



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE ALTERNATIVAS
ELECTROANALÍTICAS PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL**

TESIS

que para obtener el grado de

**DOCTORA EN QUÍMICA
(QUÍMICA ANALÍTICA)**

Presenta:

Q. MÓNICA HERNÁNDEZ CRUZ

Director:

DR. CARLOS ANDRÉS GALÁN VIDAL

Mineral de la Reforma, Hidalgo, 2011

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios 1 y 2 del Cuerpo Académico de Química Analítica y Química Física de Soluciones y Superficies (Área Académica de Química) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

El presente trabajo ha sido se ha realizado gracias al financiamiento de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT (Ref 62462).

Mónica Hernández Cruz agradece la beca otorgada por CONACyT (203348).

Publicaciones del presente trabajo:

Desarrollo de sensores potenciométricos para la determinación de colesterol.

Hernández Cruz, M., Galán Vidal, C.A., Álvarez Romero G. A., Ramírez Silva, M.T., Páez Hernández, M.E. Memorias en extenso de XXII Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica 2007. **ISBN 978-970-991-02-2**

Desarrollo de un biosensor amperométrico de colesterol en configuración plana.

Mónica Hernández Cruz, Carlos A. Galán Vidal, Giaan A. Álvarez Romero, M. Teresa Ramírez Silva, M. Elena Páez Hernández, José Luis González Vidal. Memorias en extenso del XXII Congreso Nacional de Química Analítica 2008. **ISBN 978-968-9400-01-1.**

Desarrollo de un biosensor amperométrico de colesterol en configuración plana con TCNQ como mediador.

Hernández Cruz, M., Galán Vidal, C.A., Álvarez Romero G. A., Ramírez Silva, M.T., Páez Hernández, M.E. Memorias en extenso de XXIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica 2009. **ISBN 978-607-9048-01-3**

Desarrollo de un biosensor amperométrico de colesterol en configuración plana.

Mónica Hernández Cruz, Carlos A. Galán Vidal, Giaan A. Álvarez Romero, M. Teresa Ramírez Silva, M. Elena Páez Hernández, José Luis González Vidal. Memorias en extenso XXIII Congreso Nacional de Química Analítica 2010. **ISBN 978-607-9048-01-3.**

Desarrollo de un Biosensor Amperométrico en Configuración plana para la Cuantificación de Colesterol,

Mónica Hernández, Carlos A. Galán*, Giaan A. Álvarez, M. Elena Páez, Información Tecnológica CIT, vol. 22 núm. 6 (Noviembre-Diciembre) 2011.

Development of disposable screen-printing biosensors for sensible determination of free cholesterol: Behavior of two and three electrode configuration and different mediator son working electrode

Mónica Hernández Cruz, Carlos A. Galán Vidal, Giaan A. Álvarez Romero, M. Teresa Ramírez Silva, M. Elena Páez Hernández, José Luis González Vidal, Sometido al Journal of Mexican Chemical Society, 2011

Los avances del presente trabajo han sido presentados en:

Desarrollo de sensores potenciométricos para la determinación de colesterol.

Hernández Cruz, M., Galán Vidal, C.A., Álvarez Romero G. A., Ramírez Silva, M.T., Páez Hernández, M.E. XXII Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica. Pachuca, Hidalgo. 27 Mayo-1° Junio 2007.

Desarrollo de un biosensor amperométrico de colesterol en configuración plana.

Mónica Hernández Cruz, Carlos A. Galán Vidal, Giaan A. Álvarez Romero, M. Teresa Ramírez Silva, M. Elena Páez Hernández, José Luis González Vidal. XXII Congreso Nacional de Química Analítica. Mérida, Yucatán. 23-27 Junio 2008.

Desarrollo de un biosensor amperométrico de colesterol en configuración plana con TCNQ como mediador.

Hernández Cruz, M., Galán Vidal, C.A., Álvarez Romero G. A., Ramírez Silva, M.T., Páez Hernández, M.E. XXIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica. Puerto Vallarta. 30 Junio-2 Julio 2009.

Desarrollo de un biosensor amperométrico de colesterol en configuración plana.

Mónica Hernández Cruz, Carlos A. Galán Vidal, Giaan A. Álvarez Romero, M. Teresa Ramírez Silva, M. Elena Páez Hernández, José Luis González Vidal. XXIII Congreso Nacional de Química Analítica. Acapulco, Guerrero. 30 Junio-2 Julio 2010.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Son muchas personas especiales a la que me gustaría agradecer su amistad, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo, otras en mi recuerdo y en el corazón. Sin importar donde estén si algún o si algún día llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

A mi hija a quien amo, por haber cedido todo su tiempo. Solo puedo decir que te quiero mucho.

A Carlos, por guiarme en todo momento, por todo lo que he aprendido y su apoyo incondicional. Quiero que sepas que ocupas un lugar muy especial y decirte te quiero mucho.

Mama y mi abuela Cata, no me equivoco por decir que eres la mejor mama, gracias por todo tu esfuerzo, tu apoyo y confianza que depositaste en mí. Gracias por todo.

Papá, este logro que quiero compartir contigo, gracias por ser mi papá y creer en mí. Gracias por todo.

A mis hermanos, mil gracias

A mis sobrinos, aunque todavía no pueden leer algunos de ellos, un día van aprender y por eso también les dedico esta tesis.

A todos mis profes no solo de la carrera si no de la vida, mil gracias porque de alguna manera forman parte de que ahora soy. Especialmente a los cinco que están en esto conmigo: Dr. Galán, Dra. Elena, Dra. Tere, Dr. Giaan. Gracias.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a Irma, Yu, Israel, Chivis, Gaby, Tere, mil gracias por todos los momentos y porque han estado conmigo siempre. Solo puedo decir que son amigos de verdad.

Y al más especial de todos, a ti Señor, por hiciste realidad mi sueño, con todo el amor que me rodeas y porque me tienes en tus manos. Esta tesis es para ti.

A todos mi gran fraternal agradecimientos

Mónica

RESUMEN

El colesterol juega un papel muy importante en la vida de cada ser humano; no sólo por la múltiples funciones que desempeña dentro del organismo, sino porque actualmente el índice de mortalidad relacionado con enfermedades cardiovasculares se ha incrementado como consecuencia de elevados niveles de colesterol en sangre. Sin lugar a dudas, el contenido de colesterol en sangre y en alimentos deber ser constantemente evaluado.

De hace varios años la comunidad científica se ha interesado en la determinación de colesterol y por consiguiente ha diseñado gran variedad de técnicas analíticas que han reportado diversidad características. Entre ellas destacan las técnicas electroanalíticas por su simplicidad y bajo costo.

Considerando que el objetivo principal de este trabajo es desarrollar y caracterizar sensores electroquímicos para la determinación colesterol y cuyo intervalo de detección se ubique al menos entre los niveles normales en suero sanguíneo y sean compatibles con su fabricación en serie y el análisis descentralizado; hemos explorado y desarrollaro diferentes técnicas electroanalíticas para la cuantificación de colesterol.

El presente estudio está organizado en 6 capítulos. El primero presentan los antecedentes relacionados con el las características e importancia del colesterol y las metodologías de se han desarrollado para su cuantificación; asimismo, se presentan los objetivos de este trabajo. En el capítulo 2 se reportan los estudios realizados durante el desarrollo de un sensor potenciométrico. Por otra parte en el capítulo 3 se presentan y discuten los resultados del desarrollo de sensores voltamperométricos. En el capítulo 4 se discuten los principales resultados respecto al desarrollo de biosensores amperométricos de colesterol en configuración cilíndrica. Finalmente, en el capítulo 5 se muestran los resultados del desarrollo de biosensores amperométricos en configuración plana utilizando diversos mediadores para reducir interferencias e incrementar la sensibilidad. Las principales conclusiones y proyecciones del trabajo son reunidas en el capítulo 6.

CONTENIDO

CAPÍTULO	1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	
	1.1. Generalidades del colesterol	2
	1.1.1. Química del colesterol	2
	1.1.2. Importancia del colesterol	4
	1.1.2.1. Función	4
	1.1.2.2. Metabolismo	5
	1.1.2.3. Fuentes	7
	1.1.2.4. Importancia	7
	1.2. Métodos analíticos para cuantificar colesterol.	8
	1.3. Métodos electroquímicos para la cuantificación de colesterol	10
	1.3.1. Determinación voltamperométrica para colesterol	10
	1.3.2. Biosensores de colesterol	11
	1.4. Objetivos	16
	1.5. Referencias	17
CAPÍTULO	2. SENSORES POTENCIOMÉTRICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL.	
	2.1 Introducción	24
	2.2 Metodología	28
	2.2.1 Equipo, Reactivos y soluciones.	28
	2.2.1.1 Equipo	28
	2.2.1.2 Reactivos y soluciones	28
	2.2.2 Construcción de electrodos	29
	2.3 Resultados y Discusión	30
	2.3.1 Sensores Potenciométricos de colesterol	31
	2.3.1.1 Interferencias	34
	2.3.1.2 Optimización de la variables de la construcción de los electrodos	35
	2.3.1.3 Mecanismo de detección	37
	2.3.2 Electrodo potenciométrico de colesterol basado en la electropolimerización de β -ciclodextrina	40
	2.3.3 Evaluación de electrodos potenciométricos para cuantificar colesterol basados en la interacción del analito con las ciclodextrinas	42
	2.3.4 Electrodo potenciométrico de colesterol basado en la electropolimerización de polianilina	44
	2.4 Referencias	46

CAPÍTULO	3. SENSORES VOLTAMPEROMÉTRICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL.	
	3.1 Introducción	49
	3.2 Metodología	51
	3.2.1 Equipo, Reactivos y soluciones.	51
	3.2.1.1 Equipo	51
	3.2.1.2 Reactivos y Reactivos	51
	3.3 Resultados y Discusión	52
	3.3.1 Desarrollo de un sensor voltamperométrico para la cuantificación colesterol basado en la adsorción sobre un electrodo de carbón vítreo	52
	3.3.2 Desarrollo de un sensor polarográfico de colesterol mediante la adsorción de este en un electrodo de mercurio.	54
	3.4 Referencias	56
CAPÍTULO	4. BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO EN CONFIGURACION CONVENCIONAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL	
	4.1 Introducción	59
	4.2 Metodología	61
	4.2.1 Material, Equipo, Reactivos y soluciones.	61
	4.2.1.1 Material	61
	4.2.1.2 Equipo	62
	4.2.1.3 Reactivos y soluciones	62
	4.2.2 Construcción de electrodos	63
	4.2.2.1 Preparación y depósito del composite grafito-epoxi	63
	4.2.2.2 Inmovilización de la enzima	64
	4.3 Resultados y Discusión	65
	4.3.1 Biosensor amperométrico de colesterol utilizando como mediador al ferricianuro de potasio	66
	4.3.1.1 Parámetros analíticos	66
	4.3.1.2 Determinación de la constante de Michaelis-Menten.	67
	4.3.2 Estudio del mediador	68
	4.4 Referencias	70
CAPÍTULO	5 BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO EN CONFIGURACIÓN PLANA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL	
	5.1 Introducción	73
	5.2 Metodología	75
	5.2.1 Material, Equipo, Reactivos y soluciones.	75
	5.2.1.1 Material	75
	5.2.1.2 Equipo	75
	5.2.1.3 Reactivos y soluciones	75
	5.2.2 Construcción de electrodos	76

5.2.2.1	Construcción de biosensores en configuración plana a 2 electrodos (tipo I)	78
5.2.2.2	Construcción de biosensores en configuración plana a 3 electrodos (tipo II)	79
5.2.2.3	Inmovilización de la enzima	81
5.3	Resultados y Discusión	81
5.3.1	Evaluación de la respuesta de los electrodos planos	81
5.3.1.1	Electrodos planos en configuración a 2 electrodos (tipo I)	81
5.3.1.2	Electrodos planos en configuración (tipo II).	84
5.3.1.2.1	Evaluación de la operación transductor plano y de las señales de interferencias	88
5.3.1.3	Electrodos planos a 3 electrodos para equipo DropSens	89
5.3.2	Biosensores amperométricos para la determinación de colesterol utilizando diferentes mediadores	92
5.3.2.1	Biosensor IFECO A (transductor a 2 electrodos, mediador ferricianuro)	92
5.3.2.1.1	Evaluación del comportamiento del biosensor	93
5.3.2.1.2	Parámetros analíticos	94
5.3.2.1.3	Constante de Michaelis-Menten	95
5.3.2.2	Biosensor ITQCO A (transductor a 2 electrodos, mediador TCNQ)	96
5.3.2.2.1	Potencial de trabajo	96
5.3.2.2.2	Comportamiento del biosensor	97
5.3.2.2.3	Parámetros analíticos	98
5.3.2.2.4	Constante de Michaelis Menten	99
5.3.2.3	Biosensores tipo II con TCNQ.	99
5.3.2.3.1.1	Biosensor IITQGLA (transductor a 3 electrodos, mediador TCNQ)	100
5.3.2.3.1.2	Parámetros analíticos	101
5.3.2.3.2	Biosensor tipo IITQCO A (transductor a 3 electrodos, mediador TCNQ)	101
5.3.2.3.2.1	Parámetros analíticos	102
5.3.2.3.2.2	Constante de Michaelis Menten	103
5.3.2.3.2.3	Interferencias	104
5.3.2.4	Transductor tipo II con Azul de Prusia	104
5.3.2.4.1	Evaluación de Azul de Prusia en un electrodo de platino	104
5.3.2.4.2	Evaluación de Azul de Prusia sobre un electrodo de carbón vítreo.	106
5.3.2.4.3	Evaluación de azul de Prusia en un electrodo plano tipo II	108
5.3.2.4.4	Biosensor tipo II utilizando al Azul de Prusia	111
5.3.2.4.4.1	Biosensor tipo IIPBGLA (transductor a 3 electrodos, Azul de Prusia	111

5.3.2.4.4.1.1	Parámetros analíticos	111
5.3.2.4.4.2	Biosensor tipo IIPBCOA (transductor a 3 electrodos, Azul de Prusia)	112
5.3.2.4.4.2.1	Parámetros analíticos	113
5.3.2.4.4.2.2	Constante de Michaelis-Menten	114
5.3.2.5	Biosensor tipo IIFRCOA (transductor a 3 electrodos, Ferrita)	114
5.3.2.5.1	Potencial de trabajo	114
5.3.2.5.2	Parámetros analíticos	116
5.3.2.5.3	Constante de Michaelis-Menten	117
5.3.2.5.4	Interferencias	118
5.4	Conclusiones	118
5.5	Referencias	120
CAPÍTULO 6	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	
6.1	Conclusiones	126
6.2	Proyecciones	128

Capítulo 1

Antecedentes

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1.1 Generalidades del colesterol

1.1.1 Química del colesterol

El colesterol es uno de los esteroides más importantes en la naturaleza; posee un grupo hidroxilo en el anillo A, un doble enlace en el anillo B y una cadena carbonada unida al anillo D (Fig.1.1). La molécula de colesterol tiene una región no polar (anillos fusionados y cadenas carbonadas) y una cabeza polar (grupo –OH), siendo esta última la posición químicamente más reactiva y que en suero sanguíneo se encuentra esterificada entre un 70 y 80%. La fórmula química del colesterol se representa de dos formas $C_{27}H_{46}O$ y $C_{27}H_{46}OH$ [Bohinski, 1998; Solomons, 2000].

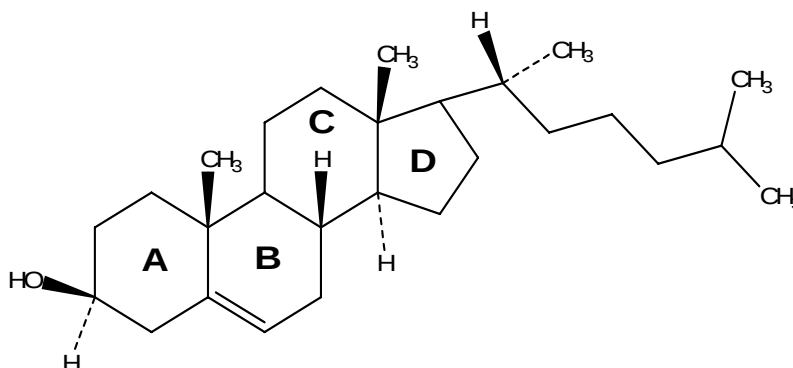


Figura 1.1 Estructura del colesterol

El colesterol es un esteroide de origen animal, sólido a temperatura ambiente y que se caracteriza por ser una sustancia blanda y grasosa. Es una molécula tan hidrofóbica que su solubilidad como especie libre en agua es de tan sólo 10^{-8} M; sin embargo, es muy soluble en disolventes no polares como la acetona [Buehler, 2002]. Debido a la

gran insolubilidad del colesterol en agua, su transporte en la sangre sólo es posible mediante las lipoproteínas.

El colesterol se identificó por primera vez en los cálculos de la vesícula biliar a principios del siglo XIX por Salkowski, de aquí su nombre que proviene del griego chole (bilis) y stereos (sólido) [Cid, 2007].

La biosíntesis del colesterol se efectúa en el retículo endoplasmático liso de los animales vertebrados. Este proceso consiste de diversas etapas que fueron descubiertas en 1940 por Konrad Bloch en la Universidad de Harvard [Boyer, 2000]. La síntesis comienza con la producción de mevalonato a partir de tres moléculas de acetil CoA con la posterior formación del isopreno (2-metil-2,3 butadieno, Fig. 1.2) de la cual se deriva la molécula de colesterol.

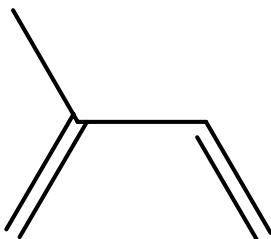


Figura 1.2 Estructura del isopreno.

Para sintetizar el sistema de anillos fusionados, se combinan seis bloques de isopreno para dar origen al escualeno que tras la acción de la enzima escualeno monooxigenasa y otras reacciones adicionales, genera el lanosterol.

El lanosterol, para transformarse en colesterol, necesita de aproximadamente veinte etapas catalizadas por diversas enzimas que favorecen la pérdida de grupos metilo y el reacomodo de dobles enlaces (Fig. 1.3).

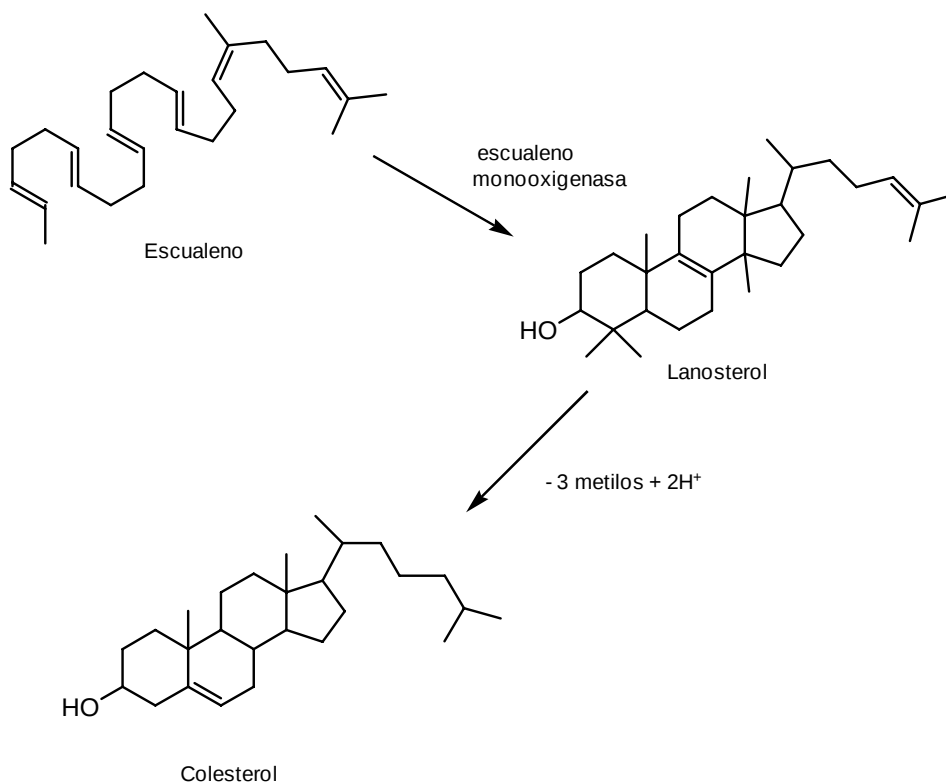


Figura 1.3. Biosíntesis del colesterol

1.1.2 Importancia del colesterol

El colesterol es una molécula compleja e importante que se ha asociado a los peores riesgos cardiovasculares por la formación de ateromas o placas aterogénicas en los vasos sanguíneos. Si bien esto es verdad, hay que tener presente también la importancia biológica que posee en el metabolismo y en el mantenimiento de nuestra salud [Cid, 2007; Henry, 1990].

1.1.2.1 Función

El colesterol y los ésteres del colesterol abundan en un tipo específico de proteínas plasmáticas denominadas lipoproteínas, cuya función es transportar las diversas grasas en el organismo a tejidos corporales; especialmente triglicéridos y colesterol. Las lipoproteínas se clasifican según su densidad en:

Lipoproteínas de baja densidad: (Low Density Lipoprotein, LDL). Es la principal responsable de transportar al colesterol desde su lugar de origen que es el hígado hacia los tejidos periféricos. Contienen más grasa que proteína, por lo que popularmente se consideran como “colesterol malo”, ya que son susceptibles de depositarse en las paredes de los vasos sanguíneos; provocando la aterosclerosis y dificultando el bombeo de la sangre del corazón al cuerpo.

Lipoproteínas de alta densidad: (High Density Lipoprotein, HDL). Al igual que LDL transportan el mismo colesterol pero en sentido opuesto (del tejido periférico hacia al hígado); así al viajar por el torrente sanguíneo atrapan el exceso de colesterol y lo llevan al hígado donde es excretado por el organismo, por esta razón se ha considerado como “colesterol bueno” y consecuentemente es importante consumir alimentos que mantengan un buen nivel de HDL en nuestra sangre [Boyer, 2000].

El colesterol presenta una función estructural muy importante que lo hace imprescindible para la vida. Forma parte de las membranas plasmáticas de los animales regulando sus propiedades físico químicas y particularmente el transporte de nutrientes y desechos; se encuentra en una proporción 1:1 con relación a los fosfolípidos [Krause, 1975; Tudela, 2002]. Además de esta función estructural, el colesterol participa como precursor de diversas moléculas que regulan el metabolismo como hormonas, vitaminas y sales biliares.

1.1.2.2. Metabolismo

A partir del colesterol el organismo sintetiza diversas biomoléculas que coadyuvan a regular el metabolismo [Bohinski, 1998] (Fig. 1.4).

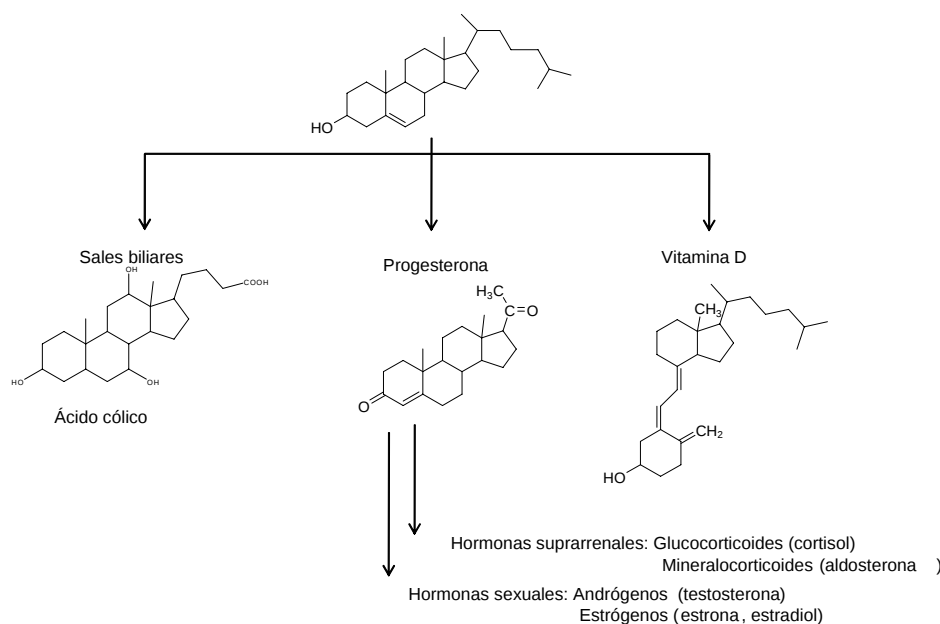


Figura 1.4 Rutas biosintéticas que inician con colesterol para generar estructuras importantes en el metabolismo.

Las biomoléculas más importantes que se sintetizan a partir de colesterol son las siguientes:

- * *Vitamina D*: Esencial en el metabolismo del calcio y fósforo; un déficit de la vitamina ocasiona raquitismo en los niños y en los adultos (fragilidad en los huesos).
- * *Sales biliares*: Esenciales en la absorción de algunos nutrientes lipídicos. Las sales biliares se producen en el hígado, se almacenan en la vesícula biliar y se secretan en el intestino para ayudar a solubilizar, digerir y absorber las grasas de la dieta. El principal ácido biliar es el ácido cólico.

Por otra parte, existen cinco hormonas esteroideas; tres hormonas sexuales (progesterona, andrógenos y estrógenos) y dos hormonas suprarrenales ó corticoides (mineralocorticoides y glucocorticoides) cuya biosíntesis inicia a partir del colesterol.

- * *Progesterona*. Regula los cambios fisiológicos del embarazo
- * *Andrógenos*. Promueven el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos

- * *Estrógenos*. Dan lugar al desarrollo de los caracteres sexuales femeninos
- * *Mineralocorticoides*. Regulan la adsorción de Na^+ , Cl^- , y HCO_3^- en los riñones
- * *Glucocorticoides*. Influye en el metabolismo al promover la gluconeogénesis, la formación del glucógeno y la degradación de grasa.

1.1.2.3. Fuentes

El ser humano obtiene el colesterol a través de dos vías [Cid, 2007; Xu, 2002]:

- Vía exógena. El colesterol que se ingiere a través de los alimentos de origen animal, como los sesos, la yema de huevo, leche, camarones, carnes rojas, entre otros alimentos que son ricos en grasas.
- Vía endógena. Es el colesterol sintetizado por el hígado. Diariamente el organismo produce entre 800 y 1000 mg de colesterol [Bohinski, 1998], producción que depende de factores hereditarios por lo que algunas personas pueden producir más colesterol que otras.

1.1.2.4. Importancia

Todos los seres humanos en su organismo tienen colesterol en mayor o menor proporción, ya que es imprescindible para mantener las funciones vitales. Así, el organismo sintetiza todo el colesterol que requiere y en realidad no sería necesario adquirirlo en la dieta. Algunas personas producen exceso de colesterol por causas hereditarias, pero la mayoría de la gente que presenta altos niveles de colesterol en sangre, es debido a su dieta.

Los alimentos contribuyen a aumentar el nivel de colesterol total, debido a que a través de ellos se ingieren grasas saturadas e insaturadas. Las grasas saturadas son la principal causa de que el colesterol aumente, éstas se encuentran principalmente en los alimentos que provienen de los animales como: leche, mantequilla, huevo, sesos y mariscos entre otros.

Las grasas insaturadas también contribuyen a aumentar el colesterol total; estas se encuentra en las grasas trans que son el resultado de añadir hidrógeno a los aceites vegetales.

Pese a que el colesterol es necesario, su incremento provoca reacciones adversas en la salud. Los niveles normales de colesterol en sangre se muestran en la Tabla 1.1. Su exceso se denomina hipercolesterolemia [Henry, 1990; Enciclopedia Encarta, 2010].

Tabla 1.1. Concentración de colesterol en sangre

Nivel	Concentración mg dL⁻¹ (mM)
Normal	< 200 (3.9)
Moderado	200-239 (3.9-6.5)
Alto	> 240 (6.5)

Los niveles de colesterol en la sangre han recibido mucha atención, ya que se ha identificado como un factor en la aparición de enfermedades del corazón como la aterosclerosis, infartos cardíacos y cerebrales, embolias e hipertensión entre otras. En estas enfermedades, las placas que contienen colesterol se depositan en las paredes de las arterias, en especial en las de pequeño y mediano tamaño, reduciendo su diámetro interior y el flujo de sangre. El cierre total de las arterias coronarias, por ejemplo, provoca un ataque al corazón [Tudela, 2002].

