

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“Determinación de compuestos fenólicos empleando
electrodos enzimáticos serigrafiados”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA

Alan Gabriel Ayala Bautista

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Margarita Stilianova Stoytcheva

CODIRECTOR

Dr. Roumen Koytchev Zlatev

Mexicali, B. C.

JUNIO DE 2017

Agradecimientos

Quisiera expresar mis agradecimientos en este apartado a las personas que han hecho posible la conclusión de este trabajo de investigación, comenzando por Dios quien ha estado presente durante el trayecto de mi vida dándome perseverancia, confianza y seguridad para lograr los sueños que me propongo, siendo el mayor consejero de mi vida. Gracias por cuidarme siempre.

A toda mi familia que sin duda alguna me han brindado su apoyo incondicional. Gracias por todo lo que han hecho por mí.

A los dirigentes del laboratorio de biosensores analíticos, la Dra. Margarita Stilianova Stoytcheva y el Dr. Roumen Koytchev Zlatev quienes estuvieron presentes durante el trayecto del proyecto de investigación, compartiendo su experiencia, conocimiento, inversión de recursos y mediante su liderazgo permitieron una conclusión exitosa. Gracias de corazón por aceptarme como su estudiante de posgrado, permitiendo el desarrollo de mi formación como investigador.

A la Dra. Lydia Toscano Palomar quien en el desarrollo de mi formación académica permitió que fuera su colaborador, creyendo en las habilidades que habría de desarrollar, siendo pionera de mi formación como investigador. Gracias por creer en mí en momentos difíciles.

Al M.C. Ángel García Velázquez y la Dra. María Guadalupe Amado Moreno quienes en mi formación académica fomentaron valores de trabajo profesional, perseverancia ante la adversidad, apoyo incondicional y sobre todo su gran amistad. Gracias por todos sus consejos, los cuales han sido de ayuda para mi desarrollo personal y profesional.

A CONACyT por su programa de becas nacionales y al programa MYDCI de la UABC por permitir el desarrollo de profesionistas más preparados para las dificultades de un mundo moderno.

Índice

Capítulo 1. Introducción General	1
1.1 Introducción	1
1.2 Justificación	2
1.3 Hipótesis de Investigación.....	2
1.4 Objetivo de la investigación	3
1.5 Objetivos específicos	3
Capítulo 2. Revisión de literatura.....	4
2.1 Introducción	4
2.2 Reacción electroquímica	6
2.3 Interferencias presentes en la detección de dopamina	8
2.4 Interacción entre Dopamina y la enzima Tirosinasa	9
2.5 Biosensores electroquímicos	11
Diseño de un Biosensor	15
2.6 Electroodos Serigrafiados	16
Aplicaciones y ventajas de los electrodos serigrafiados	18
Nanopartículas de oro	21
Electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro.....	22
Electrodos serigrafiados de grafeno modificados con nanopartículas de oro	25
2.7 Inmovilización de la enzima	27

Adsorción.....	29
Unión covalente.....	30
Microencapsulación	31
Atrapamiento.....	32
Reticulación.....	33
2.8 Método de inmovilización	33
Hidrogeles	34
PVA – SbQ	35
PVA – AWP.....	37
2.9 Métodos Electroquímicos	38
Voltametría	38
Voltametría Cíclica	38
Amperometría	40
Capítulo 3. Materiales y Métodos.....	42
3.1 Optimización de la Inmovilización	43
Coeficiente de Difusión	44
Actividad enzimática	45
3.2 Optimización de las condiciones de la microcelda.....	46
3.3 Determinación del Área real del electrodo y la constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones	47

3.4 Determinación amperométrica de dopamina utilizando electrodos enzimáticos serigrafiados.....	50
3.5 Análisis estadístico de los resultados.....	51
Capítulo 4. Resultados y Discusión.....	53
4.1 Coeficiente de difusión y actividad enzimática	53
4.2 pH óptimo y temperatura óptima.....	60
4.3 Constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones y área real del electrodo	67
4.4 Determinación de dopamina	71
4.5 Límite de detección e intervalo dinámico lineal	76
Conclusiones	77
5.1 Recomendaciones.....	78
Referencias	79
Anexos.....	89

Capítulo 1. Introducción General

1.1 Introducción

La determinación de compuestos fenólicos llegó a generar un gran impacto en varias ramas de la ciencia, principalmente en medio ambiente y medicina, en donde existe un gran avance tecnológico y científico en las últimas décadas; aunque existen diversas alternativas para determinar este tipo de compuestos, los métodos electroquímicos ofrecen ventajas que se deben de considerar; sobre todo en el área de biosensores que, mediante su uso y aplicación, se pueden emplear para cuantificar compuestos como la dopamina, importante neurotransmisor del ser humano.

En electroquímica se utilizan electrodos para la medición de diferentes indicadores mientras este sea electroactivo, sin embargo, puede que ocurran diferentes interferencias debido al potencial de oxidación de cada compuesto que se encuentra en la microcelda. Para realizar un análisis selectivo existe la alternativa de utilizar biosensores, que según la organización IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) los define como: "Un sensor electroquímico es un dispositivo autónomo que es capaz de proveer información analítica específica cuantitativa o semi cuantitativamente usando un elemento de reconocimiento biológico (un receptor bioquímico) que permanece contenido y tiene contacto físico directo con un elemento electroquímico transductor". Al utilizar biosensores, se necesita un medio de bioreconocimiento, al que llamaremos enzima. Se utilizará tirosinasa como receptor biológico para la determinación selectiva del sustrato fenólico a utilizar, que es la dopamina.

Al involucrar enzimas en los procesos electroquímicos, la interacción directa con el transductor cambia, la especie electroactiva en realidad es un producto de la reacción

enzimática entre tirosinasa y dopamina; la reacción de oxidación produce orto – quinonas las cuales son electroactivas, detectándose en la medición electroquímica.

1.2 Justificación

La mayoría de los métodos que utilizan biosensores para la determinación de compuestos fenólicos usan tirosinasa, una enzima encargada de catalizar la oxidación de estos compuestos. Sin embargo, es una enzima inestable, y el método de análisis no se puede practicar in situ, agregando otra importante desventaja es que los sensores amperométricos para la determinación de compuestos fenólicos disminuyen su sensibilidad y precisión debido a que comienza a ensuciarse la superficie del electrodo por la polimerización de los radicales formados durante las secuencias de reacciones enzimáticas y electroquímicas.

Así, como se disminuyen progresivamente estos factores, se plantea utilizar electrodos desechables cuya superficie es modificada con nanopartículas.

1.3 Hipótesis de Investigación

La sensibilidad de la determinación de compuestos fenólicos aumentará debido a las modificaciones estructurales mediante diversos nanomateriales y las ventajas de la serigrafía en los electrodos desechables.

1.4 Objetivo de la investigación

- Desarrollar un método sensible, preciso y selectivo para la determinación de dopamina utilizando electrodos serigrafiados desechables modificados con nanopartículas.

1.5 Objetivos específicos

- Optimizar el método de inmovilización apropiado de la enzima tirosinasa sobre la superficie de los electrodos desechables.
- Optimizar las condiciones de operación de la microcelda.
- Realizar una caracterización de las propiedades de los electrodos.
- Realizar un análisis de sensibilidad para la cuantificación de dopamina para cada uno de los electrodos serigrafiados.

Capítulo 2. Revisión de literatura

2.1 Introducción

Actualmente se presenta un gran interés en biología cerebral, entre las áreas de investigación destacan los neurotransmisores debido a que son responsables de diversas neuropatías. El estudio de dopamina es de importancia debido a que posee una gran variedad de funciones, entre ellas están la influencia en el control del aprendizaje, la alimentación, la atención, el control del estrés y la neurocognición cerebral [1]. También afecta al sistema cardiovascular y renal, debido a la producción de dopamina en las glándulas suprarrenales, afectando a diferentes órganos tanto positiva como negativamente [2].

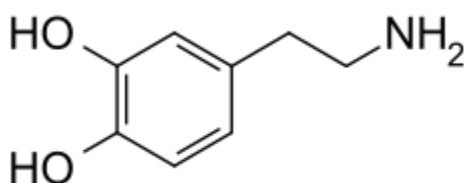


Figura 2.1.1 Estructura química de la dopamina.

La fluctuación temporal de la concentración de dopamina en el cerebro humano tiene efectos críticos que presentan algunos de los más severos trastornos neurológicos como lo son la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson [3]. En el proceso de transferencia de información mediante neuronas se usan corrientes eléctricas mientras que la dopamina actúa como una molécula facilitadora de la sinapsis neuronal enlazando al receptor con la información transportada [4]. En este intercambio de respuesta eléctrica y reacciones bioquímicas pueden existir intervinientes que abusan de la facilitación que ofrece la dopamina para el intercambio de información; muchos de estos estudios se enfocan en la

adicción que se genera al consumir drogas, provocando adicciones y tienen como caso de estudio a la dopamina [5].

La detección de dopamina tiene por importancia no solo estos casos, también influye en el rendimiento de atletas porque regula las funciones renales, cardiovasculares, (como el ritmo cardíaco y la presión sanguínea) tonificación muscular, procesamiento visual de imágenes, homeostasis del calcio, síntesis proteica y utilización óptima de la alimentación [6]. Se ha observado que las acciones periféricas que se reflejan de dopamina están relacionadas con la que se activa a nivel cerebral con actividad física en animales y humanos; un perfil diferente en las reacciones enzimáticas en el entrenamiento físico puede potenciar la síntesis de dopamina y preservar la integridad estructural de las neuronas [7].

Esas son algunas de las funciones de la dopamina en nuestro cerebro, mostrando la importancia de tener un método exacto y selectivo para cuantificarla en diferentes tipos de muestra como muestras celulares o tejidos biológicos; algunas de las técnicas que utilizan los investigadores son microdiálisis, ensayos enzimáticos, cromatografía líquida, espectrometría de masas, electroforesis capilar [8], siendo las detecciones ópticas o electroquímicas las principales técnicas que se utilizan actualmente para la cuantificación de dopamina en muestras biológicas.

Sin embargo, el método más rápido, eficaz y efectivo con respecto al costo es el uso de técnicas electroquímicas sensibles para la detección de neurotransmisores electroactivos, incluyendo la dopamina [9]. El desarrollo de sensores electroquímicos se enfoca en mejorar la sensibilidad y la selectividad de los ensayos, también con el paso del desarrollo científico se han podido miniaturizar los sensores a tal grado que se logra una mejor resolución espacial e incluso una detección de diversos analitos [10].

2.2 Reacción electroquímica

Los métodos electroquímicos han sido ampliamente usados para la detección de dopamina teniendo una gama de ventajas sobre los diversos métodos antes utilizados (cromatografía de gases, espectrometría de masas); por mencionar algunos ejemplos está la rápida respuesta a la detección de cambios de corriente con respecto a la concentración de analito en la microcelda, reactor o recipiente que contenga la solución y también el uso relativamente sencillo de operación [11], esto debido a que el equipo a utilizar es manejable, pequeño (si se utilizan microceldas incluso el análisis se puede realizar con volúmenes muy pequeños, facilitando la manera en que se utiliza la muestra de dopamina, solo un par de microlitros) y los electrodos son relativamente baratos y su manejo sencillo [12].

Aun con estas cualidades, existen ciertas desventajas de usar estos métodos para la detección electroquímica de dopamina, uno de ellos es el amplio rango de detección en el electrodo de potenciales de oxidación, de manera que puede detectar otros compuestos electroactivos e influenciar en el cambio de la corriente eléctrica y voltaje por estos interferentes [13]; mientras que el otro factor es la formación de radicales fenólicos que mientras dura la reacción electroquímica se van polimerizando en la superficie del electrodo, esto hace un tipo de pasivación al formar una película muy fina en este, si se hacen análisis consecutivos de dopamina debido a que esta produce como subproducto dopamina o-quinona, la cual se polimeriza haciendo esta capa fina [14].

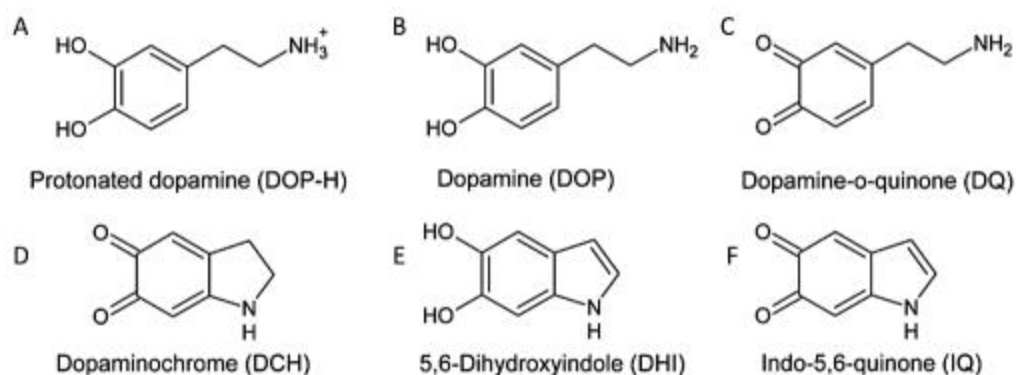


Figura 2.2.1 Diferentes productos de la oxidación de Dopamina (B) como la Dopamina – o -quinona

(C)

Existe otro problema que se necesita resolver para esta clase de determinaciones, al encontrarse con muestras que manejan sistemas biológicos, existen compuestos que interfieren al habitar junto con la dopamina; estos son el ácido ascórbico, la epinefrina y el ácido úrico; su importancia radica en el potencial de oxidación de estos compuestos, al ser muy similares los resultados de la determinación suelen ser inconclusos, no dando un valor de la respuesta voltamétrica adecuado [15].

Se observa que los métodos electroquímicos para la determinación de dopamina necesitan ser selectivos y sensibles para la determinación de diversos compuestos; sobre todo los fenólicos, que son de interés como parte del objetivo encontrar estos parámetros en un método desarrollado con biosensores cuya superficie serigrafiada y compuesta con nanopartículas de oro ayuda a aumentar la sensibilidad de la determinación [16].

2.3 Interferencias presentes en la detección de dopamina

Existen tres compuestos que pueden llegar a ser interferentes en las determinaciones de dopamina por medio de métodos electroanalíticos, estos son el ácido ascórbico, el ácido úrico y la epinefrina. Estos compuestos presentan un desafío por su similitud en los potenciales de oxidación, añadiendo que el ácido ascórbico y el ácido úrico están en concentraciones mucho más grandes que la dopamina en un sistema biológico. Generalmente, la oxidación de dopamina en la superficie del electrodo ocurre en un potencial muy cercano al de la oxidación de ácido ascórbico, produciendo un ensuciamiento en los electrodos debido a que los productos de estas reacciones se quedan adheridos en la superficie afectando su sensibilidad [17]. El ácido ascórbico y el ácido úrico son interferentes para los ensayos con sensores, pero la epinefrina presenta interferencia en los biosensores.

A pesar de esto se utilizan diversos tipos de electrodos para combatir esta desventaja en las técnicas electroanalíticas, sobre todo porque estas presentan ventajas significativas referentes al costo de los ensayos, sin embargo, la baja sensibilidad que se obtienen al utilizar electrodos convencionales hace de esto un problema que resolver. La literatura reporta el uso de diversos tipos de electrodos modificados, como los electrodos de carbono modificados añadiendo nanotubos de carbono, grafeno y sus derivados [18] e incluso el añadir diversos tipos de nanomateriales, mientras que otros estudios reportan el uso de electrodos con base polimérica y de líquido iónico [19]. Cada método presenta sus ventajas con respecto a los demás; es de interés realizar un análisis selectivo para la detección de dopamina, de manera que se estudiarán los métodos que utilicen enzimas, en específico la enzima tirosinasa por su afinidad a la dopamina; al realizar una reacción enzimática el ensayo se vuelve selectivo por la afinidad de la enzima con la dopamina, eliminando la interferencia que se presenta al utilizar un electrodo sencillo [20].

2.4 Interacción entre Dopamina y la enzima Tirosinasa

Como se ha mencionado, para poder detectar específicamente a la dopamina, un elemento de biorreconocimiento es necesario, para ser más certeros se necesita una enzima que reconozca a la dopamina como su sustrato fenólico y catalice su reacción. En este caso la literatura reporta que la enzima idónea para esta determinación es la tirosinasa, enzima cuyo centro activo contiene cobre [21].

La tirosinasa o polifenol oxidasa pertenece a la familia de las oxidasas, las cuales catalizan la oxidación de los difenoles a orto quinonas, en presencia de oxígeno molecular como otro sustrato, el producto final de esta reacción es un polímero insoluble (melanina) que puede ser removido fácilmente por centrifugación [22].

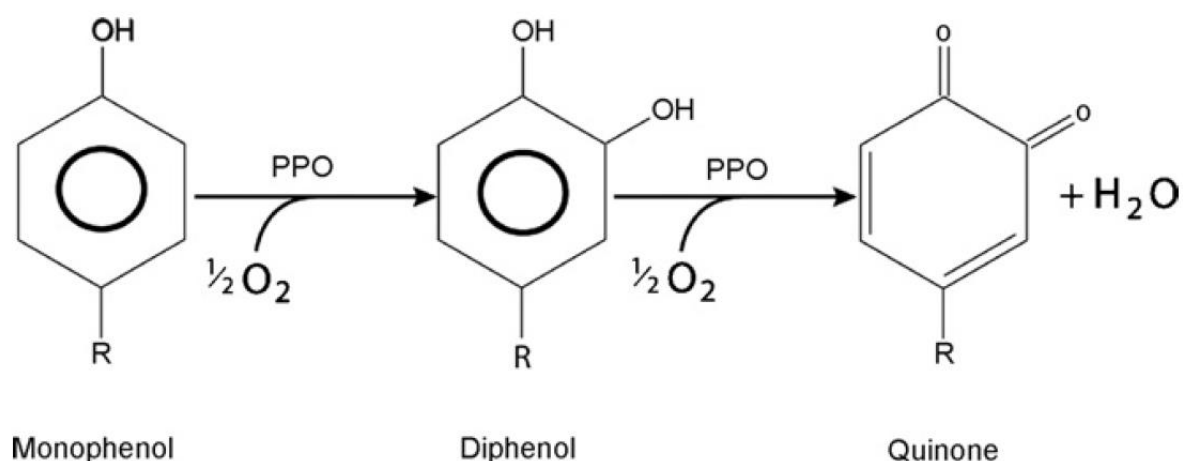


Figura 2.4.1 Mecanismo de reacción de la tirosinasa con monofenoles y difenoles.

Se ha descubierto que el oxígeno tiene que enlazarse con el centro activo de cobre antes de que el sustrato reaccione con la enzima y quede oxidado a orto quinona [23]. Un mecanismo de reacción propuesto para la catálisis enzimática de la oxidación de dopamina es como el que se describe a continuación en la figura 2.4.2

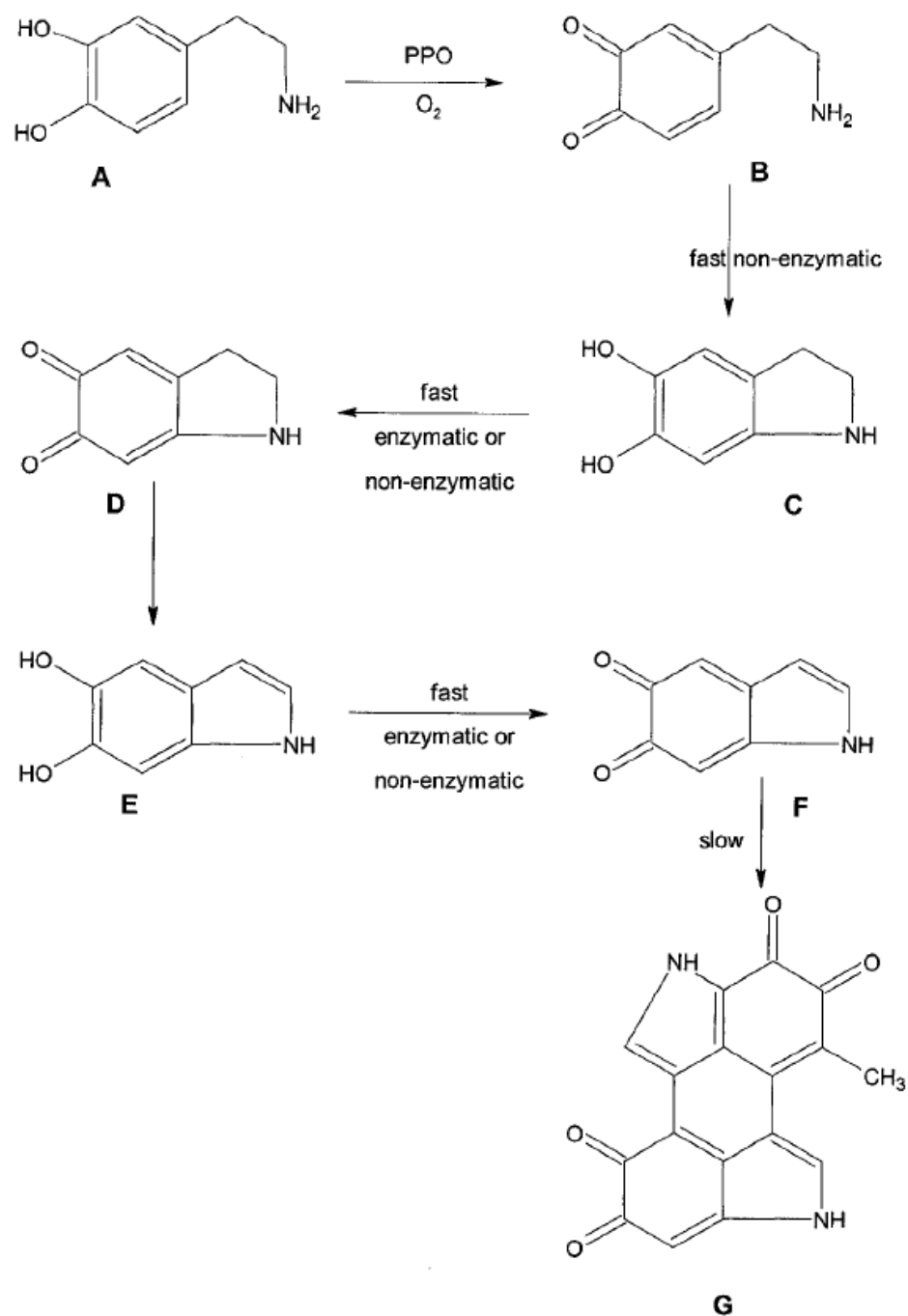


Figura 2.4.2 Pasos de la oxidación catalítica de dopamina mediante tirosinasa, siendo A) Dopamina, B) Dopamina -quinona, C) leucodopaminachroma, D) aminochromas, E) 5,6 – dihidroxindola, F) índola – 5,6-quinona y G) melanina.

Se puede apreciar que una manera indirecta para la determinación de dopamina es por medio del oxígeno consumido o monitoreando la concentración de dopamina - quinona, sin embargo, este compuesto sobrelleva una auto oxidación que no es catalizada por la enzima que lleva al compuesto leucodopaminachroma, por lo que no es un compuesto estable [24] [25]. Una solución, por ejemplo, sería la reducción de dopamina – quinona, para regresarla a dopamina en una reacción donde solo se transfieran dos electrones y usar la dopamina como el sustrato de la enzima en las reacciones subsecuentes, para así mejorar el rendimiento de la señal de detección. La detección de melanina puede ser útil para la cuantificación de dopamina debido a que también es una molécula electroactiva; la desventaja sería el ensuciamiento de la superficie del electrodo (igual que utilizar dopamina, solo que la polimerización de melanina sería con mayor velocidad) y el bajo rendimiento en la actividad enzimática [26].

