynski vel Krawczyk, M. Zmorzynska, L. Campanella. *Electroanalysis*, **9** (1997) 1062-1066
- ⁶ A. Gambhir, M. Gerard, A. K. Mulchandani, B. D. Malhotra. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **96** (2001) 249-257
- ⁷ T. Ghous, A. Townshend. *Analytica Chimica Acta*, **387** (1999) 47-51
- ⁸ T. Krawczynski vel Krawczyk, M. Moszczynska, M. Trojanowicz. *Biosensors & Bioelectronics*, **15** (2000) 681-691
- ⁹ S. Alegret, A. Merkoçi. *A: Comprehensive Analytical Chemistry XXXIX*, Elsevier Science B. V. (2003) pp 402-405
- ¹⁰ M. F. Cardosi, S. W. Birch. *Analytica Chimica Acta*, **276** (1993) 69-74
- ¹¹ C. G. J. Koopal, A. A. C. M. Bos, R. J. M. Nolte. *Sensors and Actuators*, **B18** (1994) 166-170
- ¹² R. D. Schmidt, I. Rohm, P. Rüger, W. Weise, U. Billtewski. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **349** (1994) 607-611
- ¹³ N. Pasco, C. Jeffries, Q. Davies, A. J. Downard, A. D. Roddick-Lanzilotta, L. Gorton. *Biosensors & Bioelectronics*, **14** (1999) 171-178

CONCLUSIONS GENERALS

CONCLUSIONS GENERALS

A continuació s'exposen les principals conclusions obtingudes a partir dels estudis recollits en aquesta tesi, adreçats cap a l'obtenció de biosensors basats en enzims oxidoreductases:

La detecció electroquímica del parell electroactiu NADH/NAD⁺ sobre un transductor de grafit-epoxi, es basa en l'oxidació del cofactor reduït, car l'espècie oxidada posseeix un caràcter feble com a oxidant. Aquesta oxidació implica una passivació progressiva de la superfície electròdica, que esdevé palesa per una pèrdua de sensibilitat contínua. La causa de l'enverinament de la superfície del transductor és l'adsorció del NAD⁺ sobre aquesta superfície, que es veu afavorida amb l'aplicació de potencials positius elevats.

El recobriments de la superfície dels elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi amb capes denses de poliamida, permet minimitzar la passivació causada per l'adsorció del cofactor NAD⁺. No obstant això, no es redueix el sobrepotencial necessari associat a l'oxidació de NADH, fet que provoca una baixa selectivitat.

L'electropolimerització de mediadors d'oxidació-reducció sobre la superfície electròdica permet obtenir superfícies altament reproduïbles, alhora que la presència dels mediadors disminueix el potencial de treball necessari, fet que incideix en una disminució de la passivació, juntament amb una millora de la sensibilitat, especialment per als mediadors o-PDA i 3,4-DHB. No obstant això, s'ha comprovat que la incorporació més efectiva del mediador a la configuració electròdica s'ha dut a terme mitjançant la seva inclusió en membranes de polisulfona. Els sensors preparats amb MB seguint aquesta metodologia, han mostrat un comportament òptim, amb una elevada sensibilitat, un potencial de treball de -0.1 V vs SCE, una bona estabilitat d'emmagatzematge i una excel·lent estabilitat operacional, a més de preparar-se d'una forma senzilla i reproduïble. El desenvolupament posterior d'aquests sensors, però amb transductors plans, ha portat a l'obtenció d'una bona reproductibilitat entre corbes de calibració successives, temps de resposta inferiors a 30 s en tots els casos i absència de passivació de la superfície electròdica i de lixiviació del mediador. A més, el mètode de preparació seguit, ràpid i senzill, fa possible la seva producció massiva.

S'han desenvolupat sensors per a peròxid d'hidrogen amb un comportament analític òptim, basats en mesclades de xerogels preparats amb APTMS i TEOS i diferents metalls (Zn, Ce, Fe i Cu), amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol. Per a l'oxidació del peròxid d'hidrogen els sensors basats en els xerogels modificats amb Ce i Zn han estat els que han mostrat el millor comportament, mentre que per a la reducció del peròxid d'hidrogen ho ha estat el sensor preparat amb xerogel modificat amb Zn.

Els enzims Dp i HRP s'han incorporat al sistema de detecció com a bioelectrocatalitzadors de l'oxidació de NADH i de la reducció de peròxid d'hidrogen respectivament. La millor configuració per als biosensors amb enzim Dp ha estat l'obtinguda mitjançant la seva incorporació com a sòlid a una membrana de polisulfona amb MB, recoberta amb nafió o poliamida, si bé el problema de lixiviació de l'enzim no s'ha resolt totalment. En canvi, la incorporació de l'enzim HRP en un gel de sílice sense

etanol, dipositat sobre una mescla de xerogel modificat amb metall, amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol, ha portat a uns sensors per a peròxid d'hidrogen que augmenten la seva sensibilitat en un 50 %, alhora que mostren una bona estabilitat operacional.