1.2. Métodos analíticos para cuantificación de colesterol

Debido a los conocidos riesgos a la salud que trae consigo el aumento del nivel colesterol, es de suma importancia cuantificarlo en alimentos y/o en plasma sanguíneo.

En la actualidad existen diversos métodos de análisis para la detección de colesterol y en muchos de los casos para cuantificarlo. En la literatura científica, se reportan métodos colorimétricos, espectrofotométricos, enzimáticos, fluorométricos,

electroforesis capilar y métodos electroquímicos principalmente [Zak, 1977; Ruizgutierrez, 1995; Hoving, 1995; Richmond, 1992; Johg, 1990 Xu., 2002].

En el año 1910 se desarrolló el primer método para la determinación de colesterol, el cual consiste en un proceso gravimétrico desarrollado por Windaus [Zak, 1977] En el mismo año Schoenheimer-Sperry tomaron como referencia dicho trabajo y crearon el primer método colorimétrico a micro escala [Shoenheimer, 1934; Sturges 1938]; no obstante, hoy en día se ha demostrado que son metodologías poco eficientes y cualitativas, aunque son pruebas muy rápidas. Poco tiempo después se desarrolló la reacción de Liebermann-Buchard que es uno de los métodos de amplio uso en el que se realiza la detección cuantitativa de colesterol y esteres de colesterol mediante una reacción con ácido acético y ácido sulfúrico en medio con cloroformo [Burke, 1974].

Por otra parte, las técnicas cromatográficas han resultado ser buen método para la cuantificación de colesterol [Ruizgutierrez, 1995; Hoving, 1995; Richmond, 1992]. Actualmente se están implementando métodos por electroforesis capilar, con la ventaja de fácil operación y reducción de volumen, trayendo consigo un menor tiempo de análisis [Thiam, 2000].

Los métodos enzimáticos han destacado por su aplicación dentro de la medicina, sobre todo en la determinación de compuestos fisiológicos, ya que los métodos convencionales adolecen de baja sensibilidad y selectividad; así como de facilidad de manejo.

Aunque las técnicas enzimáticas han representado un importante avance en la cuantificación de colesterol, su uso no está exento de ciertas desventajas como: un largo tiempo análisis, grandes cantidades de muestra, alto costo, necesidad de personal capacitado para el manejo de los equipos y no son aplicables en campo. En este sentido, el desarrollo de técnicas electroquímicas es una alternativa para superar algunas de estas desventajas sin sacrificar la confiabilidad con respecto a otros poderosos métodos instrumentales de análisis.

Considerando las interesantes ventajas de contar con métodos electroquímicos de cuantificación de colesterol; particularmente la posibilidad de aplicarlas en análisis de campo, se han reportado diversas técnicas, el objetivo de estudio en el presente trabajo.

1.3 Métodos electroquímicos para la cuantificación de colesterol

La instrumentación electroquímica es significativamente más económica y compacta que en otros métodos instrumentales de análisis; así, es posible hacer análisis de campo superando algunas de las desventajas de otras técnicas sin sacrificar la fiabilidad con respecto a los poderosos métodos instrumentales de análisis.[Vikas, 2008]. Entre los métodos electroquímicos reportados para la cuantificación de colesterol destacan los sensores y biosensores electroquímicos.

1.3.1 Determinación voltamperométrica para colesterol

La voltamperometría es una de las técnicas electroquímicas que en la actualidad se ha utilizado para la determinación de colesterol sin el uso de enzimas.

Estas técnicas se basan en diferentes modos de detección del colesterol, una de ellas se basa en oxidación de ferrocianuro que es parcialmente impedida por la adsorción de colesterol, aunque no se mide eficientemente el analito y la selectividad está comprometida [Pilesky, 1999; Chou, 2005; Hosokawaa 2009]. Otra forma de detección reportada consiste en la oxidación directa del colesterol en ácido acético glacial sobre un electrodo de platino; no obstante, esta técnica no es viable para la cuantificación de colesterol en muestras biológicas [Kowalksi, 2005].

Asimismo, la determinación directa de colesterol basada en la voltamperometría de redisolución anódica es otra técnica voltamperométrica basada en la adsorción de colesterol sobre la gota de mercurio y su posterior oxidación mediante la aplicación de un barrido de potencial. En este caso el intervalo de concentración de trabajo es reducido y se trabaja en un medio etanol-agua [Peng, 1992].

No obstante los esfuerzos voltamperométricos para cuantificar colesterol sin enzimas, la mayoría de los sensores electroquímicos pertenecen al grupo de los biosensores [Ayra, 2007; Vikas 2007].

1.3.2 Biosensores de colesterol

Una definición clásica de sensor químico es la de “pequeño dispositivo que como resultado de una interacción química entre el analito y el sensor, transforma información química o bioquímica de tipo cuali o cuantitativo en una señal medible y útil analíticamente” [Stetter, 2003]. El sensor químico está constituido por un elemento de reconocimiento químico o receptor que se encuentra inmovilizado sobre un transductor. Algunos sensores químicos pueden incluir en su configuración una estructura adicional entre la muestra y el receptor, por ejemplo, una membrana semipermeable (Fig. 1.5).

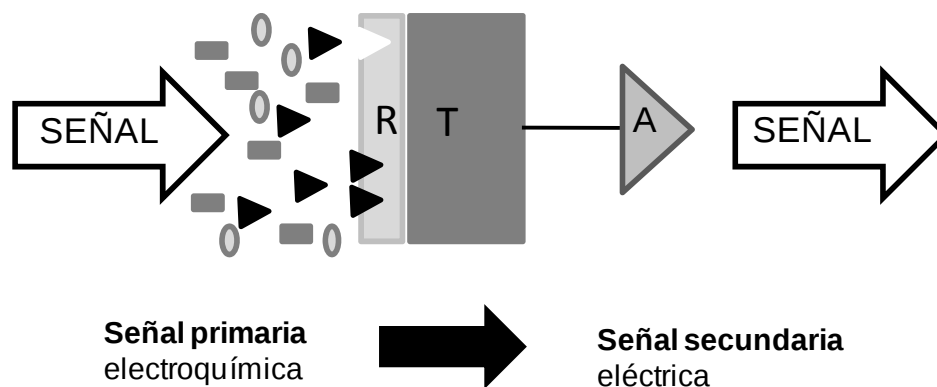


Figura 1.5. Sensor químico.

La clasificación de los sensores se hace con base en diferentes criterios, por ejemplo de acuerdo a su aplicación, al costo del dispositivo, la tecnología empleada en su fabricación, tipo de receptor, su exactitud, etc.; sin embargo, la clasificación más aceptada se basa en el principio de operación del transductor: ópticos, electroquímicos, másicos, térmicos y otros (Tab. 1.2) [Janata, 1989; Brett, 1993].

Tabla.1.2 Clasificación de los sensores químicos

Principio operativo del transductor	Descripción
Óptico	Fenómenos ópticos, resultantes de la interacción del analito receptor
Electroquímico	Efecto de la interacción electroquímica entre el analito y el electrodo
Másico	Cambio de masa sobre una superficie modificada
Térmico	Efecto calorífico de la interacción entre el analito y el receptor

Los transductores electroquímicos se subdividen de acuerdo al tipo de medida en conductimétricos, potenciométricos y amperométricos.

Los transductores conductimétricos se basan en la medida de los cambios en la conductividad así como en las propiedades asociadas a ésta (impedancia, cambios de constante dieléctrica, etc.) inducidos por un agente de reconocimiento químico. Dentro de este grupo de dispositivos, encontramos a los quimioresistores, sensores basados en óxidos semiconductores y los sensores con membrana permeable a gases.

Los transductores potenciométricos son aquellos en los cuales la señal primaria, fruto de la interacción entre analito y elemento de reconocimiento, es un potencial eléctrico. La medida se realiza a intensidad nula, frente a un electrodo de referencia. Este tipo de transductores son el grupo más desarrollado y estudiado. Debido a criterios de índole histórico y tecnológico, se subdividen en tres grupos: sensores de iones, sensores de gases y biosensores. Dentro de los sensores de iones se ubican los electrodos selectivos de iones con contacto líquido y electrodos selectivos de iones con contacto sólido.

Los transductores amperométricos se basan en la proporcionalidad que existe en la concentración de alguna especie electro-activa y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse ésta en su superficie; la relación intensidad-concentración, esta

gobernada fundamentalmente por el transporte de la especie y por el potencial aplicado al electrodo. Existen básicamente tres grupos: electrodos modificados, biosensores amperométricos (transferencia electrónica directa o través de un mediador) y electrodos de gases.

Los transductores electroquímicos poseen importantes ventajas, la más importante está relacionada directamente con la característica de los equipos de medida de costo reducido y fácil manejo.

Los biosensores son un subgrupo de los sensores químicos modificados biológicamente con un bioreceptor que nos permiten identificar, transformar y cuantificar un evento bioquímico de manera extraordinariamente selectiva.

Estos bioreceptores son elementos biológicos de reconocimiento que como consecuencia de la interacción analito-receptor producen o consumen especies electroactivas que los transductores electroquímicos transforman en señales eléctricas fácilmente procesables.

Generalmente el bioreceptor es una enzima inmovilizada que transforma el analito en un producto que es detectable por el transductor. Existen gran variedad de bioreceptores, los más empleados son catalizadores biológicos (enzimas), microorganismos, tejidos, inmunoreceptores y quimiorreceptores.

- * Catalizadores biológicos. Las enzimas pueden ser extraídas de una o más fuentes (in situ) para aplicaciones específicas y pueden usarse solas o con sus cofactores. Las enzimas que se consiguen comercialmente presentan las siguientes ventajas: se reproducen en lotes, amplios tiempos de vida, características conocidas y disponibilidad inmediata. Las desventajas de las enzimas purificadas son que no son siempre estables y necesitan la presencia de cofactores para operar en forma apropiada.
- * Microorganismos. Son entidades estructurales que poseen todas las enzimas necesarias y sus cofactores en un ambiente optimizado por la naturaleza. Pueden reproducir y compensar pérdidas en la actividad enzimática con el tiempo.
- * Tejidos y organelos. El tejido tiene la ventaja de la cohesión, y tiene una estructura que es lo suficientemente robusta para adherirse a un transductor sin

necesidad de recurrir a técnicas de inmovilización de proteínas. Pueden usarse tejidos animales y vegetales como fuentes naturales de material enzimático y organelos que contienen biocatalizadores en lisosomas, cloroplastos, mitocondrias, etc..

- * **Inmunoreceptores.** Considerando la reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo, se pueden producir anticuerpos para prácticamente cualquier analito (antígeno). Así, al inmovilizar el anticuerpo sobre un transductor electroquímico es posible seguir una señal eléctrica proporcional a la concentración del analito.
- * **Quimiorreceptores.** Se emplean receptores celulares específicos de membranas celulares que se excitan químicamente para producir cambios conformacionales.

El paso crucial en la construcción de un biosensor es inmovilizar el receptor de interés. Las enzimas pueden ser inmovilizada sobre una amplia gama de soportes, los métodos mas comunes de inmovilización se dividen en métodos físicos y métodos químicos [Arroyo, 1998].

Métodos físicos: Generalmente son más rápidos y fáciles que los métodos químicos, entre ellos se encuentra:

- **Adsorción.** Implica un contacto adecuado entre la enzima y el soporte. El enlace puede ser por interacciones físicas, hidrofóbicas, de Van der Waals o iónicas, esto va a depender de la naturaleza del soporte. Este es el método más simple.
- **Retención en gel.** La enzima se queda atrapa en un gel
- **Retención en fibras.** La enzima se encuentra atrapada dentro de las microcavidades de fibras inertes.
- **Microencapsulación.** La enzima queda dentro de partículas semipermeables, que la retienen permitiendo el transporte de los reactivos y los productos. Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, de tamaño entre 1 y 100 μm de diámetro.

Métodos químicos. Son los métodos de inmovilización más utilizados.

- Entrecruzamiento. Se basa en la formación de enlaces entre diversas moléculas de enzima o entre la enzima y otras proteínas. Normalmente se utiliza en el proceso un reactivo bifuncional (cross-linking).
- Enlace iónico. Las enzimas se fijan a soportes como resinas intercambiadoras de iones, la fuerza de la unión va a depender del pH y de la fuerza iónica del medio.
- Enlace metálico. Implica el uso de compuestos que contienen metales de transición para activar la superficie del soporte y favorecer el acoplamiento de la enzima.
- Enlace covalente. La unión covalente se realiza con la ayuda del glutaraldehído. El método se lleva a cabo a pH neutro y la formación del enlace covalente da estabilidad y versatilidad al biosensor.

Muchos de los desarrollos reportados para cuantificar colesterol han mostrado diferentes e interesantes características con la finalidad de construir un biosensor electroquímico versátil, sensible, selectivo y de bajo costo. Los biosensores más utilizados involucran la inmovilización de la enzima colesterol oxidasa, colesterol deshidrogenasa y colesterol esterasa [Ayra, 2007; Vikas 2007] (Tab. 1.3).

Tabla 1.3 Ejemplos de biosensores reportados para la cuantificación de colesterol

Receptor	LD (ID) (mM)	Referencias
COD	(0.25-2.5)	[Nakaminami,1997]
COD	0.2 (0.2-6.0)	[Guo, 2004]
COD	0.012	[Vidal, 2001]
COD	(0.01-3)	[Yang, 2006]
COD y CES	(1-8)	[Shing, 2004]
COD	0.12(0.5-15)	[Brahim,2001]
COD	1-20	[Isiar, 2010]
COD	2.5-12.9	[Kumar, 2006]
Hemoglobina	0.95 (0.01-0.6)	[Zhao, 2008]

COD Colesterol oxidasa, CES Colesterol esterasa, LD Límite de detección, ID Intervalo detección

Es interesante notar que no todos de los biosensores reportados cubren el intervalo de concentración requerido para el análisis de suero sanguíneo (3.5-6.5 mM). Por otra parte, su estabilidad a largo plazo es limitada y debido a su metodología de construcción, no pueden ser miniaturizados o producidos a bajo costo. Así, los desarrollos no son factibles para hacer posible el análisis descentralizado por el propio paciente en el hogar o en su caso, el médico en su consultorio a fin de tomar oportunamente medidas que conlleven a un mejor estado de salud.

Estimulados por estas limitaciones, se han reportado algunos trabajos sobre el desarrollo de biosensores en configuración plana (thick film) [Shen,2007; Li, 2005, Shin 2009, Carrara 2008].

Tabla 1.3 Características de biosensores de colesterol en configuración plana.

Transductor	Mediador o agente electrocatalítico	Sensibilidad ($\text{nA mM}^{-1} \text{mm}^{-2}$)	Referencias
Oro	Sin mediador	17	[Shen, 2007]
Grafito / Nanotubos de carbono	Fe(CN)_6^{4-}	37	[Li, 2005]
Grafito	Fe_3O_4	87	[Shih , 2009]
Citocromo P450	Grafito, rodio, oro y nanotubos de carbono	1,120	[Carrara, 2008]

Es importante señalar que los reportes presentan una serie desventaja en el costo, ya que utilizan como transductores electrodos de platino, oro y rodio. Por otro lado la sensibilidad de algunos ellos es relativamente baja.

1.4 Objetivos

Considerando la relevancia del uso de sensores electroquímicos para el análisis eficiente de diversas sustancias y la importancia biomédica de contar con alternativas analíticas para la cuantificación de colesterol especialmente en muestras de sangre (suero) y en alimentos (huevo, leche, etc.), el objetivo de este trabajo es:

Objetivo general

Desarrollar y caracterizar sensores electroquímicos para la determinación de colesterol cuyo intervalo de detección se ubique al menos entre los niveles normales en suero sanguíneo y sean compatibles con su fabricación en serie y el análisis descentralizado.

Objetivos particulares

- Construir y caracterizar sensores potenciométricos para la cuantificación de colesterol.
- Construir y caracterizar sensores voltamperométricos para la cuantificación de colesterol
- Construir y caracterizar biosensores amperométricos para la cuantificación de colesterol.

1.5 Referencias

Arya, S. K., Datta, M., Malhotra, B. D., *Recent advances in cholesterol biosensors*, Biosensors and Bioelectronics, 23 1083-1100 (2008).

Boyer R., Conceptos de Bioquímica, International Thomson Editores, México, 237-272, 557-590, (2000).

Brett Cristhoper and Ana Maria Oliveria, *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, New York (1993).

Burke, R W.; Diamondstone, B. I.; Velapodi, O. *Mechanisms of the Libebersmann-Buchard and Zak color reactions for cholesterol*, Clinica. Chemica 20, 794-801 (1974).

Carrara, S., Shumyantseva, V. V., Archakov., A. I., Samori, B., *Screen-printed*

electrodes based on carbon nanotubes and cytochrome P450scc for highly sensitive cholesterol biosensors, Biosensors & Bioelectronics, 24, 148-150 (2008).

Cid, E. Cid. M. T. Cortes F. Ledesma M C, Marchena M, Pedrero P Ureña, J. Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico. Ediciones Universidad de Salamanca, España (2007).

Domínguez, R.O., Alonso-Lomillo, M.A., Arcos M. M. J., *Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications*, Talanta, 73, 202-219 (2007).

Gilmartin, M. y Hart, J., *Fabrication and characterization of a screen-printed, disposable, amperometric cholesterol biosensor*, Analyst, 119, 2331-2336 (1994).

Hoving, E. B., *Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids*, Journal of Chromatography B, 671, 341-362 (1995).

Janata, Principals of chemical Sensors, Plenum Press, New York (1989).

J.D. Buehler, *Cholesterol*, Drug Dev Ind Pharm, 19, 1-3. (2002)

Jonh Bernad Henry, Tood Sanford., *Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio. 8a Edición*, Ed Salvat. México, 234-288, (1990).

Vidal Juan Carlos, Esperanza Garcia- Ruiz, Juan-Ramon Castillo, *Design of a multilayer cholesterol amperometric biosensor for preparation and use in flow systems*. Electroanalysis, 13, 229-235 (2001).

Karube, K. Hera, H. Matsuoka, and S. Suzuki, *Amperometric determination of total cholesterol in serum with use of immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase*, Analitica. Chimeca.Acta, 139, 127-132, (1982).

Krause M. V. Hunscher M.A. *Nutrición y Dietética en clínica*. 5ª Edición Interamericana, México, 61-62 (1975).

Kulys, J., Simkeviciene, V., Higgins, I. J., *Concerning the toxicity of 2 compounds used as mediators in biosensor devices - 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) and tetrathiafulvalene (TTF)*. *Biosensors & Bioelectronics*, 7,495-50, (1992).

Li, G, Liao J. M., Hu, G. Q., Ma N. Z., Wu P.J., *Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood*, *Biosensors & Bioelectronics* 20, 2140-2144 (2005).

Manli Guo, Jinhua Ben, Jia Li, Lihua Nie, Shouzhuo Yao, *Electroanalysis*, 16, 1991-1998, (2004)

Minghui Yang, Yu Yang, Haifeng Yang, Guoli Shen and Ruqin Yu, *Layer-by-layer self-assembled multilayer films of carbon nanotubes and platinum nanoparticles with polyelectrolyte for the fabrication of biosensors*, *Biomaterials*, 27, 246-255 (2006)

Richmond, W., *Analytical reviews in clinical biochemistry - The quantitative-analysis of cholesterol*, *Annals of Clinical Biochemistry*, 29, 577-597 (1992).

Robert Bohinski, *Bioquímica*, 5a Edición. Addison Wesley, México 1998

Ruizgutierrez, V. y Barron, L. J. R., *Methods for the analysis of triacylglycerols*, *Journal of Chromatography B*, 671, 133-168 (1995).

Stetter, W. R. Penrose, S. Yao, *Sensors, chemical sensors, electrochemical sensors, and ECS Journal of The Electrochemical Society*, 150, S11-S16 (2003)

Sean Brahim, Dyer Nariesingh and Anthony Guiseppi-Elie, *Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane*, *Analytica Chimica Acta*, 448, 27-36, (2001).

Shen, J. y Liu C. C., *Development of a screen-printed cholesterol biosensor: Comparing the performance of gold and platinum as the working electrode material and fabrication using a self-assembly approach*, Sensors and Actuators B, 120, 417-425 (2007)

Shih, W. C., Yang, M. C., Lin, M. S., *Development of disposable lipid biosensor for the determination of total cholesterol*, Biosensors & Bioelectronics, 24 1679-1678 (2009).

Shoenheimer, R; Sperry. W. M. A. *micromethod for the determination of free and combined cholesterol*. Journal Biol. Chemica 106 715-760 (1934).

Sturges, S.; Knudson, A. *Application of the Shoenheimer- Sperry method for cholestrol determination*. Journal Biol. Chemica. 187, 97-107, (1938).

Suman Singh, Asha Chaubey and B. D. Malhorta, *Anal. Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films*, Analytica Chimica Acta, 502 229-234, (2004).

Thiam Serigne, Shahab A Shamsi, Charles Williams Henry, James W. Robinson and Isiah M Warner, *Capillary Electrochromatography of cholesterol and its ester derivates*, Analitical Chemica, 72, 2541-2546, (2000).

T.W.G. Solomons, *Química Orgánica*. Limusa-Wiley, México 2000

Takhiro Nakaminami, Shin-ichiro Ito, Susumu Kuwabata, and Hiroshi Yoneyama, *Amperometric determination of total cholesterol at gold electrodes covalently modified with cholesterol oxidase and cholesterol esterase with use of thionin as an electron mediator*, Anal. Chem, 71, 1068-1076, (1999).

Takahiro Nakaminami, Susumu Kuwabata, and Hiroshi Yoneyama, *Electrochemical oxidation of cholesterol catalyzed by cholesterol oxidase with use of an artificial electron mediator*, Anal. Chem., 69 2367-2372, (1997)

Tudela, V., *El colesterol: lo bueno y lo malo*, 3ª edición, Fondo de Cultura Económica, Cd de México, México (2002).

Vikas &. Pundir, *Biotechniques in Electrochemical Determination of Cholesterol Review*, Sensors & Transducers Journal, 83, 1504-1512, (2007).

Vrielink. A. y Ghisla S., *Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features*, FEBS Journal 276, 6826–6843 (2009).

Xu XH, Li RK, Chen J, Chen P, Ling XY, Rao PF, *Quantification of cholesterol in foods using non-aqueous capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography B, 768(2) 369-373 (2002).

Xu, S, Li R., Che J, Chen P., Ling X., Rao P. *Quantification of cholesterol in foods using non-aqueous capillary electrophoresis* Journal of Chromatography B, 768 369-373 (2002).

Zak Bennie, *Cholesterol methodologies*. Clin. Chem, 23 1201-1214, (1977)

Miguel Arroyo, *Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications* Ars Pharmaceutica, 39, 23-29, (1998)

Zhao, Li Wan, Li Wan, Li jiang, quin Wang, *Highly sensitive and selective cholesterol biosensor based on direct electron transfer of hemoglobin*, Analytical Biochemistry 383, 25-30 (2008)

Lawrence Chaou, Chung-Chiun Liu, *Development of a molecular imprinting thick film electrochemical sensor for cholesterol detection*, Sensors and Actuators B, 110, 204-208 (2005).

Yu-Ya Hosokawaa, Hideki Hakamataa, Tomonori Murakamia, Sakae Aoyagic, Minpei Kurodad, Yoshihiro Mimakid, Ayumi Itoa, Sayaka Morosawaa, Fumiyo Kusua
Electrochemical oxidation of cholesterol in acetonitrile leads to the formation of cholesta-4,6-dien-3-one, *Electrochimica Acta* 54 6412–6416 (2009).

Arun Kumar, Ravi Ranjan Pandey, Brian Brantley, *Tetraethylorthosilicate film modified with protein to fabricate cholesterol biosensor* *Talanta*, 69, 700-705 (2006)

M.Q. Israr, J.R. Sadaf, M.H. Asif, O. Nur, M. Willander, B. Danielsson., *Potentiometric cholesterol biosensor based on ZnO nanorods chemically grown on Ag wire* *Thin Solid Films*, 519, 1106-1109 (2010).

Capítulo 2

Sensores
potenciométricos

2. SENSORES POTENCIOMÉTRICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL

En el presente capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en el desarrollo de electrodos potenciométricos para la cuantificación de colesterol. Las estrategias investigadas se basan en la impresión molecular, mediante el electrodeposición de polipirrol dopado con colesterol sobre electrodos de carbón vítreo.

2.1. Introducción

La potenciometría es una técnica analítica que se basa en la medida de la diferencia de potencial entre dos electrodos de una celda electroquímica en condiciones de equilibrio termodinámico. Es uno de los métodos electroquímicos más evolucionado y de uso más extendido debido a su simplicidad de operación y economía.

Originalmente las medidas potenciométricas estuvieron limitadas a determinaciones de pH; sin embargo, rápidamente se incorporaron como métodos indicadores de puntos de equivalencia en análisis volumétrico. A partir de 1965 con el desarrollo de electrodos selectivos de iones (ESI) basados en membranas selectivas, la potenciometría experimentó un gran impulso que desembocó en la gran variedad de aplicaciones que se tienen en la actualidad para este tipo de dispositivos [Wang, 2000].

Los sensores potenciométricos tienen muchas ventajas, las cuales están relacionadas directamente con los equipos de manejo utilizados, como su reducido costo, fácil manejo y posibilidad de miniaturización. Así mismo, tienen alta sensibilidad, amplios intervalos de concentración de trabajo, bajos límites de detección y cortos tiempos de respuesta.

Recientemente se han desarrollado sensores potenciométricos basados en la electropolimerización de gran variedad de polímeros conductores dopados con algún anión de interés analítico [Hutehins, 1995]. Entre los polímeros conductores más

estudiados se encuentran polipirrol, polianilina, poliacetileno y politiofeno [Eggins, 1996]. Debido a su amplio intervalo de respuesta lineal y particularmente su selectividad, estos dispositivos han encontrado diversas aplicaciones en el desarrollo de gran variedad de sensores utilizando la síntesis electroquímica, así como la reducción u oxidación del polímero para la determinación de analitos (metales, fármacos, moléculas biológicas etc.).

El polipirrol es un polímero conductor que se forma a través de la oxidación del pirrol por medios químicos o electroquímicos, siendo estos últimos los preferidos pues brindan un mejor control en cuanto al espesor, morfología y pureza de la película. El polipirrol se forma a través de la oxidación electroquímica del monómero (Fig. 2.1).

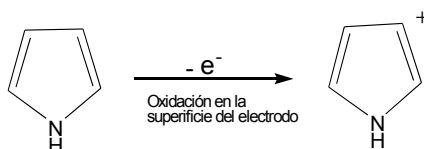


Figura 2.1. Formación electroquímica del catión radical de pirrol.

La polimerización empieza con la oxidación del monómero que es convertido en un catión radical sobre la superficie del electrodo. El segundo paso involucra una dimerización acompañada por la eliminación de dos protones [Fernández, 2003; Alegret, 2004; Díaz, 2005] (Fig. 2.2).

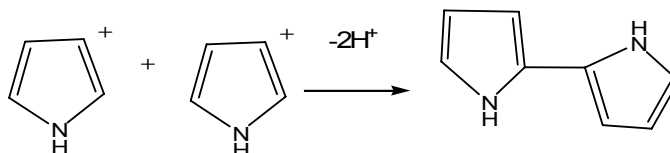


Figura 2.2. Dimerización de cationes radical de pirrol.

Posteriormente, el dímero sufre una oxidación y forma entonces un nuevo catión radical que continuará la polimerización mediante la reacción con otro catión radical de pirrol (Fig. 2.3).