2.5 Biosensores electroquímicos

Un biosensor electroquímico se puede definir de diversas formas, existen dos clases de sensores, entre ellos los sensores químicos y los biosensores, según la organización IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define a los biosensores de la siguiente manera: “Un sensor electroquímico es un dispositivo autónomo que es capaz de proveer información analítica específica cuantitativa o semi cuantitativamente usando un elemento de reconocimiento biológico (un receptor bioquímico) que permanece contenido y tiene contacto físico directo con un elemento electroquímico transductor” [9]; otra definición utilizada es: “Son dispositivos que transforman información bioquímica como lo es la concentración de analitos en una señal analíticamente útil como voltaje o corriente” [27]. Usualmente contienen dos componentes básicos: un elemento de reconocimiento biológico (receptor) y un transductor físico. El propósito del elemento de reconocimiento biológico es para detectar al analito de interés selectivamente en una muestra, mientras

que el transductor físico convierte el evento del reconocimiento biológico a una señal eléctrica que puede ser detectada y relacionada con la concentración del analito.

El biocomponente limita la vida útil del biosensor, también su estabilidad y calibración, a diferencia del transductor físico. Los receptores más comúnmente utilizados en los biosensores electroquímicos son enzimas. Debido a que sus centros activos están relativamente escondidos en la molécula, la transferencia directa de electrones entre el sitio activo y la superficie del transductor (electrodo) no es posible; por lo que se utilizan mediadores de electrones orgánicos para ese propósito [28]. Un ejemplo de este funcionamiento es la enzima oxidorreductasa que consiste en que reconoce el sustrato con el cual tiene afinidad, después el sitio activo de la enzima oxida al sustrato (también puede reducirlo, dependiendo del sustrato y la reacción). La forma oxidada del mediador regenera (oxida) al sitio activo de la enzima, mientras que la superficie del electrodo (transductor) regenera (oxida) al mediador de electrones orgánico. Al final la corriente que se utiliza para la oxidación del mediador es medida, y relacionada con la cantidad de sustrato en la solución de la microcelda.

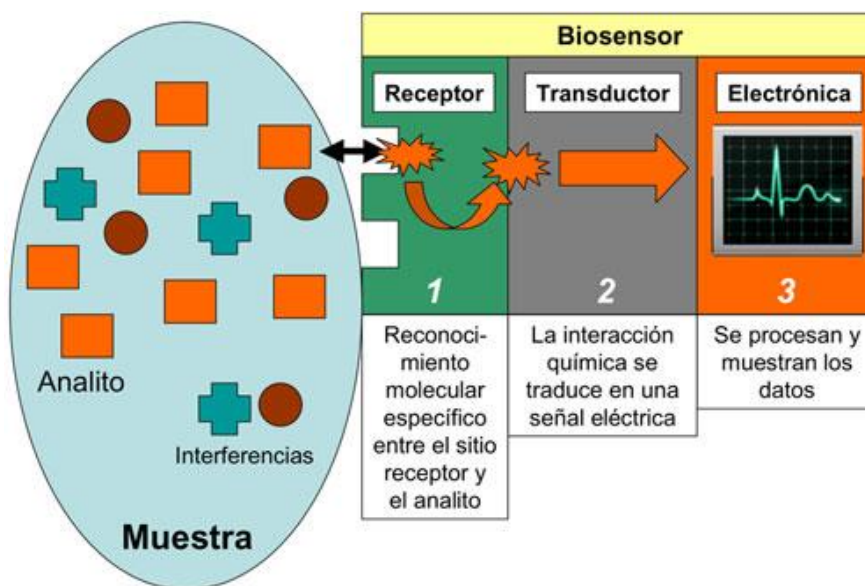


Figura 2.5.1 Esquema simple del funcionamiento de un biosensor

En contraste con los biosensores, muchos sensores químicos contienen especies no biológicas como elementos activos para su determinación, mostrando una mayor sensibilidad y selectividad para la detección de diversos analitos [29]. Los sensores electroquímicos utilizan electrodos modificados para determinar diversos elementos. Estos electrodos pueden formarse a base de diversos materiales orgánicos e inorgánicos caracterizados por una conductividad eléctrica óptima o de buen rendimiento y asimismo ayuda si el material cuenta con propiedades catalíticas para cierto tipo de determinaciones [30].

En investigaciones recientes, se ha hecho mucho esfuerzo para mejorar el rendimiento de los sensores electroquímicos sobre todo en sus propiedades catalíticas, en su sensibilidad y selectividad, utilizando materiales a nanoescala como son las nanopartículas, los nanotubos y los nanocables [31], o utilizando materiales de membrana (hidrogeles, membranas lipídicas) para la inmovilización de la enzima [32]. Muchos de los biosensores electroquímicos que se han probado para la determinación de dopamina en sueros biológicos utilizan tirosinasa, la enzima también conocida como polifenol oxidasa, caracterizada porque proviene del plátano y su sustrato característico son los polifenoles encontrados en diversos frutos [33].

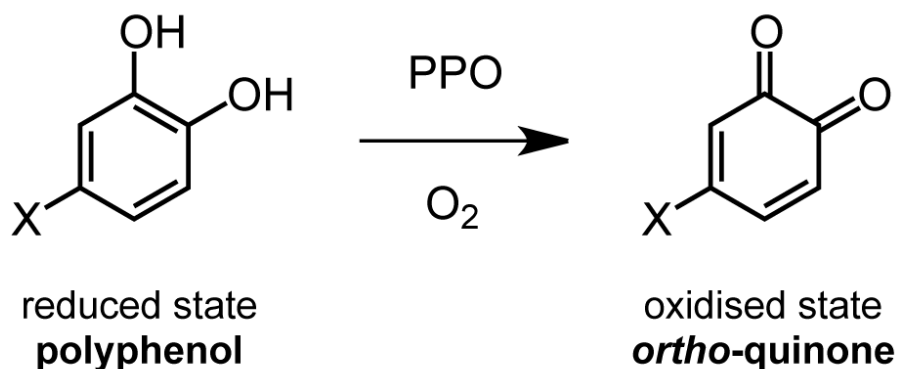


Figura 2.5.2 Reacción catalizada por medio de la enzima Polifenol Oxidasa (Tirosinasa) usando un sustrato polifenólico a orto – quinona.

La tirosinasa es una enzima multifuncional con una variedad muy amplia de sustratos fenólicos y polifenólicos, conteniendo un grupo de cobre oxidorreductasa que realizan mutuamente dos tipos de funciones catalíticas utilizando oxígeno (realizan reacciones de oxidación) [34]

- 1) Realizan una hidroxilación por medio de la cresolasa, usando como sustrato los orto-difenoles o los monofenoles.
- 2) La oxidación de difenoles a orto quinonas por medio de la enzima catecolasa

Las orto-quinonas resultantes pueden reaccionar consecutivamente en el electrodo mediante reacciones electroquímicas de reducción, de esta manera no necesitan un mediador (un paso atrás se usó la enzima tirosinasa para la producción de orto-quinonas). Esta reacción constituye el principal método de detección a potenciales negativos en los ensayos amperométricos para la determinación de compuestos fenólicos.

La dopamina, que es un compuesto fenólico similar a la familia de los catecoles puede ser detectado por medio de amperometría con un electrodo modificado con enzima inmovilizada en su superficie, en este caso la tirosinasa.

La aplicación de la tirosinasa como enzima para la determinación de dopamina incluso puede favorecer la problemática que ocurre con los interferentes químicos en los sistemas biológicos, como lo son el ácido ascórbico, el ácido úrico y algunos otros neurotransmisores.

Diseño de un Biosensor

Se necesitan resolver algunos problemas al momento de diseñar un biosensor para la detección de dopamina:

- Dependencia del oxígeno: la enzima tirosinasa utiliza oxígeno molecular para regenerarse a su forma activa. Controlar los niveles de oxígeno en diversas muestras contenidas en una celda electroquímica puede ser difícil, y esto ocasionar limitaciones a la eficiencia del biosensor.
- Inmovilización de la enzima y eliminación de moléculas interferentes: Es necesario realizar una inmovilización enzimática estable y mantener su actividad enzimática al máximo, de esta manera el método que se elija debe de cumplir con parámetros óptimos al suspender la enzima en la superficie del electrodo. Se debe realizar un análisis para tener en cuenta como se suspenderá, sea por absorción o por adsorción, dependiendo de las características en los ensayos electroquímicos como lo es la difusión. Esta variable depende de la inmovilización, si se usan polímeros, suspensiones o incluso absorciones habrá obstaculización para el transporte de materia, hablando específicamente de la reacción enzimática entre dopamina y tirosinasa, la enzima tardaría más en salir de su lugar de origen, por lo que se vería afectada la cinética enzimática de la reacción, lo que se busca en un método sería entonces maximizar la difusividad de la enzima a la solución de la microcelda. Se analizarán los diversos métodos de inmovilización y se optara por el que más se apegue a las necesidades de la investigación.

2.6 Electroodos Serigrafiados

Un electrodo es un conductor eléctrico usado para hacer contacto con una pieza no metálica de un circuito (en el área electroquímica es una solución electrolítica). En una celda electroquímica como se ha mencionado anteriormente el único componente no solo es un electrodo, adicionalmente se encuentra el transductor y el receptor, en el caso de los electrodos convencionales de oro, platino o carbono como transductores de sensores o biosensores viene siendo una práctica común en algunos ensayos a nivel investigativo, sin embargo no es muy viable utilizarlos a nivel médico debido a que si se usa para algún suero biológico (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo) invalida al sensor para posteriores determinaciones por su ensuciamiento, lo que llevaría a la necesidad de emplear electrodos de este tipo de material de un solo uso teniendo un impacto económico negativo [35].

Si se utiliza entonces electrodos que incluyen los 3 componentes en un solo instrumento, mediante la impresión de circuitos por medio de la serigrafía el objeto cambia e incluso se reduce el impacto económico aun siendo de un solo uso. Existen diversas ventajas que se discutirán que se discutirán a continuación:

- 1) Su versatilidad en el diseño: Debido a la técnica de serigrafía, cualquier geometría se puede aplicar al electrodo y de esta manera afectar al diseño de la celda, electrolítica, modificando los volúmenes de solución e incluso la posición de este; por ejemplo, una gota de solución sería suficiente para tener la celda (dependiendo del tamaño del electrodo).
- 2) El proceso de producción: De manera que se pueden fabricar muchos a gran escala ya una vez realizado el diseño de este, en donde todos los componentes como las tintas de serigrafiado, la producción de las tarjetas y el circuito impreso quede completado, se escala reproduciendo geometrías con precisión y abaratando costos.

- 3) La variedad de material utilizado para la serigrafía como las tintas permite una flexibilidad al momento de combinar diversos materiales electródicos en la microcelda. De manera que es posible utilizar electrodos con oro, platino, carbono, plata en la misma celda de acuerdo a las necesidades del transductor del biosensor.
- 4) El proceso de producción da versatilidad para utilizar diversos materiales en función de las necesidades concretas, por ejemplo, la tarjeta soporte puede utilizar materiales poliméricos, plásticos y hasta cerámicos o metálicos.

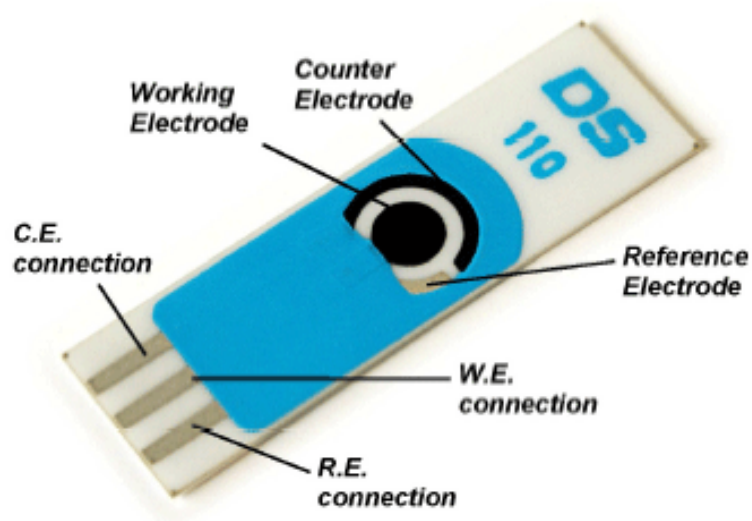


Figura 2.6.1 Diseño de un electrodo serigrafiado que contiene los 3 electrodos (Electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia)

Considerando el aspecto de la microcelda electroquímica, una de las ventajas principales reside en el poco volumen para fabricar la celda; por ejemplo, entre sus aplicaciones más industrializadas están los biosensores para la medición de glucosa, de manera que al dejar una gota de sangre en el electrodo este puede hacer la medición de la glucosa [36].

Esta ventaja nos lleva a la utilización de electrodos serigrafiados para análisis amperométricos con enzimas inmovilizadas, considerando que el sistema de trabajo requiere volúmenes muy bajos de hasta microlitros o gotas. Dependiendo del tipo de ensayo es el requerimiento de la solución electrolítica, en algunas ocasiones se necesitan concentraciones altas (mililitros) del sustrato que el biosensor reconocerá; sin embargo, en otros ensayos solo se utiliza un mayor volumen para tener visibilidad del campo de trabajo. De acuerdo a lo anterior, el volumen que se ha de utilizar para un ensayo electroquímico es tan flexible que incluso se puede usar solo el volumen mínimo para cubrir la parte activa del electrodo.

Aplicaciones y ventajas de los electrodos serigrafiados

La investigación analítica se enfoca a la creación de nuevas metodologías que puedan abarcar diversos aspectos, no solo enfocarse en la línea implícita, si no ser una técnica trascendente, por ejemplo, el caso de los contaminantes ambientales, es necesario el desarrollo de métodos que puedan realizar mediciones en tiempo real, previniendo entonces la entrada de materiales tóxicos al ambiente [37]. El progreso en el campo de la electroquímica analítica nos lleva a la utilización de equipos más compactos y portátiles; esta estrategia hace que los volúmenes de muestra sean considerablemente reducidos para realizar análisis con mayor eficiencia.

Una de las ventajas de utilizar este tipo de equipamiento es la reducción considerable del tamaño del material, haciendo los protocolos analíticos un tanto sencillos. Así también cumple la necesidad de realizar análisis in situ, removiendo la metodología antigua de utilizar potenciostatos grandes, electrodos de trabajo y celdas electroquímicas.

La serigrafía ofrece una manera atractiva de diseñar sensores electroquímicos, las tintas utilizadas para el proceso consisten en partículas, aglutinantes poliméricos entre otros aditivos que mejoran el proceso de dispersión, impresión y adhesión. La formulación exacta

de la composición de la tinta esta patentada por las diversas compañías que se encargan de producir estos materiales, sin embargo, la variación de su composición como el tipo o la carga de partículas influye grandemente en el proceso de transferencia de electrones y cambian el rendimiento del electrodo serigrafiado diseñado [38].

Los electrodos serigrafiados han sido utilizados como una herramienta para diseñar sensores electroquímicos desechables y portátiles para el monitoreo del medio ambiente, como lo son los ensayos de calidad de agua, detección de compuestos orgánicos incluso hasta la detección de metales pesados y contaminantes gaseosos.

En los ensayos de calidad de agua, es de vital importancia monitorear la fuente del agua e incluso los sistemas acuáticos que pueden ser contaminados por desechos industriales, por desagües municipales del alcantarillado, los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y el uso de agua en la zona rural.

La serigrafía permite que biomoléculas sean inmovilizadas en la superficie del electrodo, para así fabricar un biosensor selectivo con la capacidad de ser desechable. Muchos biosensores electroquímicos desechables han sido aplicados para monitorear la interacción entre biomoléculas y el elemento de biorreconocimiento como anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas, etc.

La aplicación más conocida de la serigrafía para análisis clínicos en el área biomédica es la medición de los niveles de glucosa en la sangre para los pacientes con diabetes. Las estrategias de muchos biosensores han sido a partir de esta aplicación; muchos de estos utilizan la enzima glucosa oxidasa. Esta enzima tiene una especificidad e incluso estabilidad muy elevada, agregando la disponibilidad es una de las enzimas más utilizadas para el desarrollo de biosensores electroquímicos basados en la serigrafía [39].

Enfocándonos en el sensor serigrafiado, al tener todos los componentes necesarios, un electrodo serigrafiado tiene un buen sistema de transducción y es útil para la construcción de todo tipo de sensores electroquímicos. Sin embargo, es necesaria la investigación para desarrollar nuevos transductores que mejoren las características del sensor, como su sensibilidad y adaptabilidad.

El cambiar el tipo de tecnología del transductor permite conferir propiedades inherentes a estos modificando su superficie serigrafiada con nanopartículas de diversas naturalezas y fuentes; así se amplía su campo de aplicación sin elevar mucho el precio del producto. En este apartado se hará referencia a los 3 tipos de nanoestructuraciones que se han de utilizar para los ensayos amperométricos:

- 1) Electrodo serigrafiado de carbono. (C)
- 2) Electrodo serigrafiado de carbono modificados con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro. (CNT)
- 3) Electrodo serigrafiado de carbono modificados con grafeno y nanopartículas de oro. (GPH)

El electrodo serigrafiado de carbono es el más sencillo, se muestra en la figura 2.6.2. Contiene una pequeña lámina de carbono dentro del polímero que funciona como estructura; es versátil y cuenta con todas las funciones de usar los 3 electrodos añadiendo las ventajas de la serigrafía.

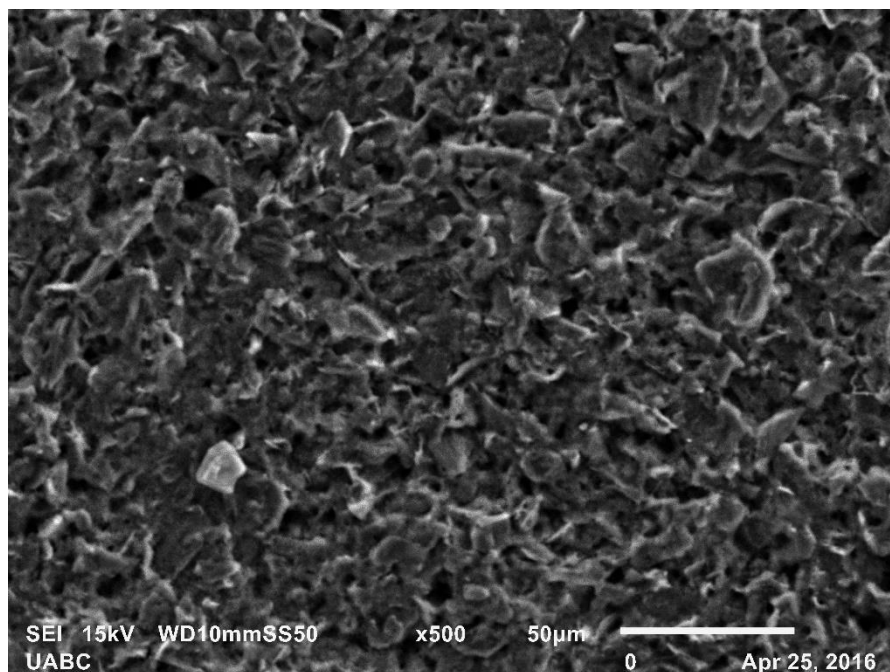


Figura 2.6.2. Imagen tomada a un electrodo serigrafiado de carbono desde un SEM (scanning electron microscope)

Nanopartículas de oro

En el ámbito de la electroquímica, las nanopartículas de oro han tenido un atractivo único debido a su oportunidad en el aspecto biológico por la biocompatibilidad de las proteínas y el oro, además de sus aplicaciones electroanalíticas como la conductividad eléctrica aumentan la relación superficie/volumen que presentan al agregarlas a un electrodo serigrafiado. Una ventaja importante es la manera de obtener suspensiones coloidales estables de partículas de oro de tamaño medio con muy poca desviación ha abierto en la actualidad un nuevo uso para de estos tipos de ensayos electroquímicos [40].

Existen diversos métodos para recubrir en la superficie del electrodo con nanopartículas de oro, uno de ellos es, como se comentó anteriormente, obtener el coloide de nanopartículas de oro cuyo tamaño es favorable para las condiciones de los ensayos y se deja evaporar

el volumen deseado en la superficie del electrodo serigrafiado de trabajo. Así se producen transductores electroquímicos nanoestructurados con oro de bajo costo [16].

Otra manera de generar in situ sobre la propia superficie del electrodo serigrafiado nanopartículas de oro de forma más sencilla y barata es usando técnicas de electrodeposición para dar lugar a estos transductores nanoestructurados de oro.

Electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro.

Los nanotubos de carbono se pueden considerar un alótropo unidimensional del carbono que se describe como una cinta o listón de grafeno tomando forma cilíndrica. Se pueden categorizar aun dependiendo del número de capas de grafeno que forman el tubo cilíndrico. Las SWCNT (por sus siglas en ingles single walled carbon nanotubes) que solo tienen una capa de grafeno con configuración sp^2 ; mientras que las MWCNT (multi walled carbon nanotubes) consisten en dos o más capas de hojas de grafeno formando cilindros concéntricos. Dependiendo del método de síntesis para los SWCNT y los MWCNT tienen diámetros que varían entre 0.43 – 2.0 nanómetros y hasta más de 10 nanómetros respectivamente, con longitudes que van desde cientos de nanómetros hasta cientos de micras [41].

Mientras los MWCNT tienen propiedades conductoras metálicas, los SWCNT pueden ser semiconductores o tener propiedades conductoras, también se les considera que tienen alta elasticidad, dureza, conductividad térmica y estabilidad; todo depende de la quiralidad, el diámetro y la nanoestructuración que presentan. En los SWCNT las bandas energéticas varían inversamente con el diámetro [42].

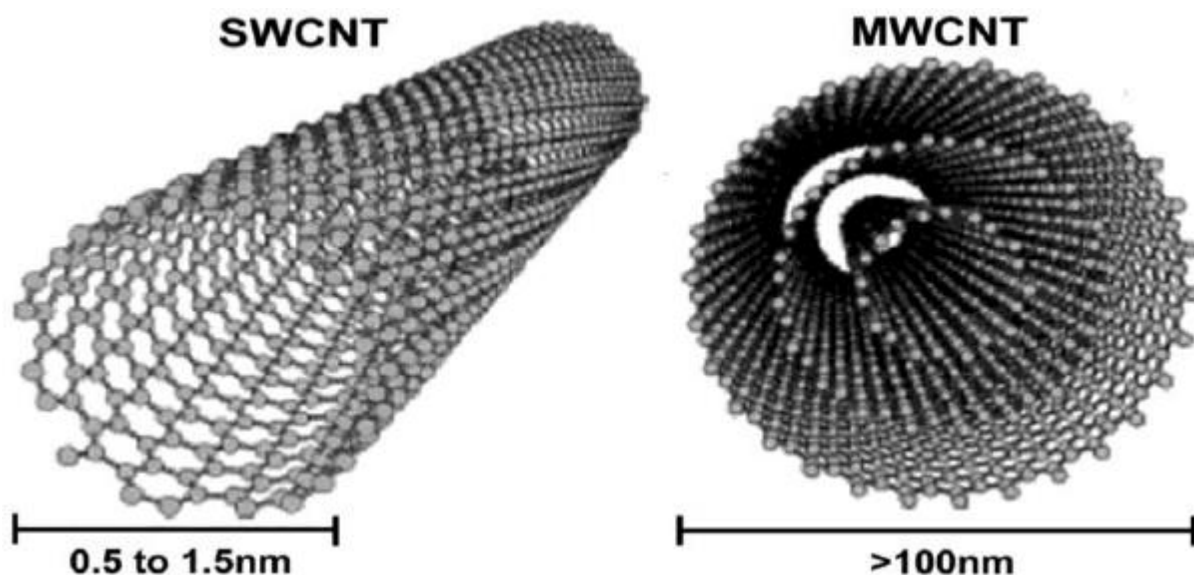


Figura 2.6.3 Nanotubos de carbono y dimensiones de los mismos. A la izquierda SWCNT y a la derecha MWCNT

Un factor relevante a la hora de escoger este tipo de añadimiento al electrodo es la insolubilidad de los nanotubos de carbono en disolventes tanto polares como no polares; este material tiene carácter hidrófobo en la superficie de los cilindros concéntricos por lo que sí a la hora de los ensayos electroanalíticos se requiere obtener dispersiones estables se necesita modificar su superficie añadiendo surfactantes o películas biopoliméricas o bien funcionalizando su estructura.