S'han desenvolupat biosensors convencionals per a lactat, ió amoni i urea, basats en membranes de polisulfona amb MB. Malgrat el bon comportament observat per a tots ells, no s'ha aconseguit obtenir biosensors totalment compactes, atesa la dificultat relacionada amb la immobilització del cofactor a l'interior de la membrana polimèrica. Els biosensors per a lactat, amb l'enzim LDH incorporat durant la inversió de fases necessària per a la precipitació de la polisulfona, han incorporat una capa addicional de poliamida amb l'objectiu de reduir la pèrdua de l'enzim per dissolució. D'altra banda, els biosensors per a ió amoni, que també incorporen l'enzim GIDH durant el procés d'inversió de fases, han mostrat una sensibilitat elevada, una bona reproductibilitat, temps de resposta curts, inferiors a 30 s, i una bona estabilitat durant una setmana, mentre que els biosensors per a urea, que incorporen a més l'enzim ureasa sòlid a la polisulfona inicial, han mostrat una disminució progressiva de la seva activitat. La preparació posterior de tots aquests biosensors, però basats en transductors plans serigrafiats, i la seva consegüent implementació a un sistema FIA, ha permès obtenir amplis intervals de resposta lineal, una bona repetitivitat entre mesures successives, una bona reproductibilitat entre corbes de calibració consecutives per a un mateix biosensor i per a biosensors diferents d'un mateix lot i temps de resposta curts.

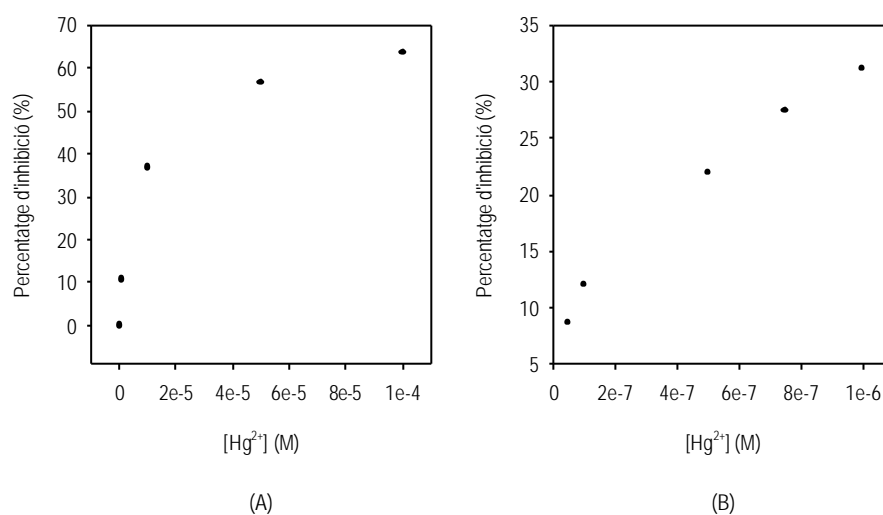
S'han desenvolupat biosensors per a glucosa basats en una configuració constituïda per una primera membrana de xerogel modificat amb metalls, que aporten les propietat catalítiques, i una segona capa de gel de sílice sense etanol amb l'enzim GOD, que han mostrat amplis intervals lineals de resposta, una excel·lent reproductibilitat per a determinacions consecutives i una bona estabilitat durant un període de temps de 2 mesos.

ANNEXOS

ANNEX A

Representació del percentatge d'inhibició, per metalls pesants, de l'activitat enzimàtica de l'enzim ureasa

A la gràfica es troba representat el percentatge d'inhibició de l'activitat enzimàtica de l'enzim ureasa en funció de la concentració d'inhibidor (Hg^{2+}), per a dos sistemes de flux, un amb detecció potenciomètrica (A), i l'altre amperomètrica (B). En aquest estudi preliminar es va emprar com a elèctrode de treball un elèctrode selectiu d'ió amoni, per al sistema potenciomètric, i un elèctrode de platí, per al sistema amperomètric. Malgrat que a la bibliografia, es referencien certes adsorcions de caràcter desconegut sobre la superfície del platí¹ quan s'usa com a elèctrode de treball en la detecció de l'oxidació de NADH a NAD^+ , no es fa palès el procés de passivació àmpliament descrit per a l'oxidació de NADH sobre un elèctrode de grafit.



¹ J. Moiroux, P. J. Elving. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **102** (1979) 93-108

ANNEX B

Espectres obtinguts de l'anàlisi per espectrometria d'energia dispersiva dels xerogels modificats amb ceri, zinc, ferro i coure