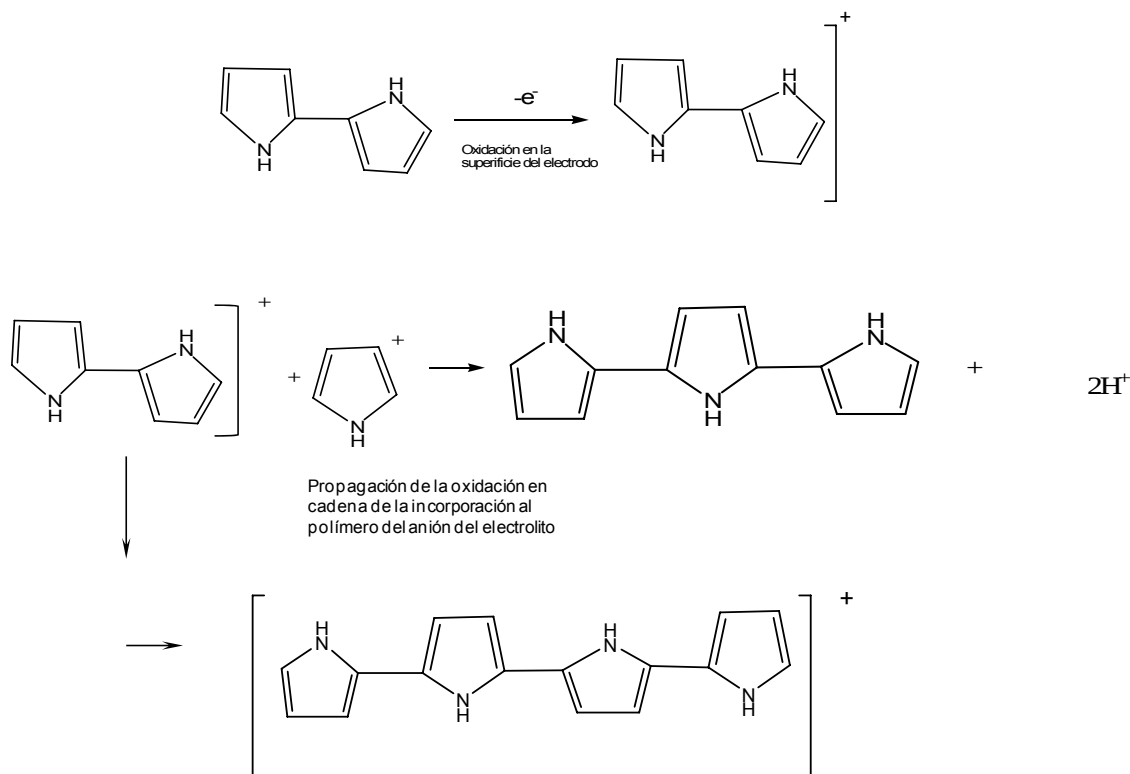


Figura. 2.3. Propagación de la electropolimerización de pirrol.

Cuando el polipirrol se oxida, se transforma en un catión PPy^+ , y los aniones del medio dopan la matriz conductora debido a la atracción electrostática, produciendo la formación de cavidades selectivas en su estructura. Una vez completado el proceso de electropolimerización, la membrana formada tendrá una carga neutra y el anión dopante podrá entrar o salir selectiva y reversiblemente de la membrana, dependiendo del gradiente de concentración entre la membrana y la solución.

Como ejemplo, una membrana del polímero conductor formada en un medio de nitratos es selectiva a estos aniones, ya que son atrapados durante la electropolimerización formando cavidades específicas para el ion en la red polimérica. La forma de estas cavidades y las interacciones que se establecen con el analito constituye el mecanismo de reconocimiento de la membrana selectiva a iones [Fernández, 2003; Díaz, 2005; Hutehins. 1995; Eggins, 2002].

Otro polímero conductor es la polianilina (PANI). Es uno de los polímeros con mayor interés debido a su estabilidad química y alta conductividad; además de poder ser mezclada con diferentes polímeros sin que se produzca degradación. La familia de estos polímeros ha estado sujeta recientemente a estudios más detallados debido a sus propiedades electrónicas y ópticas que pueden modificarse variando el número de protones, el número de electrones, o ambos. El polímero de polianilina puede presentarse en diversas formas, incluyendo la denominada forma reducida (base de leuco-esmeraldina), la parcialmente oxidada denominada esmeraldina y la forma pernigranilina, completamente oxidada [Stejkskal, 2002] (Fig. 2.4).

La forma base de la leucoesmeraldina, esmeraldina y pernigranilina son eléctricamente aislantes, mientras que el polímero de sal (protonada) de esmeraldina, es conductora. Por otra parte se sabe que la conductividad de la polianilina depende del pH y de otros parámetros químicos.

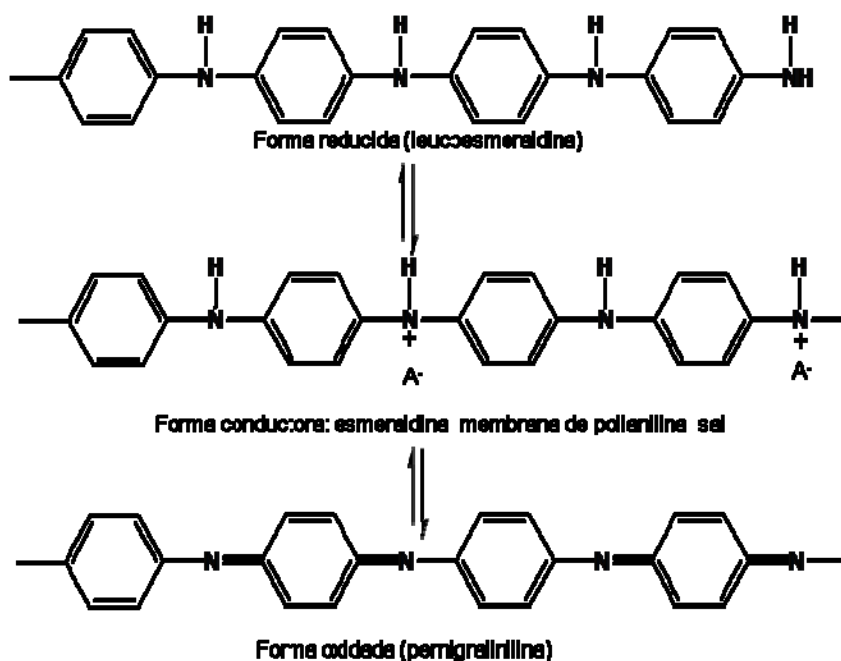


Figura 2 4 Oxidación de la anilina

Dadas las cualidades que representa el uso de la potenciometría como método instrumental de análisis, desarrollar este tipo de electrodos para la cuantificación de colesterol es una alternativa interesante y atractiva; hasta el momento no se han encontrado reportes en este sentido.

En el presente capítulo se describen los resultados correspondientes al desarrollo y evaluación de sensores potenciométricos para la cuantificación de colesterol basados en la impresión molecular.

2.2 Metodología

2.2.1 Instrumentación, reactivos y soluciones

2.2.1.1 Equipo

El equipo empleado para fabricar y caracterizar física y químicamente los sensores desarrollados, se lista a continuación:

- AUTOLAB PGSTAT 30 (Ecochemie)
- Potenciómetro PHM 250 ION ANALYZER (Radiometer Copenhagen).
- Electrodo de alambre de platino (XM110 Radiometer-Copenhagen)
- Electrodo de referencia de doble camisa Ag/AgCl (900200 Orión) con solución externa de KNO_3 10%
- Electrodo de carbón vítreo MF 2012 (BAS)

2.2.1.2 Reactivos y Soluciones

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos comerciales de grado analítico.

- NaNO_3 (Sigma)
- Pirrol (Sigma)
- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{OSO}_3\text{Na}$ (Sigma)
- CH_3OH (Mallikrodt Chromar HPLC)
- $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH}$ (Hycel México).
- NaCl (J.K Baker)
- Vitamina E y D (productos farmacéuticos comerciales)

- $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Sigma)
- HClO_4 (Sigma)
- NaClO_4 (J.T. Baker)
- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (J.T. Baker)
- KCl (Técnica Química S. A.)
- β -Ciclodextrina (Acros Organics)
- huevo

Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua desionizada Milli Q (Millipore) ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

El pirrol fue purificado por destilación, se protegió de la luz y se mantuvo en refrigeración hasta su uso. La destilación se realizó bajo atmósfera inerte (nitrógeno), controlando la temperatura a 80°C con un baño de aceite [Anderson 1995; Perrin, 1996; Smith 1989].

El colesterol se disgrega en una mezcla de metanol:agua en una proporción 2:10, posteriormente se dispersa mediante un baño ultrasónico (hasta formar una emulsión estable) y se afora con una solución de dodecil sulfato de sodio 0.1M.

Para realizar los calibrados de los electrodos potenciométricos obtenidos mediante electropolimerización, se prepararon diferentes diluciones de colesterol en SDS 0.1 M a partir de una solución stock de colesterol 0.01 M disuelta en metanol 1/5 v/v en solución acuosa de SDS 0.1M.

2.2.2. Construcción de electrodos

Los electrodos de trabajo se construyeron mediante la electropolimerización de pirrol sobre un electrodo de carbón vítreo. Para los sensores de nitratos, la solución de electropolimerización se compone de una solución acuosa de pirrol purificado 0.1M y nitrato de sodio 0.1M. Para los sensores de colesterol, la solución de electropolimerización se compone de una solución de pirrol purificado 0.1M en SDS 0.1M y colesterol 0.01M. En ambos casos, antes de empezar la

electropolimerización, se desoxigena con N_2 por 10 min por cada 20 mL y se electropolimeriza en régimen potencioestático por 30 min a 0.9 V.

Una vez contruidos los electrodos, se acondicionaron con una solución de nitratos 1×10^{-3} M y 1×10^{-4} M de colesterol en SDS 0.1 M respectivamente.

2.3 Resultados y Discusión

Para evaluar la metodología global de impresión molecular con pirrol en el desarrollo de sensores potenciométricos, se fabricó un sensor de nitratos para confirmar el procedimiento previamente reportado [Hutehins, 1995].

Para desarrollar el sensor de nitratos primeramente se electropolimerizó el pirrol 0.1 M sin purificar en $NaNO_3$ 0.1M, bajo un régimen potencioestático, usando un voltaje de 0.9 volts por 30 min. Al término de la electropolimerización se observa una película de color negro correspondiente al polímero de polipirrol.

Realizada la electropolimerización, se acondicionó el electrodo por al menos 2 hrs antes de su calibración, primeramente con una solución $NaNO_3$ de 1×10^{-2} M como se encuentra reportado en la literatura [Hutehins, 1995] aunque posteriormente con una solución 1×10^{-3} M se obtuvieron mejores respuestas en un intervalo de 1×10^{-6} a 1×10^{-1} M del ion nitrato, siendo las respuestas lineales y aniónicas, aunque no nernstianas (Fig 2.5). Las pendientes de 10 ± 2.85 mV/década se atribuyen a que el pirrol no está purificado.

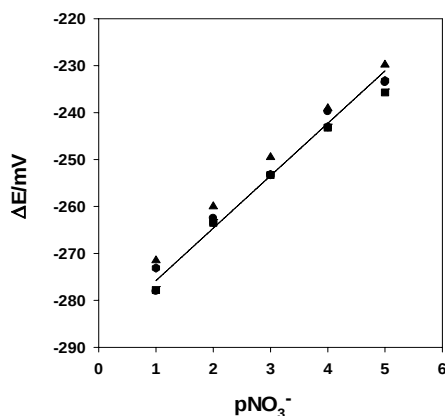


Figura 2.5 Curvas de calibración del electrodo de carbono vítreo con la película de polipirrol sin purificar dopado con $NaNO_3$ (triplicado).

Realizando la misma metodología con pirrol purificado 0.1M dopado con NaNO_3 , se observa posteriormente a la electropolimerización una película negra uniforme, la cual fue acondicionada conforme a lo anteriormente descrito, obteniendo respuestas nernstianas con pendientes 60 ± 2.17 mV/década como se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Réplicas de curvas de calibración de un electrodo de carbón vítreo con una película de pirrol purificado 0.1M dopado con nitratos 0.1M

-log $[\text{NO}_3^-]$	mV					X	SD	%CV
	1	2	3	4	5			
5	-36.1	-43.3	-47.8	-51.7	-54.8	-46.74	7.34	-15.71
4	-41.2	-51.4	-66.4	-61.1	-65.3	-57.08	10.67	-18.69
3	-128.6	-133.2	-135.2	-137.5	-139.3	-134.76	4.14	-3.08
2	-176.4	-185.5	-184.9	-188.8	-190.3	-185.78	4.22	-2.27
1	-228.8	-244.7	-247.1	-248.5	-250.0	-246.22	3.60	-1.464
pendiente (mV/década)	61.06	63.22	59.18	61.35	60.51	61.06	$r^2 \geq$	0.9962

Las curvas de calibración se realizaron en un intervalo de 1×10^{-5} a 1×10^{-1} M de nitratos, encontrando respuestas aniónicas y además lineales hasta una concentración 1×10^{-4} M de nitratos (Fig. 2.6).

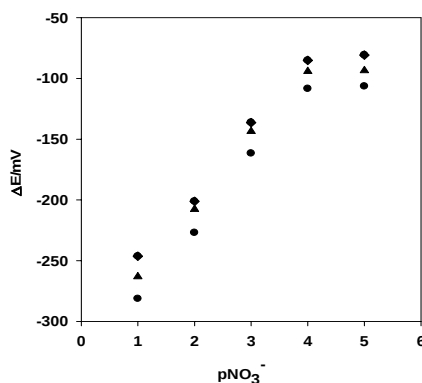


Figura 2.6 Curvas de calibración del electrodo de carbón vítreo con la película de polipirrol purificado, dopado con NaNO_3 (triplicado)

2.3.1. Sensores potenciométricos de colesterol

El colesterol es un analito neutro, insoluble en agua y termodinámicamente estable en la naturaleza, por lo que desarrollar un sensor potenciométrico no es una tarea

sencilla. Así, la estrategia propuesta implica cargar y disolver al colesterol utilizando un tensoactivo aniónico [Pal, 1993].

Debido a la conocida respuesta del polipirrol a los aniones, se desarrolló un electrodo selectivo de iones con la membrana selectiva compuesta de polímero conductor de polipirrol dopado con el colesterol en SDS; asumiendo que las micelas aniónicas de colesterol serán detectadas por el dispositivo.

Utilizando la metodología reportada para la electropolimerización de nitratos, se electropolimerizó pirrol purificado 0.1M y colesterol 0.01M en SDS 0.1M obteniendo una película negra uniforme en el electrodo, el cual fue acondicionado en colesterol 1×10^{-4} M en SDS 0.1M. Se obtienen curvas de calibración en un intervalo de 1×10^{-6} a 1×10^{-2} M como se muestra en la tabla 2.2, observándose una pendiente de 30 ± 4.12 mv/década, siendo lineales en un intervalo de concentración 1×10^{-5} a 1×10^{-2} M.

Tabla 2.2 Réplicas de curvas de calibración de un electrodo de carbón vítreo de pirrol purificado 0.1M dopado con colesterol 0.01 M en SDS 0.1M.

-log [colesterol] en 0.1M SDS	mV					X	SD	%CV
	1	2	3	4	5			
2	-228.6	-233.0	-237.0	-233.0	-227.0	-231.72	3.97	-1.71
3	-252.4	-256.7	-257.2	-256.7	-257.2	-256.04	2.05	-0.80
4	-286.4	-298.0	-292.6	-298.0	-292.6	-293.52	4.81	-1.64
5	-305.5	-319.4	-310.3	-319.4	-312.3	-313.38	6.03	-1.92
6	-309.1	-306.0	-312.0	-320.1	-313.5	-312.14	5.30	-1.70
pendiente (mV)	-28.9	-32.5	-27.8	-30.05	-29.13	-29.68	$r^2 \geq$	0.9910

El comportamiento del electrodo desarrollado es catiónico y no corresponde a lo esperado teóricamente (Fig 2.7).

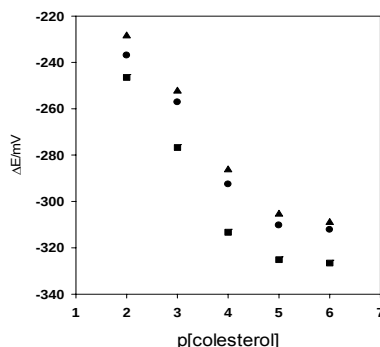


Figura 2.7 Curvas de calibración al electrodo de carbón vítreo con la película de polipirrol purificado, dopado con colesterol en SDS (triplicado).

El sensor de colesterol fue aplicado a muestras estándar de colesterol a fin de evaluar su potencial para determinar su concentración (Tab. 2.3). A partir de medidas potenciométricas de las soluciones “problema” por interpolación directa de la curva de calibración, se obtuvo la concentración.

Tabla 2.3 Resultados de las muestras estándar

Muestra	Concentración preparada	Concentración obtenida
Directa ¹	0.00050M	0.00453 M
Por Extracción ²	0.0010 M	0.00090 M

¹Obtenida en solución estándar

²Obtenida por una técnica extracción utilizada para la cuantificación de colesterol de huevo. [Reynolds, 1974]

Los resultados de concentración obtenidos son ~10% más bajos que los esperados, no obstante cabe aclarar que en términos logarítmicos el error de la determinación es 1.8%.

Para poder corroborar si se llevó a cabo la impresión molecular propuesta se prepararon electrodos dopando y sin dopar con colesterol, obteniendo respuesta potenciométrica hacia colesterol en ambos casos. Cuando se dopó con colesterol se obtuvo una respuesta lineal de 1×10^{-4} a 1×10^{-1} M con una pendiente de 30 ± 3.12 mV/década y un coeficiente de correlación 0.9931 (Fig. 2.8). En contraparte el electrodo no dopado muestra los mismos intervalos de respuesta y pendiente que el anterior; aunque menor coeficiente de correlación (0.9530). Los resultados obtenidos, no permiten asegurar que la impresión molecular se llevó a cabo.

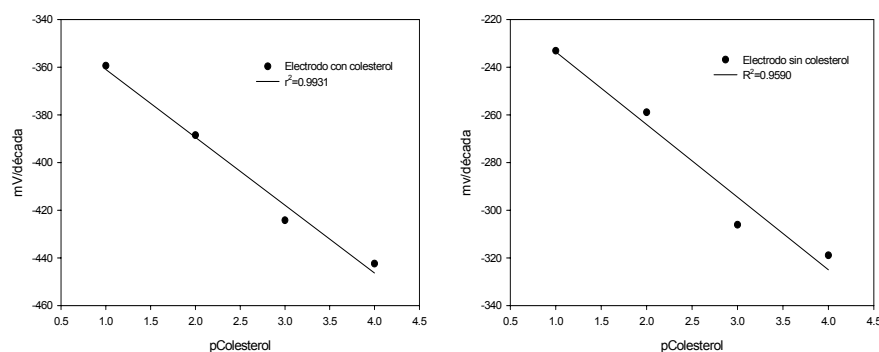


Figura 2.8 .Comparación de curvas de calibración del electrodo potenciométrico de polipirrol dopado con colesterol en SDS y del electrodo potenciométrico de polipirrol no dopado en SDS.

2.3.1.1 Interferencias

Debido al comportamiento que exhiben los sensores potenciométricos contruidos dopando y sin dopar con colesterol, se estudiaron diversos analitos orgánicos e inorgánicos como los cloruros y nitratos quienes posiblemente pueden interferir en la respuesta potenciométrica de los electrodos desarrollados. Otra posibilidad de interferencia es la de moléculas neutras como glucosa, Vitamina D y E ya que al igual que el colesterol son especies neutras y presentes comúnmente en suero sanguíneo; Adicionalmente las Vitaminas E y D tienen una estructura química similar al colesterol. Otro interferente importante estudiado es el ácido ascórbico, ya que es el principal interferente en los biosensores amperométricos.

Para analizar las interferencias que pudiera tener el electrodo de colesterol dopado se realizaron curvas de calibración obteniendo las pendientes mV/década para diferentes especies químicas potencialmente interferentes. En Tabla 2.4 se presentan las pendientes y coeficientes de correlación obtenidos. Comparando con la pendiente de colesterol podemos observar que sí hay interferencia en términos de sensibilidad con los cloruros, nitratos, la vitamina D y ácido ascórbico. Es posible que para el ácido ascórbico se deba a que existe formación de micelas, en consecuencia la existencia de cavidades en donde estas moléculas ocupan este espacio; por otra parte, la respuesta a cloruros y nitratos puede atribuirse a la respuesta que los electrodos de carbón exhiben a los aniones [Huerta, 2006].

Tabla 2.4 Respuesta potenciométrica del electrodo de pirrol purificado 0.1M dopado con colesterol en SDS 0.1M.

Analito	mV	r²
Glucosa	0.90	0.8293
Vitamina E	1.08	0.9531
NaCl	-7.36	0.9145
NaNO ₃	-5.32	0.9108
Vitamina D	-14.4	0.9122
Ácido Ascórbico	8.36	0.9942

Para analizar las interferencias que pudiera tener el electrodo de SDS (no dopado), se realizaron las curvas de calibración respectivas (Tab. 2.5). Comparando con la pendiente de colesterol podemos observar que prácticamente no existe interferencia con ningún de estos analitos.

Tabla 2.5 Respuesta potenciométrica del electrodo de pirrol purificado 0.1M no dopado con colesterol en SDS 0.1M.

Especie	mV	r²
Glucosa	-0.94	0.9624
Vitamina E	-1.78	0.7372
NaCl	-2.93	0.8939
NaNO ₃	-4.30	0.9900
Vitamina D	-1.10	0.1409
Ácido Ascórbico	1.61	0.6522

Es importante señalar que el electrodo no dopado exhibe menor interferencia hacia los 4 analitos mencionados, hecho que implicaría que en el electrodo dopado sí se llevó a cabo la impresión molecular en alguna medida.

2.3.1.2 Optimización de las variables de la construcción de los electrodos

Una vez establecida la posible funcionalidad del electrodo desarrollado, con la finalidad de mejorar el desempeño del electrodo, se procedió a evaluar el efecto de las variables más importantes relacionadas con su construcción.

Se realizaron estudios en la variación de concentración tanto para el pirrol, como el dodecil sulfato de sodio para el electrodo con colesterol y sin colesterol, obteniendo las pendientes para cada una de las condiciones.

Para el electrodo con colesterol (Tab. 2.6, Fig. 2.9) se observan pendientes mayores cuando la concentración de dodecil sulfato de sodio y pirrol son ambas 0.1 M. Así, no se puede determinar un patrón claro en cuanto al efecto independiente de cada una de las especies químicas.

Tabla 2.6 Pendientes en mV /década para diferentes concentraciones de pirrol y de dodecil sulfato de sodio para el electrodo dopado con colesterol.

Concentración de pirrol	Concentración de SDS		
	0.01 M	0.05 M	0.1 M
0.2 M	-16.5	-6.3	-27.1
0.1 M	-12.0	-16.1	-30.8
0.05 M	-17.2	-23.1	-17.2

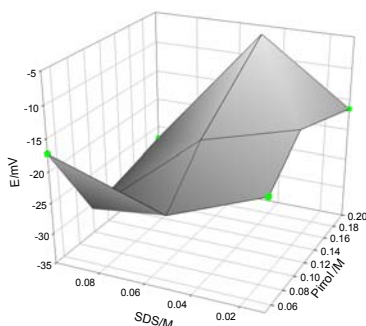


Figura 2.9 Superficie de respuesta del electrodo potenciométrico de polipirrol purificado dopado con colesterol en SDS variando la concentración de pirrol y SDS

Para el electrodo sin colesterol (tabla 2.7, Fig. 2.10) se observan pendientes mayores cuando la concentración de dodecil sulfato de sodio es 0.01 M y la de pirrol es 0.05 M. Así, el patrón es diferente al del electrodo dopado con colesterol.

Tabla 2.7 Pendientes para diferentes concentraciones de pirrol y de dodecil sulfato de sodio para el electrodo sin dopar con colesterol.

Concentración de pirrol	Concentración de SDS		
	0.01 M	0.05 M	0.1 M
0.2 M	-6.2	-6.5	-15.0
0.1 M	-25.0	-4.8	-26.4
0.05 M	-31.9	-15.5	-18.0

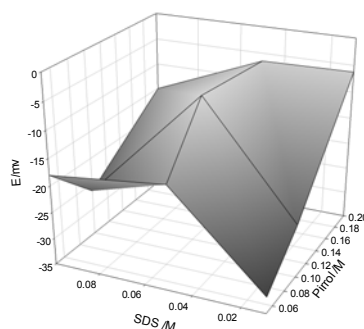


Figura 2.10. Superficie de respuesta del electrodo potenciométrico de polipirrol purificado sin dopar variando la concentración de pirrol y SDS

Haciendo el análisis de las dos condiciones que se variaron, podemos observar de manera muy general que a mayores concentraciones de pirrol y SDS se electropolimeriza mejor el electrodo con colesterol; sin embargo, para el electrodo sin colesterol se encuentra el caso contrario. Está hecho pudiera ser debido a que cuando se polimeriza con colesterol, la solución no es totalmente acuosa requiriendo mayor concentración de pirrol para formar el depósito y requiriendo mayor concentración de SDS para incrementar la solubilidad.

2.3.1.3 Mecanismo de detección

Los electrodos desarrollados responden al colesterol como si se tratara de un dicatión; este hecho podría explicarse si consideramos que existe una diferencia de dos moléculas de SDS entre las micelas sin colesterol, con respecto a las que incorporan al colesterol; así, al difundir las micelas con colesterol en la membrana de polipirrol, desplazarían a las micelas “vacías” que tendrían dos moléculas más de SDS, creándose un transporte de carga positivo hacia el interior de la membrana (Fig. 2.11).

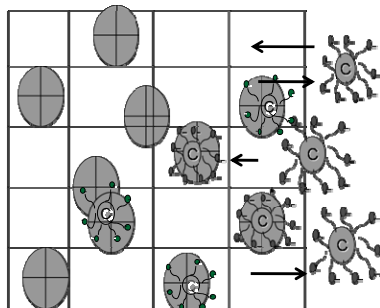


Figura 2.11 Propuesta de mecanismo de respuesta del electrodo de carbono vítreo polimerizado con pirrol dopado con colesterol en dodecil sulfato de sodio.

Debido a la baja solubilidad del colesterol en SDS, la solución stock del analito contiene metanol 4.9 M; razón por la cual al realizar las diluciones necesarias para preparar las curvas de calibración se diluye el metanol en la misma proporción que el colesterol manteniéndose la concentración de SDS constante. Así, existe la posibilidad que el sensor responda a metanol, consecuentemente es necesario evaluar el posible efecto del metanol en la respuesta. En este sentido se realizaron curvas de calibración para un electrodo de pirrol dopado con colesterol conforme a la tabla 2.8.

Tabla 2.8: Combinaciones posibles para las calibraciones potenciométricas del electrodo dopado con colesterol

Electrodo electropolimerizado con Py 0.1M	SDS 0.01M	Metanol (4.9 M)	Colesterol
A	Constante	Variable	Variable
B	Constante	Constante	Variable
C	Constante	No agregado	Variable

Los resultados obtenidos (Fig. 2.12), muestran claramente que los electrodos solamente responden cuando varía la concentración de metanol, sugiriendo que la respuesta observada y reportada en trabajos anteriores puede no ser debida mayoritariamente a colesterol.

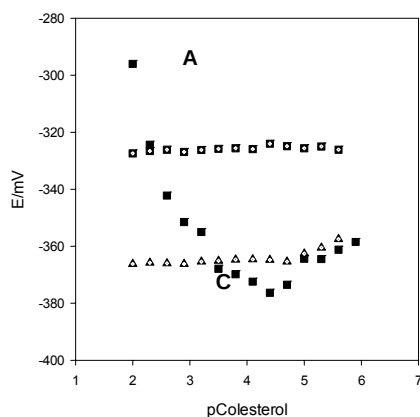


Figura 2.12 Curvas de calibración potenciométricas de electrodos electropolimerizados con pirrol y dopados con colesterol (para condiciones ver tabla 2.8).

Para tener la certeza de los resultados anteriores, se evaluaron nuevamente los electrodos, realizando curvas de calibración de metanol diluido en agua sin SDS y sin colesterol, obteniendo respuestas potenciométricas equivalentes a las anteriormente reportadas y donde la concentración de metanol varía (Fig. 2.13).

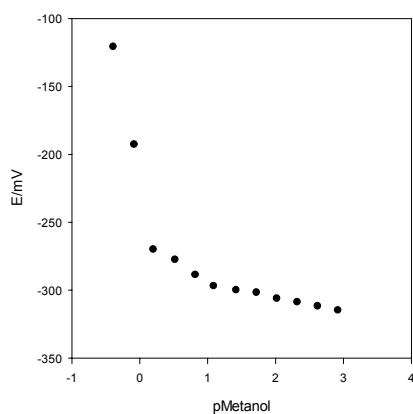


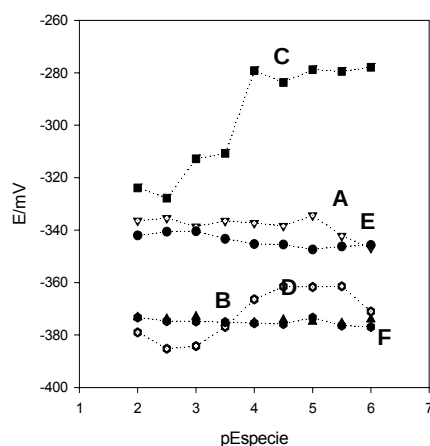
Figura 2.13 Curva de calibración potenciométrica de un electrodos de carbón vítreo electropolimerizado con pirrol y dopados con colesterol en función de la concentración de metanol.