Los sensores electroquímicos a base de CNT (carbon nanotubes) han tomado cierto interés en la última década, especialmente los biosensores se benefician de estas estructuras de carbono debido a que abren la posibilidad de la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo. Además, los CNT poseen propiedades favorables para la construcción y diseño de biosensores electroquímicos, como las propiedades eléctricas, electroquímicas y el aumento de área específica de trabajo o área real [43].

Uno de los factores más importantes que influyen en el rendimiento del biosensor es el arreglo espacial entre el electrodo con CNT y la enzima; debido a que la eficiencia de transferencia de electrones disminuye dramáticamente cuando aumenta la distancia del centro activo de la enzima y la superficie del electrodo. Es muy importante en este tipo de electrodo controlar la orientación o posición de la enzima en la superficie del electrodo; de esto surgen diferentes estrategias para preparar electrodos a base de CNT a lo que se les llama inmovilización de enzima en la superficie del electrodo por adsorción [32].

Una manera para nanoestructurar un electrodo serigrafiado (si no contiene nanotubos de carbono) que no aumenta mucho el precio del electrodo sería como se describe:

- Preparar una suspensión estable de nanotubos de carbono carboxilados (MWCNT-COOH) que se agrega a una mezcla de dimetilformamida con agua en relación 1:1.
- Recubrir con una gota de la suspensión la superficie del electrodo de trabajo, secándola a temperatura ambiente.

Es una alternativa a comprar con un proveedor el electrodo serigrafiado modificado, si en dado caso el personal ya cuenta con un electrodo sólo necesitaría agregar los nanotubos de carbono, haciendo este un proceso sencillo y de gran reproducibilidad [35].

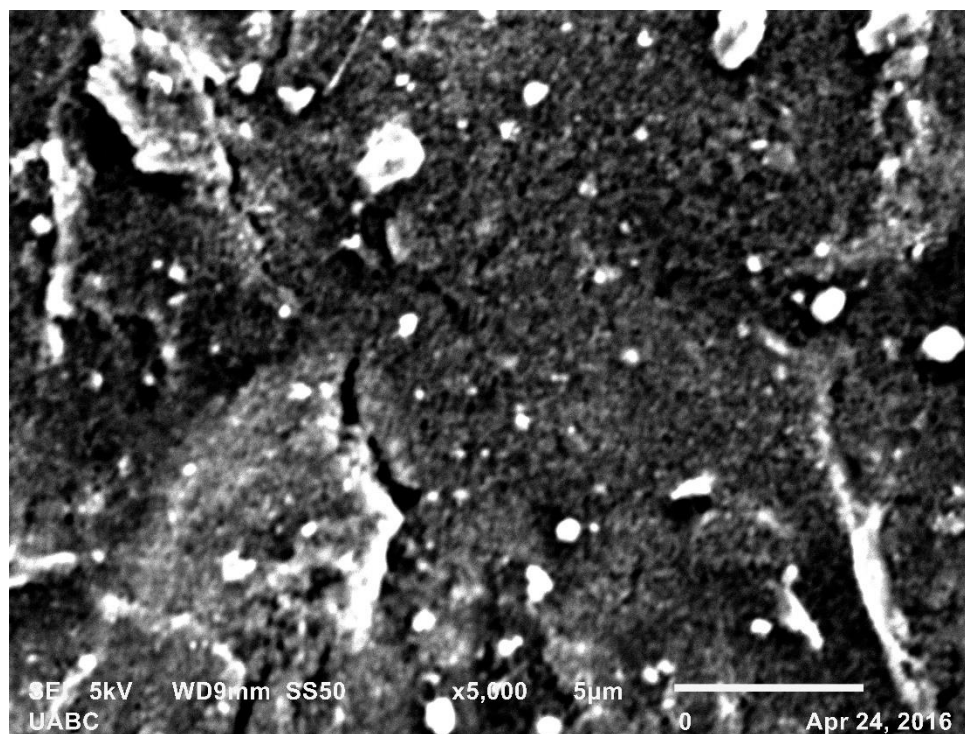


Figura 2.6.4 Imagen tomada a un electrodo de nanotubos de carbono con nanopartículas de oro desde un SEM (scanning electron microscope)

Electrodos serigrafiados de grafeno modificados con nanopartículas de oro

El grafeno se obtiene a partir de grafito pirolítico, siendo películas en 2D en donde los átomos de carbono están unidos mediante enlaces covalentes en una red de átomos sp^2 otorgándole propiedades físicas diferentes. Posee características únicas y propiedades excelentes que son necesarias en los ensayos electroquímicos, por nombrar algunos ejemplos: la elevada área superficial, alta conductividad térmica, gran movilidad de cargas y fuerza mecánica de resistencia [44].

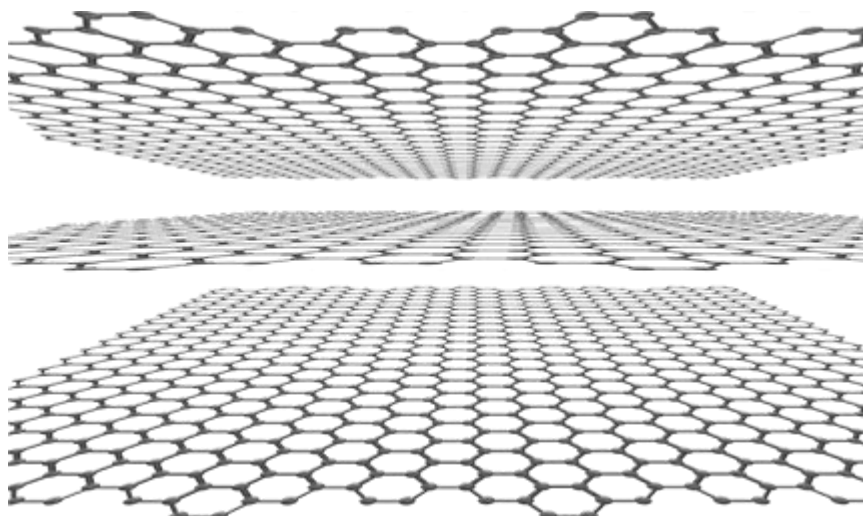


Figura 2.6.5 Estructura espacial del grafeno

El grafeno se ha utilizado para la detección de dopamina a bajas concentraciones en métodos electroanalíticos, ofrece un incremento de la sensibilidad y disminuye las concentraciones altas de interferencias debido a moléculas como el ácido ascórbico y ácido úrico. Por todas estas características este material es prometedor para la construcción e implementación en sensores electroquímicos y biosensores [45].

Existe una desventaja al utilizar este tipo de material y es la aglomeración de las capas de grafeno por sus interacciones de enlaces pi, alterando la superficie de contacto. Es importante contrarrestar este efecto para mejorar la eficiencia en los ensayos electroquímicos; estudios sugieren que utilizar nanomateriales modifica la superficie, disminuyendo la aglomeración de estas capas de grafeno y facilitando la exposición del sitio activo de estas aumentando la actividad catalítica en los ensayos para los biosensores electroquímicos [46].

El utilizar nanopartículas de oro en electrodos serigrafiados de grafeno muestra que en los ensayos electroquímicos se tiene un límite de detección inferior a otros electrodos, una gran especificidad y cortos tiempos de respuesta en los métodos electroanalíticos [47].

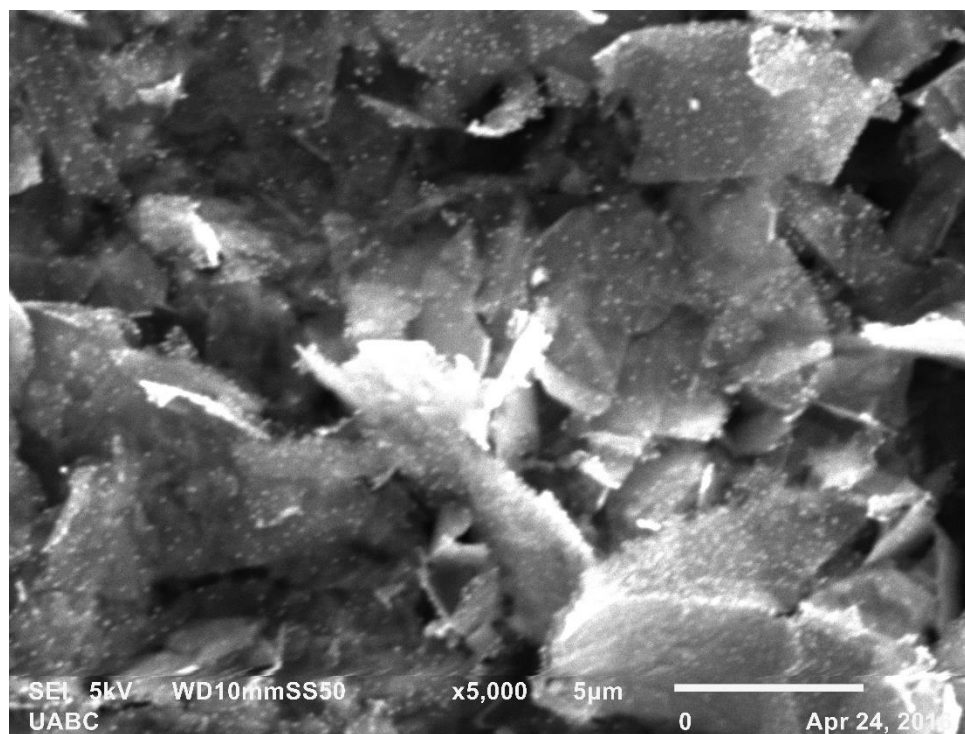


Figura 2.6.6 Imagen tomada a un electrodo de grafeno con nanopartículas de oro desde un SEM (scanning electron microscope)

2.7 Inmovilización de la enzima

La inmovilización atrapa al bioreceptor a un material inerte, en este caso el biosensor, haciéndolos insolubles, mejorando sus capacidades de estabilidad y actividad. La flexibilidad y porosidad de la capa del bioreceptor inmovilizado debe permitir una difusión libre entre los sustratos y productos que a traviese la capa. Los biosensores a base de enzimas ofrecen algunas ventajas sobre los métodos químicos, como lo son su especificidad, su selectividad y la habilidad de operar por condiciones debajo de las mínimas requeridas en estos métodos [48].

Las técnicas de adsorción son relativamente sencillas de realizar, sin embargo, la adhesión de la enzima con la superficie del transductor frecuentemente es débil. Los métodos que

utilizan a usar enlazamiento covalente suelen ser más tediosos sin contar que los compuestos involucrados usualmente inactivan o reducen la actividad enzimática [49].

El atrapamiento en geles permite la retención de agua en la capa donde permanece el bioreceptor y promueve la estabilidad a largo plazo de la enzima, sin embargo, las películas resultantes son susceptibles a rompimientos [50]. De los diversos métodos para inmovilizar la enzima se busca uno que mejore la actividad y estabilidad enzimática sin comprometer la transferencia de masa de los analitos a través de la capa del bioreceptor. Adicionalmente el proceso debe ser práctico y barato para permitir una producción favorable de biosensores a base de enzimas para análisis in situ.

La eficiencia de un proceso de inmovilización se puede medir con los siguientes criterios:

- 1) Un porcentaje alto de la enzima que inicialmente se inmovilizo debe permanecer después del proceso.
- 2) Las enzimas deben de ser mecánicamente estables y detenidas físicamente para evitar que se difundan de nuevo en el sustrato en un momento posterior.
- 3) Las enzimas deben tener biocompatibilidad con el medio de inmovilización.
- 4) Los fenómenos de transferencia de masa de los analitos a través de la película de inmovilización no deben ser limitados.

Debido a que las enzimas son catalizadores biológicos que promueven la velocidad de reacción y no se consumen en las reacciones que participan, puede que sean usadas repetidas veces mientras ellas permanezcan activas. En la mayoría de los procesos industriales, ensayos analíticos y procesos clínicos, las enzimas son mezcladas en una solución con sustratos y no pueden ser recuperadas después de que se termina su sustrato. Esto es una desventaja si se considera el costo de las enzimas en el proceso [51].

La mayoría de los métodos de inmovilización pueden clasificarse en cinco categorías: Adsorción, microencapsulación, atrapamiento en matriz, reticulación y unión covalente.

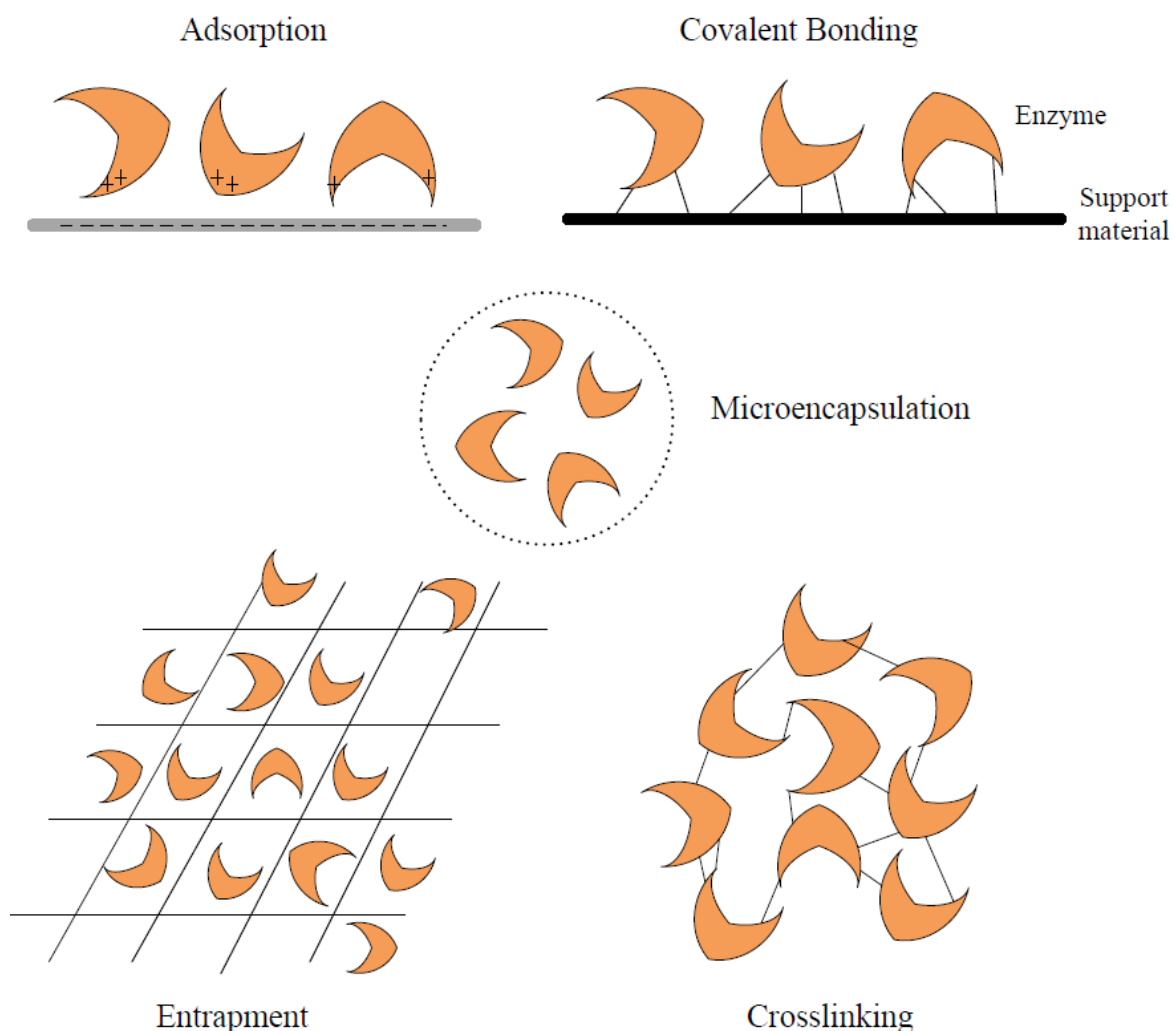


Figura 2.7.1 Tipos de métodos para inmovilización

Adsorción

La inmovilización por adsorción es el método más simple e involucra interacciones reversibles entre la enzima y el material de soporte. Las fuerzas involucradas son mayormente electroestáticas, como las fuerzas intermoleculares de Van der Waals, iónicas e interacciones de puentes de hidrógeno, siendo débiles todas ellas, pero lo suficientemente grandes en número como para crear una unión razonable. La superficie

existente entre la enzima y el soporte se utiliza para que no se requiera una activación química que modifique la estructura de la enzima [52].

El proceso consiste en mezclar los juntamente los componentes biológicos y la matriz de adsorción por un periodo de incubación, seguido de lavar extensivamente para remover cualquier componente biológico que no se unió. Este proceso ofrece diversas ventajas como el poco o nulo daño a la enzima, que es simple, económico y rápido, no se presentan cambios químicos para fijar la enzima al electrodo y tiene un grado de reversibilidad, de tal manera que permite una regeneración de la enzima [53].

Una desventaja de este método de inmovilización es la fuga de la enzima a través de la matriz, al ser la unión poco específica, se presenta una sobrecarga e incluso el efecto estérico. Los enlaces poco específicos ocurren si el sustrato, producto o contaminante residual obtienen una carga eléctrica e interactúan con la matriz. Esto puede llevar a limitaciones en los fenómenos de transferencia de masa como la difusión y a ciertos problemas en la cinética de la reacción. Sobrecargar la matriz conlleva una baja actividad catalítica por parte de la enzima, pero también la ausencia de un espacio adecuado entre la molécula de la enzima y la matriz, esto puede producir problemas relacionados con el efecto estérico [54].

Unión covalente

Este tipo de inmovilización involucra un cuidadoso diseño en los enlaces que existen entre el grupo funcional de la enzima o biomaterial y la matriz de soporte. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas [55]. Esta unión normalmente se forma entre los grupos funcionales presentes en la superficie de la matriz y los grupos funcionales que pertenecen a los aminoácidos residuales que están presentes en la superficie de la enzima [56].

Uno de los agentes más comunes para este tipo de inmovilización son las llamadas perlas amoni-epóxidas comerciales (amino-epoxy-Sepabeads®). Este compuesto tiene una película de etilendiamina que se encarga de realizar la unión covalente con la matriz de soporte [57].

Algunas de las propiedades que se adquieren por medio de la inmovilización usando este reactivo son las siguientes:

- 1) La inmovilización tiene una fuerza iónica baja
- 2) La inmovilización suele ser más rápida que utilizando la matriz de epóxidos convencionales.
- 3) La estabilidad de la enzima inmovilizada suele ser más elevada que utilizando los métodos tradicionales de epóxidos hidrofóbicos.

Microencapsulación

En la microencapsulación, la enzima se coloca detrás de la membrana quedando una estrecha cercanía entre este y el transductor. Esta interacción no afecta a la enzima, asegurando la confiabilidad, evitando la contaminación y la biodegradación. Este método se basa en el confinamiento del agente de bioconocimiento o enzima en una membrana que se coloca sobre la superficie del electrodo [58]. Esta retiene a la enzima en una posición fija presentando una porosidad controlada para permitir una difusión libre entre el sustrato y los productos de la reacción (una membrana semipermeable). Se han utilizado numerosas membranas, como el nylon, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, resinas epóxicas, colágeno, polisulfonatos, poliacrilatos, policarbonatos, entre otros polímeros [59].

Algunas de las desventajas de este método de inmovilización se asocian con los fenómenos difusivos de transferencia de masa de los sustratos, los productos de la reacción enzimática y de los inhibidores a través de la membrana; así como que existe crecimiento microbiano

en la superficie de esta, provocando una inhibición de la capa enzimática, como consecuencia hace que el biosensor se comporte de manera errónea [60].

Atrapamiento

Enzimas inmovilizadas por atrapamiento son libres en la solución, pero se restringe su movimiento por la estructura de un gel. Este proceso es sencillo y reproducible, agregando que no requiere equipo costoso. Se basa en el atrapamiento de la biomolécula en una matriz polimérica, esto restringe algunos movimientos rotacionales y de despliegue, pero permite el reconocimiento del sustrato, así como la acción catalítica [61].

Algunas de las ventajas que posee es la permeabilidad de las matrices poliméricas, que permiten el transporte de moléculas de bajo peso molecular sin que existan grandes fugas de las enzimas atrapadas, la porosidad manejable del material, que permite un arreglo de biomoléculas de diferente tamaño, la posibilidad de modificar químicamente la matriz, propiedades ópticas que abre las puertas para hacer análisis de absorbancia como los fluorométricos y la resistencia a la degradación térmica, química y biológica [62].

El atrapamiento depende del entrelazamiento de las moléculas y este a su vez depende de la polimerización del polímero, así como el grado de la formación de la matriz. Es inevitable tener fugas de la enzima inmovilizada debido a que gradualmente se difunden hacia afuera de la matriz, aunque esto depende del tamaño de la malla polimérica [63]. Debido a esto, se presentan pérdidas en la actividad enzimática mientras más tiempo se tenga usando el biosensor, lo cual hace necesario sustituirlo o remover completamente la matriz y realizar nuevamente el proceso de inmovilización.

El atrapamiento puede lograrse por diversos métodos, como lo es la solidificación inducida por temperatura, la polimerización orgánica por medio de una reacción química o fotoquímica o con una precipitación por un solvente inmiscible. El tamaño de los poros en

la superficie del gel y sus propiedades mecánicas son determinadas por la cantidad de monómeros y su forma de reja en el espacio [64].

Reticulación

Ocurre cuando se crean enlaces covalentes o iónicos para enlazar un polímero con otro polímero, en el área bioquímica la interacción sería polímero – proteína, que nos habla de un atrapamiento dentro de las cadenas poliméricas ya establecidas [65]. Un ejemplo de este tipo de reacciones es la utilización de glutaraldehído para la reticulación de enzimas con el polímero [66].

2.8 Método de inmovilización

Se busca que el método a emplear durante la inmovilización en la superficie del electrodo cumpla con las siguientes características:

1. Que permita una difusión libre del sustrato hacia la enzima.
2. Que exista una fijación sobre la superficie del electrodo y se eviten las fugas de enzima.
3. Que sea poca o nula la pérdida de actividad enzimática.
4. El método debe tener una alta reproducibilidad.