Con la finalidad de disminuir el efecto del metanol en la respuesta potenciométrica y resaltar la del colesterol, se evaluaron los electrodos dopados con colesterol en diferentes soluciones con una concentración de metanol 0.01M (Tabla 2.9).

Tabla 2.9: Combinaciones posibles para las lecturas potenciométricas del electrodo dopado con colesterol.

Variable independiente	SDS (0.01M)	Metanol (0.01M)	Colesterol
A-p alcohol	No agregado	Variable	No agregado
B-p alcohol	Constante	Variable	No agregado
C-p SDS	Variable	Constante	No agregado
D-p SDS	Variable	No agregado	No agregado
E-p colesterol	Constante	Constante	Variable
F-p colesterol	Constante	No agregado	Variable

A partir de los resultados obtenidos (Fig. 2.14), es posible observar que los electrodos responden exclusivamente y de manera aniónica hacia el SDS y que en este caso la concentración baja de metanol, no afecta dicha respuesta. La señal hacia el cambio de concentración de metanol en este intervalo bajo de concentraciones, no se presenta. Finalmente, estos estudios confirman que los electrodos desarrollados no responden significativamente a colesterol.

**Figura 2.14.** Curvas de calibración del electrodo potenciométrico de polipirrol dopado con colesterol en SDS para diferentes especies

2.3.2 Electrodo potenciométrico de colesterol basado en la electropolimerización de β -ciclodextrina

Debido al fracaso de la estrategia de electropolimerización de pirrol, se estudió la posibilidad de hacer un desarrollo con base en la electropolimerización de ciclodextrinas. Existen reportes que demuestran la impresión molecular de colesterol

con ciclodextrinas [Davidson, 2002; Piletsky, 2002; Manakker, 2008], el incremento en su solubilidad y su capacidad de electropolimerizar. Así, se intentó electropolimerizar la ciclodextrina en un electrodo de carbón vítreo, en un medio que contenía ácido perclórico 1M y β -ciclodextrina 0.01M por voltametría cíclica a condiciones previamente reportadas [Roa, 2009]; desafortunadamente se obtiene nula polimerización.

Para aprovechar la mayor solubilidad del colesterol en soluciones de ciclodextrinas y la posible formación de complejos de inclusión, se realizó una copolimerización en un electrodo de carbón vítreo con pirrol 0.05M, β -ciclodextrina 0.01M en ácido perclórico 1 M a las mismas condiciones de trabajo. Al realizar calibrados de colesterol disuelto en una concentración constante de β -ciclodextrina, se obtiene una pendiente aniónica de 20 mV/década aproximadamente la cual se podría atribuir al colesterol; sin embargo, dado el carácter neutro de las especies presentes en solución es difícil proponer un mecanismo de respuesta (Fig. 2.15) considerando además que la concentración de ácido perclórico y β -ciclodextrina son constantes en todo el intervalo de pColesterol.

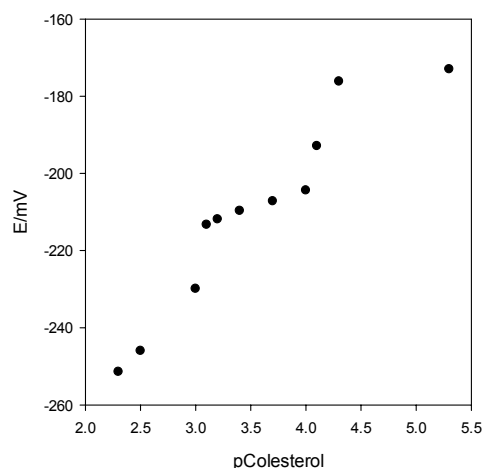


Figura 2.15. Curva de calibración potenciométrica de un electrodo potenciométrico de carbón vítreo polimerizado con pirrol y β -ciclodextrina en medio de ácido perclórico.

Por otra parte, intentando cargar el colesterol durante la co-polimerización se agregó al medio de electropolimerización utilizado anteriormente, dodecil sulfato de sodio.

Obteniendo una mínima respuesta potenciométrica catiónica, con pendiente de 2 a 3 mV/década (Fig. 2.16).

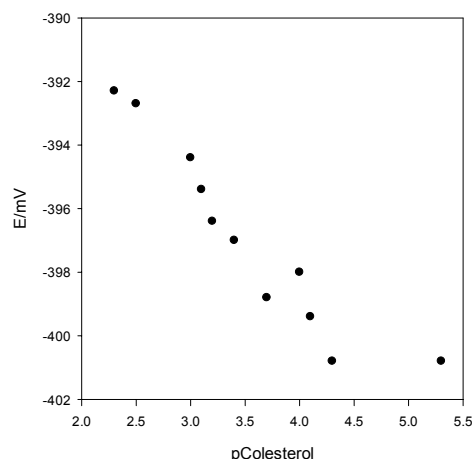


Figura 2.16. Curva de calibración de un electrodo potenciométrico de carbón vítreo polimerizado con pirrol 0.05M y β -ciclodextrina 0.01M en medio de ácido perclórico 1M con colesterol 0.01M y dodecil sulfato de sodio 0.01M. En la curva de calibración se mantiene una concentración constante de β -ciclodextrina, ácido perclórico y SDS.

A partir de los resultados se puede decir que la respuesta hacia colesterol es prácticamente nula, lo cual puede atribuirse a una mayor respuesta a SDS como en los electrodos polimerizados con polipirrol en SDS anteriormente descritos.

2.3.3 Evaluación de electrodos potenciométricos para cuantificar colesterol basado en la interacción del analito con ciclodextrinas.

En virtud de no contar con resultados satisfactorios para la cuantificación electroquímica de colesterol hasta el momento, se exploró la posibilidad la interacción del colesterol con ciclodextrinas a partir de la respuesta potenciométrica de un electrodo de Pb^{2+} , su disminución de potencial al agregar ciclodextrinas y el posible aumento de la señal al competir el colesterol con el plomo por la ciclodextrina. Así, se trazaron curvas de calibración E contra pPb en agua, obteniendo respuestas potenciométricas con pendientes de 40 mV/década (Fig. 2.17). Al realizar los calibrados de plomo en ciclodextrina 0.01M se observa el aumento de potencial esperado en bajas concentraciones, debido a la formación del complejo de inclusión; sin embargo, al agregar colesterol, no se obtiene la esperada

disminución del potencial por el desplazamiento del plomo por el colesterol (Fig. 2.17).

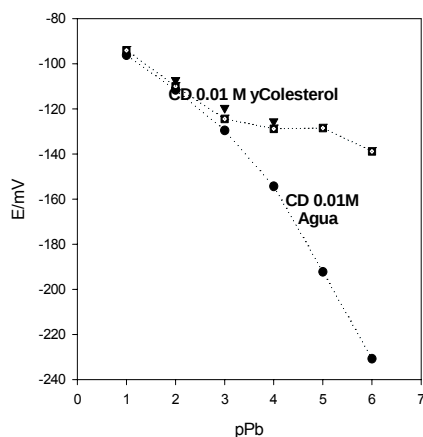


Figura 2.17 .Curva de calibración del electrodo potenciométrico selectivo a plomo.

Por otra parte, tratando de formar una membrana que fuese selectiva a plomo, se electropolimerizó un electrodo de carbón vítreo en perclorato de sodio 0.01M, ciclodextrina 0.01M y plomo 1×10^{-4} M utilizando la metodología reportada para la polimerización de ciclodextrinas [Roa, 2000]. En esta ocasión se presenta una ligera capa del polímero sobre la superficie del electrodo, la cual demostró ser sensible a Pb^{2+} (30 mV/década) (Fig. 2.18). Desafortunadamente, en este caso la competencia entre Pb y colesterol, tampoco es observada (Fig. 2.18).

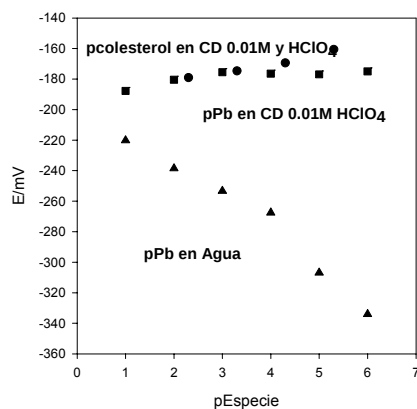


Figura 2.18. Curva de calibración del electrodo potenciométrico polimerizado con β -ciclodextrina, perclorato de sodio 1M y plomo 0.0001M

2.3.4 Electrodo potenciométrico de colesterol basado en la electropolimerización de polianilina

Pretendiendo desarrollar una alternativa para la cuantificación de colesterol sin el uso de una enzima, se hace un estudio con base en la impresión molecular, en esta ocasión con anilina. Así, se realizó un estudio preliminar de la caracterización electroquímica de pani (polianilina) mediante la técnica reportada Haiyan sobre un electrodo de carbón vítreo [Wang, 1999]. Mediante voltametría cíclica se identifican durante el proceso potenciodinámico 3 procesos redox (Fig. 2.19). Los primeros aparecen en 0.3 V y son atribuidos a la oxidación/reducción de leucoesmeraldina y esmeraldina, mientras el segundo proceso redox en 0.5 V implica los estados complemente oxidado (pernigranilina) y parcialmente reducido (nigranilina) de la anilina. El tercer proceso en 0.8 V corresponde a los productos de degradación benzoquinona/hidroquinona [Focke, 1987]. Se ha reportado que el pH en la solución es muy importante sobre las propiedades de selectividad y electroactividad del polímero, observando que en solución buffer de PBS de pH 6.2 y 7.0 van desapareciendo los picos representativos de la electropolimerización de pani.

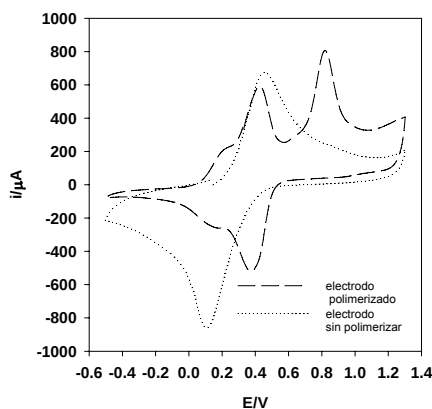
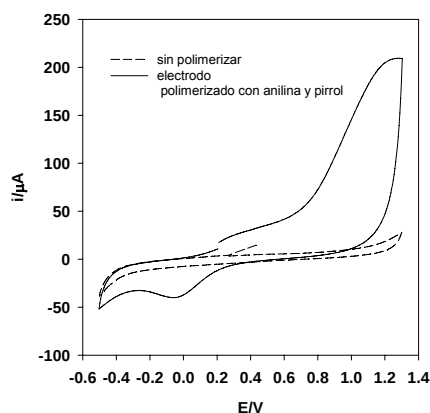
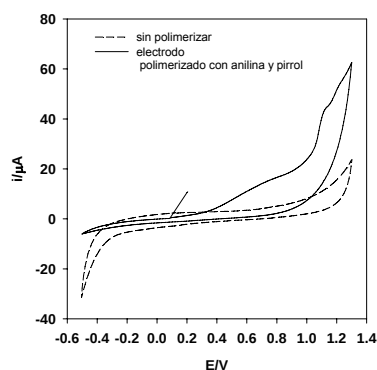


Figura 2.20. Voltamperogramas de caracterización en solución 1.0 M de H_2SO_4 para pani.

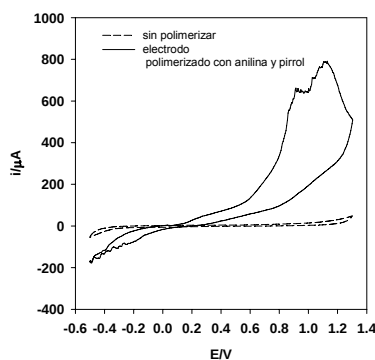
Así mismo se evaluó un codepósito de pani y polipirrol; sin embargo sólo se observa la electropolimerización parcial de anilina, aunque los potenciales de pico se ven afectados por el pirrol (Fig. 2.21a, b y c).



(a)



(b)



(c)

Figura 2.21. a) Voltamperogramas de caracterización en solución de H_2SO_4 pH 0, (b) PBS 0.05M (0.1 KCl) pH= 6.2 y (c) en solución PBS 0.05M (0.1 KCl) pH= 7.0 para polipirrol-polianilina.

Considerando los resultados obtenidos se realizó la impresión molecular inicialmente con la polimerización de anilina 0.1M, dodecilsulfato de sodio (SDS) 0.05M y colesterol en ácido sulfúrico 1M sobre un electrodo de carbón vítreo con un régimen potencioestático de 0.5 V por 30 min. La curva de calibración potenciométrica del electrodo desarrollado no muestra cambios apreciables de potencial respecto a la concentración de colesterol; este hecho es consecuencia de la escasa solubilidad del SDS ya que se protona bajo las condiciones elegidas (pKa 4.16).

2.4 Referencias

Alegret Savador, del Valle Manuel, Merkoci Arben, Sensores electroquímicos. Introducción a los quimiosensores y biosensores Curso teórico-práctico 1ª edición España 2004.

Álvarez Romero Gaaan' Morales-Pérez Adriana, Rojas-Hernández Alberto, Palomar-Pardavé' Ramírez-Silva Manuel Maria Teresa, *Development of a tubular sensor based on a polypyrrole-doped membrane for the potentiometric determination of the dodecylsulfate anion in a FIA system*, Electroanalysis, 16 1236, (2004).

Anderson Hugo J, *Pyrrole: from dippel to du dont*, Journal of Chemical Education, 72 875, (1995).

Davidson and W. Hayes, *Molecular Imprinting of bilogically antive steroidal systems*, Current Organic Chemistry, 6, 265-281,(2002).

Díaz, M.,. Rojas A., Vera E, M, *Síntesis electroquímica y caracterización eléctrica de polímeros conductores a partir de pirrol*, Cortes Revista Colombiana de Física, 7 357 (2005).

Eggins Brian R., Sensores y Biosensores, Wiley, Inglaterra, 2002

Fernández Otero Toribio, *Polímeros conductores: síntesis, propiedades y aplicaciones electroquímicas*, Revista Iberoamericana de Polímeros, 4, 1, (2003)

Focke Watet W., Journal Phys Chemica, 91 3813-3818 (1987).

Gómez Moliné Rosa Margarita y Alegret Salvador, Educación Química 8, 191,(1997).

Huerta L. A, Galán-Vidal C. A., Álvarez Romero G. A.,. Páez-Hernández M. E Potentiometric behaviour of graphite-epoxy electrochemical transducer towards

anions, cations and pH in aqueous media. *Revista Mexicana de Física* 52 17-19 (2006).

Hutehins Richard s. and G. B Leonidas, *Chemically mediated imprinting/doping of polypyrrole*, *Analytical Chem.*, 67 1654 (1995).

Manakker Frank van de, Pot Martin van der, Vermonden Cornelus Tina, Nostrum F. van, and El Hennink Wim, *Serf-Assembling Hydrogels Base don B-ciclodextrin-cholesterol inclusion complexes*, *Macromolecules*, 41, 1766-1773, (2008).

Pal Swapna y. Moulin S. P, *Journal of lipid Research*, 24, 1281. (1993).

Pelesky and Turner, *Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers review*, *electroanalysis*, 14, 317, (2002).

Perrin Armarego, *Purificación of Laboratory Chemicals*, 4ª Edición, USA, 1996.

Reynolds y Simon, *Expand the interaction of polypeptide components of human high density lipoprotein with sodium dodecyl sulfate*, *Journal of Biological Chemistry*, 12 3937, (1974).

Roa Gabriela, Ramírez Silva. M T. Romo M. M. and Galicia Laura, *Applications of Analytical Chemistry in Enviromental Reserch*, *Resech Sigpost* , 2009 57-66.

Smith Vogel Furniss, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 7a Edición, Inglaterra, (1989).

Stejaskal, *Polyaniline. Preparation of a conducting polymer*. *Pure Appl.Che*, 71, 5, 857-867, (2002).

Wang Haiyan, Mu Sahaolin, *Bioelectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in a polyaniline film*, *Sensors and Actuators B*, 56, 22-30, (1999)

Wang Joseph, *Analytical Electrochemistry*, 2a edición, editorial Wiley-Vch, (2000).

Capítulo 3

Sensores
voltamperométricos

3. SENSORES VOLTAMPEROMÉTRICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL

En este capítulo se presentan y se discuten los principales resultados obtenidos a través del desarrollo de electrodos voltamperométricos para la cuantificación de colesterol. Las estrategias investigadas involucran el uso de la polarografía con un electrodo de gota de mercurio y el efecto de la adsorción en la corriente de oxidación del ferrocianuro sobre un electrodo de carbón vítreo.

3.1. Introducción

Las técnicas voltamétricas tienen su origen en el año 1922, cuando el químico Jaroslav Heyrovsky desarrolló la polarografía. La voltamperometría en general, engloba un grupo de métodos electroquímicos en que la información analítica se obtiene a partir de la medida de la intensidad de corriente que fluye a través de un electrodo de trabajo en función del potencial aplicado [Wang, 2000]. Estos estudios pueden ser usados con fines cualitativos o cuantitativos y es posible obtener a partir de ellos información tanto termodinámica como cinética.

En la voltamperometría cíclica (CV), el potencial aplicado al electrodo de trabajo es cambiado linealmente con respecto al tiempo, partiendo de una posición en la que no se verifique ninguna reacción electroquímica (potencial de corriente nula). La dirección del barrido de potencial será aquella en la que se lleve a cabo el proceso de oxidación o reducción que nos interese estudiar. Una vez recorrida la región del potencial en que la reacción electroquímica de interés tiene lugar, la dirección del barrido es invertida de tal manera que los productos electroactivos generados son detectados. Esta técnica ha sido utilizada con éxito para estudiar la cinética de las reacciones que se verifican en la interface electrodo solución; así mismo, es una poderosa herramienta para elucidar mecanismos de reacción [Skoog, 1995, Harris, 2001].

La voltamperometría lineal (LSV) difiere de la CV en que el barrido de potencial solamente se lleva a cabo en una dirección y en consecuencia, es una técnica que aporta menos información. No obstante, en sistemas electroquímicos lo suficientemente conocidos, es de gran utilidad cuando se requiere obtener información analítica en forma reproducible y rápida.

La polarografía es un tipo específico de medida que cae en la categoría general de voltamperometría de barrido lineal cuando se emplea un electrodo de mercurio. La respuesta está determinada fundamentalmente por el transporte difusional de masa hacia el electrodo, ya que la convección y migración son controladas fijando la temperatura y fuerza iónica del electrolito soporte. La respuesta corriente vs potencial de un experimento polarográfico tiene una forma típica sinusoidal ya que el área del electrodo cambia constantemente debido al uso del electrodo de gota de mercurio (DME).

Como una alternativa al uso de costosas enzimas en el desarrollo de biosensores electroquímicos, se ha reportado la posibilidad de adsorber y oxidar colesterol sobre un electrodo de gota de mercurio [Peng, 1992]. Este método determina al colesterol de forma directa adsorbiéndolo sobre la gota de mercurio durante la reacción oxidación, siguiendo la concentración del analito mediante el aumento de la intensidad del pico. Aunque se evaluaron interferentes como el ácido ascórbico, ácido úrico, Cu (II) y Fe (II); sólo se reporta la interferencia del Cu (II) al disminuir el pico de colesterol (Tab. 3.1).

Tabla 3.1 Resultados obtenidos en la curva de calibración del sensor [Peng 1992].

IRL / [Colesterol]	Límite de detección	r^2
0.1-8.0 μM	0.06 $\mu\text{M} \pm 0.3$	0.998

Como otra alternativa analítica para la cuantificación de colesterol sin el uso de enzimas se han propuesto la adsorción de colesterol [Chou, 2005] o la oxidación directa de colesterol [Kowalksi, 2005] (Tab. 3.2). El desarrollo propuesto por Chou y colaboradores, se basa en la reacción de oxidación del ferrocianuro y la disminución de la corriente por adsorción del colesterol en una membrana de hexadecil

mercaptano crecida en presencia de colesterol para inducir una impresión molecular; por otra parte, en el reporte de Kowalksi se realiza una oxidación directa del colesterol en una solución de ácido acético.

Tabla 3.2 Resultados obtenidos en la curva de calibración del sensor .

Electrodo de trabajo	IRL /[Colesterol]	Límite de detección	Ref.
platino	0.6-4.0 mM	no reportado	[Kowalksi, 2005]
oro	66-700 nM	238 nM	[Shou, 2005]

Partiendo de las ideas anteriormente reportadas, en el presente capítulo se presentan algunos de los resultados obtenidos mediante la modificación de estas estrategias de cuantificación de colesterol.

3.2 Metodología

3.2.1 Equipo, reactivos y soluciones

3.2.1.1. Equipo

El equipo empleado para realizar la caracterización física y química de los sensores desarrollados, se enlistan a continuación:

- Electrodo de referencia MF 2012 (BAS) Ag/AgCl
- Electrodo de carbón vítreo MF 2012 (BAS)
- Electrodo de grafito
- Sistema electroquímico BAS Controlled Growth Mercury Electrode (CMGE) incorporado a un potenciostato BAS 100B
- AUTOLAB PGSTAT 30 (Ecochemie)

3.2.1.2 Reactivos y Soluciones

Todos las soluciones fueron preparadas con reactivos comerciales de grado analítico.

- NaNO_3 (Sigma)
- Dodecil Sulfato de Sodio (Sigma)
- metanol (Mallikrodt ChromAr HPLC)

- Colesterol (Hycel México).
- NaCl (J.K Baker)
- $K_4Fe(CN)_6$ (Sigma)
- $HClO_4$ (Sigma)
- $NaClO_4$ (Sigma)
- propanol (J.T. Baker)
- KCl (Técnica Química S. A.)
- β -Ciclodextrina (Acros Organics)

Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua desionizada Milli Q (Millipore) (18.2 M Ω cm).

El colesterol se dispersa con metanol en una proporción 2:10, posteriormente se sónica en el ultrasonido (hasta formar una emulsión estable) y se afora con una solución de dodecil sulfato de sodio 0.001 M.

Para los calibrados de los sensores polarográficos de mercurio se utilizó una solución stock 1 mM de colesterol disuelto en etanol. En este caso el electrolito soporte fue una solución acuosa de KCl 0.1M.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1. Desarrollo de un sensor voltamperométrico de colesterol basado en la adsorción sobre un electrodo de carbón vítreo.

El carácter neutro del colesterol, lo convierte en una especie que puede adsorberse fácilmente sobre los electrodos en un medio iónico. En este estudio se evaluó la respuesta voltamperométrica de oxidación del ferrocianuro de potasio sobre carbón vítreo y la disminución en la intensidad del pico de oxidación a consecuencia de la adsorción del analito de interés. El estudio se realizó partiendo de una solución de ferrocianuro de potasio 0.004M disuelto en β -ciclodextrina 0.01M para posteriormente adicionar sucesivamente de 200 μ l de solución de colesterol 0.025mM en β -ciclodextrina 0.01M. Es importante aclarar que se pretende que la

ciclodextrina polimerize sobre la superficie tratando de crear una impresión molecular que contribuya al reconocimiento de colesterol por parte del dispositivo [Davidson, 2002].

Las curvas de calibración obtenidas exhiben una sensibilidad muy baja; siendo mayor a bajas concentraciones y con un intervalo lineal 0.005mM a 0.020mM (Fig. 3.1).

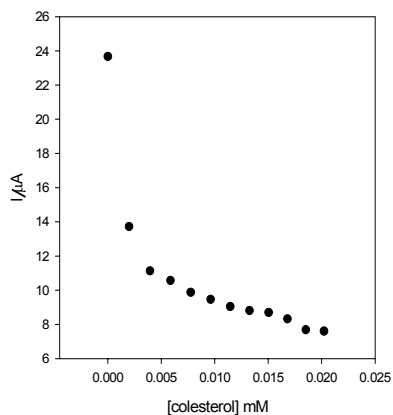


Figura 3.1 Curva de calibración de colesterol para el electrodo de carbón vítreo en una solución de ferrocianuro 0.004M en ciclodextrina 0.01M

Con la finalidad de incrementar la sensibilidad se evaluaron las curvas de calibración por voltametría diferencial de pulsos; no obstante, las características de la técnica afectan significativamente el proceso de adsorción presentándose cambios más pequeño de corriente respecto a la voltametría cíclica (Fig. 3.2).

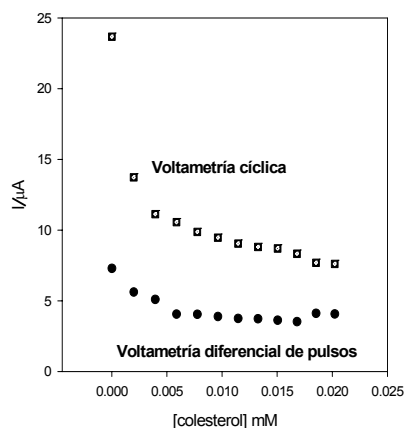


Figura 3.2 Curvas de calibración de colesterol para el electrodo de carbón vítreo en una solución de ferrocianuro 0.004M en β -ciclodextrina 0.01M en los modos de voltametría cíclica y diferencial de pulsos.

El sistema voltamperométrico estudiado presenta una sensibilidad muy baja y en consecuencia no es útil para un análisis descentralizado de colesterol ya que no cubre el intervalo de concentración de interés clínico. Es necesario mencionar que no existe evidencia que se haya formado un polímero de ciclodextrina en la superficie del electrodo y consecuentemente está puede ser la razón de la baja sensibilidad. Por otra parte es de esperar que cualquier sustancia neutra presente en la muestra como proteínas y grasas interfiera significativamente con el análisis.

3.3.2 Desarrollo de un sensor polarográfico de colesterol mediante la adsorción de este en un electrodo de mercurio.

Continuando en la búsqueda de alternativas electroquímicas de cuantificación de colesterol sin el uso de enzimas, se estudió voltamperométricamente la adsorción y oxidación de colesterol reportada sobre mercurio en una solución de KCl 0.1M [Peng, 1992] (Fig 3.3). Es interesante observar la aparición de un pico de oxidación y uno de reducción en -0.025 V y -0.040V respectivamente, mismos que no fue posible reproducir sobre sustratos de Pt, Ag y Au. Es importante mencionar que la separación de los picos de oxidación y reducción del colesterol en nuestro caso es de 15 mV contra los 25 mV reportados por Peng. Asimismo, se confirma que el producto de oxidación también es adsorbido sobre la superficie del electrodo.

El modo polarográfico utilizado en este trabajo es de electrodo goteante contrariamente al de gota suspendida utilizado por Peng; este hecho nos permite controlar más fácilmente el tiempo de adsorción del colesterol en la gota de mercurio.

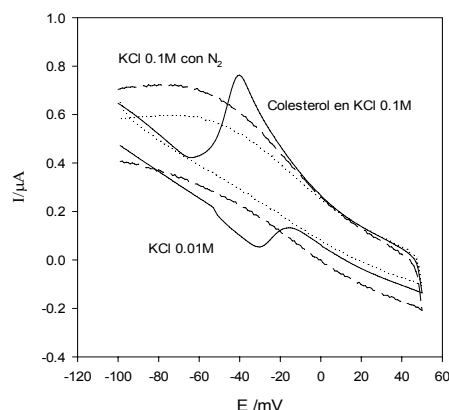


Figura 3.3 Voltamperogramas de una solución de KCl 0.1M y de colesterol en KCl 0.1M sobre gota suspendida de mercurio a una velocidad de 20 mV/s.

Al incrementar la concentración de colesterol a partir de la solución stock disuelta en etanol, se encuentra que los picos de oxidación y reducción se incrementan proporcionalmente respecto a la concentración (Fig 3.4).