Un aspecto importante que requiere su análisis individual es la estabilidad de la enzima que principalmente se determina por su estructura intrínseca en donde depende de varios factores, que son:

- La cantidad de enlaces que tienen lugar en la matriz.
- El ambiente en donde se localiza la molécula de la enzima.
- La estructura química y física del agente de inmovilización.
- Las propiedades del agente como si está cargado, si es hidrófilo, hidrofóbico, la longitud de la matriz, etc.

Hidrogeles

Las matrices de los hidrogeles contienen una cantidad grande de agua, por lo que proveen al soporte propiedades elásticas y mecánicas similares a tejidos biológicos blandos que permiten la difusión de agua por su permeabilidad, así como de moléculas significativas.

Se puede utilizar entonces por medio de hidrogeles la inmovilización por los grupos PVA que han sido utilizados en los últimos años por investigadores para realizar el atrapamiento, reticulación e inmovilización de enzimas debido a sus propiedades elásticas, su aumento de volumen cuando está en una solución acuosa, nula toxicidad y biocompatibilidad con diversas proteínas [67]. Estos compuestos al estar en contacto con radiación ultravioleta comienzan el proceso de reticulación de manera que el proceso de polimerización es adecuado para controlar debido a sus variables como la intensidad de la radiación y el tiempo de exposición [68].

Un ejemplo de estos materiales es el PVA-AWP o por sus siglas en inglés “poly(vinyl alcohol) azide-unit pendant water-soluble photopolymer” o fotopolímero soluble en agua de alcohol polivinílico con unidad colgante de azida, sin embargo existe otro fotopolímero que cumple con los requisitos, este es similar y su nombre es PVA-SbQ o por sus siglas en inglés “poly(vinyl alcohol)-quarternized stilbazole” [69].

Este tipo de películas poliméricas se usan para cubrir superficies, hacer acabados, como control de la difusión de los medicamentos, inmovilización de enzimas, etc. En el caso de utilizar fotopolímeros es importante que las películas poliméricas cumplan con el requisito que sea adaptable en términos de su morfología (geometría espacial y dimensional), que cuenten con una fuerza mecánica y una cohesión, dependiendo del proceso en el que se ha de utilizar debido a que algunos métodos no son tan demandantes.

Se compararán estos dos polímeros para la inmovilización de la enzima tirosinasa y concluir el más adecuado a utilizar en los ensayos electroquímicos.

PVA – SbQ

El poly (vynil alcohol)- quaternized stilbazole (PVA – SbQ) es un prepolimero soluble en agua que, mediante radiación ultravioleta, forma reticulaciones y genera un atrapamiento con la enzima que se desea inmovilizar. Este fotopolímero no ha sido utilizado para ser la matriz de inmovilización de enzimas, sin embargo, sus características lo hacen un potente candidato para ser la matriz que hospedará a la enzima en el diseño y desarrollo de dispositivos analíticos basados en los biosensores para pruebas electroanalíticas [70].

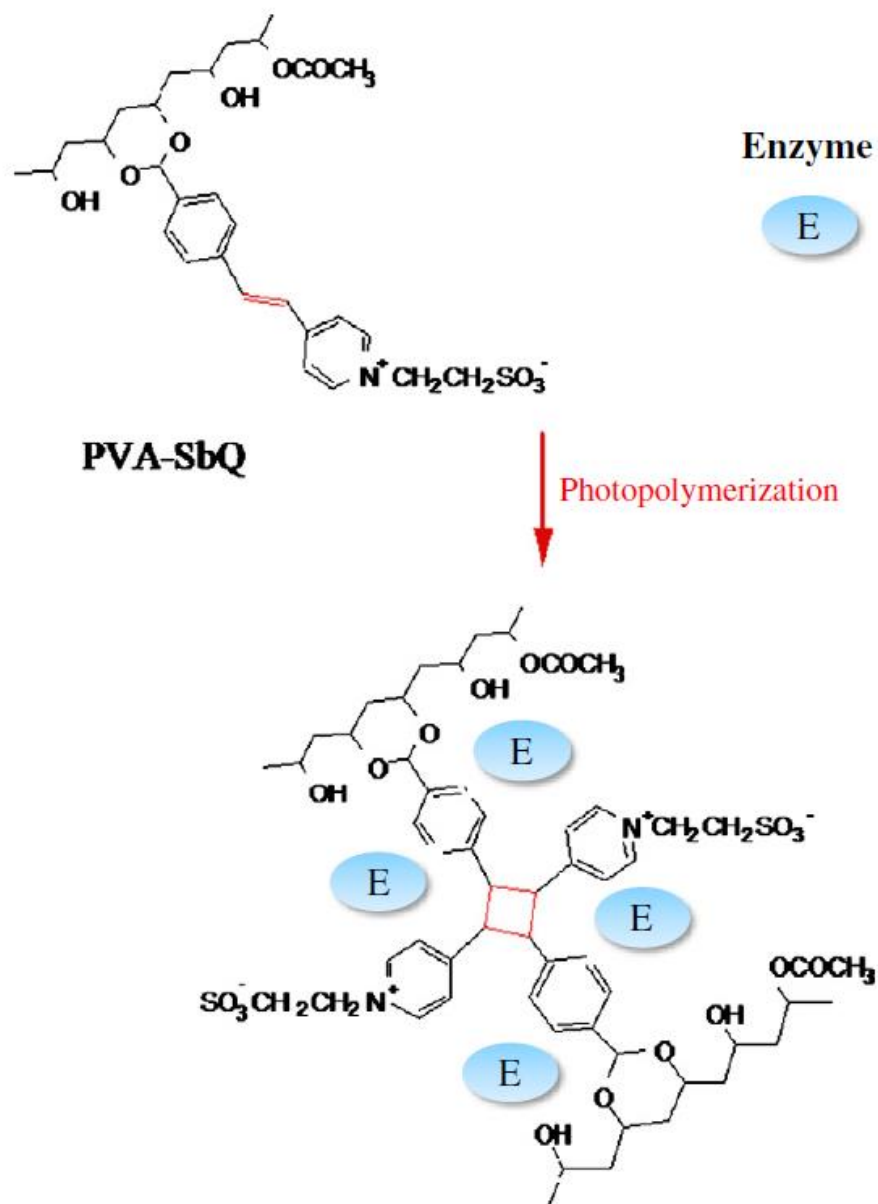


Figura 2.8.1 Atrapamiento de enzimas por acción de PVA – SbQ

Al ser un fotopolímero hidrófilo, las condiciones necesarias para su fotopolimerización e inmovilización hacen de este un material efectivo para ser el soporte a la inmovilización de proteínas. La reticulación del polímero se logra mediante radiación UV, de esta manera las enzimas pueden ser inmovilizadas en la matriz obteniendo una alta densidad de área,

aunque pueden utilizarse métodos complejos para producir a gran escala utilizando técnicas como la serigrafía en los electrodos.

PVA – AWP

El poly(vinyl alcohol) azide-unit pendant water-soluble photopolymer se ha utilizado para inmovilizar enzimas como las fosfatasas, lactasas y otras en biosensores para la determinación de pesticidas, por nombrar un ejemplo. Los biosensores que utilizan este fotopolímero muestran un LOD (límite de detección) de relativamente bajos dependiendo de la enzima utilizada y de las condiciones de operación [71].

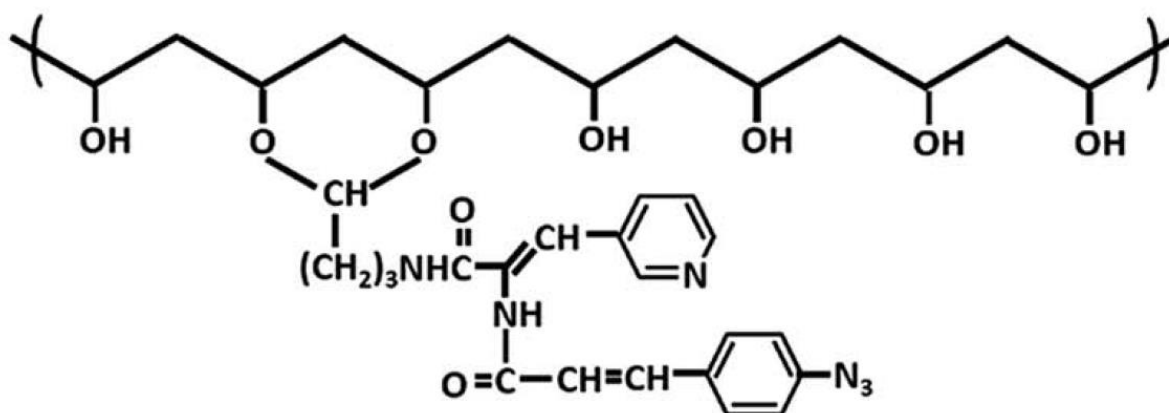


Figura 2.8.2 Estructura química del hidrogel PVA-AWP

Se encontró que el PVA-AWP tiene mejor sensibilidad comparado con otros hidrogeles e incluso que utilizar glutaraldehído para inmovilizar enzimas [72]. El utilizar este fotopolímero para inmovilizar enzimas tiene como ventaja la retención de actividad enzimática comparado con otros compuestos, también presenta mejor estabilidad mecánica y una alta reproducibilidad. Debido a que el atrapamiento de la enzima ocurre mientras el material se está formando, existe una baja pérdida de proteína por lixiviación.

Presentando las características de cada uno de los hidrogeles, se optó por utilizar PVA – AWP para la inmovilización de la enzima en la superficie de los electrodos, debido a que presenta una reticulación más sencilla, tiene mayor estabilidad y su reproducibilidad en los ensayos es superior [73].

2.9 Métodos Electroquímicos

Voltametría

El termino voltametría es usado para clasificar una serie de técnicas electroanalíticas en donde la corriente que fluye dentro de una celda electroquímica es medida en función del potencial aplicado a los electrodos. La información se obtiene al ocurrir la polarización del electrodo de trabajo. En los últimos años las técnicas analíticas voltamétricas han mejorado debido al aumento de la tecnología en los dispositivos electrónicos. Existen actualmente nuevas maneras de realizar ensayos donde se evalúe la corriente por medio de señales que se comunican con dispositivos digitales. Se discutió la composición de las celdas electroquímicas en el capítulo anterior y para función de esta investigación las llamaremos microceldas debido a que manejan volúmenes relativamente pequeños; en esta sección se analizará el uso de las técnicas voltamétricas que se habrán de utilizar para los ensayos electroquímicos [74].

Voltametría Cíclica

La voltametría cíclica se utiliza comúnmente cuando se desea estudiar el comportamiento de electrodos hechos con materiales modificados, con analitos que se sospecha que sean electroactivos. Los materiales comunes que se utilizan en estas microceldas son electrodos de platino, carbón vítreo, pasta de carbono, grafito, oro, diamante y nanotubos de carbono; tecnología que se ha discutido con anterioridad.

Su funcionamiento se basa en la percepción de la señal de la corriente durante un cambio lineal del voltaje en el electrodo de trabajo, muy similar al barrido lineal con excepción de que en voltametría cíclica el potencial regresa a su valor inicial; en otras palabras, se grafica la corriente en función del cambio del potencial aplicado al electrodo; durante la operación, la microcelda no debe llevar agitación, esto debido a que altera las condiciones normales difusivas y comienzan a presentarse los fenómenos difusivos por convección.

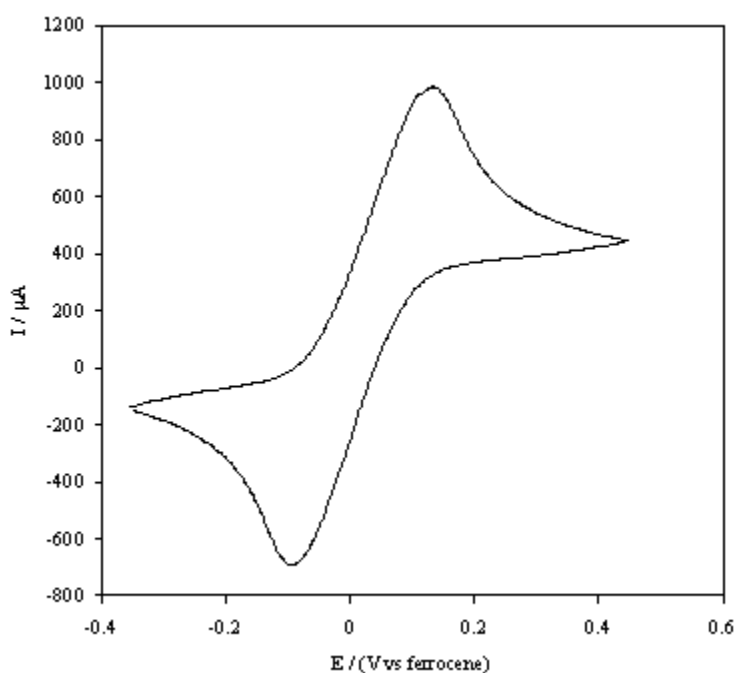


Figura 2.9.1. Voltamograma característico de un análisis de voltametría cíclica.

En la figura 2.9.1 se logra apreciar la relación que existe entre corriente – potencial, de manera que mientras dura el análisis se van graficando los cambios que existe en la intensidad de corriente. Los extremos de voltaje en los cuales ocurre la inversión son llamados potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio que se escoge para un ensayo depende de la reacción de oxidación reducción que ocurre por acción de la difusión de analitos dentro de la microcelda. Es importante mencionar que la voltametría

cíclica es utilizada principalmente para estudiar la reversibilidad de los procesos del electrodo y para análisis cinéticos; en algunas ocasiones se utiliza con propósitos analíticos.

La voltametría cíclica se utiliza para diversos motivos sobre todo para la descripción el comportamiento de la cinética de transferencia de electrones en función de variables tanto físicas como químicas, descritas por la ecuación de Randles – Sevcik, que a temperatura ambiental es:

$$I_p = 2.686 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A c D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

Donde I_p es la corriente de pico en amperes, A es el área del electrodo de trabajo en cm^2 , D es el coeficiente de difusión en cm^2/s , c es la concentración en mol/cm^3 y v es la velocidad de barrido en Volts/s. Esta ecuación se utiliza en los ensayos voltamétricos para la determinación del área real del electrodo de trabajo, para el cálculo del coeficiente de difusión del analito a la superficie del electrodo o para las corrientes de los picos.

Amperometría

El análisis amperométrico es distintivo por su objetivo principal: relacionar los cambios de concentración de la sustancia electroactiva con los cambios de corriente. Cuando inicia el ensayo no existe concentración del componente electroactivo dentro de la microcelda, mientras avanza el tiempo se agrega una concentración conocida del analito e inmediatamente el equipo detecta el cambio de corriente debido al incremento de la especie electroactiva [75].

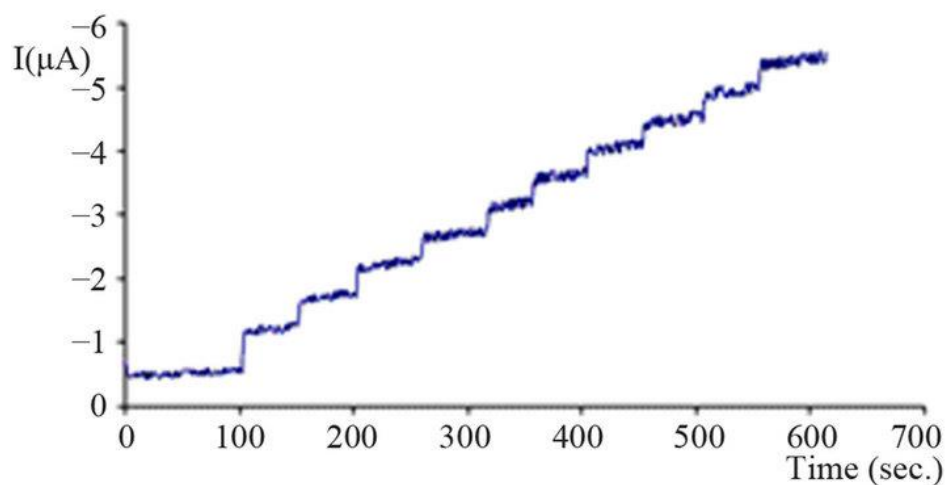


Figura 2.9.3 Amperograma mostrando el comportamiento de un biosensor de CPE (Chlorinated Polyethylene) con nanopartículas de SiO_2 . Agregando 50mg/L de H_2O_2 cada escalón.

En la figura 2.9.3, se aprecia que al inicio de la determinación amperométrica existe un estado estable en donde no hay presencia de H_2O_2 , al transcurrir el tiempo de ensayo, se agrega una concentración de 50 ppm aproximadamente cada 50 segundos y se presenta un cambio en la intensidad de corriente en microamperios, este cambio en la corriente es directamente proporcional a la concentración de la sustancia electroactiva, de manera que es un método para cuantificar indirectamente un analito mediante correlaciones de concentración – intensidad de corriente [76].

Capítulo 3. Metodología

Al realizar el diseño experimental de la investigación, se optó por dividir los métodos en cinco secciones importantes, de manera que se dividen por objetivos específicos de acuerdo al análisis establecido:

1. La optimización de la inmovilización encontrando la concentración del prepolímero (llamémosle así a la solución del medio de inmovilización, PVA – AWP, que se prepara al disolverse en agua) adecuada en función del coeficiente de difusión y la pérdida de actividad enzimática por lixiviación de la enzima. En otras palabras, se busca maximizar el coeficiente de difusión D mientras que se minimice la pérdida de actividad α , se lleva a cabo realizando un análisis voltamétrico cíclico con los diversos valores de concentración de PP (prepolímero) y enzima; el cálculo de la pérdida de actividad se usó un análisis espectrofotométrico en función del cambio de absorbancia.
2. La optimización de las condiciones de la microcelda; para maximizar la actividad enzimática, esto se busca al alterar las condiciones de pH y temperatura, preparando en la microcelda soluciones con PBS (Phosphate Buffered Solution, por sus siglas en inglés) a diferentes pH y modificando la temperatura del medio. Se utilizará amperometría para determinar la sensibilidad de los cambios al agregar alícuotas de dopamina.
3. Determinación del área real del electrodo y el coeficiente de transferencia de cargas de cada uno de los 3 electrodos serigrafiados que se discutieron con anterioridad. El objetivo de estos experimentos es conocer el área real de los electrodos (donde ocurre las interacciones y los procesos difusivos) y calcular el coeficiente de

transferencia de cargas. Mientras más elevados sean estos valores, los electrodos son mejores para las determinaciones. Los procedimientos son a partir de ensayos voltamétricos variando la velocidad de barrido, determinando en cada uno los picos catódicos y anódicos.

4. Determinación amperométrica de dopamina utilizando electrodos enzimáticos serigrafiados, añadiendo una concentración conocida de dopamina a la microcelda cada cierto intervalo de tiempo para conocer las diferentes sensibilidades que presenta cada uno de los electrodos.
5. Análisis estadístico de los resultados.

3.1 Optimización de la Inmovilización

Existen algunas variables que son importantes al momento de optimizar la inmovilización, es de interés agregar en la optimización las siguientes:

- Tiempo de polimerización(t).
- Concentración del prepolímero (en v/v %).
- Coeficiente de difusión (D).
- Actividad enzimática (α)

De acuerdo al tiempo se refiere a la exposición directa a la luz ultravioleta, al existir poco tiempo de exposición se presenta un menor grado de polimerización, caso contrario si este es alto. Es importante considerar la cantidad de prepolímero que se usará, los ensayos involucran concentraciones definidas de acuerdo al diseño experimental y usado por diversas fuentes reportadas en la literatura.

Debe presentarse una difusión del analito hacía dentro de la matriz de inmovilización, sin embargo, esta no debe ser muy elevada esto provocaría que el analito no pueda difundirse libremente, ni ser muy baja; para que no exista demasiada lixiviación de la enzima. Un

parámetro importante para optimizar es la actividad enzimática. Definiremos actividad enzimática como

$$E = \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (2)$$

Donde ΔA es el cambio de absorbancia que presenta la solución al agregar una alícuota de dopamina y Δt el lapso de tiempo que transcurrió para que la absorbancia cambie. Es importante notar que el experimento se realiza para medir la actividad de la enzima que se difundió o lixivió de la inmovilización, por lo que este parámetro se busca minimizar.

Se realizó un diseño de experimentos para realizar la optimización de la inmovilización en donde se establecieron las variables y que valores se utilizarían, quedando de la siguiente manera:

- Para el tiempo de polimerización se tienen 3 valores, 15, 30 y 60 minutos.
- Para la concentración de prepolímero se tienen 3 valores, 1.5%, 3.0% y 6.0%

En total son 9 diseños a los que se le calculará coeficiente de difusión y la actividad enzimática.

Coeficiente de Difusión

Para el cálculo del coeficiente de difusión se tienen que preparar las disoluciones de enzima y polímero. Se compró PVA – AWP con concentración de 6%; se hacen disoluciones para obtener las concentraciones acordadas (1.5, 3.0 y 6%), al tener la solución del PP se prepara la mezcla de PP – Enzima, se utilizó albumina como sustituto de tirosinasa para estos ensayos debido a que no se necesita actividad enzimática, solo una proteína que produzca la reticulación deseada al momento de fotopolimerizar. Se inmovilizó en un

electrodo de grafito tomando 5 μL de enzima y 5 μL de solución de PP (Con concentración deseada) y de esa dilución se agregaron 5 μL a la superficie del electrodo, se dejó en una lámpara que emite radiación UV con una potencia de 36 watts el tiempo deseado; se debe dejar secar por 3 horas para remoción de humedad y estabilización de la matriz polimérica. Así, se realiza la inmovilización para después hacer la prueba de voltametría cíclica.

En la microcelda se añaden 10 ml de KNO_3 como electrolito soporte y 60 μL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ como estándar electroquímico, de electrodo de trabajo se utiliza un electrodo sólido de grafito con la enzima inmovilizada, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y de contraelectrodo uno de grafito; los 3 se conectan a un potenciostato DY2100 Series Mini Potentiostat. El experimento tiene por objetivo observar la difusión de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a través de la membrana que inmoviliza a la enzima; este se calcula mediante la ecuación de Randles – Sevcik descrita en la ecuación 1, como resultado se obtiene la corriente del pico anódico del voltamograma.

Actividad enzimática

Para la obtención de la actividad se utilizan métodos espectrofotométricos que miden la absorbancia de la solución mientras esta reacciona [77], realizando así un estudio cinético. Se realizaron disoluciones del PP con tirosinasa, mezclándolo en la misma relación que el experimento para calcular el coeficiente de difusión, siendo 5 μL de PP (los tres tipos de concentración) y 5 μL de Tirosinasa. En 3 tubos se agregan 3 μL de la mezcla a cada uno colocándolos en la lámpara UV usada en la fotopolimerización con el tiempo deseado. Al terminar el tiempo de polimerización se deja secar por 3 horas para después lavar con 100 μL de solución PBS 0.1 M con pH de 6.5 durante 30 minutos, esto es para que la enzima se difunda en la solución PBS y calcular la actividad precisamente a la parte que logró escaparse.

Se pasa a una cubeta para introducirse al espectrofotómetro; la determinación tiene una duración de 30 minutos en los que se añade una alícuota de dopamina de 50 μ M a los 5 minutos. Al añadir el sustrato se comienza el estudio cinético de la actividad de tirosinasa, deteniendo la determinación a los 30 minutos. De los datos obtenidos se necesita solamente la sección en donde la relación entre absorbancia y tiempo es lineal, el estudio cinético se enfoca en obtener la pendiente de las mediciones, como lo describe la ecuación 2.