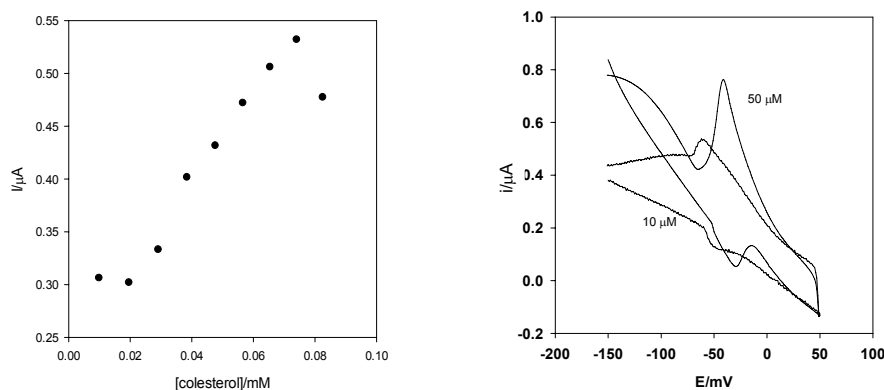


Figura 3.4 .Curva de calibración de colesterol para el electrodo de goteante de mercurio en una solución de KCl 0.1M con colesterol.

Al realizar curvas de calibración por triplicado en un intervalo de 0.01–0.08 mM de colesterol se encuentra buena reproducibilidad con un intervalo lineal de 0.02 a 0.07 mM y un coeficiente de correlación promedio de 0.9815 con una pendiente de 30 ± 3 nA, misma que es superior a la reportada por Peng y colaboradores (20 ± 3 nA).

Aunque esta metodología podría ser de utilidad para muestras de alimentos, no es adecuada para el análisis de suero o sangre, ya que no cubre las concentraciones

de interés clínico. Adicionalmente es importante mencionar que ésta alternativa analítica requiere de un electrodo altamente tóxico y de una instrumentación que no es portátil.

Aunque la idea de desarrollar un sensor electroquímico de colesterol que no involucre el uso de costosas enzimas es sumamente atractiva, es importante mencionar que las alternativas electroquímicas hasta el momento presentan serias deficiencias en cuanto a selectividad e interferencias. Aunque ambos desarrollos podrían implementarse en configuración plana para el análisis descentralizado, el carácter complejo de las muestras de sangre o alimentos hace que su uso sea poco práctico en campo debido a la exigencia de pretratamiento para eliminar las interferencias.

3.4. Referencias

Bard, Allen J.; Larry R. Faulkner). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2 edición). Wiley. (2000).

Davidson L. and W. Hayes, *Molecular Imprinting of Biologically Active Steroidal Systems*, Current Organic Chemistry, 6 265-28, (2002).

Harris, Daniel C., *Análisis Químico Cuantitativo*, “2da Edición, Editorial Reverte, Barcelona 460, (2001).

Kowalksi Jan, Jolanta Ploszynska, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 585 275-280 (2005).

Wang, Joseph, *Analytical Electrochemistry*, 2do editorial, Wiley-Vch, (2000)

Lwrence C.S. Chou, Chung-Chiun Liu, *Development of a molecular imprinting thick film electrochemical sensor for cholesterol detection*. *Sensors and Actuators B* 110 204-208, (2005)

Pilesky S.A., E. V Piletskaya, T.A Sergeyeva, *Molecularly imprinted self-assembled films with specificity to cholesterol*, Sensors and Actuators B, 60 216-220, (1999).

Skoog, Douglas A.; Donald M. West, F. James Holler (1995). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (7a edición). Harcourt Brace College Publishers.

Peng Tuzhi, Huiping Li and Rongshan Lu, *Direct measurement of cholesterol based on anodic stripping voltammetry*, Analytica Chimica Acta, 257 15-19, (1992)

Capítulo 4

Biosensores en
configuración cilíndrica

4. BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO EN CONFIGURACIÓN CONVENCIONAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL

En éste capítulo se presentan y discuten los principales resultados obtenidos durante el desarrollo de los biosensores amperométricos para la cuantificación de colesterol mediante dispositivos en configuración cilíndrica.

4.1 Introducción

El principio de funcionamiento de un biosensor electroquímico es relativamente simple; el elemento receptor interacciona selectivamente con un componente o analito de la muestra generando una señal primaria de naturaleza electroquímica, que posteriormente el transductor se encarga de transformar en una señal útil del dominio eléctrico.

En el caso particular de los biosensores amperométricos enzimáticos, la interacción entre el analito y el receptor puede provocar el consumo de algún cosustrato o mediador electroquímicamente activo, la generación de productos electroactivos; o bien, un cambio del estado de oxidación del mismo receptor (Fig. 4.1). En cualquiera de los casos, es posible obtener una intensidad de corriente proporcional a la concentración del analito de interés aplicando al transductor un potencial de trabajo conveniente, de acuerdo a la siguiente ecuación (Ec. 4.1).

$$i = K^{E_{\text{trab}}} C; (E_{\text{trab}} = \text{constante}) \quad \text{Ec. 4.1}$$

Donde i es la intensidad de corriente, C la concentración del analito, K la constante de proporcionalidad y E_{trab} es el potencial óptimo de trabajo.

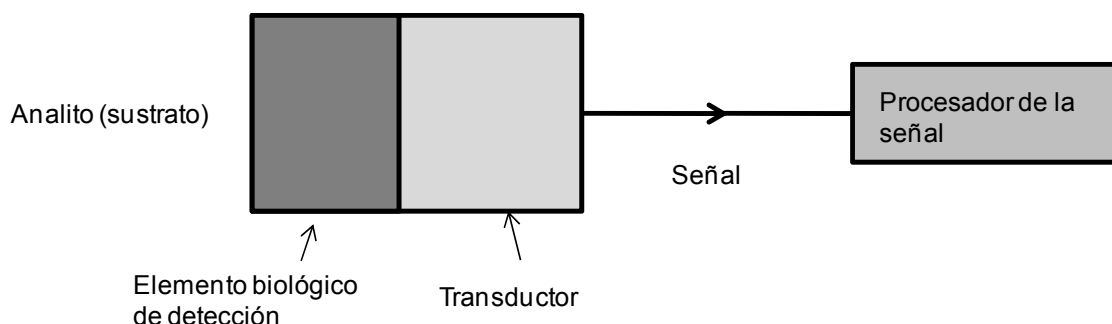


Figura 4.1 Representación esquemática del principio de operación de un biosensor amperométrico enzimático.

El biosensor de glucosa oxidasa es el ejemplo más conocido y fue desarrollado hace más de 50 años; sin embargo, aún despierta el interés de sectores importante de investigadores que procuran su perfeccionamiento y amplían sus aplicaciones a diversas muestras, a la vez que se trabaja en la incorporación de otras enzimas para generar dispositivos analíticos de utilidad para cuantificar otras especies químicas de interés [Papastathopoulos, 1975]. Debido al importante mercado potencial de los biosensores electroquímicos y las limitaciones que se encuentran en aplicaciones específicas, este campo de investigación continua siendo un área de importante científica.

En el biosensor amperométrico de colesterol oxidasa COD típico, la enzima (receptor), interacciona con el colesterol (el analito) consumiendo O_2 (cosustrato o mediador natural) para genera colesteno y peróxido de hidrógeno (productos). El consumo de oxígeno por parte de la enzima, provoca la regeneración del sitio activo a su forma redox original, conservando de esta manera su actividad catalítica [Doukyu, 2009]. Hasta ahora no ha sido posible regenerar electroquímicamente los sitios activos FAD de la enzima colesterol oxidasa [Doukyu, 2009] y debido a que la colesteno no es una especie electroattractiva, las estrategias de detección amperométrica se reducen a la reducción de oxígeno, la oxidación de peróxido de hidrógeno, o bien la oxidación de algún mediador artificial que sustituya al oxígeno (ferroceno, TTF, TCNQ, ftalocianinas, etc.). Las estrategias de detección mencionadas anteriormente han sido implementadas para desarrollar una gran variedad de biosensores amperométricos en configuración convencional (Tab. 4.1).

Tabla 4.1. Biosensores en configuración convencional para colesterol

Transductor	Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1} \text{mm}^{-2}$)	Intervalo lineal mM	Referencia
Grafito Nanotubos AuPt	90.7	0.05-6.2	[Safavi, 2011]
Au	9.02	0.04-0.22	[Saxena,2011]
Grafito	0.54	0.008-0.45	[Tan, 2005]
Grafito Nanotubos	1.55	0.004-0.7	
Au Nanotubos	20	0.5-5	[Gopalan, 2009]
Platino	1.29	7.5×10^{-4}	[Singh, 2006]
Platino-ITO	10.35	-	[Dhanda, 2007]
Platino	8.51		[Vidal,2002]
Grafito	0.39	0.1-1	[Li, 2006]
Platino	-	0.5-15	[Brahim, 2001]

Este tipo de sensores poseen ventajas relevantes como excelentes sensibilidades comparados con reportes de años anteriores, amplios intervalos de linealidad, límites de detección bajos y cortos tiempos de respuesta. Sus principales desventajas son las interferencias de especies oxidables a los potenciales de trabajos y que la gran mayoría de estos biosensores utilizan sustratos de alto costo como platino y oro.

En este capítulo se describe el desarrollo de biosensores amperométricos de colesterol en configuración cilíndrica con diversas ventajas comparados con los reportados en la tabla, una de las principales es el uso de grafito incorporando a diferentes mediadores, idea que podrá transportarse a sensores planos.

4.2 Metodología

4.2.1 Material, equipo, reactivos y reactivos

4.2.1.1. Material

- Tubos de metacrilato de 10.0 cm de largo x 1.0 cm de diámetro exterior y 8.5 mm de diámetro interior.
- Tubos de metacrilato de 2.0 cm de largo x 8.0 mm de diámetro exterior y 4.0 mm de diámetro interior
- Cable blindado coaxial

- Discos de cobre de 8.0 mm de diámetro
- Soldadura de estaño
- Conector banana estándar
- Resina epóxica Araldyt HY956 con catalizador REM 001 (Ciba Geigy)

4.2.1.2. Equipo

La voltamperometría cíclica, cronoamperometría y la preparación de soluciones fueron obtenidos mediante la ayuda del siguiente equipo y accesorios:

- AUTOLAB PGSTAT 30 (Ecochemie)
- Electrodo de alambre de platino (XM110 Radiometer-Copenhagen).
- Electrodo de referencia de doble camisa Ag/AgCl (900200 Orión) con solución externa de KNO₃ 10% (E=ECS).
- Potenciómetro PHM 250 ION ANALYZER (Radiometer Copenhagen).
- Baño ultrasónico (Cole–Parmer 8890).
- Estufa incubadora (BOEKL 132000).
- Amperímetro BAS LC-4C

4.2.1.3 Reactivos y Soluciones

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos comerciales de grado analítico.

- C₂₇H₄₅OH (Hycel México).
- K₃(FeCN₆) (Sigma)
- CH₃CH₂OH (J.T. Baker)
- KCl (Técnica Química S. A.)
- Colesterol (Research Organics).
- KH₂PO₄ (Sigma)
- K₂HPO₄ (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- 7,7,8,8-Tetracianoquinodimetano (Aldrich)
- Ferroceno (Aldrich)

- Cobalto (II) Phtalocianina (Fluka)
- Tetratiofulvaleno (Aldrich)
- Colesterol oxidasa de *Pseudomonas flourescens* 2.4 UI/mg (Sigma).
- Glutraldehído, grado 1 al 8 % (SIGMA)
- Grenetina

Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua desionizada Milli Q (Millipore) (18 MΩ cm).

El colesterol se disuelve con 2 ml de isopropanol y 2 ml de Triton X-100 agitando hasta formar una solución estable completamente. Posteriormente se afora a 100 mL con una solución buffer de fosfatos 0.05M/KCl 0.1M a pH 7.0 (PBS) formándose una emulsión estable.

4.2.2. Construcción de electrodos en configuración cilíndrica

El cuerpo del electrodo fue construido con tubo de metacrilato de 10 cm de largo y 8.5 mm de diámetro interior, un extremo de éste se fija con pegamento a otro tubo con 2 cm de largo y 4 mm de diámetro interior; a través de este tubo se hace pasar un cable blindado que se suelda con estaño a un disco de cobre de 8 mm de diámetro, el cual se asienta sobre el tubo interno de metacrilato, dejando un espacio aproximadamente de 0.5 cm (Fig. 4.2).

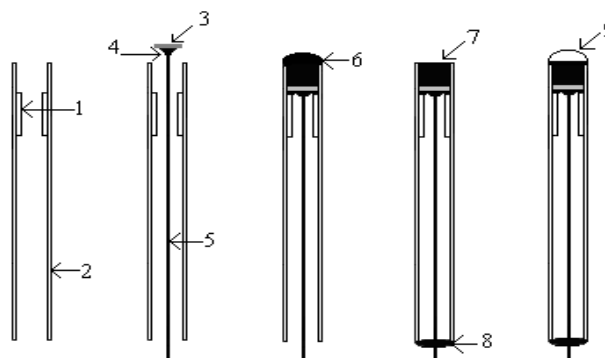


Figura 4.2. Representación de la construcción de biosensores amperométricos de colesterol con contacto interno sólido y membrana de PVC. (1) Tubo de metacrilato interno. (2) Tubo de metacrilato externo. (3) Disco de cobre. (4) Soldadura de estaño. (5) Cable blindado. (6) Composite y mediador depositados. (7) Superficie

pulida del composite. (8) Fijación del cable. (9) Inmovilización de la enzima colesterol oxidasa

4.2.2.1 Preparación y depósito del composite grafito-epoxy:

Se deposita una mezcla de grafito-epoxy y mediador en el espacio creado entre el tubo externo de metacrilato y el disco de cobre previamente pulido para quitar el óxido presente (Fig. 4.2).

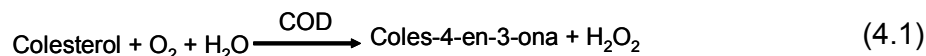
Para preparar el composite grafito-epoxy, se mezclan 100 partes en masa de resina con 20 partes en masa de catalizador; estas a su vez son mezcladas con la carga de grafito y se dejan curar por al menos 24 horas a una temperatura de 40 °C. La proporción de grafito-epoxy en masa es 50 % de polvo de grafito, 50 % resina-catalizador (100:20). Una vez mezclado el composite y previo al proceso de curado, se adiciona un 1% en masa de mediador (TCNQ, TTF, Co-Ph y ferroceno). Una vez endurecido el material, se lija y se pule el composite hasta lograr una superficie plana y brillante para depositar la membrana enzimática (Fig.4.2).

4.2.2.2 Inmovilización de la enzima

Se prepara una solución con 5.0 mg de enzima de colesterol oxidasa (1.2 U.I.) y 65 mg de grenetina, las cuales son disueltas a 37° C en 1 mL de buffer PBS. Esta solución se gotea sobre la superficie de grafito-epoxi del electrodo, previamente lavada con agua desionizada. La membrana se calienta en una estufa incubadora a una temperatura entre 25-30°C durante 15 min, con la finalidad de que se disuelva totalmente y que a la vez cubra toda la superficie; transcurrido el tiempo indicado, se sumergen en una solución al 1% de glutaraldehído por 60 segundos, se enjuaga con agua desionizada y se sumerge posteriormente en una solución 0.1 M de glicina por 20 min. Mediante este procedimiento denominado *cross-linking* o entrecruzamiento, se lleva a cabo la inmovilización física de la enzima, creando una red que le da mayor estabilidad y durabilidad a la membrana de COD.

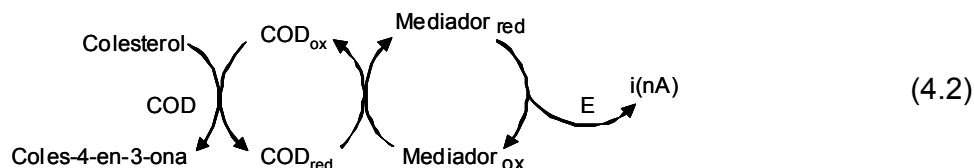
4.3 Resultados y Discusión

El funcionamiento convencional de los biosensores de colesterol se basa en la ecuación 4.1.



La enzima colesterol oxidasa (COD) al entrar en contacto con el colesterol, en presencia del oxígeno y agua, produce coles-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno; mismo que es oxidado posteriormente cuando es aplicado un potencial adecuado sobre el transductor, generando así una corriente eléctrica proporcional a la concentración de colesterol. No obstante, el peróxido de hidrógeno se oxida a potenciales muy elevados por lo que especies electroatrativas que se encuentren presentes en las muestras a analizar, como el ácido úrico, ácido ascórbico, etc. pueden interferir en el estudio.

En primera instancia, con la finalidad de disminuir el efecto de las posibles interferencias en el biosensor, se incorporó ferricianuro como mediador con el objetivo de disminuir el potencial de trabajo. Dichos mediadores sustituyen al O_2 en el esquema de reacción enzimática (Ec. 4.2) regenerando el sitio activo de la enzima. Así, el mediador oxidado pasa a mediador reducido, volviéndose a reoxidar a un potencial menor que el peróxido de hidrógeno, generando una corriente eléctrica proporcional a la concentración de colesterol (Ec. 4.2).



Para corroborar el mecanismo de funcionamiento de los biosensores se construyó el biosensor en configuración cilíndrica incorporando como mediador al ferricianuro.

4.3.1 Biosensor amperométrico de colesterol utilizando ferricianuro de potasio como mediador

Para evaluar la correcta inmovilización de la enzima del biosensor de colesterol, se obtuvo el registro cronoamperométrico del dispositivo (Fig. 4.3). El potencial de trabajo se fijó a 0.6 V conforme a estudios previos en que se reporta el pico de oxidación del ferrocianuro generado a ese potencial. En este caso se utilizaron 15 mL de solución blanco (buffer de fosfatos pH=7) a la cual se le fueron agregando sucesivamente adiciones de 1 mL colesterol 20 mM a determinados tiempos. Se encuentra que al agregar colesterol hay un aumento en la intensidad de corriente, lo cual corrobora el funcionamiento de la enzima bajo las condiciones de trabajo.

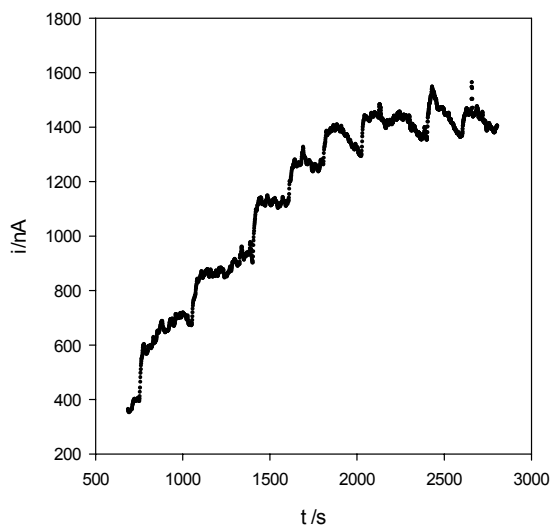


Figura 4.3 Respuesta amperométricas para el biosensor cilíndrico de grafito con 1.2 U I de enzima COD. ($E_{\text{trabajo}} = 0.6 \text{ V}$).

4.3.1.1 Parámetros analíticos

No obstante que en el registro cronoamperométrico se observa cierta inestabilidad de la señal (Fig. 4.3), la curva de calibración amperométrica exhibe un comportamiento lineal en un intervalo de concentración 2.8-11.4 mM con un coeficiente correlación de 0.994. (Fig. 4.4). El límite de detección se ubicó en 0.80 mM y la sensibilidad es $1.83 \mu\text{A}/\text{mm}^2 \pm 0.29$.

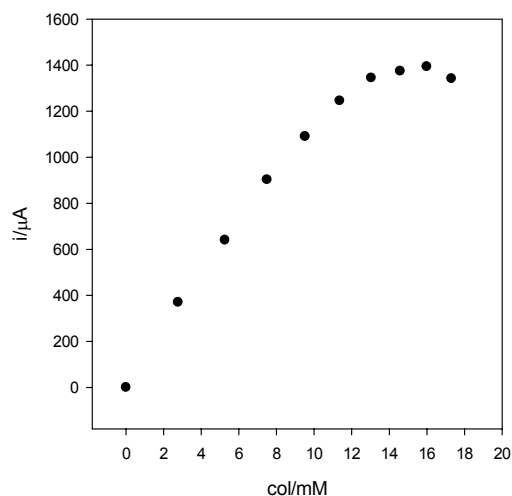


Figura 4.4. Curva de calibración amperométricas para el biosensor cilíndrico de grafito con 1.2 U.I. de enzima COD. ($E_{\text{trabajo}} = 0.6\text{V}$).

4.3.1 2 Determinación de la constante de Michaelis-Menten

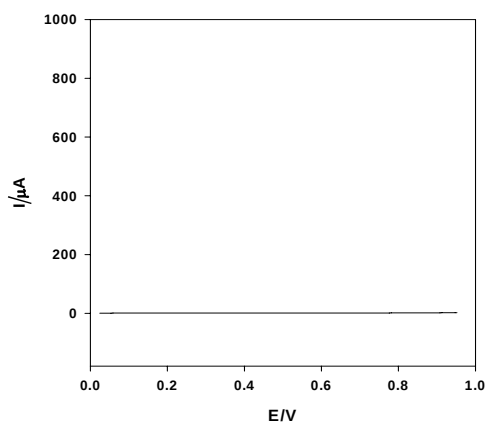
Conforme al modelo cinético de Michaelis-Menten [Bonhiski, 1998; Limoges, 2003], la curva de calibración se hace asintótica a concentraciones mayores a 12 mM debido a la saturación de la enzima. A partir de la gráfica de Lineweaver-Burk, se calculó la constante aparente de Michaelis-Menten la cual fue de 29.6 ± 0.30 mM; valor mayor al reportado para la COD 0.013-0.35 mM, indicando que la afinidad de la enzima por el sustrato ha sido afectada por el proceso de inmovilización. Este hecho abre la posibilidad de incrementar la sensibilidad del biosensor mediante la optimización de las condiciones de análisis y fabricación.

Conforme a los resultados obtenidos, podemos concluir que el desarrollo del biosensor para colesterol realizado confirma el funcionamiento tradicional de los biosensores de colesterol en nuestras condiciones de trabajo y que las concentraciones de trabajo se ubican dentro del intervalo de interés clínico. Comparando con algunos de los biosensores reportados, aportamos algunas ventajas en cuanto al costo y la sensibilidad.

4.3.2 Estudio del Mediador

En la actualidad la multiplicidad de mecanismos de respuesta y la variedad de tecnologías implicadas en la construcción de los diferentes sensores da lugar a implementar nuevas tecnologías como la serigráfica que permite la producción en grandes cantidades de biosensores a bajo costo, con la ventaja adicional que pueden ser usados una vez y desecharlos por lo que su tiempo de vida no necesariamente implica una desventaja. Para hacer compatibles las técnicas convencionales de construcción de biosensores con metodologías de producción en serie e incrementar la reproducibilidad de los dispositivos fabricados es frecuentemente emplear en serigrafía el dopaje de la pasta que conforma el electrodo de trabajo; así, las tintas de carbono pueden ser dopadas con varios mediadores electroquímicos (TCNQ, TTF, Cobaltoftalocianina) y con derivados del ferroceno, azul de Prusia o incluso con enzimas.

Considerando que nuestro objetivo es desarrollar un biosensor en configuración plana se realizó un estudio mediante voltamperometría cíclica a diversos mediadores en el cual se incorporó el 1% de mediador dentro grafito-epoxi en el electrodo en configuración cilíndrica, la medida se efectuó en una solución blanco que contenía isopropanol 2%, tritón X-100 2%, PBS 96% v/v, obteniendo los voltamperogramas para cada uno de ellos como se muestra en la figura 4.5. Cabe mencionar que solo se muestra la parte positiva del voltamperograma, dado que es la parte en donde se observa el pico de oxidación.



(a)

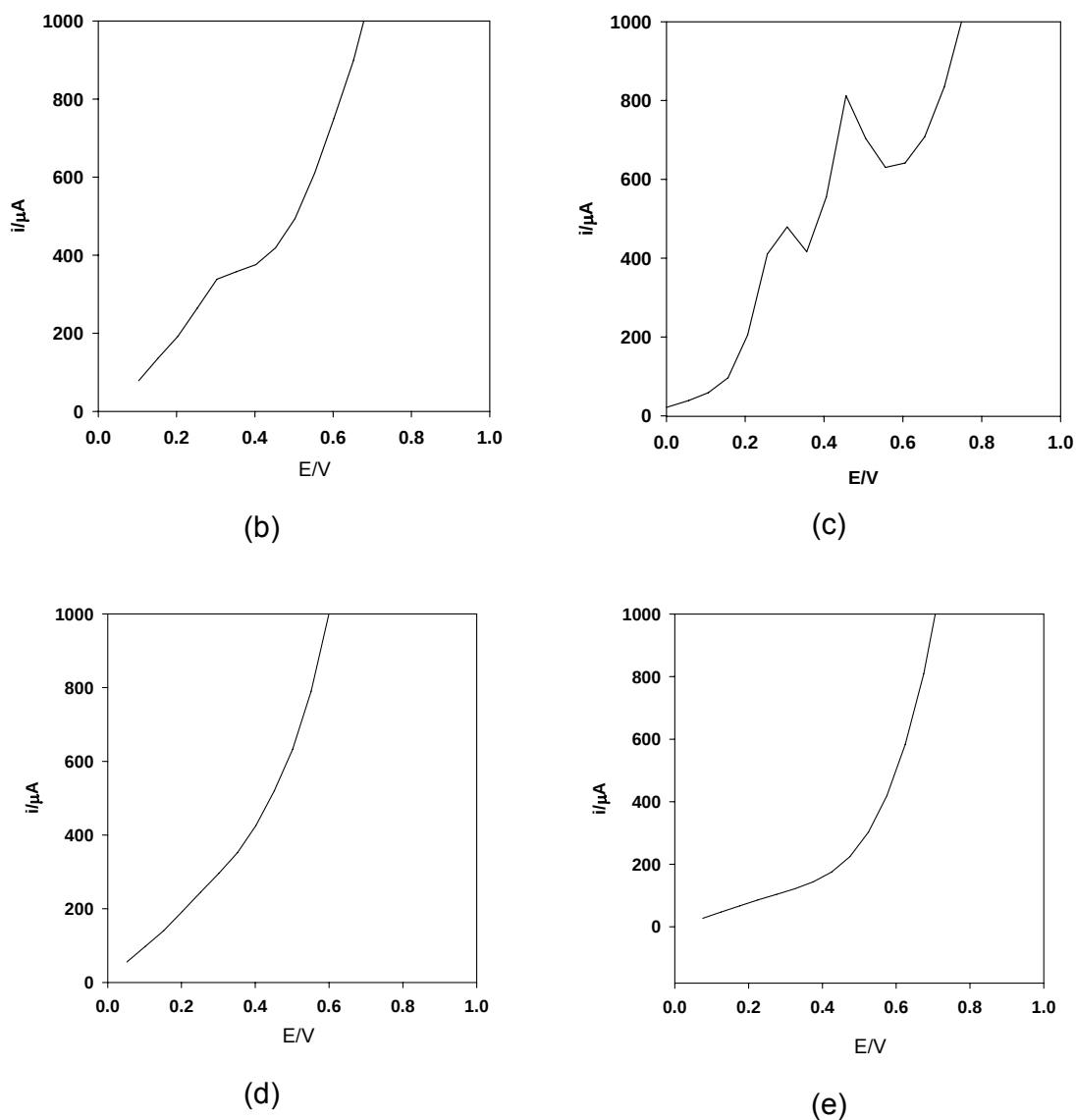


Figura 4.5 Voltamperogramas cíclicos del transductor y mediador al 1% en solución blanco (isopropanol 2%, tritón X-100 2%, PBS 96% v/v) ($v=10$ mV/s). a) blanco b) ferroceno, c) TCNQ, d) TTF, e) CoPh.

Conforme a los resultados se puede observar que los transductores que contienen un mediador presentan señales de oxidación en comparación al electrodo de grafito-epoxy no dopado (figura 4.5a). En el caso particular del TCNQ se obtienen picos de oxidación en 0.3 y 0.45 V, y un pico de oxidación en 0.3 V para el electrodo cargado con ferroceno (Fig 4.5b y 4.5c). En cuanto a los electrodos que contienen cobalto ftalocianina y TTF no se observa claramente el pico de oxidación, aunque si el

incremento en la intensidad de corriente. Éste hecho podría ser atribuido a la cantidad insuficiente de mediador que se encuentra en la superficie del electrodo para estos dispositivos.