3.2 Optimización de las condiciones de la microcelda

Para la oxidación entre tirosinasa y dopamina se necesita un valor de pH y temperatura que maximice los productos de esta reacción [78], mediante una medición indirecta por amperometría y un análisis escalar se obtienen las diversas curvas de calibración para cada una de las condiciones.

Se usó un electrodo de grafito con enzima inmovilizada mediante PVA – AWP depositando en la superficie 5 μ L de la mezcla de 3 μ L de enzima (1 mg/mL) y 3 μ L del polímero (3% v/v), polimerizándose en una lámpara de luz UV con potencia de 36 Watts con un tiempo de exposición a la radiación de 60 minutos para después dejar estabilizar y secar por 3 horas. Esta deposición se realiza con una micropipeta para fluidos viscosos; al caer la gota se esparce uniformemente por la superficie del electrodo, evitando espacios vacíos y contaminar la inmovilización. el electrodo de referencia es un electrodo diseñado de Ag/AgCl y el contraelectrodo es un electrodo de grafito. Los 3 se conectan a un potenciostato DY2100 Series Mini Potentiostat. Como medio en la celda se utilizó solución buffer PBS 0.1 M de pH y Temperatura variable. Al terminar cada ensayo, se debe remover el polímero con enzima debido al ensuciamiento provocado en este, nuevamente realizando la inmovilización cada vez que se realice un ensayo.

El diseño nos da 25 ensayos distintos, cada uno con su amperograma correspondiente. La relación de corriente – concentración de dopamina debe notarse al momento de agregar la alícuota, se deja de agregar dopamina cuando en la gráfica no existe cambio de la corriente, en ese punto se dice que se alcanzó la saturación.

3.3 Determinación del Área real del electrodo y la constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones

De acuerdo con algunas investigaciones, el área real del electrodo es diferente al área geométrica (espacial) por lo que es de interés conocer el área de los electrodos serigraviados y modificados con nanopartículas [79]. Para determinar estos valores se utilizarán técnicas voltamétricas en donde el coeficiente de difusión para $K_3Fe(CN)_6$ tiene un valor reportado en la literatura de $6.210 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [80], utilizando la ecuación de Randles – Sevcik despejada para obtener el área del electrodo:

$$A = \frac{I_p}{2.686 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A c D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}} \quad (3)$$

Estos ensayos tienen como objetivo el cálculo de los picos anódicos y catódicos para aplicar la ecuación descrita con anterioridad, sin embargo, también es importante que en las determinaciones voltamétricas se estudie la cinética del electrodo, además de la enzimática. Para efecto del estudio cinético por medio de voltametría cíclica se usará el tratamiento descrito por Nicholson para la evaluación de Ψ siendo un parámetro cinético referente a la reacción electroquímica cuasi – reversible [81]:

$$\Psi = k^0 \left[\frac{\pi D n v F}{RT} \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (4)$$

Donde K^0 es la constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones, Ψ es el parámetro de transferencia de cargas siendo adimensional, π la constante matemática, D el coeficiente de difusión para $K_3Fe(CN)_6$ en $cm^2 s^{-1}$, n el número de electrones transferidos en la reacción de oxidación – reducción (para esta reacción el Fe^{+3} se reduce a Fe^{+2}) siendo el valor de $n=1$; v la velocidad de barrido, la cual se variará de 0.02 hasta 0.3 $V s^{-1}$, F es la constante de Faraday con un valor de 96 485.332 $C mol^{-1}$, R la constante de los gases con valor de 8.314 $J mol^{-1} K^{-1}$ y T es la temperatura en Kelvin.

Existe un inconveniente al utilizar la Ecuación de Nicholson mostrada en la ecuación 4, se desconocen los valores de la constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones K^0 y también el parámetro de transferencia de cargas Ψ , de manera que se plantea la siguiente ecuación empírica para la obtención de Ψ :

$$\Psi = \frac{-0.6288 + 0.0021X}{1 - 0.017X} \quad (5)$$

Donde X es ΔE_p siendo el potencial de la celda calculado mediante los datos obtenidos en los ensayos voltamétricos usando la diferencia del potencial del pico anódico E_{pa} y el potencial del pico catódico E_{pc} .

Es importante mencionar el objetivo de estos ensayos, que es obtener el área real o efectiva y los parámetros cinéticos Ψ y K^0 de los electrodos serigrafados añadidos con nanopartículas; siendo el electrodo de carbono, el electrodo de nanotubos de carbono con nanopartículas de oro y el electrodo de grafeno con nanopartículas de oro; por lo que no

se inmovilizará enzima en estos electrodos, solamente es de interés encontrar los parámetros del electrodo limpio para usarlos como un valor de referencia a la hora de plantear la comparación de los electrodos.

El ensayo se realizará por medio de una celda electroquímica que contenga KCl 0.1 M como electrolito soporte y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mM el cual es el compuesto reducido. La técnica electroanalítica a utilizar es la voltametría cíclica con el objetivo de obtener la corriente del pico catódico y anódico, así como el potencial del pico catódico y anódico variando su velocidad de barrido o scan rate para obtener la tendencia lineal.

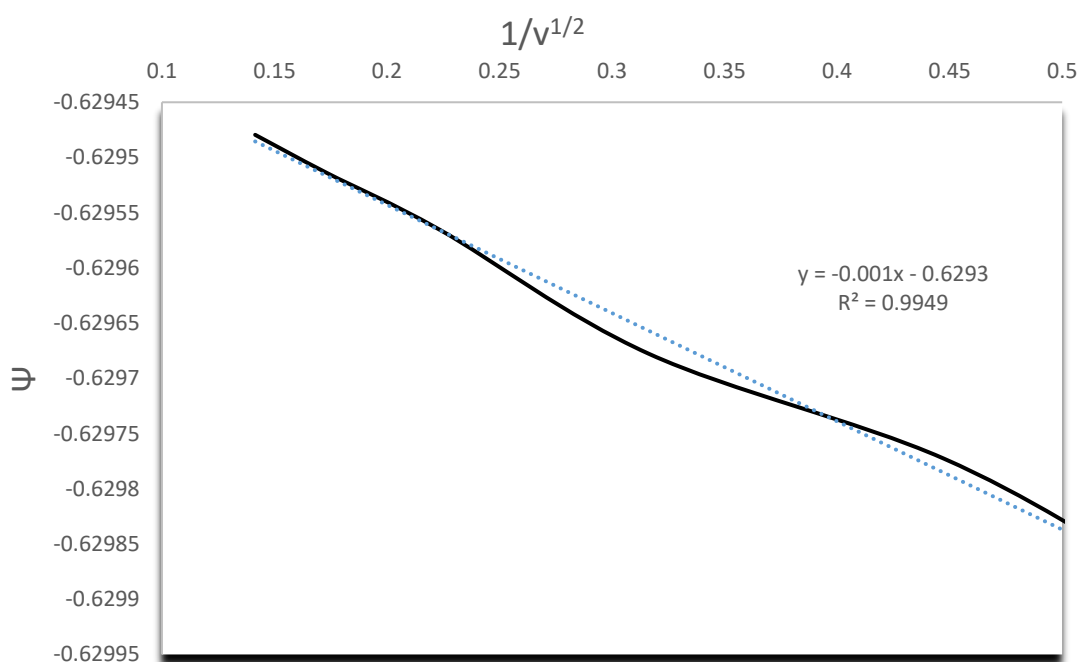


Figura 3.3.1 Ejemplo de una gráfica que relaciona el parámetro de transferencia de cargas Ψ y la raíz cuadrada del inverso de la velocidad de barrido

Como se muestra en la figura 3.3.1, existe una tendencia lineal que relaciona el parámetro de transferencia de cargas Ψ obtenido a partir de la ecuación 5 y la velocidad de barrido

usada durante el ensayo voltamétrico; para cada uno de estos electrodos es necesario determinar estos parámetros.

3.4 Determinación amperométrica de dopamina utilizando electrodos enzimáticos serigrafiados

Utilizando las dos optimizaciones realizadas en el apartado 3.1 y 3.2, se diseñan los electrodos serigrafiados con la inmovilización y los parámetros óptimos obtenidos; así se plantea la determinación de dopamina utilizando cada uno de los 3 electrodos serigrafiados: carbono, nanotubos de carbono con nanopartículas de oro y grafeno con nanopartículas de oro.

Se utilizó técnica amperométrica para la determinar mediante los amperogramas la sensibilidad correspondiente al cambio de corriente debido a la formación de orto – quinonas por la agregación de alícuotas de dopamina de 0.05 milimoles, 30 μ L. La determinación lleva agitación de la solución de buffer PBS con un volumen de 15 mL.

Se realizaron ensayos de 3 electrodos por cuestiones de tiempo, debido a que desde el momento de inmovilizar a analizar por amperometría se llevan 5 horas, más el tiempo invertido en la amperometría tiende a extenderse; por consecuente se optó por inmovilizar la enzima en un juego de los electrodos (uno de cada tipo) a la vez, para después realizar la determinación amperométrica.

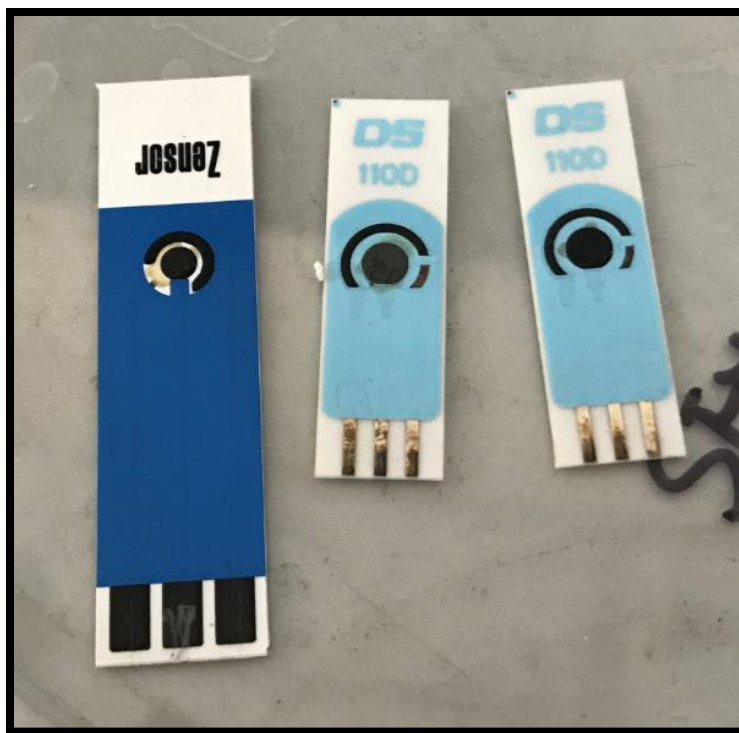


Figura 3.4.1 Electrodo serigrafiados con enzima inmovilizada, de izquierda a derecha: Carbono, Grafeno con Nanopartículas de oro, Nanotubos de Carbono con Nanopartículas de oro.

3.5 Análisis estadístico de los resultados

Al contar con todos los datos experimentales, se plantea obtener tres parámetros a partir de análisis estadísticos:

LOD (Limite de detección) que es la concentración más pequeña que se puede determinar con un nivel de confianza k . En el caso de las determinaciones a usarse en esta investigación, la mayoría utiliza curvas de calibración y así podemos definir que el límite de detección como la concentración de dopamina que produce una respuesta de corriente mayor que la desviación estándar del blanco; se describe con la siguiente ecuación:

$$LOD = \frac{k\sigma b}{m} \quad (6)$$

Donde m es la sensibilidad de la calibración o la pendiente de la recta, k es el factor de confianza, se utilizará un valor de 3 para k correspondiente a un valor de 98.3% de confianza, mientras que σb es la desviación estándar del blanco.

Para el rango lineal o intervalo dinámico lineal de este tipo de determinaciones lo definiremos como el intervalo de concentración en el que se puede realizar la determinación con una curva de calibración. Usualmente el punto inferior del rango suele ser el límite de detección, mientras que el superior es el valor que se desvía de su comportamiento lineal con un cierto grado antes considerado. Se realizará mediante la curva de calibración, tomando solo un nivel de confianza de 5% referente a todo aquel valor puntual que se retire del 5% de la linealidad será considerado no apto.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1 Coeficiente de difusión y actividad enzimática

La experimentación se llevó a cabo planteando los parámetros descritos en el apartado 3.1; cada vez que se realizaba un experimento se aseguraba que el electrodo de grafito tuviera una superficie limpia puliendo esta con una fresadora y papel de lija. Cada vez que se depositaba el medio de inmovilización PVA – AWP con enzima tirosinasa, se debe cuidar la forma final del polímero sobre el electrodo para asegurar la máxima reproducibilidad del espesor de la capa de inmovilización. Para añadir a la superficie la solución de PVA – AWP con tirosinasa, se coloca la micropipeta totalmente vertical para depositar la gota, si existe una burbuja se repite la preparación de este; de manera que se esparce con la puntilla de la micropipeta la gota para homogenizar la distribución del medio sobre la superficie. Se realizaron 9 diseños para la inmovilización de la enzima, los cuales solamente varía el tiempo de exposición y la concentración del polímero.

Se planteó el diseño de experimentos alterando las condiciones de concentración y de tiempo de polimerización, usando los 9 diseños para calcular los picos anódicos con voltametría cíclica. Los cálculos se realizaron con la ecuación de Randles – Sevcik utilizando una hoja de cálculo en Excel[®], variando la velocidad de barrido y obteniendo los picos, a estos datos se les realizó un tratamiento para obtener los promedios de las determinaciones del coeficiente de difusión, teniendo un margen mayor a la hora de analizar los datos experimentales.

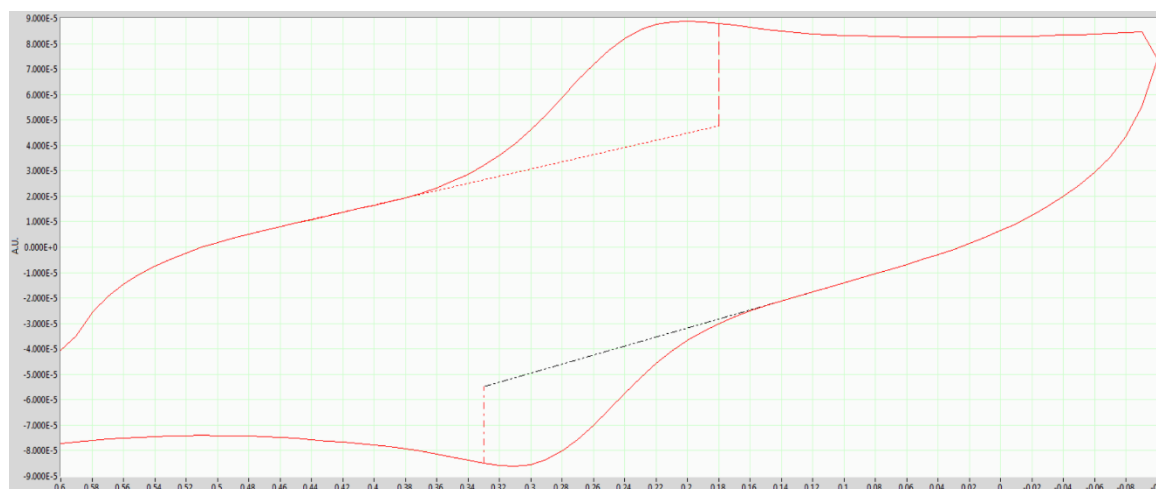


Figura 4.1.1 Voltamograma del diseño 6 (60 minutos, 3.0% v/v) en donde se aprecia la obtención de los picos.

Para el cálculo de la actividad enzimática se necesita realizar el estudio cinético con un espectrofotómetro que medirá la absorbancia a lo largo del ensayo. Al obtener la gráfica de tiempo vs absorbancia, se logra apreciar que al momento de añadir la alícuota de dopamina se crea un comportamiento lineal en esta relación.

En 30 minutos se toman alrededor de 360 mediciones de absorbancia, cada 0.083 minutos se realiza una medición. Como solo nos interesa la parte lineal de la absorbancia se tomarán los valores de 15 minutos a 25 minutos para todos los experimentos y a partir de la pendiente de la recta obtendremos la actividad enzimática.

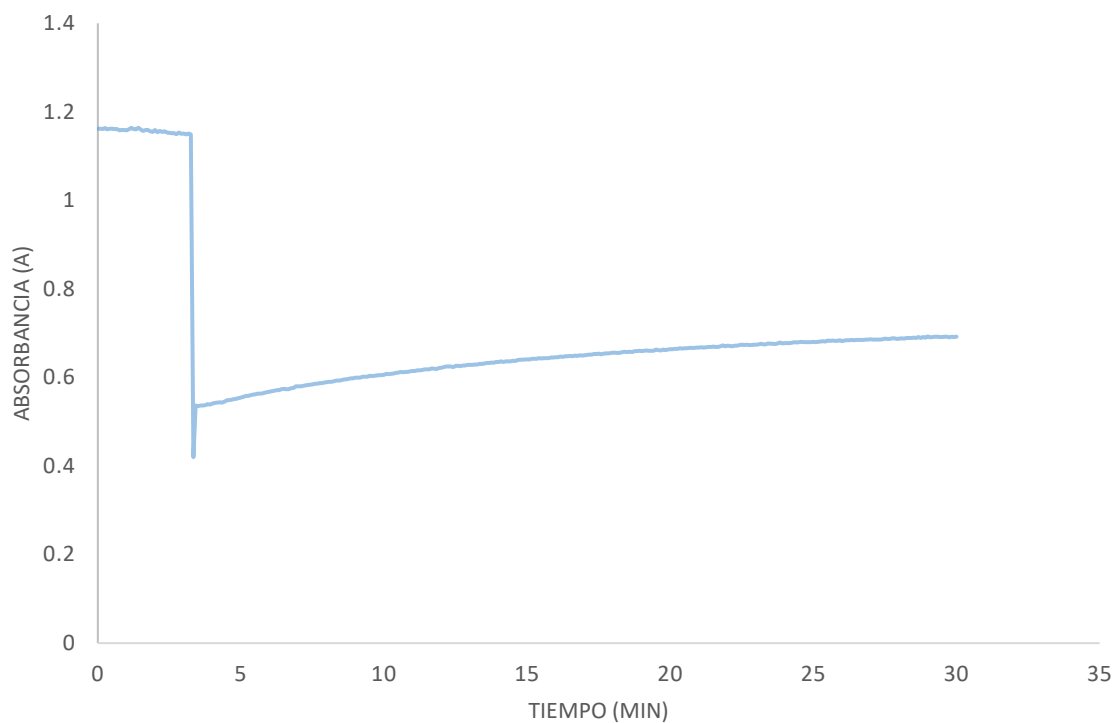


Figura 4.1.2 Estudio cinético del diseño 1 (15 minutos de polimerización con concentración de 1.5% (v/v) donde se observa el comportamiento de la curva de absorbancia vs tiempo.

Se mostrarán las rectas de todos los 9 experimentos para definir lo que se considerará como lineal al momento de analizar las pendientes de las gráficas y con ello el análisis de la actividad enzimática.

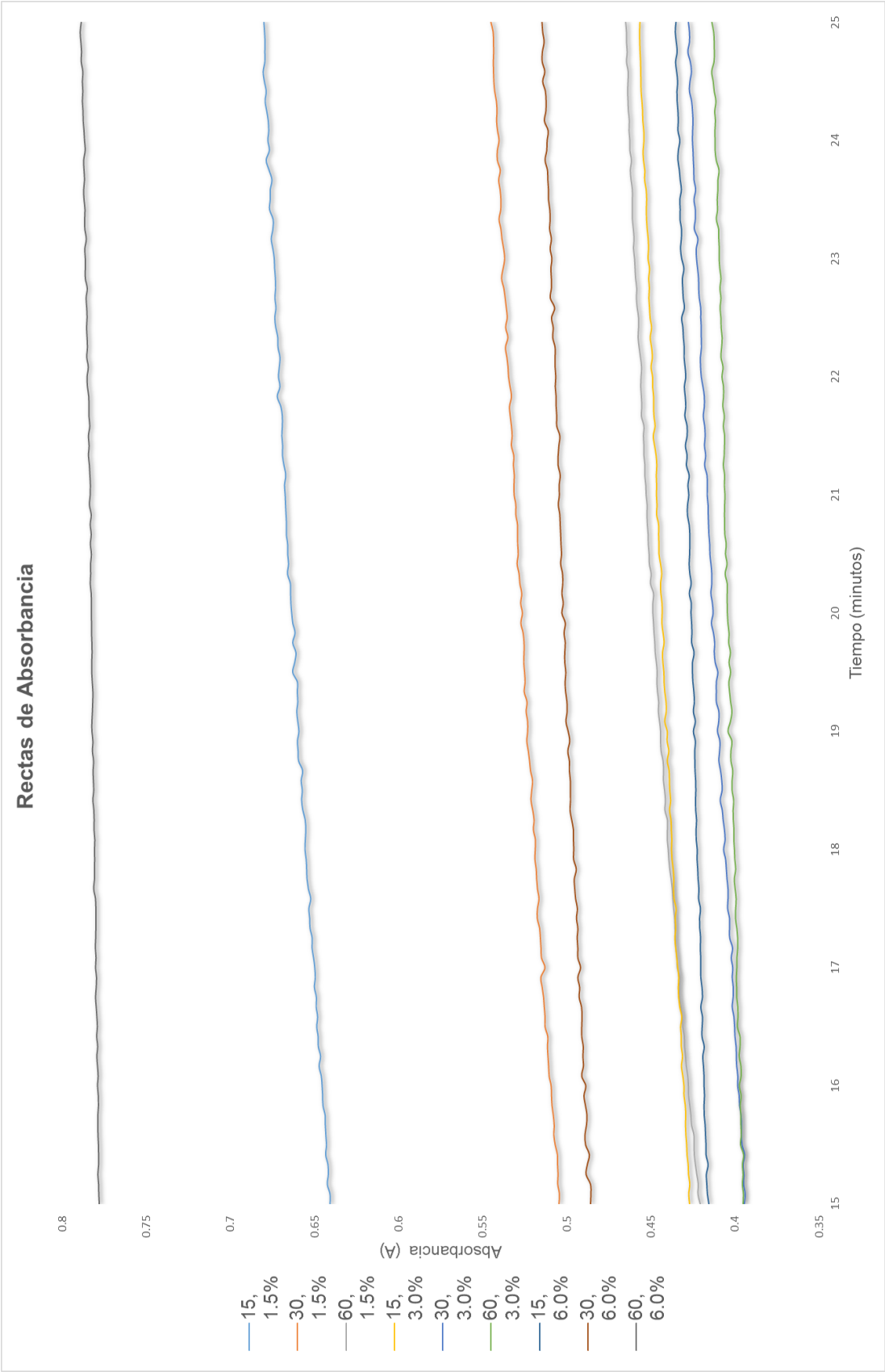


Figura 4.1.3 Rectas de los nueve diseños para la determinación de actividad enzimática.

Para obtener la actividad enzimática se usa la ecuación 7 para definir actividad, pero ahora se define como:

$$E = \frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{0.001}{1 \text{ min}} \quad (7)$$

Los resultados obtenidos se mostrarán en la Tabla 4.1.1, de acuerdo a lo obtenido en la experimentación, todos los datos se trataron en una hoja de cálculo para realizar operaciones aritméticas y algebraicas de una manera sencilla, obteniendo la siguiente información:

Capítulo 4. Resultados y Discusión

Tabla 4.1.1 Concentrado de resultados obtenidos en la experimentación para optimizar el diseño de la inmovilización.

Número de diseño	Tiempo de polimerización (min)	Concentración del Prepolímero (% v/v)	Coeficiente de Difusión D ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	Actividad enzimática E (U)
1	15	1.5%	8.61	29.88
2	30	1.5%	5.557	29.1
3	60	1.5%	3.405	26.16
4	15	3.0%	2.223	5.63
5	30	3.0%	1.451	4.70
6	60	3.0%	1.29	2.78
7	15	6.0%	0.554	1.89
8	30	6.0%	0.542	1.79
9	60	6.0%	0.389	1.128

Se aprecia la relación existente entre D y E, mientras una es mayor otra también lo es; es necesario observar este comportamiento para inferir las siguientes conclusiones:

- No es igual de representativa la variable tiempo de polimerización respecto a la concentración del prepolímero, se puede apreciar con los datos de la tabla que los valores son muy similares en los bloques de 3. En los datos de actividad se aprecia que los cambios de 15 minutos a 30 minutos son muy pocos, caso contrario cuando se avanza a 60 minutos muestra que es significativo.
- Se necesita utilizar un método para optimizar las variables y decidir que diseño se utilizará para los electrodos serigrafados.

Al obtener los valores se concluye que la difusión debe maximizarse para facilitar el paso del analito a través de la membrana, mientras que la absorbancia debe ser mínima, haciendo del método un medio óptimo para evitar la lixiviación de enzima.

Se utilizará un acercamiento heurístico tomando en cuenta la relación difusión sobre la totalidad de la difusión más la actividad enzimática, siendo el porcentaje correspondiente a la difusión [82]; se busca maximizar esta expresión. Esta relación se presenta en función al coeficiente de difusión debido a que es más significativo este parámetro que la actividad enzimática del lixiviado. Se trataron los datos mediante Excel® y se obtuvo lo siguiente:

Capítulo 4. Resultados y Discusión

Tabla 4.1.2 Concentrado de resultados obtenidos y normalizados para obtener el diseño optimizado.

Número de diseño	Coefficiente de Difusión $D \times 10^{-6} \text{ (cm}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$	Actividad enzimática E (U)	Normalización de D	Normalización de E	Relación con respecto a D
1	8.61	29.88	1	1	0.5
2	5.557	29.1	0.64	0.97	0.39
3	3.405	26.16	0.39	0.87	0.31
4	2.223	5.63	0.25	0.18	0.57
5	1.451	4.70	0.16	0.15	0.51
6	1.29	2.78	0.14	0.09	0.61
7	0.554	1.89	0.06	0.06	0.50
8	0.542	1.79	0.06	0.05	0.51
9	0.389	1.128	0.04	0.03	0.54

El diseño 6 es el que presenta un máximo en la relación con respecto al coeficiente de difusión, por lo que se tomará como el diseño óptimo de inmovilización para la determinación de dopamina en los siguientes ensayos.

4.2 pH óptimo y temperatura óptima

Se utilizó para las determinaciones un electrodo de grafito utilizando el método de inmovilización que mostró óptimas condiciones. El diseño experimental consistió en 5 valores de temperatura (20, 25, 30, 35 y 40) y pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0). Se mantuvo la temperatura de operación con una parrilla eléctrica durante el ensayo amperométrico y el pH se modificó con soluciones buffer PBS 0.1 M para cada valor. Durante la determinación se agregan alícuotas de 20 μL de dopamina con concentración de 50 μM cada 200

segundos. En la microcelda se añaden 10 mL de solución buffer correspondiente al experimento; no se añadirá dopamina hasta que pase 30 segundos al inicio del experimento; es necesario que exista una tendencia estable al inicio de las mediciones para observar, cuando al momento de añadir dopamina, el cambio de la corriente con respecto a esa cantidad de sustrato. Se debe mantener la temperatura de operación a lo largo del experimento.

Es importante definir el objetivo de los ensayos; estos son para obtener la relación corriente – concentración de las gráficas. Estos datos se tratan con el método de escalamiento, que es realizar una medición de cada aumento de la corriente correspondiendo la cantidad de moles presentes en la solución, tiene una tendencia lineal y se realiza una segunda gráfica que nos muestra este comportamiento. La pendiente de la gráfica resultante del escalamiento se le llamará coeficiente de sensibilidad, definiéndolo como la sensibilidad que presenta la enzima al reaccionar con el sustrato presentando condiciones específicas de pH y temperatura en la microcelda.

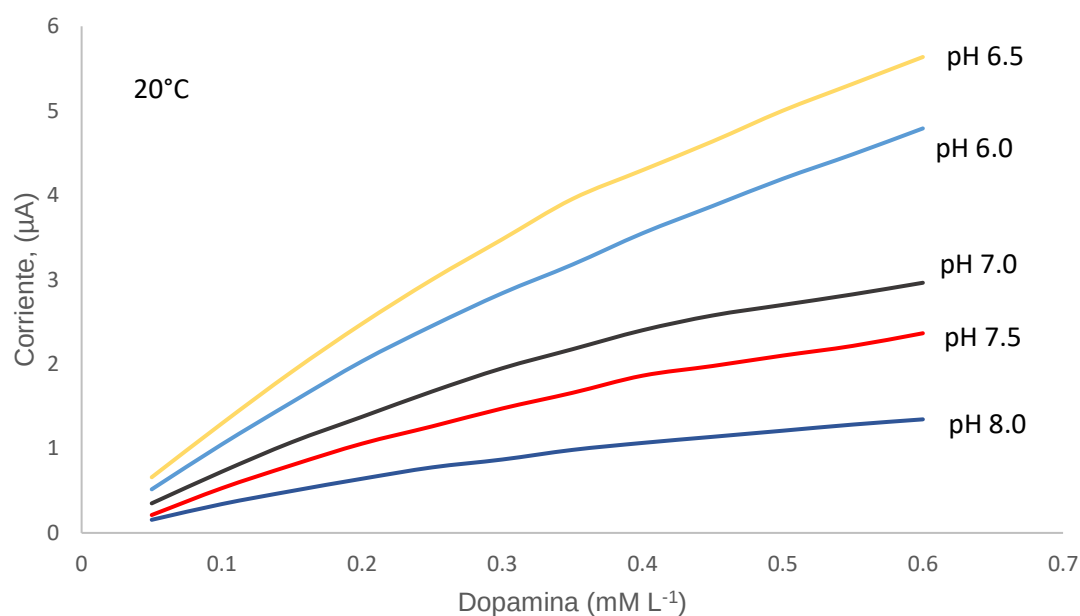


Figura 4.2.1 Curvas de pH para los ensayos a 20°C

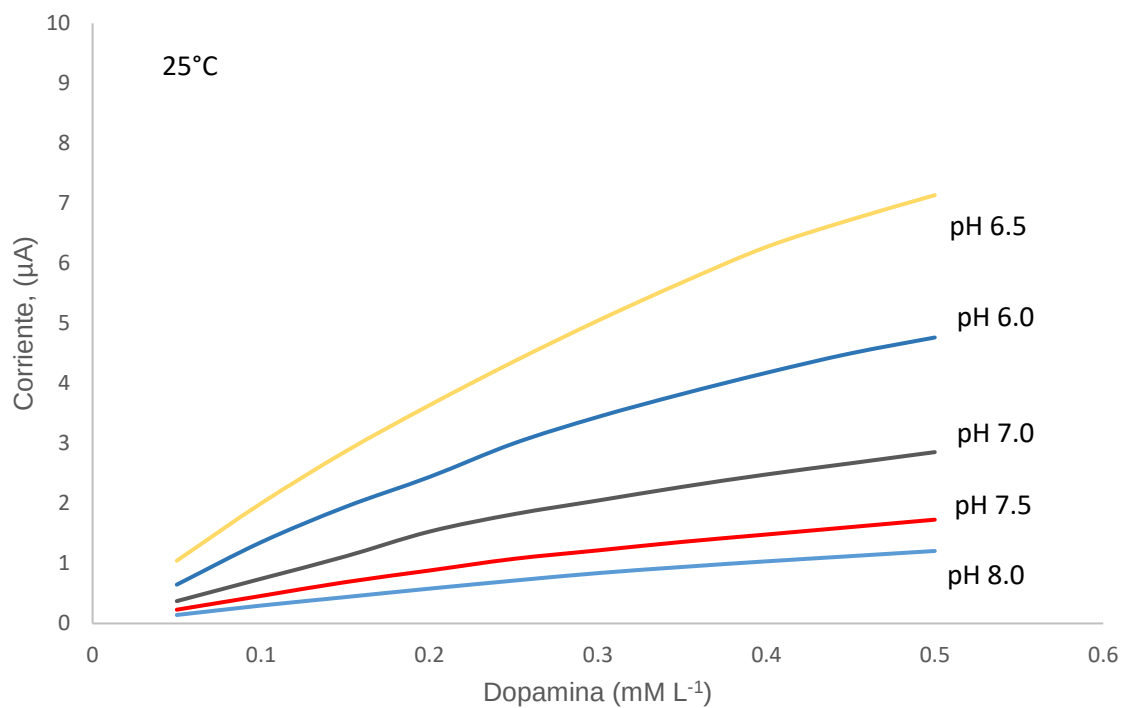


Figura 4.2.2 Curvas de pH para los ensayos a 25°C

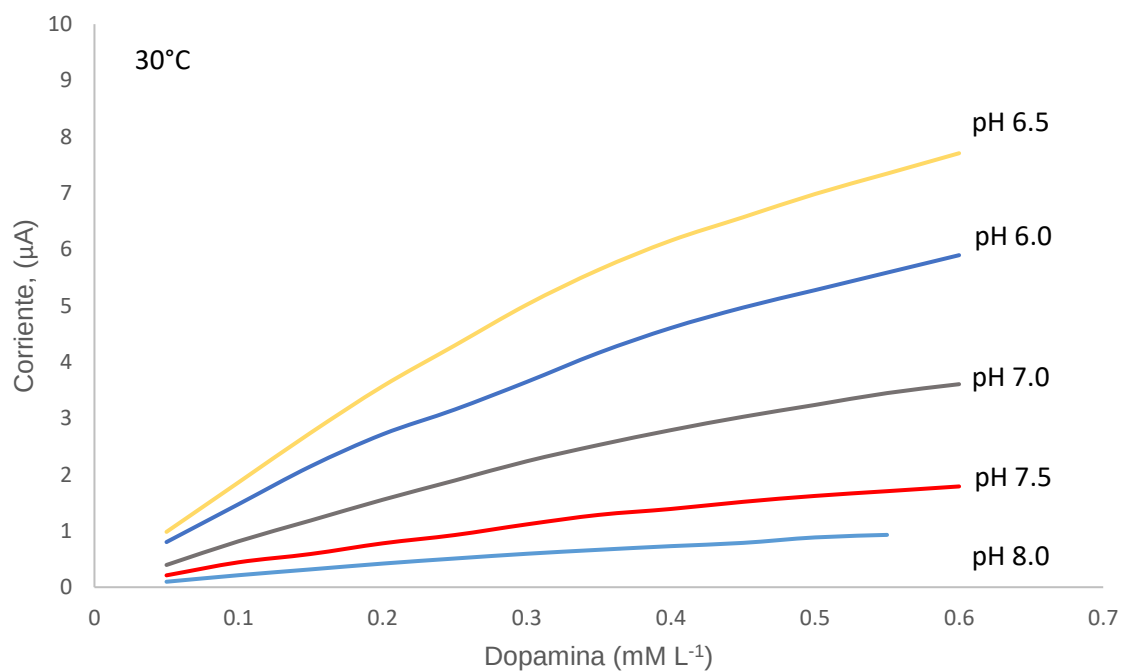


Figura 4.2.3 Curvas de pH para los ensayos a 30°C

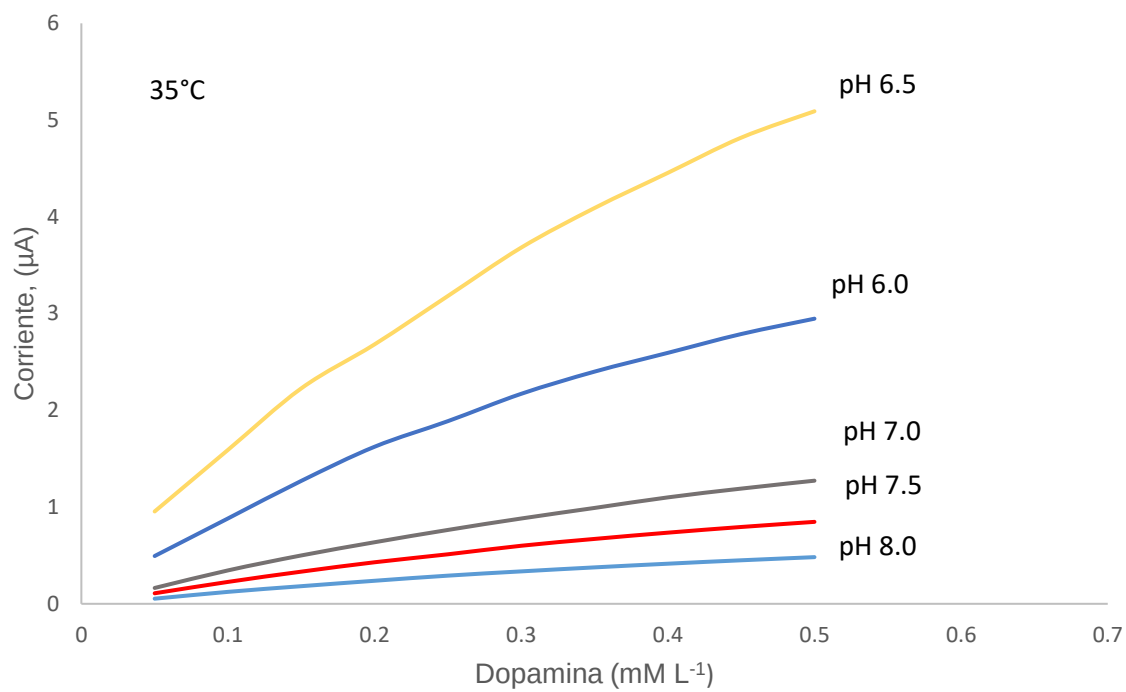


Figura 4.2.4 Curvas de pH para los ensayos a 35°C

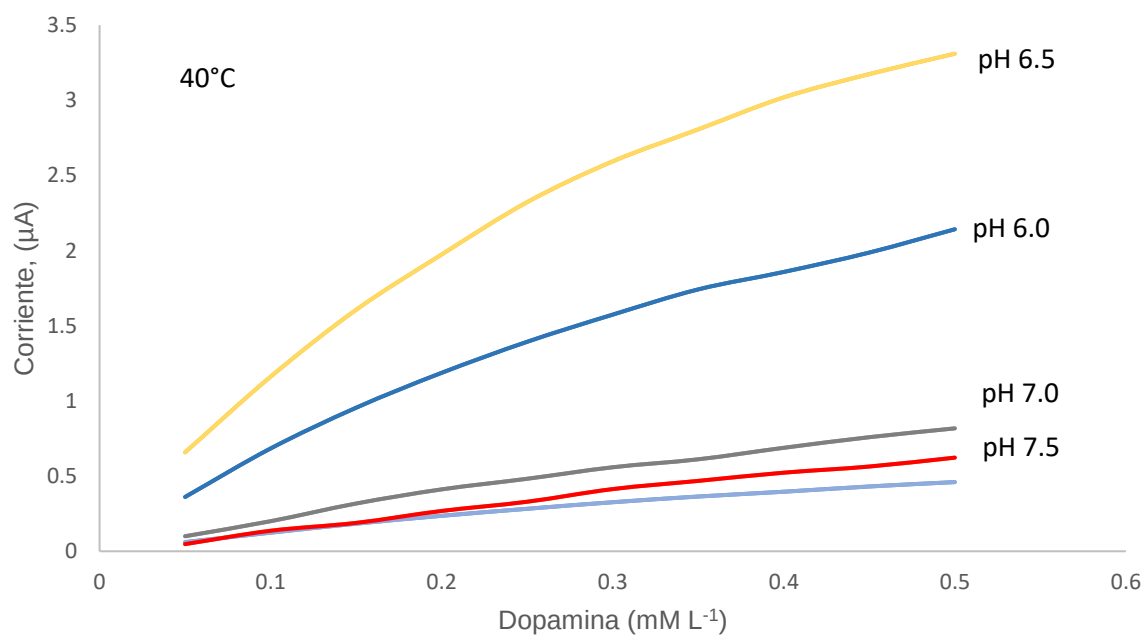


Figura 4.2.5 Curvas de pH para los ensayos a 40°C

Capítulo 4. Resultados y Discusión

Las curvas anteriores son construidas a partir del método de escalamiento descrito en este capítulo; en el amperograma se tiene los pasos de cada momento en el que se agregó una alícuota de dopamina, estos escalones nos dan la relación lineal descritas por las gráficas.

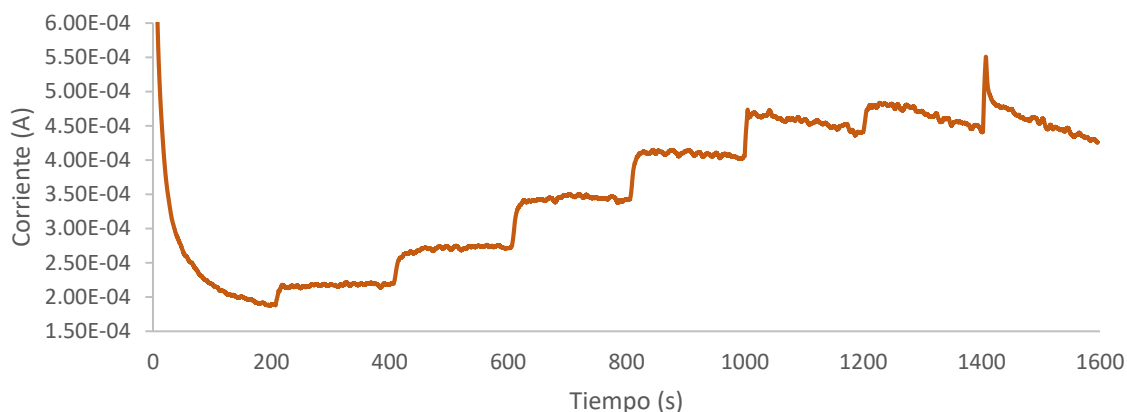


Figura 4.2.6 Amperograma correspondiente a una temperatura de 25°C y pH 7.5

La pendiente de todas las curvas a distintas temperaturas será el coeficiente de sensibilidad K , el cual concentraremos en la Tabla 4.2.1.

Tabla 4.2.1 Concentrado de los resultados del coeficiente de sensibilidad K

Temperatura (°C)					
pH	20	25	30	35	40
6	10.258	12.627	14.034	8.3765	6.5622
6.5	12.591	18.788	18.138	14.364	11.143
7	7.0167	7.4332	7.8596	3.2667	2.0667
7.5	5.2718	4.4941	3.8034	2.1843	1.338
8	3.2621	2.8891	2.0347	1.184	1.2019

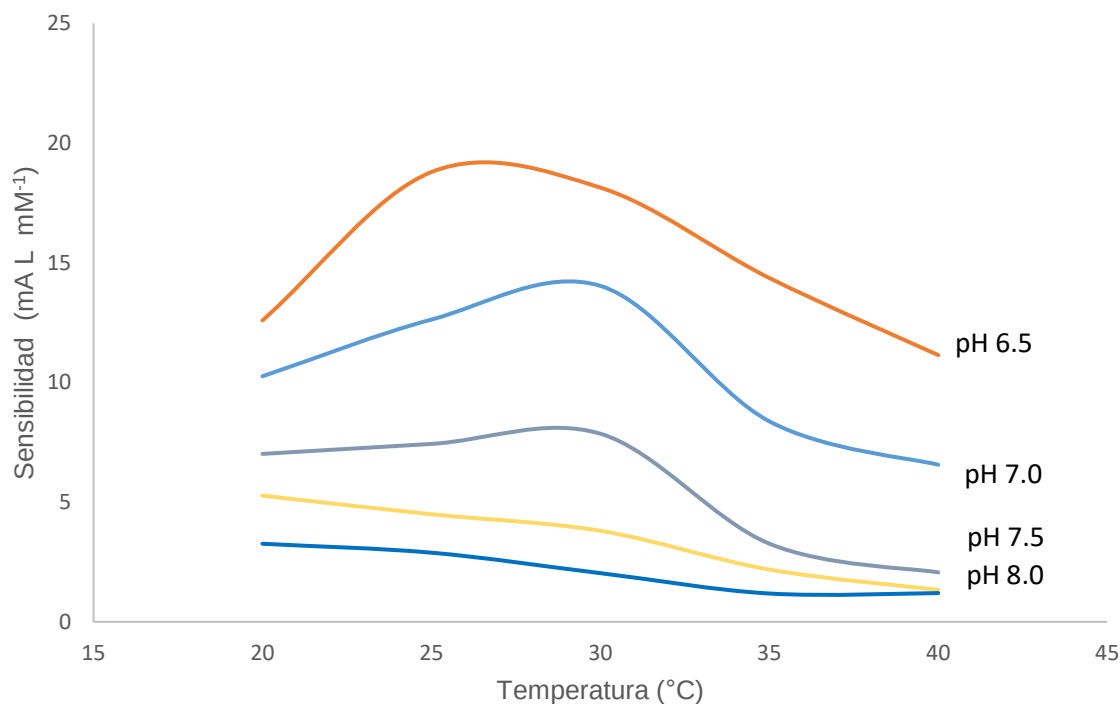


Figura 4.2.7 Curvas de Sensibilidad vs Temperatura al fijar el pH

Al observar los resultados se aprecia que el valor más alto está en el experimento que se realizó con pH de 6.5 y una temperatura de 25°C, sin embargo, se necesita saber con certeza si las condiciones no presentan variabilidad al momento de que existen cambios ligeros de temperatura. Al ser una función de dos variables presenta un comportamiento diferente, por lo que no se puede asumir un comportamiento lineal. Se optó por utilizar un método numérico para optimizar y calcular de manera computarizada los valores reales que presentan un máximo en la función, siendo este máximo el punto en donde la enzima tiene una actividad máxima, porque se presenta más sensibilidad a la dopamina en estas condiciones de pH y temperatura.