Conforme a los resultados obtenidos es posible establecer que los mediadores más prometedores son el ferroceno y el TCNQ para el desarrollo de biosensores en configuración plana.

4.4. Referencias

Safavi Afsaneh, Fatemeh Farjami, *Electrodeposition of gold-platinum alloy nanoparticles on ionic liquid-chitosan composite film and its application in fabricating an amperometric cholesterol biosensor* Biosensors and Bioelectronics, 26, 5, 15 , 2547-2552, (2011).

Anantha Iyengar Gopalan, Kwang-Pill Lee, Dhanusuraman Ragupathy, *Development of a stable cholesterol biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-gold nanoparticles composite covered with a layer of chitosan-room-temperature ionic liquid network*, Biosensors and Bioelectronics, 24, 2211-2217, (2009).

Benoît Limoges, Jean-Michel Savéant, *Cyclic voltammetry of immobilized redox enzymes. Interference of steady-state and non-steady-state Michaelis-Menten kinetics of the enzyme-redox cosubstrate system* Journal of Electroanalytical Chemistry, 549, 61-70, (2003)

Robert Bohinski, Bioquímica 5a Edición. Addison Welesy, México (1998).

Chetna Dhanda, S.P. Singha, Sunil K. Arya,, Monika Datta, B.D. Malhotra, *Cholesterol biosensor based on electrophoretically deposited conducting polymer film derived from nano-structured polyaniline colloidal suspension*, Analytica chimica acta, 602, 244-25, (2007).

D S Papastathopoulos and G. A. Rechnitz, Analytical Chemistry, 47, 1742, (1975).

Jian-Ping Li and Hai-Ning Gub, *Selective Cholesterol Biosensor Based on Composite Film Modified Electrode for Amperometric Detection*, Journal of the Chinese Chemical Society, 53, 575-582, (2006).

Noriyuki Doukyu, *Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidase*, Appl Microbiol Biotechnol, 83:825–837, (2009).

Türkarslan Özlem, Senem Kıralp Kayahan, Levent Toppare, *A new amperometric cholesterol biosensor based on poly(3,4-ethylenedioxyppyrole)*, Sensors and Actuators B, 136, 484–488, (2009).

Sean Brahim, Nariesingh Dyer and Guiseppi-Elie Anthony, *Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole–hydrogel membrane* Analytical. Chimica Acta, 448 27-36, (2001).

Singh Suman, Solanki Pratima R., Pandey M.K., Malhotra B.D., *Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor*, Analytica Chimica Acta, 568, 126–132, (2006).

Urmila Saxena, Mitun Chakraborty, Pranab Goswami, *Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples*, Biosensors and Bioelectronics, 26, 3037-3043, (2011).

Xuecai Tan, Minjian Li, Peixiang Cai, Lijun Luo, Xiaoyong Zou *An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film* Analytical Biochemistry, 337, 111-120, (2005)

Capítulo 5

Biosensores en
configuración plana

5. BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS EN CONFIGURACIÓN PLANA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL

5.1 Introducción

La amperometría es una técnica voltamperométrica en la cual el potencial aplicado al electrodo de trabajo provoca que una especie electroactiva presente en la solución se oxide o reduzca en la superficie del electrodo. La corriente producida por el proceso electroquímico es proporcional a la velocidad con que el analito se transporta hacia la superficie del electrodo. Existen tres mecanismos de transporte: migración (movimiento de cargas a través de un campo eléctrico), difusión (movimiento de materia a través de un gradiente de concentraciones) y convección (movimiento de especies debido a fuerzas mecánicas). Puesto que la migración no está relacionada con la concentración, su influencia sobre la corriente medida en un experimento amperométrico debe controlarse a fin de minimizarlo; esto se logra mediante la adición de una sal inerte en alta concentración al sistema de trabajo (electrolito soporte).

En la amperometría hidrodinámica la solución es agitada para que una mayor cantidad de especie llegue a la superficie del electrodo ya que de esta manera las corrientes obtenidas son mayores respecto a las de sistemas no agitados (control difusional). El régimen de transporte hidrodinámico, provoca además una disminución del grosor de la capa de difusión, manteniéndolo constante. La principal ventaja de ésta técnica, es su rapidez respecto a la LSV ya que representa un corte de potencial si se han empleado velocidades de barrido suficientemente bajas [Skoog, 1995, Harris, 2001].

Los dispositivos amperométricos trabajan normalmente bajo un régimen de control potencioestático, es decir, requieren durante su operación de la imposición de un potencial óptimo, mismo que se establece entre el electrodo de referencia y el electrodo indicador. Una vez satisfecha esta condición, los procesos electroquímicos

que se verifican en el electrodo de trabajo dan lugar a la circulación de la corriente eléctrica en la celda que es proporcional a la concentración del analito de interés.

Dependiendo del sistema particular de estudio y del potencial impuesto, el electrodo de trabajo puede comportarse como un ánodo o un cátodo; en ambos casos, otro electrodo deberá completar el circuito fungiendo de forma complementaria al de trabajo de tal manera que mantenga la electroneutralidad en la celda y el flujo de corriente no se vea limitado.

Para llevar a cabo las medidas amperométricas se han desarrollado configuraciones a dos y tres electrodos. En el primer caso, el electrodo de referencia además de ayudar a controlar el potencial impuesto al electrodo de trabajo, cumple con la función de contraelectrodo descrita en el párrafo anterior; sin embargo, esta situación puede provocar cambios de potencial del electrodo de referencia alterando la actividad de las especies químicas que lo conforman. En el segundo caso, la corriente fluye entre el electrodo de trabajo y un tercer electrodo (denominado auxiliar o contraelectrodo) de tal manera que al no existir paso de corriente a través del electrodo de referencia, su potencial se mantiene constante. Consecuentemente, la gran mayoría de los potenciostatos comerciales emplean el esquema de celda a tres electrodos en la actualidad.

El grado de miniaturización de dispositivos que se puede alcanzar mediante tecnología screen- printing, hace posible integrar en un mismo soporte o chip los tres electrodos necesarios para realizar medidas amperométricas (trabajo, auxiliar y referencia) [Galán, 1995, 1999]. Este hecho permite obtener sensores químicos pequeños y de fácil manejo adecuados para hacer análisis de campo, ampliándose así las perspectivas de aplicación.

En este capítulo se describe el desarrollo de biosensores amperométricos de colesterol en configuración a dos y tres electrodos, basados en la integración del biosensor con un electrodo de pseudo-referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de grafito.

5.2 Metodología

5.2.1 Materiales, equipo, reactivos y soluciones

5.2.1.1 Materiales

- Pasta serigráfica Ag/AgCl electrodag 7019 (Acheson).
- Pastas comercial de grafito PF-407C (Acheson).
- Pasta serigráfica dieléctrica fotocurable 451SS (Acheson)
- Un rasero de poliuretano
- Mallas serigrafías de 90 hilos
- Equipo manual de serigrafía
- Sustrato estireno

5.2.1.2 Equipo

El equipo empleado para realizar la caracterización física y química de los biosensores desarrollados, se lista a continuación:

- AUTOLAB PGSTAT 30 (Ecochemie)
- Electrodo de alambre de platino (XM110 Radiometer-Copenhagen)
- Electrodo de referencia de doble camisa Ag/AgCl (900200 Orion) con solución externa de KNO_3 10% (E=ECS)
- Potenciómetro PHM 250 ION ANALYZER (Radiometer Copenhagen).
- Amperímetro BAS LC-4C.
- Baño ultrasónico (Cole–Parmer 8890)
- Estufa incubadora (BOEKEL 132000)

5.2.1.3 Reactivos y Soluciones

Todos las soluciones fueron preparadas con reactivos comerciales de grado analítico.

- NaCl (J.T. Baker)
- CH₃CH₂OH (J.T. Baker, Fluka)
- KCl (Técnica Química S. A.)
- Grafito Aldrich con tamaño de partícula de 1-2 µm.
- Triton X-100 (Sigma)
- Colesterol (Research Organics)
- KCl (Técnica Química, S.A)
- KH₂PO₄ (Sigma)
- KHPO₄ (Sigma)
- 7,7,8,8-Tetracianoquinodimetano (Aldrich)
- K₃(FeCN₆) (Sigma)
- K₄(FeCN₆) (sigma-aldrich)
- FeCl₃ (Aldrich)
- Glucosa Oxidasa Arpegillus Níger 121.0 UI/g(Sigma)
- Glucosa (Sigma)
- Acetonitrilo (Fluka)
- Colesterol oxidasa de *Pseudomonas flourescens* 2.4 U.I./mg (Sigma)
- Tween 85 (Sigma)

Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua desionizada Milli Q (Millipore) (18.2 MΩ cm).

El colesterol se preparó conforme a la tabla 5.1.

5.2.2. Construcción de electrodos

Durante el desarrollo del trabajo se construyeron diversos tipos de biosensores conforme a la tabla 5.1. Dichos desarrollos se implementaron en configuraciones de 2 (tipo I) y 3 (tipo II) electrodos.

Tabla 5.1 Especificaciones de construcción de los diferentes biosensores desarrollados

Tipo de biosensor	Solución ó emulsión del sustrato enzimático	Coctel enzimático	Mediador (síntesis)
IFECO	El colesterol se disuelve con 2 ml de isopropanol y 2 ml de Triton X-100, posteriormente se afora a 100 mL con una solución buffer de fosfatos (PBS A) formándose una emulsión estable	El coctel enzimático se prepara disolviendo la colesterol oxidasa y el ferricianuro de potasio al 0.5% en carboxi-metilcelulosa al 0.25%, disuelta previamente en PBS A.	Ferricianuro
ITQCOA	El colesterol se disuelve con 2 ml de isopropanol y 2 ml de Triton X-100, posteriormente se afora a 100 mL con una solución PBS A formándose una emulsión estable	El coctel enzimático se prepara disolviendo colesterol oxidasa en carboximetilcelulosa al 0.25%, disuelta previamente en PBS A	TCNQ. El mediador se incorporó al electrodo de trabajo mezclándolo previamente con la pasta de grafito.
IIPBCOA	El colesterol se disuelve con 2 ml de isopropanol y 2 ml de Triton X-100, posteriormente se afora a 100 mL con una solución buffer de fosfatos PBS A formándose una emulsión estable	El coctel enzimático se prepara disolviendo la colesterol oxidasa en carboximetilcelulosa al 0.25%, disuelta previamente en PBS A	Azul de Prusia (PB). Se sintetizó mezclando dos soluciones, una solución con 2 g FeCl_3 en 100mL de agua desionizada y la otra con 1 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 100 mL de agua desionizada, precipitando el azul de Prusia (polvo azul) para posteriormente filtrar y se secar a 100°C por 24 hrs [Karyakin, 2000]. El PB se incorporó al electrodo de trabajo mezclándolo previamente con la pasta de grafito.
IIPBGLA	El colesterol con 2 ml de isopropanol y 2 ml de Triton X-100 se agita, posteriormente se afora a 100 mL con una solución buffer de PBS A formándose una emulsión estable	El coctel enzimático se prepara disolviendo la colesterol oxidasa en carboximetilcelulosa al 0.25%, disuelta previamente en PBS A	Azul de Prusia (PB). Se sintetizó e incorporó al electrodo de trabajo al igual que en el biosensor IIPBCOA.
IITQCOA	El colesterol con 2 ml de isopropanol y 2 ml de Triton X-100 se agita, posteriormente se afora a 100 mL con una solución buffer PBS A	El coctel enzimático se prepara disolviendo colesterol oxidasa en carboximetilcelulosa al 0.25%, disuelta previamente en buffer de PBS A	TCNQ. El TCNQ-grafito se prepara mezclando grafito con TCNQ mezclando 1 gr de grafito con 10 mL de TCNQ 0.1 M en acetonitrilo. El material TCNQ-grafito se filtra y se seca a 100°C por 1hr. El TCNQ-grafito se incorporó al electrodo de trabajo mezclándolo previamente con la pasta de grafito.
IITQGLA	La glucosa se disuelve PBS A	El coctel enzimático se prepara disolviendo la glucosa oxidasa en carboximetilcelulosa al	TCNQ. Se preparó e incorporó al electrodo de trabajo al igual que en el biosensor IITQCOA.

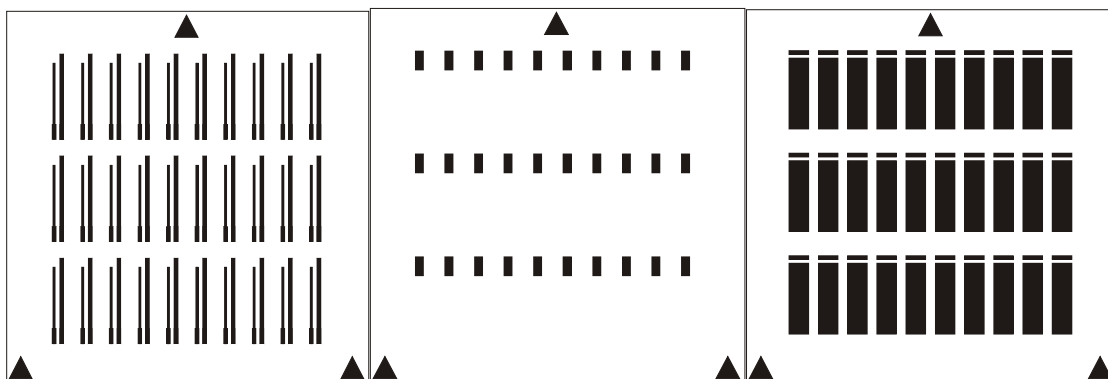
IIFRCOB	El colesterol se prepara con 2 ml de Tween y 1ml de Triton X-100 agitando, posteriormente se afora a 100 mL con una solución buffer de PBS B formándose una emulsión estable	0.25%, disuelta previamente en PBS A El coctel enzimático se prepara disolviendo la glucosa oxidasa en carboximetilcelulosa al 0.25%, disuelta previamente en buffer de PBS B	Ferrita. Ferrita (Fe_3O_4) fue preparado con: 0.03 mol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se disuelve en 100 mL de agua. La mezcla se agita vigorosamente mientras que la temperatura se incrementó a 60 ° C. Se burbujea en el tiempo que mezcla una solución de NaOH (2 mol L^{-1}) se añade hasta ajustar el pH a 10. Después de 1.0 hr., Los precipitados de ferrita fueron aislados del disolvente por un imán permanente y se lava varias veces con agua desionizada La Ferrita se incorporó al electrodo de trabajo mezclándolo previamente con la pasta de grafito.
----------------	--	--	---

I: transductores a 2 electrodos, II: transductores a 3 electrodos, **FE**: mediador de ferricianuro, **TQ**: mediador de TCNQ, **PB**: mediador de Azul de Prusia, **FR**: mediador de Ferrita, **CO**: Colesterol, **GL**: Glucosa, **A**: buffer de fosfatos 0.05M/KCl 0.1M a pH 7.0, **B**: buffer de fosfatos 0.05 M/NaCl 0.1 M a pH=6.5, **PBS**: Buffer de fosfatos.

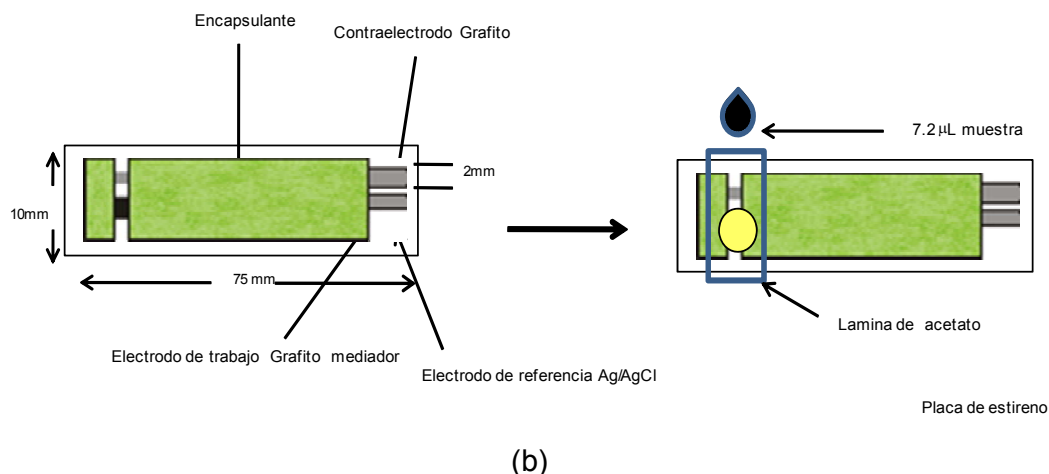
Ejemplo: IFECOA.- Biosensor para colesterol utilizando ferricianuro con PBS (buffer de fosfatos 0.05M/KCl 0.1M a pH 7.0)

5.2.2.1 Construcción de biosensores en configuración plana (tipo I)

Los transductores fueron fabricados por serigrafía sobre sustratos de estireno en configuración de dos electrodos conforme al diseño mostrado en las figura 5.1.



(a)



(b)
Figura 5.1. a. Diseño de impresión de transductores electroquímicos en configuración a dos electrodos. Izquierda: pistas de Ag/AgCl (electrodo de referencia y contactos). Centro: pistas de grafito (electrodo de trabajo 8mm^2). Derecha: Encapsulante (dieléctrico). b. Biosensor amperométrico de colesterol al término de su construcción.

Para la fabricación de los dispositivos se empleó un equipo manual de impresión y pantallas de 90 hilos. Las pastas fueron aplicadas con la ayuda de un rasero de poliuretano. Para la impresión del electrodo de referencia se utilizó una pasta serigráfica constituida por una resina vinílica cargada con Ag y AgCl. El curado fue realizado a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por al menos 30 minutos. Posteriormente, para la fabricación del transductor, se empleó una pasta comercial de grafito cargada con el correspondiente mediador con un proceso de curado igual al anterior. Por último, se aplicó una resina dieléctrica fotocurable dejando bajo exposición directa a iluminación solar por una hora.

5.2.2.2 Construcción de biosensores de configuración plana (tipo II)

Los transductores fueron fabricados por serigrafía sobre sustratos de estireno en configuración de tres electrodos conforme al diseño mostrado en la figura 5.2.

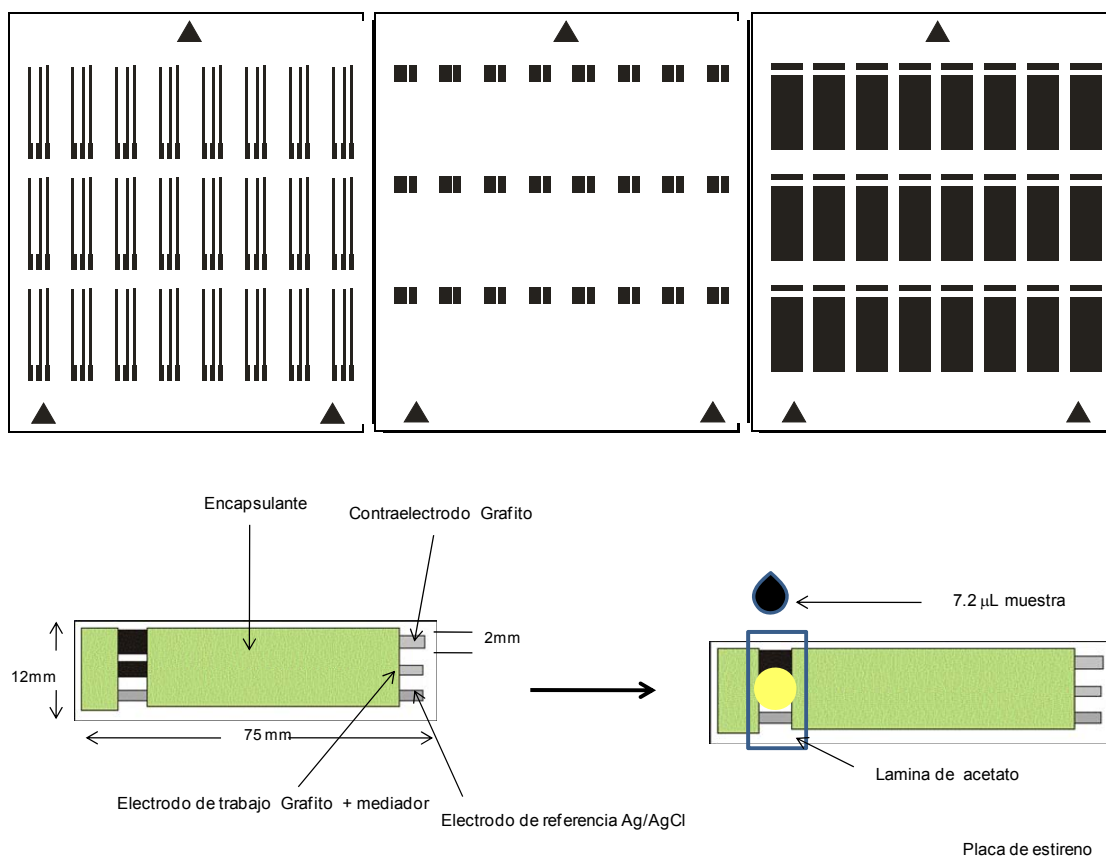


Figura 5.2. a) Diseño de impresión de transductores electroquímicos en configuración a tres electrodos. Izquierda: pistas de Ag/AgCl (electrodo de referencia y contactos). Centro: pistas de grafito (electrodo auxiliar y de trabajo (8mm^2)). Derecha: Encapsulante (dieléctrico). b) Biosensores amperométricos de colesterol en configuración plana a tres electrodos.

Para la fabricación de los dispositivos se empleó un equipo manual de impresión y pantallas de 90 hilos. Las pastas fueron aplicadas con la ayuda de un rasero de poliuretano. Para la impresión del electrodo de referencia se utilizó la pasta serigráfica comercial Electrodag 7019; dicha pasta está constituida por una resina vinílica cargada con Ag y AgCl. El curado fue realizado a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por al menos 30 minutos. Posteriormente, para la fabricación del contraelectrodo y el transductor, se empleó una pasta comercial de grafito cargada del mediador con un proceso de curado igual al anterior. Por último, se aplicó una resina dieléctrica fotocurable dejando bajo exposición directa a iluminación solar por una hora.

En algunos estudios, la pasta de grafito fue adicionada con 5% y 10 % de PB y/o TCNQ con o sin grafito [Balasubramanian, 2006] previo a su impresión.

5.2.2.3 Inmovilización de la enzima

Una vez construido el transductor plano, se inmoviliza la enzima (colesterol oxidasa o glucosa oxidasa) colocando 5 μ L de cóctel enzimático sobre la superficie de grafito. Se dejó secar en una estufa incubadora a temperatura de 30°C por 30 min. Inmovilizada la enzima, con papel acetato se forma un canal de un volumen aproximado de 7.2 mm³.

5.3 Resultados y Discusión

A fin de innovar y crear nuevas tecnologías para el desarrollo de biosensores que se puedan producir en masa y además de bajo costo, en este trabajo nos hemos propuesto construir un biosensor competente en comparación con los que existen en el mercado y construido con materiales de bajo costo. De forma inicial se realizó el estudio de los electrodos con una solución de ferricianuro de potasio.

5.3.1. Evaluación de respuesta de los transductores de planos.

5.3.1.1 Electrodos planos en configuración a 2 electrodos (tipo I)

Se valoró el comportamiento de un transductor en configuración plana de dos electrodos. Para evaluar el comportamiento del electrodo de trabajo (pasta de grafito) se procedió a obtener los voltamperogramas cíclicos en una solución de Fe(CN)₆⁴⁻ 0.01 M disuelta en PBS A. Cabe aclarar que como electrodos externos de referencia y auxiliar se utilizaron el de Ag/AgCl de doble camisa y el de carbón vítreo respectivamente, a fin de descartar en la interpretación de los resultados el posible efecto del electrodo de referencia/auxiliar del mismo chip (Fig. 5.3).

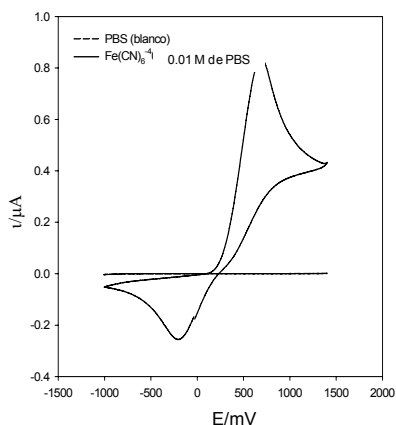


Figura 5.3. Voltamperograma cíclico típico del electrodo serigráfico de trabajo en una solución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01 M de PBS A.

De acuerdo a los resultados, el electrodo de trabajo no muestra una buena transferencia electrónica, ya que la relación de las picos anódico y catódico dista de ser la unidad; además de la gran diferencia entre los potenciales de oxidación y reducción (> 900 mV), siendo el sistema del ferrocianuro cuasi-reversible sobre el electrodo de trabajo. Aunque los resultados obtenidos no son óptimos, es importante considerar que el transductor es utilizado para el desarrollo de sensores electroquímicos potenciométricos y amperométricos a muy baja intensidad de corriente.

Considerando que el electrodo de trabajo es impreso sobre una pista de Ag/AgCl, es importante identificar las posibles señales de oxidación o reducción que pueda presentar dicho electrodo. Así, se llevaron a cabo estudios de voltamperometría cíclica en PBS A para el electrodo de trabajo (Fig 5.4a) y las pistas de plata/cloruro de plata (Fig. 5.4b).

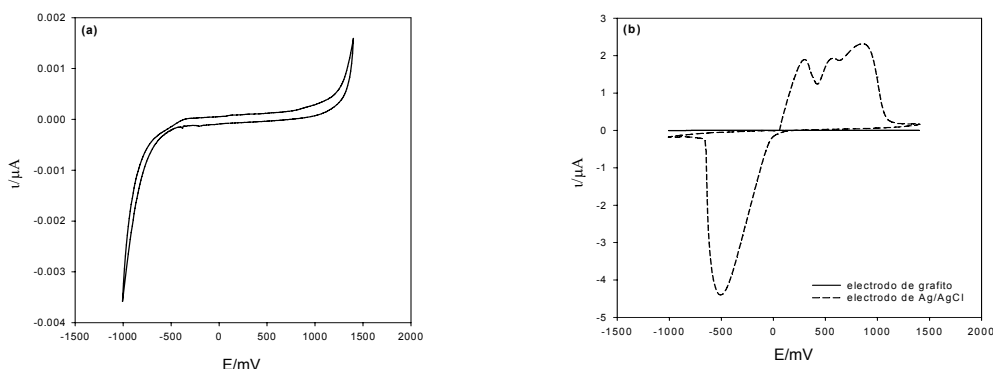


Figura 5.4. Voltamperogramas cíclicos en PBS a 100 mV/s. (a) electrodo de grafito. (b) comparativo entre electrodo de grafito y Ag/AgCl.

Conforme a los resultados obtenidos con los electrodos de grafito, es posible afirmar que la pista de Ag/AgCl es efectivamente cubierta por el grafito durante el proceso de construcción, ya que no se observan las señales de oxidación y reducción que presenta el electrodo de referencia.

Es interesante observar que las pistas de Ag/AgCl presentan tres señales anódicas. La primera de ellas (280 mV) es atribuible a la oxidación de Ag^0 a $AgCl$, ya que el PBS contiene una concentración 0.01M de iones cloruro; posteriormente se presenta la oxidación Ag^0 a Ag^+ (570 mV) debida en parte al agotamiento del Cl^- en la superficie del electrodo como consecuencia del primer proceso; finalmente se presenta una señal (820 mV) probablemente debida a la oxidación de algún componente de la pasta serigráfica.

Evalutados los electrodos de grafito con los electrodos externos, se obtuvieron voltamperogramas cíclicos de electrodos de grafito con los electrodos del mismo chip (Fig. 5.5), observando 2 picos, el primer pico se ubica alrededor 650 mV que es el potencial promedio atribuido a la señal de ferricianuro y un segundo pico ubicado en 880 mV atribuido a la oxidación de un componente de la pasta de Ag/AgCl que migra de este electrodo previa reducción en su superficie.