El tratamiento de los datos se realizó en MATLAB® usando los resultados descritos en la Tabla 4.2.1. Como se mencionó, no se puede realizar una regresión lineal por mínimos cuadrados, pero si una regresión polinomial multivariable. Se utilizó una regresión

polinomial de orden cúbico de acuerdo a la R^2 obtenida de cada grado, resultando en 0.8924. La función obtenida se le llamará ecuación de sobrevivencia, se puede graficar para obtener la superficie donde se relacionan las 3 variables.

$$K(pH, T) = -1608 + 510.39pH + 43.31T - 61.11pH^2 - 4.598pH * T - 0.9506T^2 + 2.35pH^3 + 0.3047pH^2 * T + 0.006112pH * T^2 + 0.009944T^3 \quad (8)$$

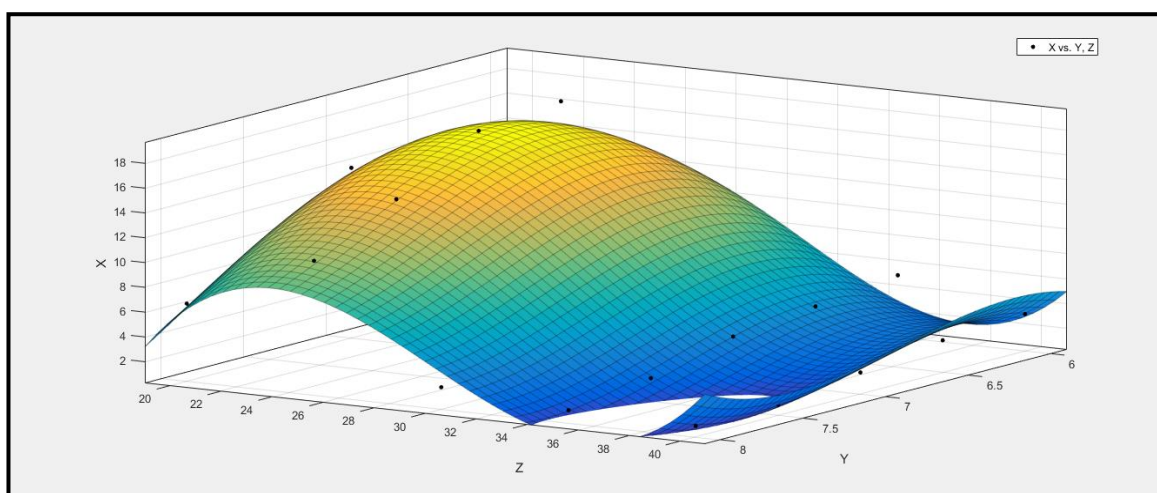


Figura 4.2.8 Superficie graficada de la función $K(pH, T)$

Se trataron los datos experimentales con MATLAB® para maximizar mediante algoritmos genéticos, que es un método que utiliza algoritmos complejos basados en la selección natural de las especies [83]; de esta manera converge y da como resultado el valor puntual de (6.64, 23.302), lo que nos da una confianza para utilizar los valores de pH de 6.5 y 25°C de temperatura.

Este análisis cumplió con el objetivo de optimizar los parámetros óptimos en la celda electroquímica que lleva a cabo la reacción enzimática tirosinasa – dopamina, siendo

importante para conocer los valores en donde la actividad enzimática es máxima. Al completar la optimización de la función de sobrevivencia, con una R^2 de 0.8924 nos da una confianza para realizar ensayos electroquímicos con estos valores de pH y Temperatura, así, las determinaciones de dopamina mediante biosensores tienen sus parámetros óptimos y se puede continuar con los análisis selectivos para la determinación de dopamina.

4.3 Constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones y área real del electrodo

Otro parámetro discutido con anterioridad es el coeficiente de transferencia de cargas; se experimentó con los electrodos serigrafiados de carbono, nanotubos de carbono con nanopartículas de oro y grafeno con nanopartículas de oro sin enzima inmovilizada, debido a que el parámetro cinético es propio del electrodo y su composición fisicoquímica.

Se usaron las velocidades de barrido de 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 $V s^{-1}$ teniendo como objetivo encontrar los valores del pico anódico, pico catódico, potencial del pico anódico y potencial del pico catódico.

Tabla 4.3.1 Resultados concentrados de los ensayos con el electrodo de Carbono.

Scan Rate				
(V s⁻¹)	I_{pc}	I_{pa}	E_{pc}	E_{pa}
0.02	7.938 x10 ⁻⁶	-7.027 x10 ⁻⁶	0.067	0.202
0.03	9.38 x10 ⁻⁶	-8.772 x10 ⁻⁶	0.063	0.210
0.05	1.140 x10 ⁻⁵	-9.925 x10 ⁻⁶	0.052	0.220
0.1	1.35 x10 ⁻⁵	-1.311 x10 ⁻⁵	0.045	0.227
0.2	1.613 x10 ⁻⁵	-1.325 x10 ⁻⁵	0.011	0.260
0.3	2.451 x10 ⁻⁵	-2.124 x10 ⁻⁵	0.009	0.2813

Tabla 4.3.2 Resultados concentrados de los ensayos con el electrodo de Nanotubos de carbono con nanopartículas de oro.

Scan Rate				
(V s⁻¹)	I_{pc}	I_{pa}	E_{pc}	E_{pa}
0.02	1.438 x10 ⁻⁵	-1.327 x10 ⁻⁵	0.070	0.179
0.03	1.748 x10 ⁻⁵	-1.681 x10 ⁻⁵	0.069	0.185
0.05	2.211 x10 ⁻⁵	-2.116 x10 ⁻⁵	0.064	0.191
0.1	2.535 x10 ⁻⁵	-2.282 x10 ⁻⁵	0.031	0.187
0.2	3.548 x10 ⁻⁵	-3.583 x10 ⁻⁵	0.041	0.220
0.3	4.024 x10 ⁻⁵	-4.113 x10 ⁻⁵	0.033	0.228

Tabla 4.3.3 Resultados concentrados de los ensayos con el electrodo de Grafeno con nanopartículas de oro.

Scan Rate				
(V s⁻¹)	I_{pc}	I_{pa}	E_{pc}	E_{pa}
0.02	1.585 x10 ⁻⁵	-1.477 x10 ⁻⁵	0.080	0.159
0.03	1.956 x10 ⁻⁵	-1.879 x10 ⁻⁵	0.087	0.170
0.05	2.452 x10 ⁻⁵	-2.421 x10 ⁻⁵	0.088	0.177
0.1	2.929 x10 ⁻⁵	-2.859 x10 ⁻⁵	0.059	0.161
0.2	4.219 x10 ⁻⁵	-4.545 x10 ⁻⁵	0.076	0.189
0.3	4.987 x10 ⁻⁵	-5.486 x10 ⁻⁵	0.071	0.197

Con los datos obtenidos durante los ensayos voltamétricos se puede calcular el área real del electrodo mediante la ecuación de Randles – Sevcik usando el potencial del pico y también la constante de transferencia heterogénea de electrones. Se utilizó Excel® para el tratamiento de los resultados, creando una gráfica de V vs Ip (velocidad de barrido contra potencial del pico) de tendencia lineal, la pendiente de esta curva permite obtener el área real.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

Tabla 4.3.4 Resultados de los cálculos para la obtención del área real y la constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones k^0

Electrodo serigrafiado	Área real (mm ²)	R ²	Constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones k^0 (cm s ⁻¹)	R ²
Carbono	7.25	0.986	3.665x10 ⁻³	0.995
Nanotubos de carbono con nanopartículas de oro	14.1	0.988	5.594 x10 ⁻³	0.992
Grafeno con nanopartículas de oro	16.2	0.9943	14.91 x10 ⁻³	0.998

Mediante el tratamiento de los datos se puede apreciar que nos da una confianza estadística por medio de un coeficiente de correlación alto, para los casos del área nos arrojó una R² arriba de 0.98 mientras para la constante de transferencia heterogénea de electrones k^0 las R² son arriba de 0.99, siendo estos valores aproximados a los que reporta la literatura [79].

Con estos valores se confirma que las modificaciones hechas añadiendo nanopartículas de oro en la superficie de los electrodos serigrafiados influye significativamente en su intercambio de electrones, así como en su sensibilidad; de modo que solamente con estos parámetros se puede suponer que el electrodo de grafeno con nanopartículas de oro realiza mayor intercambio de electrones que el electrodo de carbono y de nanotubos de carbono.

Estas modificaciones provocan que exista mejor actividad electrocatalítica y una mayor superficie de contacto mostrado en las determinaciones con un buen nivel de confianza.

4.4 Determinación de dopamina

Al obtener todas las optimizaciones, tanto de la inmovilización como de las condiciones de la celda electroquímica, se determinó mediante amperometría la sensibilidad que presenta cada electrodo serigrafiado con enzima inmovilizada a la presencia de dopamina; con sensibilidad se refiere a la razón del cambio de la corriente con respecto a la concentración de dopamina añadida cada alícuota, similar a lo que se realizó en el apartado 4.2.

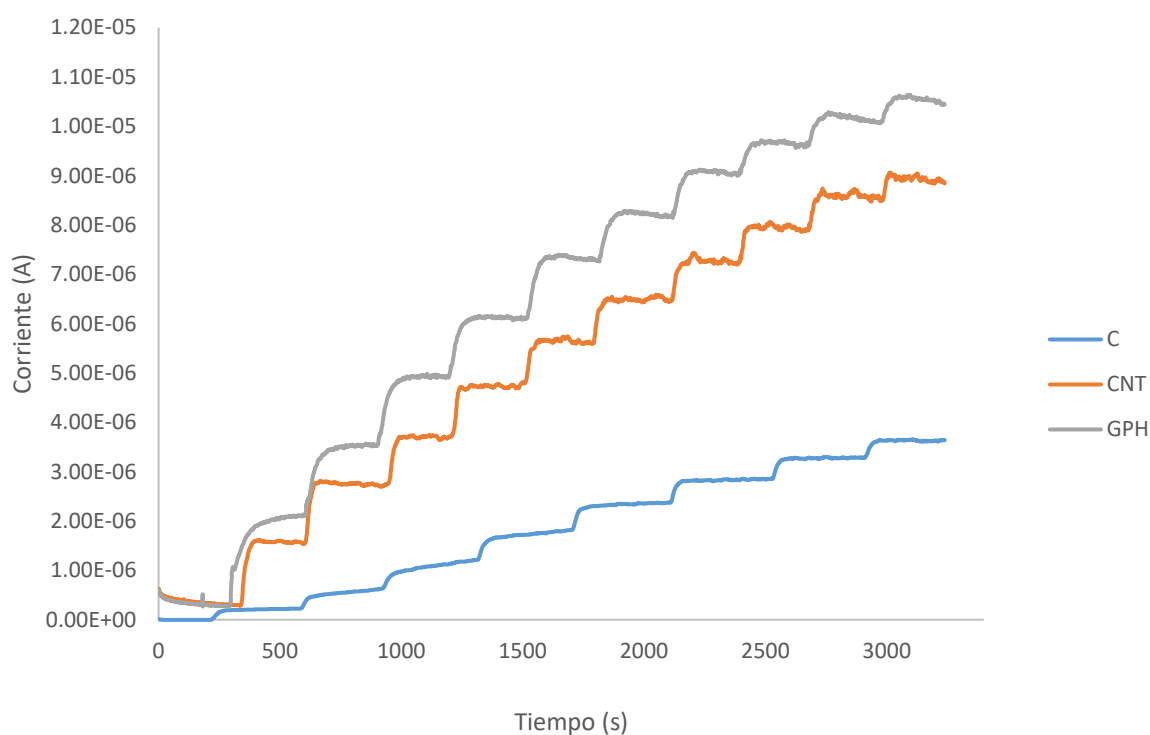


Figura 4.4.1 Análisis amperométrico de los tres electrodos serigrafiados siendo: C de carbono, CNT de nanotubos de carbono con nanopartículas de oro y GPH de grafeno con nanopartículas de oro.

De acuerdo a la figura 4.4.1 se puede observar que el electrodo de grafeno tiene una mayor sensibilidad a los cambios de concentración en la solución de la celda electroquímica, sin embargo, es necesario realizar un análisis de sensibilidad para corroborar esta hipótesis.

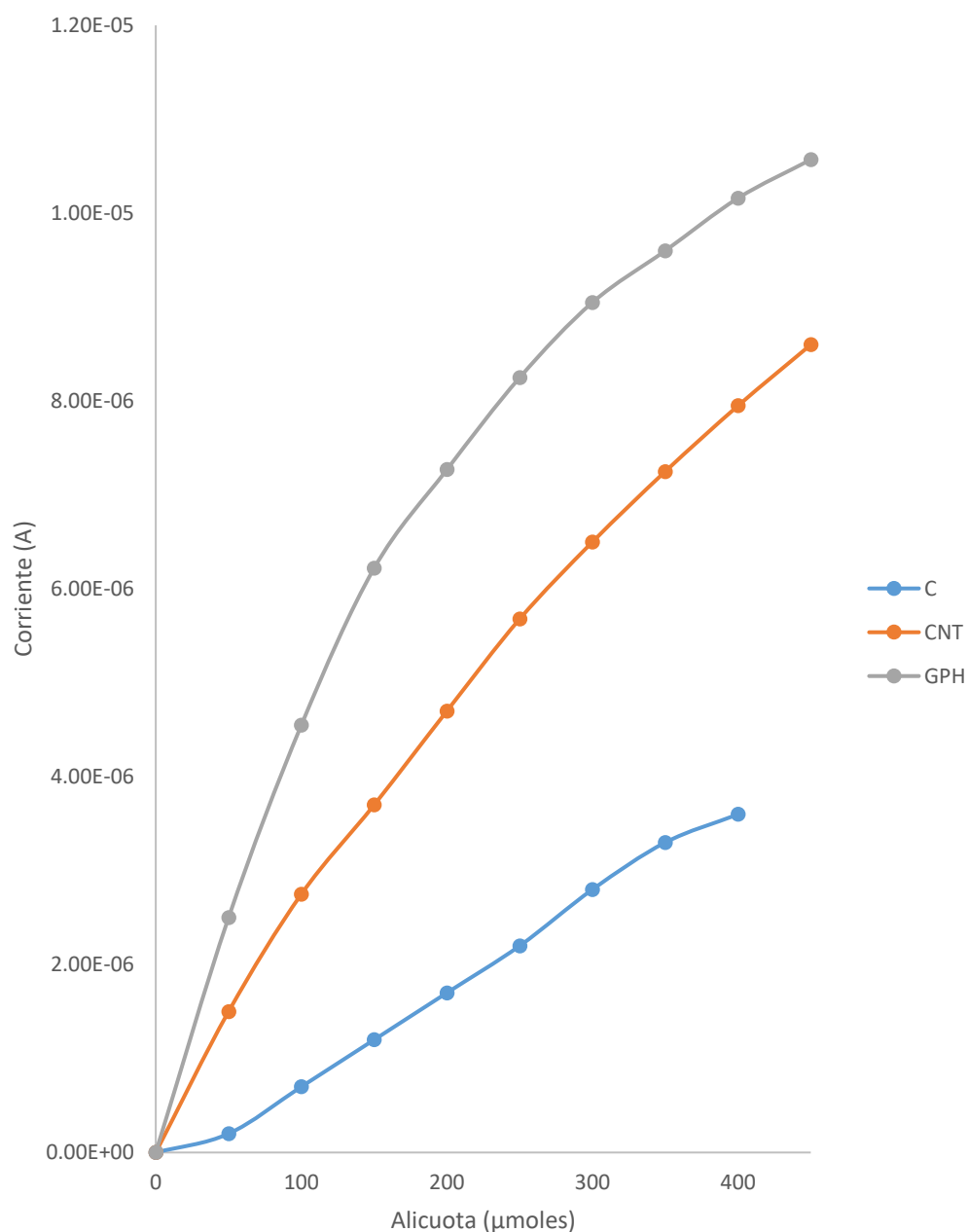


Figura 4.4.2 Curvas de calibración de los tres electrodos serigrafados siendo: C de carbono, CNT de nanotubos de carbono con nanopartículas de oro y GPH de grafeno con nanopartículas de oro.

El análisis se realizará con el mismo método que se utilizó para la optimización del pH y temperatura, usando el escalamiento de la relación lineal entre corriente – concentración, utilizando la región lineal de las curvas de calibración, la pendiente obtenida será nuestro coeficiente de sensibilidad.

Para realizar el análisis numérico se realizó la regresión mediante MATLAB®, usando una regresión de primer orden.

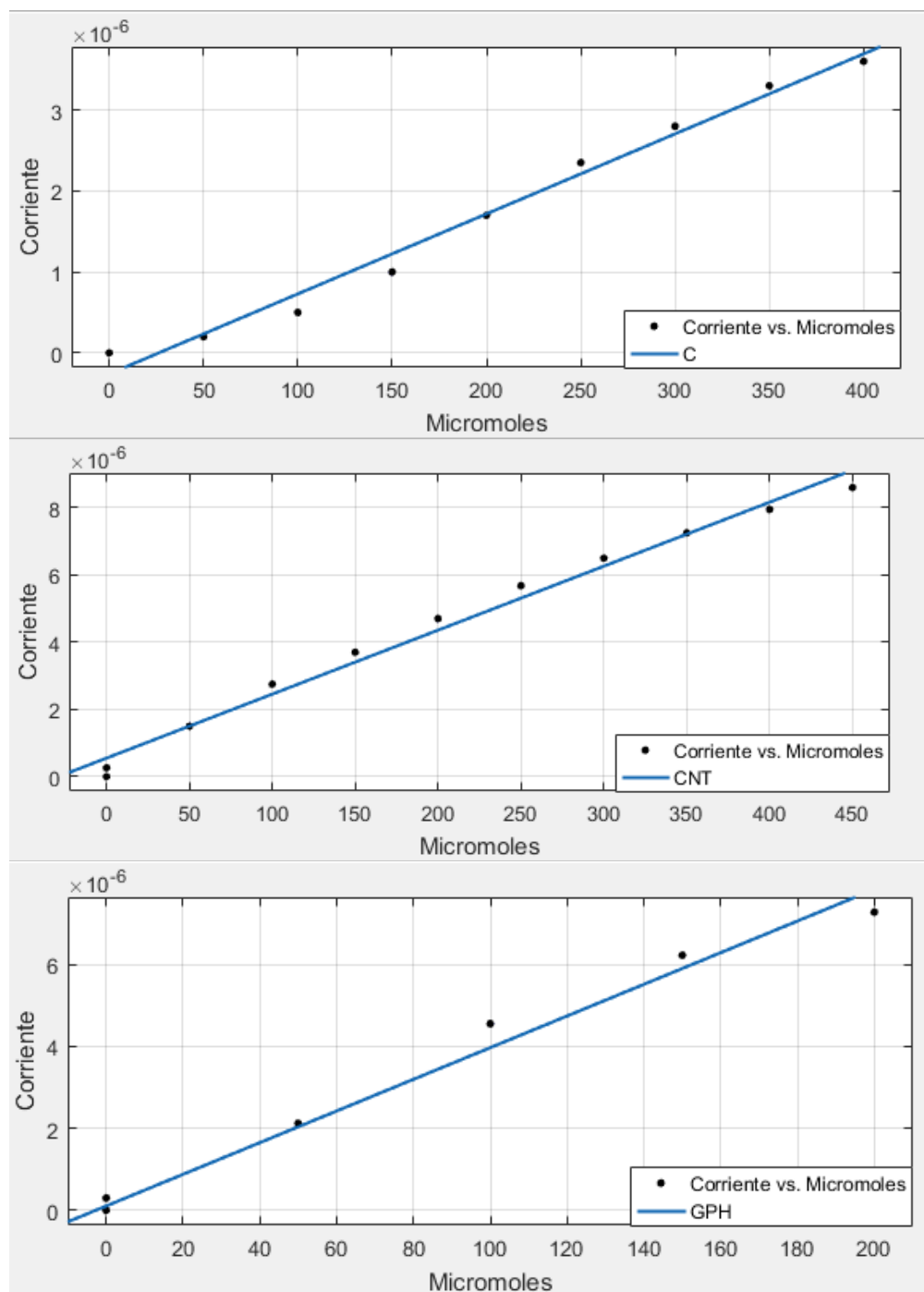


Figura 4.4.3 Ajuste de las curvas de calibración para obtener la sensibilidad de cada uno de los electrodos.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

A base de la figura 4.4.3 se obtienen las respectivas pendientes que muestran la sensibilidad de los electrodos.

Tabla 4.4.1 Ajuste de las curvas de calibración para obtener la sensibilidad de cada uno de los electrodos.

Electrodo serigrafiado	Sensibilidad ($\mu\text{A L}$	
	$\text{cm}^{-2} \text{mmol}^{-1}$)	R^2
Carbono	9.83	0.9853
Nanotubos de carbono con nanopartículas de oro	19.04	0.9872
Grafeno con nanopartículas de oro	38.61	0.989

Como lo muestra la tabla 4.4.1, se corrobora mediante el coeficiente de sensibilidad que el electrodo de grafeno con nanopartículas de oro es el más sensible a los cambios de concentración de dopamina debido a la reacción electroquímica que ocurre en la microcelda; siguiendo el electrodo de nanotubos de carbono con nanopartículas de oro y al final el de carbono.

4.5 Límite de detección e intervalo dinámico lineal

Se realizaron los cálculos de estos valores mediante herramientas estadísticas de Excel[®], primeramente, determinando la desviación estándar del blanco para después aplicar la fórmula mencionada en el apartado 3.5 con el objetivo de la obtención del límite de detección; que menciona el valor más pequeño que se puede detectar con ese electrodo por medio de amperometría.

Los valores obtenidos se concentrarán en la tabla 4.5.1.

Tabla 4.5.1. Intervalo dinámico lineal y límite de detección para cada uno de los electrodos serigrafiados

Electrodo serigrafiado	Intervalo dinámico		LOD
	lineal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	R²	($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Carbono	0.5 - 400	0.9901	0.5
Nanotubos de carbono con nanopartículas de oro	0.35 – 300	0.9909	0.35
Grafeno con nanopartículas de oro	0.25 - 150	0.992	0.25

Conclusiones

Los resultados obtenidos mediante los electrodos serigrafiados con la enzima tirosinasa inmovilizada mediante PVA – AWP para la determinación de dopamina fueron favorables, mostrado mediante diversos parámetros como el coeficiente de transferencia heterogénea de electrones, el área real efectiva de los electrodos serigrafiados y la sensibilidad que presentan los electrodos modificados. Se les atribuyen estas ventajas a las modificaciones presentadas en la superficie de cada uno, claramente el aumento del área influye en la actividad electrocatalítica y sus propiedades, siendo un método que muestra una sensibilidad apreciable con una gran aplicación; mostrando un límite de detección de $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para el electrodo de carbono, $0.35 \mu\text{mol L}^{-1}$ para el de nanotubos de carbono con nanopartículas de oro y de $0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$ para el de grafeno con nanopartículas de oro.

Se cumplió con el objetivo de desarrollar un método de inmovilización de la enzima mediante el medio PVA – AWP sobre los electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas para utilización en biosensores; aplicándolo en la determinación de dopamina. Al obtener el pH óptimo y la temperatura óptima se proponen las condiciones óptimas para las determinaciones de dopamina con tirosinasa inmovilizada en la superficie de los electrodos.

La hipótesis de investigación planteada se cumple, haciendo de este método una innovación a las determinaciones convencionales de compuestos fenólicos; resultando en una determinación práctica, sencilla, de bajo costo y con equipo sencillo.

Recomendaciones

Como recomendación queda realizar la determinación del espesor de la capa de inmovilizado; es un factor que influye en el coeficiente de difusión, siendo un obstáculo para la difusión libre mientras más espesor tenga. Existen diversos métodos para la determinación de la medida del espesor, siendo uno sencillo sumergir el electrodo en un aceite mineral para realizar un contraste óptico, se utilizan imágenes digitales donde se estima el espesor de la capa utilizando el diámetro del cuerpo del electrodo, en el caso de los electrodos utilizados aquí, al espesor de la capa de plástico como referencia.

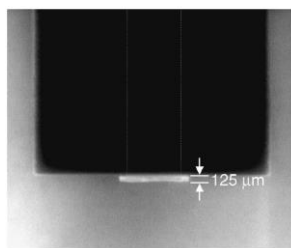


Figura 5.1 Vista lateral de un electrodo con una capa de quitosano como medio de inmovilización, su espesor es de 125 micrómetros.