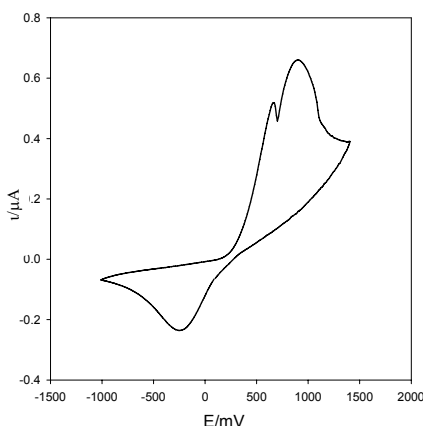


Figura 5.5. Voltamperograma cíclico típico del electrodo serigráfico de trabajo. Ag/AgCl del mismo chip como contraelectrodo y electrodo de referencia. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS A.

Una forma de eliminar el problema de la oxidación del componente de la pasta Ag/AgCl que migra hacia el electrodo de trabajo previo a su reducción, es construir el electrodo en una configuración de 3 electrodos (tipo II)

5.3.1.2 Electrodo planos en configuración (tipo II)

Debido a los problemas que se tuvieron con el transductor a 2 electrodos en el estudio anterior, se construyó un transductor a 3 electrodos. Inicialmente para confirmar los picos típicos del ferricianuro de potasio, se realizaron voltametrías cíclicas a un electrodo de carbón vítreo, en una solución de ferrocianuro de potasio 0.01M, obteniendo un pico de oxidación y uno de reducción en aproximadamente 270 y 150 mV (Fig. 5.6). Cabe mencionar que la separación que existen una menor separación de los 2 electrodos debido a que el sistema en esta ocasión existen una buena transferencia de electrones en comparación con el serigráfico donde podemos decir que la reacción es cuasirreversible.

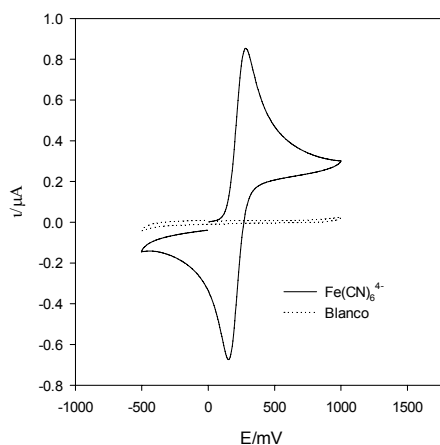


Figura 5.6. Voltamperograma cíclico típico del electrodo de carbón vítreo. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS A

Para evaluar el comportamiento del transductor tipo II se procedió a obtener los voltamperogramas cíclicos en una solución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01 M disuelta en PBS, observando un pico anódico y uno catódico correspondientes a la oxidación y reducción del ferrocianuro de potasio en 610 y -293 mV (Fig. 5.7). Confirmando los picos representativos para ferriano obtenidos en el transductor tipo I.

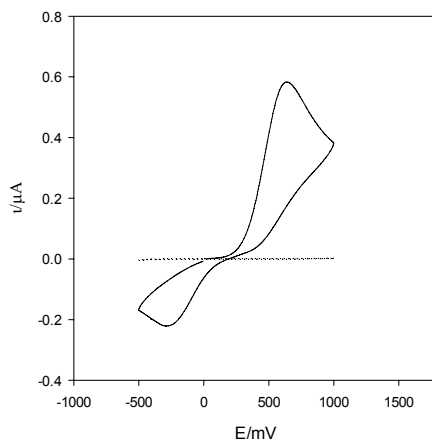


Figura 5.7. Voltamperograma cíclico típico del electrodo serigráfico de trabajo. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS A

Como una manera de estimar la reproducibilidad de las señales para transductores tipo II de un mismo lote, se obtuvieron los voltamperogramas para diversos

dispositivos, obteniendo un porcentaje del coeficiente de variación entre 0.8 y 2.6 para el potencial anódico y catódico y para la intensidad de corriente 3.8 y 4.8 para intensidad anódica y catódica respectivamente, con una diferencia de potencial promedio de 900 mV (Tab. 5.2)

Tabla 5.2 Reproducibilidad del electrodo serigráfico de trabajo (tipo II). $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS.

ELECTRODO	Epa (mV)	Ipa (μA)	Epc (mV)	Ipc (μA)	Δ Epc (mV)
SP	610	37	-293	-25	903
SP	605	34	-298	-24	903
SP	615	36	-283	-22	898
DS	4.88	1.35	7.46	1.12	2.82
promedio	610.3	35.5	-291.3	-23.6	901.6
%CV	0.8	3.8	-2.6	-4.8	0.3

De acuerdo con los resultados, podemos observar que el electrodo de trabajo no muestra una buena transferencia electrónica, ya que la relación de las picos anódico y catódico dista de ser la unidad; además de la gran diferencia entre los potenciales de oxidación y reducción (> 900 mV) (Tab. 5.2), siendo el sistema del ferrocianuro cuasi-reversible sobre el electrodo de trabajo.

De acuerdo con los resultados, se realizó un estudio del acondicionamiento potencioestático del electrodo de trabajo a distintos voltajes por un tiempo de 5 segundos, con la finalidad de mejorar la transferencia electrónica para incrementar la intensidad de corriente y disminuir la diferencia de potencial (Tab. 5.3, Fig. 5.8).

Tabla 5.3 Potencial e intensidad de corriente del electrodo serigráfico de trabajo con o sin tratamiento

Electrodo	tratamiento previo (V)	Epa (mV)	Ipa (μA)	Epc (mV)	Ipc (μA)	Δ Epc (mV)
CV	NO	278	78	156	-77	122
1 SP	NO	610	37	-293	-25	903
2 SP	E=1.0	571	38	-146	-21	718
3 SP	E=1.1	542	40	-127	-21	669
4 SP	E=1.2	537	40	-142	-23	679
5 SP	E=1.3	547	39	-127	-22	674
6 SP	E=1.4	571	38	-146	-21	718
7 SP	E=1.5	503	39	-225	-24	728

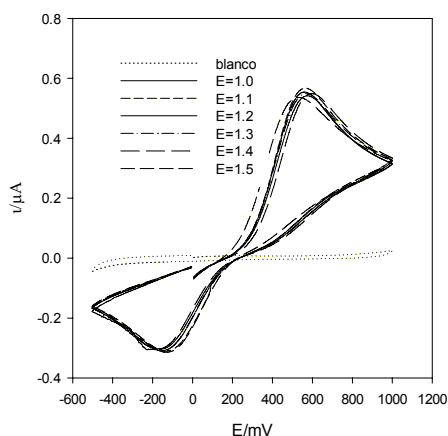
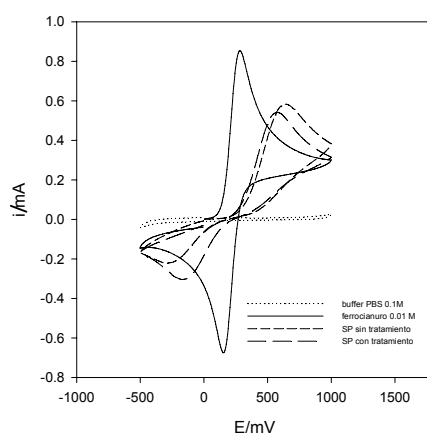


Figura 5.8. Voltamperogramas cíclicos de electrodos serigráficos de grafito con diferentes potenciales de pretratamiento por 5 segundos. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS A

Analizando los resultados se encuentra que el mejor acondicionamiento corresponde a un potencial de 1100 mV con respecto a la menor diferencia de potencial entre los picos anódico y catódico; sin embargo, considerando el menor potencial de oxidación, se considera que la mejor alternativa es a 1200 mV por 5 seg, ya que la mayoría de los biosensores amperométricos operan siguiendo señales de oxidación de peróxido de hidrógeno o de un mediador artificial. Al evaluar la reproducibilidad de la respuesta del transductor con pretratamiento se encuentra que los porcentajes de desviaciones estándar relativas para los potenciales de pico anódico, catódico e intensidades anódica y catódica respectivamente son 1.9, 0, 1.3, -3.8 respectivamente (Tab 5.4). Así, se puede afirmar que se mejora la diferencia de potencial ya que es menor que la del transductor sin el pre-tratamiento. Este hecho es atribuido a que se inducen fracturas sobre la superficie del electrodo y se oxida el grafito generando diversos grupos funcionales que hace más activa la superficie del electrodo (Fig. 5.9).

Tabla 5.4 Reproducibilidad del electrodo serigráfico de trabajo con tratamiento a 1.2 V por 5 segundos en $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M / PBS A

ELECTRODO	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μA)	E_{pc} (mV)	I_{pc} (μA)	ΔE_{pc} (mV)
1	537.1	39.5	-141.6	-22.7	678.7
2	556.6	38.5	-141.6	-21.1	698.2
3	541.0	39.2	-141.6	-21.5	682.6
DS	10.3	0.5	0.0	0.8	10.3
promedio	544.9	39.1	-141.6	-21.8	686.5
%CV	1.9	1.3	0.0	-3.8	1.5

**Figura 5.9.** Voltamperograma cíclico típico del electrodo carbón vítreo y serigráfico de trabajo. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS.

Los resultados obtenidos indican que la pasta de grafito cubre efectivamente las pistas de plata; asimismo es importante destacar que es imprescindible utilizar una configuración de tres electrodos a fin de no inducir interferencias en las señales de oxidación (Fig. 5.5).

5.3.1.2.1 Evaluación de la operación transductor plano y de las señales de interferencias

Continuando con los estudios del electrodo de trabajo, se evaluaron algunos analitos que pudiesen interferir en la señal analítica de un biosensor de colesterol al aplicar el potencial elevado que demanda la oxidación del peróxido de hidrogeno ($E=400$ mV). Para ello se realizaron voltamperogramas para acetaminofen y ácido ascórbico,

observando un incremento en la corriente con respecto al blanco a partir de 0.6 V, siendo mayor para el ácido ascórbico (Fig.5.10).

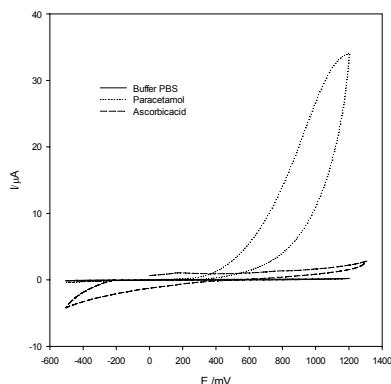


Figura 5.10. Voltamperogramas cíclicos de electrodos planos de grafito en solución PBS para distintos analitos 0.1M.

De acuerdo a los resultados, es posible concluir que es necesario el uso de un agente que disminuya el potencial de trabajo, al menos, por debajo de 0.4 V.

5.3.1.3 Electrodos planos a 3 electrodos para equipo DropSens

Durante el desarrollo de nuestro trabajo se construyeron transductores adecuados para el equipo comercial Dropsen, con la finalidad de evaluar el desarrollo de tecnología de construcción de los transductores a 3 electrodos ya que DropSens desarrolla electrodos serigráficos, basados en la tecnología híbrida de capa gruesa, para el desarrollo de sensores electroquímicos para ser aplicados a diversos análisis clínicos, medioambiental etc.

En un inicio para dicho estudio se realizó un estudio mediante voltametrías cíclicas a transductor comercial, con una solución de ferricianuro de potasio 0.01M (Fig. 5.11), obteniendo un pico de oxidación en 400 mV y uno de reducción en 0 mV, con una diferencia de potencial de 400 mV, observando un sistema reversible por tanto existe una buena transferencia de electrones en el sistema.

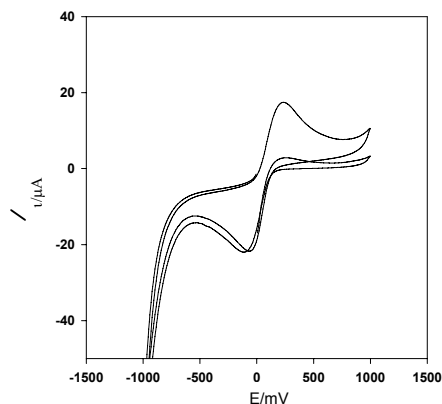


Figura 5.11 Voltamperograma cíclico típico del transductor comercial. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS A

Observando lo anterior, se evaluó el transductor construido, se realizaron voltamperogramas cíclicos en la misma solución, observando un pico anódico y uno catódico correspondientes a la oxidación y reducción del ferricianuro en 400 mV y -400mV respectivamente (Fig 5.12), confirmado el funcionamiento y los picos representativos de oxidación y reducción de ferricianuro.

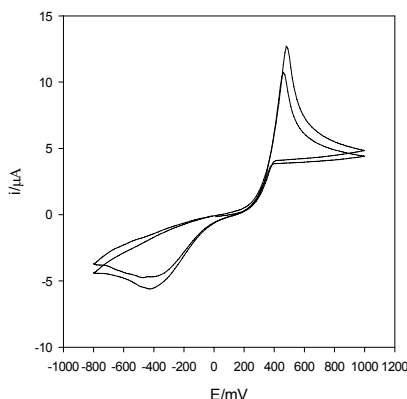


Figura 5.12. Voltamperograma cíclico típico del electrodo serigráfico de trabajo. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS

Sin embargo, podemos observar que el transductor construido no muestra una buena transferencia electrónica, ya que la relación de las picos anódico y catódico

dista de ser la unidad; además de la gran diferencia entre los potenciales de oxidación y reducción (>800 mV), siendo el sistema del ferrocianuro cuasi-reversible

Para mejorar el sistema de reacción del transductor, en forma preliminar se realizó un acondicionamiento a una condición de 1.2 V por un tiempo de 30 segundos, posterior a esto se realizaron las voltamperometrías cíclicas, obteniendo un pico de oxidación en 400 mV y uno de reducción en -250 mV, resultando una disminución en la diferencia de potencial a 650 mV e incrementando la intensidad de corriente y por tanto mejorando el resultado sin acondicionamiento. (Fig. 5.13)

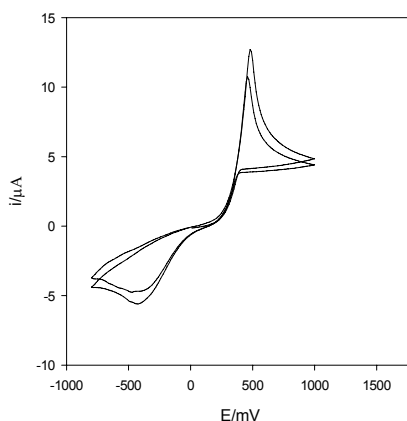


Figura 5.13 Voltamperogramas cíclicos de electrodo serigráfico. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBSA

Por tanto podemos concluir que se mejoró la diferencia de potencial, lo cual está atribuido a que existen rompimientos sobre la superficie generando otras radicales, lo que hace más activa la superficie del electrodo; no obstante comparado con el transductor comercial todavía la diferencia de potencial es mayor, esto puede deberse a las condiciones de construcción ya que éstas se realizan manualmente, a pesar de ello los transductores contruidos son una buena alternativa comparado con el costo del transductor comercial.

Como un estudio complementario se realizó una cronoamperometría y la curva de calibración con una solución $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (Figs. 5.14 a y b), obteniendo un coeficiente

de correlación 0.9998 en un intervalo lineal 0.9 a 9 mM. Corroborando el funcionamiento de transductor

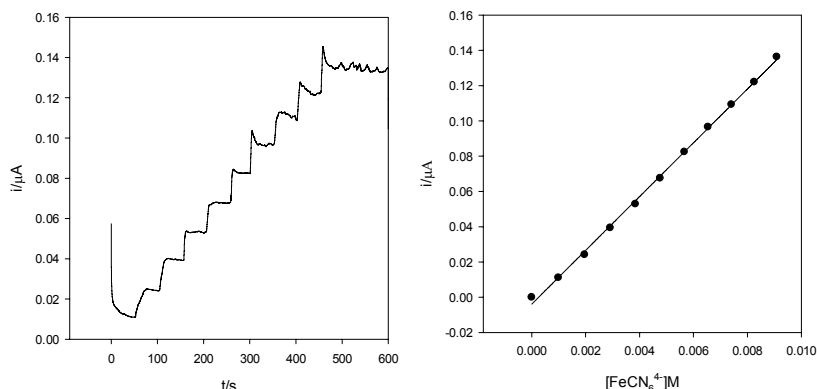


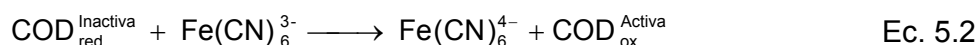
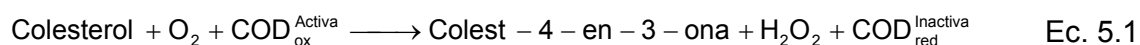
Figura 5.14. Cronoamperograma del electrodo serigráfico de trabajo. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01M en PBS

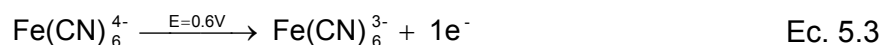
Por tanto el transductor serigráfico constituye un diseño económico que se puede producir en masa, y que es una plataforma adecuada para la construcción de biosensores amperométricos.

5.3.2 Biosensores amperométricos para la determinación de colesterol

5.3.2.1. Biosensor IFECO (transductor a 2 electrodos, mediador ferricianuro)

El biosensor amperométrico de colesterol desarrollado, está basado en la detección amperométrica de la señal de oxidación del ferrocianuro de potasio a 0.6 V. Al ser oxidado el colesterol por la enzima colesterol oxidasa, el sitio activo de la enzima se reduce inactivándola; siendo el ferricianuro de potasio (mediador) el encargado de volver a oxidar el sitio activo de la COD y en consecuencia activándolo nuevamente. Así, la intensidad de corriente debida a la oxidación del ferrocianuro producido, es proporcional a la concentración de colesterol (Ecs. 5.1, 5.2 y 5.3).





5.3.2.1.1 Evaluación del comportamiento del biosensor

Para la evaluación del comportamiento del biosensor de colesterol se obtuvieron registros cronoamperométricos con el blanco (2 ml de tritón X-100 más 2 ml propanol en 100 mL de PBSA) y a diferentes concentraciones de colesterol (la emulsión madre de colesterol fue preparada en solución blanco) (Fig. 5.15).

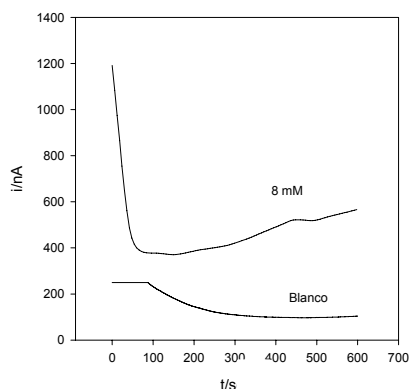


Figura 5.15. Respuestas amperométricas para biosensor IFECO con 0.6 U.I. de COD por electrodo a un potencial 0.6 V.

La corriente obtenida al imponer el potencial de trabajo, decrece rápidamente debido a que es mayoritariamente capacitiva al iniciar el experimento. Posteriormente, a partir de los 200 s, se estabiliza.

Es interesante observar que cuando existe colesterol, la corriente aumenta ligeramente después de los 200 s. Este hecho se debe al retardo en la disolución del coctel enzimático, viéndose incrementada la concentración de enzima y mediador a través del tiempo; asimismo puede atribuirse parcialmente al bloqueo de la superficie del electrodo por la CMC.

De acuerdo a lo esperado, Se observa claramente que conforme aumenta la concentración de colesterol presente en la muestra, se incrementa la intensidad de corriente de manera proporcional.

5.3.2.1.2. Parámetros analíticos

Una vez demostrada la funcionalidad de nuestro biosensor, se procedió a realizar curvas de calibración a diferentes concentraciones colesterol. Cada punto de la curva fue realizado por triplicado con tres biosensores diferentes para cada punto debido a que son desechables. (Fig. 5.16, Tab. 5.5 y 5.6).

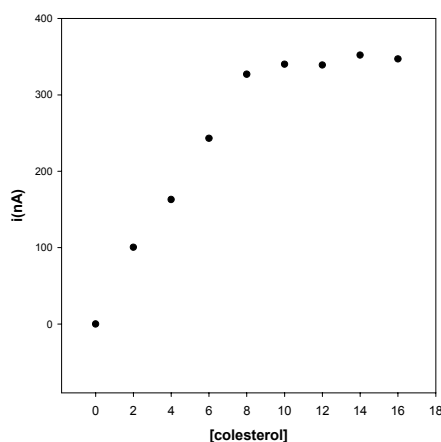


Figura 5.16. Curva de calibración amperométrica del biosensor IFECO A con enzima COD 0.6 U.I. por electrodo a un potencial 0.6V.

Tabla 5.5 Resultados obtenidos en la curva de calibración de los biosensores amperométrico IFECO A.

Sensibilidad nA/mM	IRL /[Colesterol]	Límite de detección	$r^2 \geq$
38.0 ± 0.34	2-8 mM	0.76 mM	0.996

La curva de calibración muestra un intervalo de respuesta lineal de 2-8 mM con un límite de detección de 0.76 ± 0.01 mM. La sensibilidad obtenida es de 38.0 ± 0.34 nA/mM con un coeficiente de correlación de 0.996. Cabe destacar que la respuesta lineal del dispositivo cubre adecuadamente el intervalo de interés clínico para muestras de sangre (3.5-6.5 mM), por lo que constituye un desarrollo prometedor.

El porcentaje de desviación estándar relativa obtenido para cada uno de los puntos de la curva de calibración se ubica por debajo de 8.7%, lo que nos indica una reproducibilidad competitiva para este tipo de dispositivos (Tabla 5.6).

Tabla 5.6 Intensidad de corriente obtenida a un tiempo de 200 segundos a partir de las cronoamperogramas.

[Colesterol mM]	1 ^{er} medida (nA)	2 ^{da} medida (nA)	3 ^{er} medida (nA)	Promedio	DS	%DSR
0	145.5	133.6	156.0	145.0	11.2	7.7
2	222.5	249.2	264.0	245.0	21.2	8.6
4	308.2	295.2	321.0	308.0	12.9	4.1
6	388.1	388.8	387.0	388.0	0.8	0.2
8	427.2	427.4	426.0	427.0	0.5	0.1
10	481.0	482.1	492.0	485.0	6.0	1.2
12	484.0	485.2	483.0	484.0	1.2	0.2
14	506.5	497.5	487.0	497.0	9.7	1.9
16	505.4	479.2	494.0	492.0	13.1	2.6

5.3.1.2.3 Constante de Michaelis-Menten.

La curva de calibración muestra claramente, por arriba de 8 mM, la pérdida de la sensibilidad a los cambios en la concentración de colesterol. Este hecho se debe a la saturación de la enzima por el sustrato de acuerdo a la teoría de cinética enzimática de Michaelis-Menten. Considerando que la velocidad de reacción enzimática es proporcional a la intensidad de corriente registrada, es posible calcular la constante aparente de Michaelis-Menten K_m' a partir del gráfico de Lineweaver-Burk [Bohinski, 1998].

Procesando la curva de calibración mediante el gráfico de Lineweaver-Burk, se obtiene una velocidad máxima de 685.5 nA^{-1} y la K_m' es $11.7 \pm 0.40 \text{ mM}$. Considerando que la K_m reportada para la enzima empleada en la construcción de los biosensores se ubica entre 0.013 y 0.35 mM [Vrielink y Ghisla, 2009] y que la K_m es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato, podemos concluir que la enzima fue afectada por el proceso de inmovilización sobre el transductor, por lo cual es posible mejorar el desempeño del biosensor mejorando la técnica de deposición de la enzima.

Un valor numérico pequeño de K_m refleja una alta afinidad de la enzima por su sustrato porque a una baja concentración del mismo, la enzima ha desarrollado la mitad de la velocidad máxima.

5.3.2.2 Biosensor ITQCOA (transductor a 2 electrodos, mediador TCNQ)

5.3.2.2.1 Potencial de trabajo

En el desarrollo de biosensores de colesterol basados en COD se han utilizado diversos mediadores (Arya, et al., 2008); sin embargo, hasta el momento no existen reportes en que se use el TCNQ, a pesar de ser considerado un compuesto de baja toxicidad (Kulys, 1992). Con la finalidad de explorar la conveniencia de utilizar tetracianoquinodimetano como mediador, en primera instancia se evaluó el comportamiento del transductor mediante voltametría cíclica (Fig. 5.17).

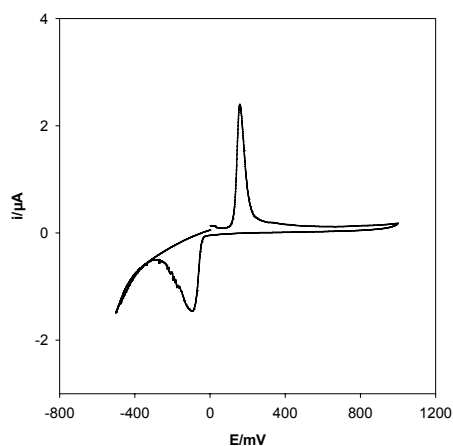
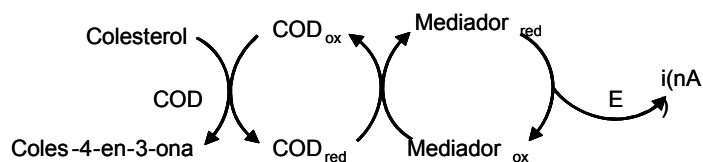


Figura 5.17. Voltamperogramas cíclicos del transductor con TCNQ al 5% en solución blanco (PBS) ($v=50$ mV/s).

Los resultados muestran una señal de oxidación en aproximadamente 150 mV después del primer barrido. Cabe señalar que dicho mediador no presenta originalmente ninguna señal de oxidación ya que se encuentra totalmente oxidado al inicio del experimento; así, al regenerar el sitio activo de la colesterol oxidasa, parte

del TCNQ se reducirá, generando una corriente de oxidación al imponer un potencial de trabajo de 150 mV en el biosensor (Ec. 5.4) y eliminando de esta manera la posible interacción de ácido ascórbico y paracetamol.



Ec. 5.4

5.3.2.2 Comportamiento del biosensor

Para la evaluación del comportamiento del biosensor de colesterol se obtuvieron registros cronoamperométricos a diferentes concentraciones de colesterol (Fig.5.18).

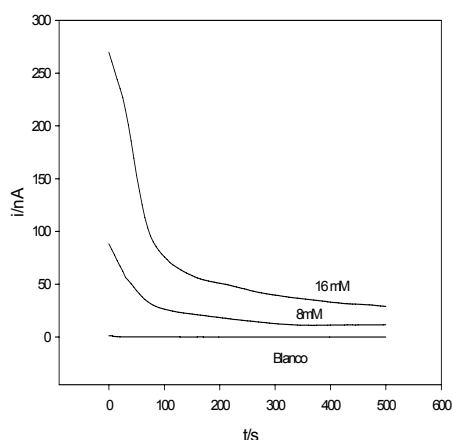


Figura 5.18. Respuestas cronoamperométrías para biosensor ITQCNA con 0.6 U.I. de COD y CMC ($E=150\text{mV}$). Electrolito soporte: 2ml de tritón X-100 más 2 ml propanol en PBSA.

Los resultados muestran que la corriente es proporcional a la concentración de colesterol y que ésta se estabiliza antes de los 200 segundos encontrados para el biosensor IFECO. Considerando que el mediador está incorporado en la pasta del transductor en el biosensor ITQCOA y que no se observa un incremento de la corriente después de los 200 segundos como en el biosensor IFECO, es indicativo

que dicho incremento se puede atribuir a la disolución del mediador más que a la de la enzima.

5.3.2.2.3 Parámetros analíticos

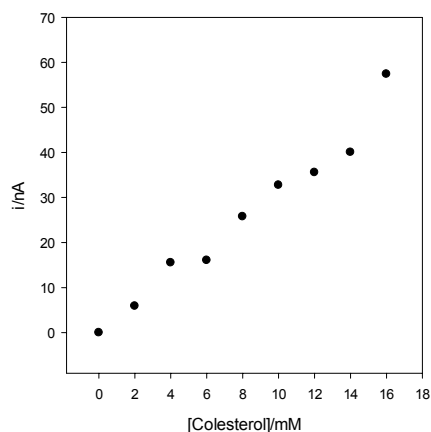


Figura 5.19 Curva de calibración amperométricas para el biosensor ITQCOA con 0.6 U.I. COD y CMC $E_{\text{trabajo}} = (150 \text{ mV})$.