El análisis no se pudo realizar debido a la falta del equipo para la toma de la imagen digital, sin embargo, queda presente para investigaciones futuras y un mejor acercamiento a la optimización de la inmovilización.

Un ensayo sugerente para futuras investigaciones para la determinación de dopamina es realizarlo en presencia de ácido ascórbico y ácido úrico; observando como la interferencia disminuye por utilizar un método selectivo al usar un biosensor para sustituir al ensayo electroquímico convencional.

Referencias

- [1] A. Carlsson, "Evidence for a role of dopamine in extrapyramidal functions," *Journal of Neural Transmission*, vol. 26, no. 4, pp. 484–493, 1964.
- [2] M. D. Gahete, J. Córdoba-Chacón, R. D. Kineman, R. M. Luque, and J. P. Castaño, "Role of ghrelin system in neuroprotection and cognitive functions: Implications in Alzheimer's disease," *Peptides*, vol. 32, no. 11, pp. 2225–2228, Nov. 2011.
- [3] L. Tran and T. Ha-Duong, "Exploring the Alzheimer amyloid- β peptide conformational ensemble: A review of molecular dynamics approaches," *Peptides*, vol. 69, pp. 86–91, Jul. 2015.
- [4] A. J. Cross, T. J. Crow, E. K. Perry, R. H. Perry, G. Blessed, and B. E. Tomlinson, "Reduced dopamine-beta-hydroxylase activity in Alzheimer's disease," *British medical journal (Clinical research ed.)*, vol. 282, no. 6258, p. 93, 1981.
- [5] P. K. Thanos, R. Kim, F. Delis, M. J. Rocco, J. Cho, and N. D. Volkow, "Effects of chronic methamphetamine on psychomotor and cognitive functions and dopamine signaling in the brain," *Behavioural Brain Research*, vol. 320, pp. 282–290, Mar. 2017.
- [6] A. R. Gallucci and R. J. Martin, "Misuse of prescription stimulant medication in a sample of college students: Examining differences between varsity athletes and non-athletes," *Addictive Behaviors*, vol. 51, pp. 44–50, Dec. 2015.
- [7] E. V. Gurevich, R. R. Gainetdinov, and V. V. Gurevich, "G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions," *Pharmacological Research*, vol. 111, pp. 1–16, Sep. 2016.
- [8] M. H. Nezhad, J. Tashkhourian, and J. Khodaveisi, "Sensitive spectrophotometric detection of dopamine, levodopa and adrenaline using surface plasmon resonance

- band of silver nanoparticles,” *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 7, no. 1, pp. S83–S91, 2010.
- [9] K. Jackowska and P. Krysinski, “New trends in the electrochemical sensing of dopamine,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405, no. 11, pp. 3753–3771, Apr. 2013.
- [10] H. Jin, R. Gui, J. Yu, W. Lv, and Z. Wang, “Fabrication strategies, sensing modes and analytical applications of ratiometric electrochemical biosensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 91, pp. 523–537, May 2017.
- [11] C. Medina-Plaza *et al.*, “The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 62, no. 2, pp. 940–947, Jul. 2015.
- [12] H. B. Yildiz, J. Castillo, D. A. Guschin, L. Toppare, and W. Schuhmann, “Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer,” *Microchimica Acta*, vol. 159, no. 1–2, pp. 27–34, Jun. 2007.
- [13] G. Wang, J. Sun, W. Zhang, S. Jiao, and B. Fang, “Simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid with LaFeO₃ nanoparticles modified electrode,” *Microchimica Acta*, vol. 164, no. 3–4, pp. 357–362, Mar. 2009.
- [14] M. Sajid, M. K. Nazal, M. Mansha, A. Alsharaa, S. M. S. Jillani, and C. Basheer, “Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 15–29, Feb. 2016.
- [15] N. Lavanya *et al.*, “Electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and folic acid based on Mn-SnO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 770, pp. 23–32, Jun. 2016.

- [16] F. W. Campbell and R. G. Compton, "The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396, no. 1, pp. 241–259, Jan. 2010.
- [17] J. Du *et al.*, "Simultaneous determination of uric acid and dopamine using a carbon fiber electrode modified by layer-by-layer assembly of graphene and gold nanoparticles," *Gold Bulletin*, vol. 46, no. 3, pp. 137–144, Sep. 2013.
- [18] L. Yang, D. Liu, J. Huang, and T. You, "Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 193, pp. 166–172, Mar. 2014.
- [19] Y. Zhou, H. Zhang, J. Zhang, T. Liu, and W. Tang, "Electrochemically sensitive determination of dopamine and uric acid based on poly (beryllon II)/nanowires-LaPO₄ modified carbon paste electrode," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 182, pp. 610–617, Jun. 2013.
- [20] D. P. Quan, D. P. Tuyen, T. D. Lam, P. T. N. Tram, N. H. Binh, and P. H. Viet, "Electrochemically selective determination of dopamine in the presence of ascorbic and uric acids on the surface of the modified Nafion/single wall carbon nanotube/poly(3-methylthiophene) glassy carbon electrodes," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 88, no. 2, pp. 764–770, Dec. 2011.
- [21] G. P. Rédei, "Tragedy of the Commons," *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, pp. 1987–1988, 2008.
- [22] N. A. Burges, "Enzymes associated with phenols," *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. Pergamon Press, Oxford, 1963.
- [23] C.-T. Chang, W.-L. Chang, J.-C. Hsu, Y. Shih, and S.-T. Chou, "Chemical composition and tyrosinase inhibitory activity of Cinnamomum cassia essential oil," *Botanical Studies*, vol. 54, no. 1, p. 10, 2013.

- [24] D.-M. Liu, J.-L. Yang, W. Ha, J. Chen, and Y.-P. Shi, "Kinetics and inhibition study of tyrosinase by pressure mediated microanalysis," *Analytical Biochemistry*, vol. 525, pp. 54–59, May 2017.
- [25] R. Yoruk and M. R. Marshall, "Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review¹," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 27, no. 5, pp. 361–422, 2003.
- [26] S. Yabuki and F. Mizutani, "Preparation of amperometric glucose sensor based on electrochemically polymerized films of indole derivatives," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 108, no. 1–2, pp. 651–653, Jul. 2005.
- [27] V. Gaudin, "Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 90, pp. 363–377, Apr. 2017.
- [28] E. A. Songa and J. O. Okonkwo, "Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review," *Talanta*, vol. 155, pp. 289–304, Aug. 2016.
- [29] X. Bo, M. Zhou, and L. Guo, "Electrochemical sensors and biosensors based on less aggregated graphene," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 89, pp. 167–186, Mar. 2017.
- [30] S. Liu, B. Yu, W. Zhang, Y. Zhai, and J. Chen, "Electrochemical performance of Co-containing mixed oxides as oxygen electrode materials for intermediate-temperature solid oxide electrolysis cells," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 41, no. 36, pp. 15952–15959, Sep. 2016.
- [31] A. Hayat and J. Marty, "Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring," *Sensors*, vol. 14, no. 6, pp. 10432–10453, Jun. 2014.

- [32] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnology Advances*, vol. 30, no. 3, pp. 489–511, May 2012.
- [33] C. Queiroz, M. L. Mendes Lopes, E. Fialho, and V. L. Valente-Mesquita, "Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control," *Food Reviews International*, vol. 24, no. 4, pp. 361–375, Sep. 2008.
- [34] S. Herter, M. Schmidt, M. L. Thompson, A. Mikolasch, and F. Schauer, "Study of enzymatic properties of phenol oxidase from nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*," *AMB express*, vol. 1, no. 1, p. 14, 2011.
- [35] J. P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K. C. Honeychurch, and R. M. Pemberton, "Some Recent Designs and Developments of Screen-Printed Carbon Electrochemical Sensors/Biosensors for Biomedical, Environmental, and Industrial Analyses," *Analytical Letters*, vol. 37, no. 5, pp. 789–830, Jan. 2004.
- [36] T. C. Gokoglan *et al.*, "A novel approach for the fabrication of a flexible glucose biosensor: The combination of vertically aligned CNTs and a conjugated polymer," *Food Chemistry*, vol. 220, pp. 299–305, Apr. 2017.
- [37] M. B. G. García and A. C. García, "Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico," *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2010.
- [38] Z. Chu, J. Peng, and W. Jin, "Advanced nanomaterial inks for screen-printed chemical sensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 243, pp. 919–926, May 2017.
- [39] B. K. Shrestha *et al.*, "High-performance glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase immobilized polypyrrole/Nafion/functionalized multi-walled carbon nanotubes bio-nanohybrid film," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 482, pp. 39–47, Nov. 2016.

- [40] C. He *et al.*, "A Highly Sensitive Glucose Biosensor Based on Gold Nanoparticles/Bovine Serum Albumin/Fe₃O₄ Biocomposite Nanoparticles," *Electrochimica Acta*, vol. 222, pp. 1709–1715, Dec. 2016.
- [41] K. Balasubramanian and M. Burghard, "Biosensors based on carbon nanotubes," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 385, no. 3, pp. 452–468, Jun. 2006.
- [42] T. A. Silva *et al.*, "Electrochemical behaviour of vertically aligned carbon nanotubes and graphene oxide nanocomposite as electrode material," *Electrochimica Acta*, vol. 119, pp. 114–119, Feb. 2014.
- [43] B. Pérez-López and A. Merkoçi, "Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences," *Microchimica Acta*, vol. 179, no. 1–2, pp. 1–16, Oct. 2012.
- [44] C. S. Park, H. Yoon, and O. S. Kwon, "Graphene-based nanoelectronic biosensors," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 38, pp. 13–22, Jun. 2016.
- [45] S. Cinti and F. Arduini, "Graphene-based screen-printed electrochemical (bio)sensors and their applications: Efforts and criticisms," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 89, pp. 107–122, Mar. 2017.
- [46] S. Mao, G. Lu, and J. Chen, "Three-dimensional graphene-based composites for energy applications," *Nanoscale*, vol. 7, no. 16, pp. 6924–6943, 2015.
- [47] N. G. Shang *et al.*, "Catalyst-Free Efficient Growth, Orientation and Biosensing Properties of Multilayer Graphene Nanoflake Films with Sharp Edge Planes," *Advanced Functional Materials*, vol. 18, no. 21, pp. 3506–3514, Nov. 2008.
- [48] Z. Taleat, A. Khoshroo, and M. Mazloun-Ardakani, "Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013)," *Microchimica Acta*, vol. 181, no. 9–10, pp. 865–891, Jul. 2014.
- [49] A. Manjón and J. L. Iborra, "Visual Assessment of Enzyme Immobilization," *Immobilization of Enzymes and Cells*, pp. 41–51, 1997.

- [50] M. J. Moehlenbrock and S. D. Minter, "Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization," in *Enzyme Stabilization and Immobilization*, vol. 679, S. D. Minter, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, pp. 1–7.
- [51] B. Elvers, Ed., *Ullmann's reaction engineering: [2 Volume Set]*, 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2013.
- [52] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2013.
- [53] T. Jesionowski, J. Zdzarta, and B. Krajewska, "Enzyme immobilization by adsorption: a review," *Adsorption*, vol. 20, no. 5–6, pp. 801–821, Aug. 2014.
- [54] J. M. Guisan, Ed., *Immobilization of enzymes and cells*, 2nd ed. Totowa, N.J: Humana Press, 2006.
- [55] G. E. A. Awad, A. A. Abd El Aty, A. N. Shehata, M. E. Hassan, and M. M. Elnashar, "Covalent immobilization of microbial naringinase using novel thermally stable biopolymer for hydrolysis of naringin," *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, Jun. 2016.
- [56] Y. Liu and J. Yu, "Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review," *Microchimica Acta*, vol. 183, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2016.
- [57] F. López-Gallego, L. Betancor, A. Hidalgo, C. Mateo, J. M. Guisán, and R. Fernández-Lafuente, "Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: Stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads," *Journal of Biotechnology*, vol. 111, no. 2, pp. 219–227, Jul. 2004.
- [58] N. Durán, M. A. Rosa, A. D'Annibale, and L. Gianfreda, "Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review," *Enzyme and microbial technology*, vol. 31, no. 7, pp. 907–931, 2002.

- [59] D. E. Wong, K. J. Senecal, and J. M. Goddard, "Immobilization of chymotrypsin on hierarchical nylon 6,6 nanofiber improves enzyme performance," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 154, pp. 270–278, Jun. 2017.
- [60] M. V. Sefton, M. H. May, S. Lahooti, and J. E. Babensee, "Making microencapsulation work: conformal coating, immobilization gels and in vivo performance," *Journal of Controlled Release*, vol. 65, no. 1, pp. 173–186, 2000.
- [61] Y. Shoja, A. A. Rafati, and J. Ghodsi, "Enzymatic biosensor based on entrapment of d -amino acid oxidase on gold nanofilm/MWCNTs nanocomposite modified glassy carbon electrode by sol-gel network: Analytical applications for d -alanine in human serum," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 100, pp. 20–27, May 2017.
- [62] T. Iype *et al.*, "A novel method for immobilization of proteins via entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking," *Analytical Biochemistry*, vol. 519, pp. 42–50, Feb. 2017.
- [63] C. G. Tsiafoulis, M. I. Prodromidis, and M. I. Karayannis, "Development of an amperometric biosensing method for the determination of l-fucose in pretreated urine," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, no. 3, pp. 620–627, Oct. 2004.
- [64] K. Isaka, Y. Kimura, M. Matsuura, T. Osaka, and S. Tsuneda, "First full-scale nitrification-anammox plant using gel entrapment technology for ammonia plant effluent," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 122, pp. 115–122, Jun. 2017.
- [65] T. Laothanachareon, V. Champreda, P. Sritongkham, M. Somasundrum, and W. Surareungchai, "Cross-linked enzyme crystals of organophosphate hydrolase for electrochemical detection of organophosphorus compounds," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 12, pp. 3049–3055, Dec. 2008.
- [66] A. G. Savelyev *et al.*, "Flavin mononucleotide photoinitiated cross-linking of hydrogels: Polymer concentration threshold of strengthening," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 341, pp. 108–114, May 2017.

- [67] A. Avramescu, S. Andreescu, T. Noguer, C. Bala, D. Andreescu, and J.-L. Marty, "Biosensors designed for environmental and food quality control based on screen-printed graphite electrodes with different configurations," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 374, no. 1, pp. 25–32, Sep. 2002.
- [68] N. Ishizuka, Y. Hashimoto, Y. Matsuo, and K. Ijro, "Highly expansive DNA hydrogel films prepared with photocrosslinkable poly(vinyl alcohol)," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 284–285, pp. 440–443, Aug. 2006.
- [69] A. Sassolas, A. Hayat, and J.-L. Marty, "Enzyme Immobilization by Entrapment Within a Gel Network," in *Immobilization of Enzymes and Cells*, vol. 1051, J. M. Guisan, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 229–239.
- [70] H. Bai, J. Xu, Y. Zhang, X. Liu, and O. J. Rojas, "Dynamics of cyclodimerization and viscoelasticity of photo-crosslinkable PVA," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 53, no. 5, pp. 345–355, Mar. 2015.
- [71] M. Campas, D. Szydłowska, M. Trojanowicz, and J. Marty, "Enzyme inhibition-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria," *Talanta*, vol. 72, no. 1, pp. 179–186, Apr. 2007.
- [72] B. Gao, T. Konno, and K. Ishihara, "Building cell-containing multilayered phospholipid polymer hydrogels for controlling the diffusion of a bioactive reagent," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 55, pp. 44408–44415, 2015.
- [73] S. Kurbanoglu, S. A. Ozkan, and A. Merkoçi, "Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 89, pp. 886–898, Mar. 2017.
- [74] D. A. Skoog, *Fundamentals of analytical chemistry*, 9th Ed. Belmont, CA: Cengage - Brooks/Cole, 2012.

- [75] F. Wachholz, K. Biała, M. Piekarz, and G.-U. Flechsig, "Temperature pulse modulated amperometry at compact electrochemical sensors," *Electrochemistry Communications*, vol. 9, no. 9, pp. 2346–2352, Sep. 2007.
- [76] D. A. Skoog, F. J. Holler, and T. A. Nieman, *Principles of instrumental analysis*, 5th ed. Philadelphia : Orlando, Fla: Saunders College Pub. ; Harcourt Brace College Publishers, 1998.
- [77] F. García-Molina, J. L. Muñoz, R. Varón, J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, and J. Tudela, "A Review on Spectrophotometric Methods for Measuring the Monophenolase and Diphenolase Activities of Tyrosinase," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 24, pp. 9739–9749, Nov. 2007.
- [78] H. Bisswanger, *Enzyme kinetics: principles and methods*. Weinheim (Federal Republic of Germany): WILEY-VCH, 2002.
- [79] M. Stoytcheva *et al.*, "PVA-AWP/tyrosinase functionalized screen-printed electrodes for dopamine determination," *Anal. Methods*, vol. 8, no. 26, pp. 5197–5203, 2016.
- [80] F. C. Vicentini, B. C. Janegitz, C. M. A. Brett, and O. Fatibello-Filho, "Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 188, pp. 1101–1108, Nov. 2013.
- [81] I. Lavagnini, R. Antiochia, and F. Magno, "An Extended Method for the Practical Evaluation of the Standard Rate Constant from Cyclic Voltammetric Data," *Electroanalysis*, vol. 16, no. 6, pp. 505–506, Apr. 2004.
- [82] R. Martí and G. Reinelt, *The Linear Ordering Problem*, vol. 175. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [83] T. A. El-Mihoub, A. A. Hopgood, L. Nolle, and A. Battersby, "Hybrid Genetic Algorithms: A Review.," *Engineering Letters*, vol. 13, no. 2, pp. 124–137, 2006.



AMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.
La Ingeniería Química en el Desarrollo Sostenible de Nuevos Procesos y Productos

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Alan Gabriel Ayala Bautista, Margarita Stilianova Stoytcheva, Roumen Zlatev Koytchev

Por la presentación del trabajo:

Determinación de Parámetros Óptimos para la Actividad de Tirosinasa con Sustrato
Fenólico en Ensayos Electroquímicos

ID: 149

XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México, del 9 al 12 de mayo de 2017


Dr. Mauricio Sales Cruz
PRESIDENTE DE AMIDIQ




Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO



Cite this: *Anal. Methods*, 2016, 8, 5197

PVA-AWP/tyrosinase functionalized screen-printed electrodes for dopamine determination†

M. Stoytcheva,^{a*} R. Zlatev,^a F. F. Gonzalez Navarro,^a Z. Velkova,^{bc} V. Gochev,^d G. Montero,^a A. G. Ayala Bautista^a and L. Toscano-Palomar^e

The development of highly sensitive amperometric biosensors for dopamine determination using commercially available SPEs in combination with the PVA-AWP photopolymer as the enzyme immobilization matrix is described in this work. This research focuses on (i) the optimization of the conditions for SPE biofunctionalization by tyrosinase entrapment in PVA-AWP and of the working conditions for dopamine determination by mathematical model application, and (ii) the evaluation of the analytical performances of the PVA-AWP/tyrosinase functionalized SPEs. Dopamine determination under optimum conditions for electrode biofunctionalization (PVA-AWP 3%, 60 min UV light exposure) and under optimum working conditions (pH 6.5, 25 °C) was performed in the dynamic concentration range of 0.9–500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0.2–400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and 0.03–150 $\mu\text{mol L}^{-1}$, using respectively C SPE, MWCNT-GNP/C SPE, and graphene-GNP/C SPE. The LOD was found to be 300 nmol L^{-1} , 60 nmol L^{-1} , and as low as 10 nmol L^{-1} , correspondingly. The excellent analytical performances of the graphene-GNP/C SPE and MWCNT-GNP/C SPE were associated with their large active area (19.72 mm² and 15.3 mm²) and enhanced electrocatalytic properties ($k^0 = 8.1 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ and $4.4 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$) compared with the bare C SPE (12.47 mm² and $k^0 = 3.0 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$). The developed biosensors were stable, reproducible, and more sensitive than most of the known biosensors for dopamine determination. They were successfully applied for dopamine determination in injections. Taking into consideration the fact that the selected enzyme immobilization approach using a water-soluble photopolymer opens the possibility of SPE biofunctionalization by photolithography, the developed biosensors are promising for fast, simple, sensitive, selective, and cost effective analysis of dopamine.

Received 16th May 2016

Accepted 6th June 2016

DOI: 10.1039/c6ay01395c

www.rsc.org/methods

Introduction

Dopamine (DA) is a naturally occurring chemical substance synthesized by some plants, multicellular animals, and human beings. Its IUPAC name, 4-(2-aminoethyl)benzene-1,2-diol, derived from its chemical structure, demonstrates that it could be classified as a catecholamine, but also as a substituted phenethylamine. Like other members of these groups of compounds, dopamine acts as a neurotransmitter and could be used as a psychoactive drug. It is typically involved in the motor control, the reward-motivated behaviour, and the related

disorders such as Parkinson's disease and drug addiction.¹ Furthermore, dopamine activity alteration implicates schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder.¹ Dopamine is also responsible for the cardiovascular, renal, and hormonal regulation and it is used in the treatment of severe low blood pressure, slow heart rate, cardiac arrest, and renal failure.² Thus, the clinical and therapeutic importance of dopamine motivated the development of a number of analytical methods for its determination, with prevalence of electrochemical methods over chromatographic (HPLC and GC), electrophoretic, and fluorometric methods.^{3,4} The attraction of electrochemical methods resides in the facts that they are more rapid and less expensive compared to the other techniques mentioned above. Additionally, they could be applied for *in situ* and *in vivo* real-time measurements.⁴ Owing to its electroactivity, DA could be directly detected by registering its oxidation current. Nevertheless, the determination suffers from a lack of selectivity in the presence, primarily, of ascorbic and/or uric acid. On the other hand, DA could be quantified without such interferences by using electrochemical biosensors, as DA is an enzyme (tyrosinase or laccase) substrate. The dopamine o-quinone obtained, as a product of the enzyme catalyzed DA

^aAutonomous University of Baja California, Engineering Institute, Mexicali, Mexico.
E-mail: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx

^bMedical University of Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Dep. of Chemical Sciences, Plovdiv, Bulgaria

^cUniversity of Food Technologies, Dep. Inorganic and Physical Chemistry, Plovdiv, Bulgaria

^dPlovdiv University "P. Hilendarski", Dep. Biochemistry and Microbiology, Plovdiv, Bulgaria

^eTechnological Institute of Mexicali, Mexicali, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ay01395c



EL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Y EL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MEXICALI

OTORGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

M.I. ALAN GABRIEL AYALA BAUTISTA

POR SU PARTICIPACIÓN COMO
PONENTE EN MODALIDAD DE CARTEL:
"DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA
LA ACTIVIDAD DE TIROSINASA CON SUSTRATO FENÓLICO
EN ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS",
EN EL "FORO DE INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL 2016",
QUE SE LLEVÓ A CABO EN ESTE INSTITUTO,
LOS DÍAS 9 Y 10 DE NOVIEMBRE DE 2016.

MEXICALI, B.C., A 10 DE NOVIEMBRE DE 2016
"LA TECNOLOGÍA PARA EL BIEN DE LA HUMANIDAD"

M.I. FRANCISCO JAVIER ORTIZ SERRANO

DIRECTOR DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MEXICALI



S.E.P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MEXICALI
DIRECCION
MEXICALI, B.C.