De acuerdo a lo esperado, se observa claramente que conforme la concentración de colesterol se incrementa, la intensidad de corriente lo hace de manera directamente proporcional (Fig. 5.18). Una vez demostrada la operatividad del biosensor, se procedió a realizar las curvas de calibración amperométricas tomado por duplicado cada uno de los puntos con diferente biosensor (Fig.5.19).

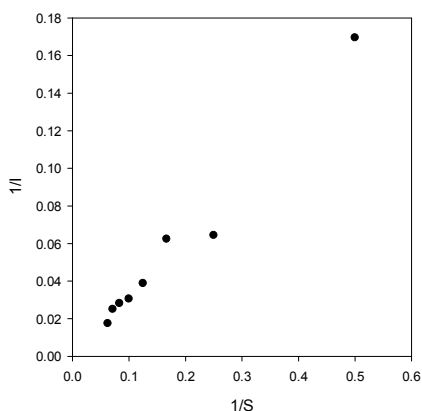
La curva de calibración muestra un comportamiento lineal en un intervalo de concentración de 0 a 14 mM con un coeficiente de correlación de 0.992. El límite de detección calculado a partir de la curva de calibración conforme al criterio IUPAC ($3\sigma_x/m$) se ubicó en 0.4 mM (Tab. 5.7). La sensibilidad con respecto al biosensor construido que contiene ferricianuro es significativamente menor, lo que es atribuido a que hay menos mediador en la interface del electrodo en contacto con la emulsión que contiene el colesterol.

Tabla 5.7 Resultados obtenidos en la curva de calibración de los biosensores amperométrico ITQCOA

Sensibilidad nA/mM	IRL /[Colesterol]	Limite de detección	$r^2 \geq$
7 ± 0.80	0-14 mM	0.4 mM	0.99

5.3.2.2.4 Constante de Michaelis Menten

Conforme al modelo cinético de Michaelis-Menten y partir de la gráfica de Lineweaver-Burk se calculó la constante aparente de Michaelis-Menten la cual fue de 0.34 ± 0.012 mM (Fig. 5.20); valor que se encuentra dentro del reportado para la COD 0.013-0.35 mM. Comparado con el biosensor construido con ferricianuro la constante es mucho menor lo que nos indica que la afinidad de la enzima no es afectada significativamente ya que el mediador se encuentra dentro de la pasta de grafito.

**Figura 5.20.** Gráfica de Lineweaver-Burk, para el biosensor ITQCOA

5.3.2.3 Biosensores tipo II con TCNQ

El biosensor de colesterol tipo I con TCNQ como mediador ITQCOA representa una ventaja tecnológica respecto a la construcción del dispositivo; ya que incorpora el mediador directamente en la pasta con la que se imprime el electrodo de trabajo; sin embargo, su sensibilidad es la décima parte del desarrollado basado en ferricianuro. Así, se decidió mejorar la distribución del TCNQ en la pasta de grafito mediante la

mezcla previa de grafito con una solución de TCNQ en acetonitrilo (Tab. 5.1) a fin de incrementar la concentración del mediador en la superficie del transductor.

Debido al alto costo de la enzima colesterol oxidasa, en primera instancia se evaluó la estrategia anteriormente descrita, mediante el desarrollo de un biosensor de glucosa basado en glucosa oxidasa (GOD); misma que presenta el mismo mecanismo de regeneración del sitio activo que la colesterol oxidasa.

5.3.2.3.1.1 Biosensor IITQGLA (transductor a 3 electrodos, mediador TCNQ)

El biosensor fue construido a partir del transductor con pasta que contiene mediador (5% TCNQ-grafito) sobre el que se depositó y se secó una membrana de carboximetil celulosa y glucosa oxidasa disueltos en PBSA. El estudio se realizó imponiendo un potencial de 150 mV.

Los resultados obtenidos muestran claramente que el biosensor responde a glucosa incrementando la intensidad de corriente de aproximadamente 10 μA para una concentración 0.01M de glucosa (Fig. 5.21).

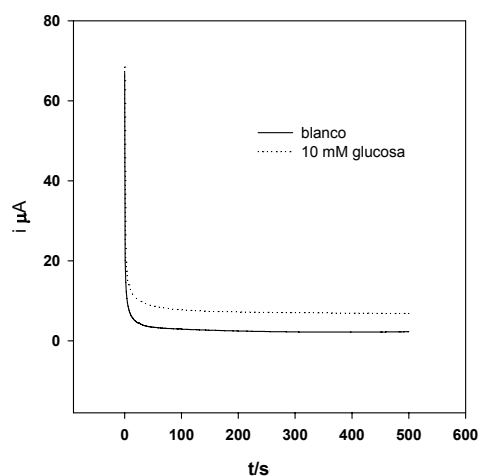


Figura 5.21. Respuestas cronoamperométricas para el biosensor IITQGLA con 0.3 U.I. de GOD y CMC ($E=150\text{mV}$).

5.3.2.3.1.2 Parámetros analíticos

Para obtener los parámetros analíticos del Biosensor desarrollado, se realizaron curvas de calibración para glucosa (Figs. 5.21 y 5.22). Los resultados obtenidos muestran claramente la proporcionalidad de la corriente con respecto a la concentración de glucosa, observando un comportamiento lineal de 10 a 100mM. con un coeficiente de correlación de 0.99. El límite de detección se ubicó en 4 mM.. (Tab. 5.8).

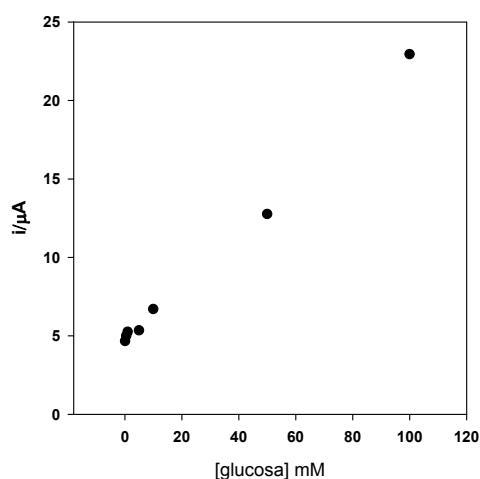


Figura 5.22. Curva de calibración amperométricas para el biosensor IITQGLA (E= 150 mV)

Tabla 5.8 Resultados obtenidos en la curva de calibración de los biosensores amperométrico IITQGLA

Sensibilidad nA/mM	IRL /[Colesterol]	Limite de detección	$r^2 \geq$
475 ± 2.05	10-100 mM	4 mM	0.99

5.3.2.3.2. Biosensor tipo IITQCOA (transductor a 3 electrodos, mediador TCNQ)

Una vez establecida la factibilidad de incorporar el TCNQ en la pasta, previa impregnación de grafito con una solución de TCNQ en acetonitrilo, se procedió a evaluar el biosensor amperométrico de colesterol basado en esta estrategia.

Los resultados obtenidos muestran claramente que el biosensor responde al

colesterol incrementando la intensidad de corriente respecto al blanco con mayor sensibilidad que en el caso del biosensor de colesterol que incorpora el TCNQ directamente en la pasta de grafito ITQCOA (Fig. 5.23). Es importante señalar que la corriente se estabiliza en menos de 100 segundos, lo cual es significativamente menor al tiempo reportado por ITQCOA.

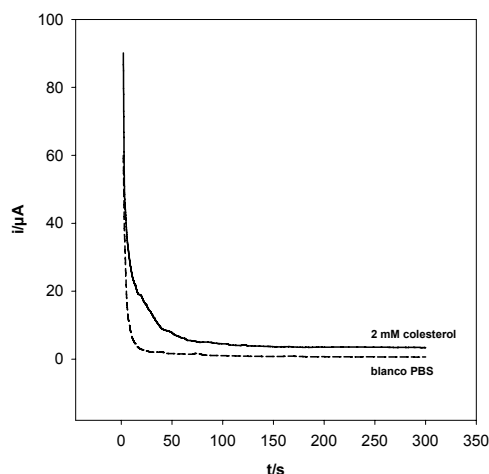


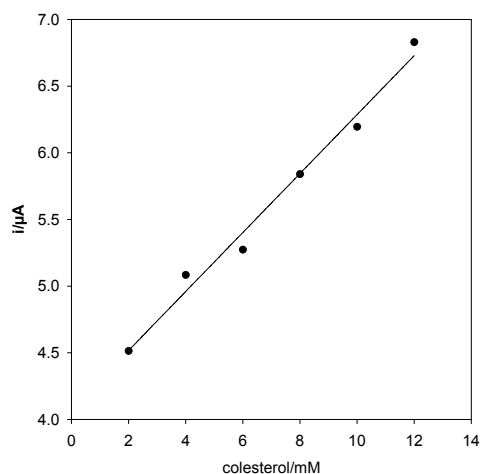
Figura 5.23. Respuestas cronoamperométricas para el biosensor IITQCOA con 0.6 U.I. de COD y CMC ($E=150\text{mV}$).

5.3.2.3.2.1 Parámetros analíticos

Para obtener los parámetros analíticos del biosensor desarrollado, se realizaron curvas de calibración para colesterol a partir de los cronoamperogramas a los 100 segundos (Fig. 5.24). Los resultados obtenidos muestran la proporcionalidad de la corriente con respecto a la concentración de colesterol, observando un comportamiento lineal para concentraciones comprendidas en el intervalo 2-12 mM con un coeficiente de correlación de 0.99. El límite de detección calculado a partir de la curva de calibración conforme al criterio IUPAC ($3.3\sigma_b$) se ubica en 1.56 mM con una pendiente de $221 \pm 1.14 \text{ nA/mM}$. (Tab.5.9). Es importante destacar que cada uno de los puntos de la curva de calibración se realiza con un biosensor diferente debido al carácter desechable y de un solo uso del dispositivo. Este hecho implica una buena reproducibilidad en la respuesta de los biosensores.

Tabla 5.9 Resultados obtenidos en la curva de calibración para los biosensores tipo IITQCOA

Sensibilidad nA/mM	IRL /[Colesterol]	Limite de detección	$r^2 \geq$
221 $\pm$ 1.14	2-12 mM	1.56 mM	0.99

**Figura 5.24** Curva de calibración amperométrica para el biosensor IITQCOA con 0.6 U.I. de COD y CMC ($E=150$ mV)

5.2.3.3.2 Constante de Michaelis Menten

Conforme al modelo de Michaelis Menten y tomando la intensidad de corriente como la velocidad de la reacción, se encuentra que la K_m' aparente es de 0.32 ± 0.01 mM, ubicándose dentro de los valores reportados para la enzima en solución COD 0.013-0.35 mM. Así, puede asumirse que la actividad de la enzima no ha sido afectada fuertemente por el proceso de inmovilización. (Vrielink y Ghisla, 2009).

La sensibilidad del biosensor de colesterol suele ser pequeña debido a la necesidad de incorporar triton X-100 y propanol para emulsionar el colesterol; así como la escasa actividad de la enzima disponible en el mercado en comparación con la glucosa oxidasa. El dispositivo desarrollado presenta una sensibilidad competitiva, particularmente si se considera que éste no incorpora materiales costosos en su fabricación como nanotubos de carbono, mediadores sofisticados o transductores de metales preciosos [Carrara, 2008; Shih, 2009].

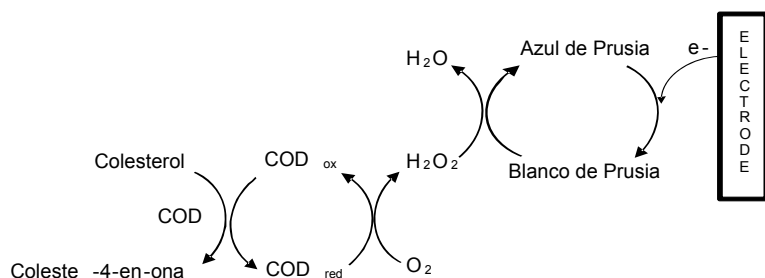
5.2.3.3.2 Interferencias

Con la finalidad de evaluar la selectividad del dispositivo desarrollado se realizó un estudio de interferencias para ácido ascórbico y dopamina (1.1 mM y 3.7 mM), encontrando un incremento mínimo de la corriente de 3.6 y 1.8 % respectivamente para una concentración de colesterol de 2.5 mM. Debido a que la concentración del ácido ascórbico estudiada supera más de 10 veces el límite normal en sangre y que la concentración de colesterol utilizada en el estudio está por debajo de los niveles normales; es posible afirmar que esta especie no afecta significativamente la respuesta del biosensor. Por otra parte, la dopamina está presente en sangre a niveles traza menores a 0.2 μM por lo que su contribución en la corriente del dispositivo desarrollado es despreciable al igual que otras catecolaminas como la epinefrina. Finalmente, aunque al ácido úrico es un conocido interferente cuya concentración en sangre es de aproximadamente 6 veces superior al ácido ascórbico, su potencial de oxidación sobre carbono es superior a 400 mV y en consecuencia no representa una interferencia importante

5.3.2.4. Transductor tipo II con Azul de Prusia

5.3.2.4.1. Evaluación de Azul de Prusia en un electrodo de platino

Como una alternativa para disminuir el potencial de trabajo de biosensores basados en enzimas oxidasas, se ha reportado el uso del Azul de Prusia (PB) como sonda para dar seguimiento al peróxido de hidrógeno producido por la reacción enzimática [Li, 2006 y 2002]. Así, el funcionamiento convencional de este tipo de biosensores es representado en la ec. 5.5.



Ec. 5.5

Con la finalidad de explorar esta estrategia de detección, inicialmente se formó el PB *in situ* sobre la superficie del electrodo de platino con el objetivo de evaluar su comportamiento electroquímico. La electrodeposición se realizó sumergiendo el electrodo de trabajo en una solución que contiene 1 M KCl, 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ y 1 mM $FeCl_3$ aplicando un potencial de 0.4 V por 100 seg., conforme a lo reportado en la literatura [Gurban, 2008; Vidal, 2004]. Para evaluar el esquema de funcionamiento de la película de PB formado, se realizaron voltamperogramas en PBS 0.05M (KCl 0.1M) (Fig. 5.25).

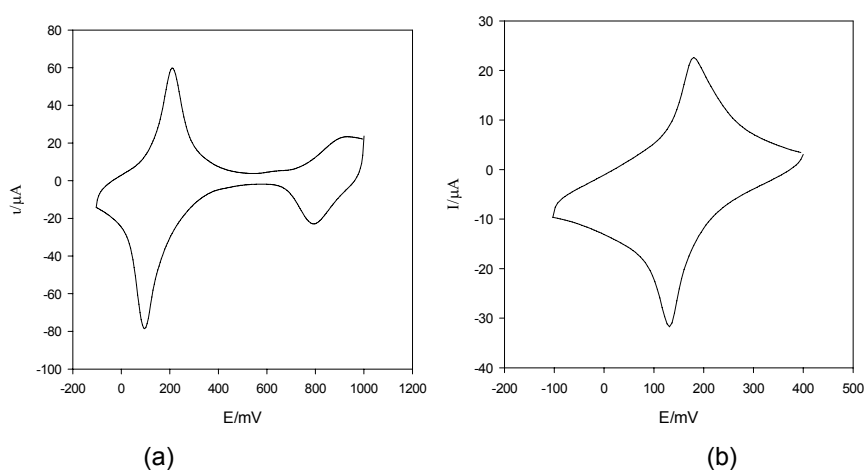
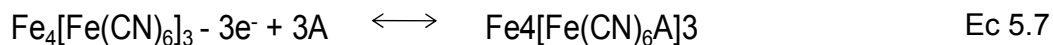


Figura 5.25 Voltamperogramas de PB sobre electrodo de platino a 50 mV/s en PBSA pH 7.0

En la figura 5.25a, se observan dos picos de oxidación y dos picos de reducción. El primer pico anódico en 194 mV es atribuido a la oxidación de blanco de Prusia (PW) a azul de Prusia (PB) y el pico catódico en 160 mV es atribuido a la reducción de PB a PW (Ec. 5.6) [Lundgren, 1998, Itaya, 1984; Karkaryn, 2000; Mattos, 2001]. El segundo pico anódico en 890 mV es atribuido a la oxidación de PB a verde de Prusia (PG) y el pico catódico a 804 mV es atribuido a la reducción de PG a PB (Ec. 5.7).





Conforme a la literatura la reducción del PB a PW es catalizada por el peróxido de hidrógeno; así, se realizaron curvas de calibración de H_2O_2 a un potencial de 0.0 V siguiendo dicha señal de reducción en PBS pH 7.0 (Fig. 5.26). Los parámetros analíticos obtenidos son: un coeficiente de correlación de 0.9951, un comportamiento lineal de 0.05 a 0.17 mM y un límite de detección de 0.012 mM con una pendiente de $1\mu\text{A}/\text{mM} \pm 0.001$ (Fig 5.26).

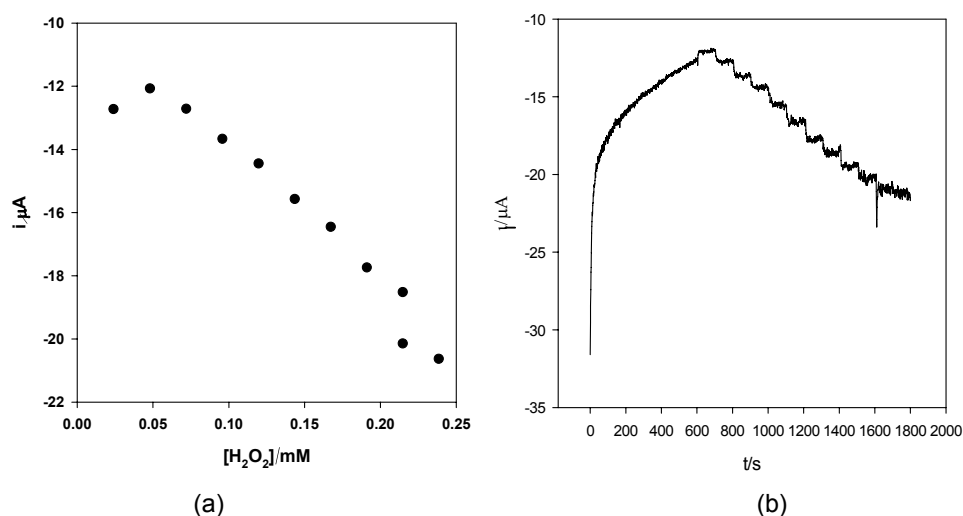


Figura 5.26 (a) Curva de calibración de peróxido de hidrógeno. (b) Cronoamperograma de la curva de calibración.

5.3.2.4.2. Evaluación de Azul de Prusia sobre un electrodo de carbón vítreo

Una vez confirmada la viabilidad de seguir el peróxido de hidrógeno a potenciales reducidos con la ayuda del azul de Prusia, se evaluó el comportamiento de electrodos de carbón vítreo bajo las mismas condiciones que con platino. Aquí es posible observar una transferencia electrónica más lenta, pero aun así se distinguen los picos de oxidación y reducción del PB/PW en 160 y 58 mV respectivamente. (Fig. 5.27).

Al llevar a cabo un experimento cronoamperométrico imponiendo un potencial de 0.0 mV en PBS y haciendo adiciones sucesivas de H_2O_2 , se observa un incremento en la magnitud de la corriente debido al efecto catalítico del peróxido de hidrógeno sobre la reducción del PB (Fig. 5.28b).

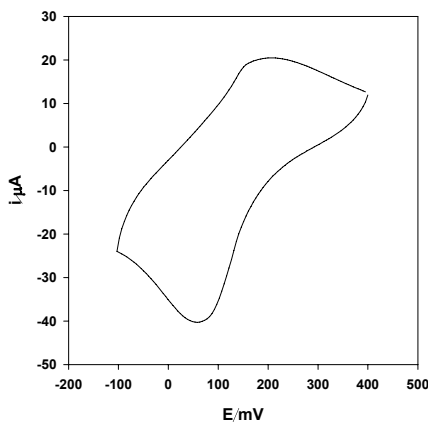


Figura 5.27 Voltamperogramas de PB *in situ* sobre electrodo de carbón vítreo en PBS pH=7.0 a 50 mV/s

Las curvas de calibración para H_2O_2 a un potencial 0.0 V en PBS pH 7.0, presentan un coeficiente de correlación de 0.9925, un comportamiento lineal de 0.05 a 0.14 mM, límite de detección de 0.015 mM y una pendiente de $0.3 \mu\text{A}/\text{mM} \pm 0.0001$. (Fig 5.28).

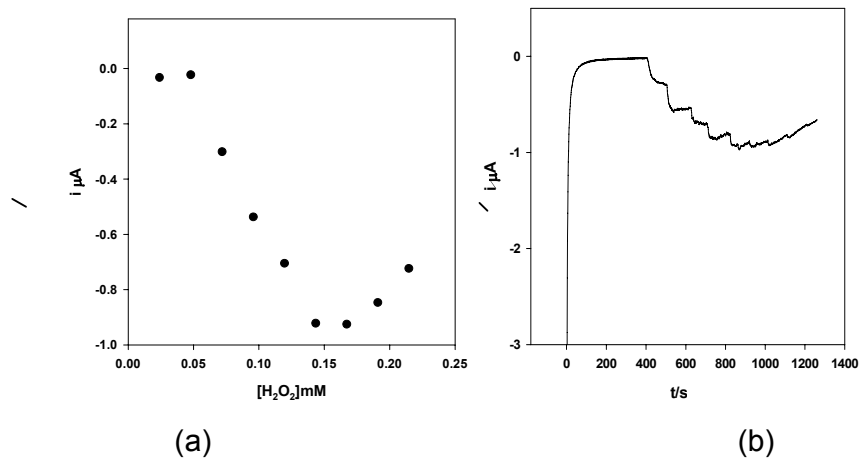


Figura 5.28 (a) Curva de calibración de electrodo de carbón vítreo de peróxido de hidrógeno. (b) Cronoamperograma de la curva de calibración.

5.3.2.4.3. Evaluación de azul de Prusia en un electrodo plano tipo II

Al crear la película de PB sobre electrodos de serigráficos de grafito es posible observar un pico de oxidación en 120 mV y un pico de reducción 20 mV debido a la oxidación y reducción del PB (Fig. 5.29). Se puede destacar que la transferencia electrónica mejora respecto a la obtenida con carbón vítreo debido a que la rugosidad de los electrodos serigráficos hace más activa su superficie.

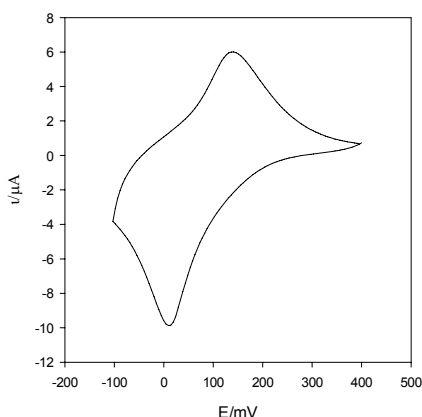


Figura 5.29 Voltamperogramas de PB *“in situ”* sobre electrodo de serigráfico de grafito en PBS pH=7.0 a 50 mV/s

Al realizar la cronoamperometría en un solución de buffer PBS haciendo adiciones sucesivas de H_2O_2 , se observa el esperado incremento en la corriente (Fig 5.30b).

Conforme a los resultados se realizaron curvas de calibración para H_2O_2 en PBS a pH 7.0, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.99, un comportamiento lineal 0.02 a 0.18 mM, un límite de detección de 0.001 mM y una pendiente de $0.39 \mu A/mM \pm 0.003$ (Fig 5.30).

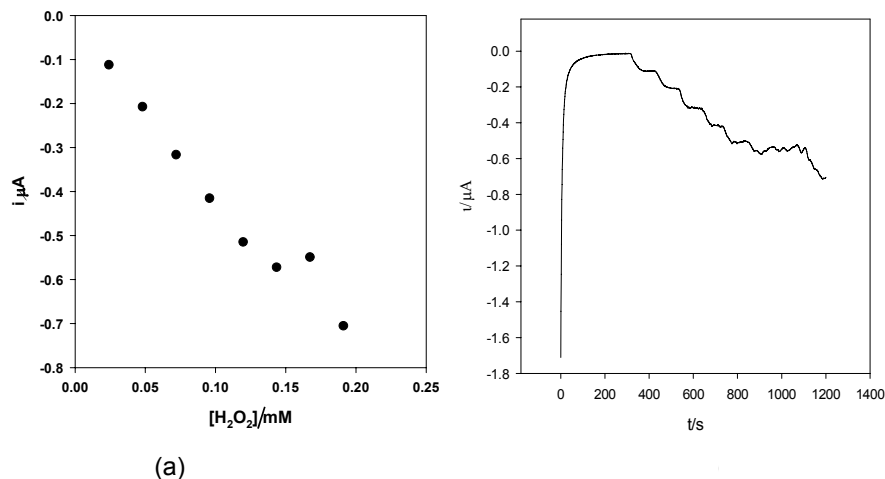


Figura 5.30 Voltamperogramas de PB *"in situ"* sobre electrodo de serigráfico de tipo II en PBS pH=7.0 a 50 mV/s

Una vez verificado el esquema de detección sobre los diferentes electrodos, con la finalidad de hacer tecnológicamente compatible la incorporación del PB en la construcción de los electrodos serigráficos, se decidió incorporar PB sintetizado con 5 y el 10% de polvo de grafito. De igual manera se realizaron voltametrías cíclicas para cada uno de ellos, obteniendo los picos de oxidación y reducción del azul de Prusia en aproximadamente 190 y 100mV respectivamente. Cabe mencionar que de la misma manera que el voltamperograma para el electrodo de platino, podemos observar los picos de oxidación y reducción del verde de Prusia en aproximadamente en 0.8 V, confirmando el buen funcionamiento del electrodo serigráfico cargado con azul de Prusia previamente sintetizado (Fig. 5.31).

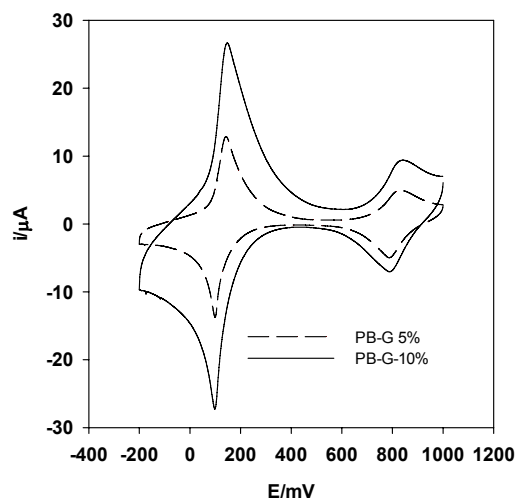


Figura 5.31 Voltamperogramas cíclicos del transductor plano de grafito cargado de PB.

Dados los resultados anteriores se realizaron curvas de calibración con peróxido de hidrógeno obteniendo los siguientes parámetros (tabla 5.10).

Tabla 5.10 Parámetros del electrodo serigráfico de trabajo cargados de Azul de Prusia.

ELECTRODO	r ²	IL	LD	Pendiente $\mu\text{A}/\text{mM}$
SP PB-G 5%	0.99	0.05-0.17	0.016	1.20 ± 0.01
SP PB-G 10%	0.99	0.05-0.17	0.016	2.67 ± 0.01

SP screen printing, PB Azul de Prusia, G grafito

Como podemos observar, se obtuvo la mayor sensibilidad conforme a los resultados con el transductor que contiene Azul de Prusia al 10%.

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo corroborar los picos representativos de la reacción oxido-reducción de azul de Prusia. [Lundgren, 1998, Itaya, 1984; Karkaryn, 2000; Mattos, 2001] en el electrodo serigráfico de carbono, demostrando una mejor transferencia electrónica, respecto a los otros electrodos de carbono estudiados, al incorporar el PB directamente en la pasta serigráfica.

5.3.2.4.4 Biosensor tipo II utilizando al Azul de Prusia

5.3.2.4.4.1 Biosensor tipo IIPBGLA (transductor a 3 electrodos, Azul de Prusia)

Debido a cuestiones económicas, previo al desarrollo de un biosensor amperométrico para colesterol, se realizó un estudio construyendo biosensores con la enzima glucosa oxidasa (GOD) utilizando el PB. Es importante aclarar que la reacción enzimática en ambos casos produce H_2O_2 .

La figura 5.32 confirma que el Azul de Prusia permite dar seguimiento al incremento en la producción de peróxido de hidrógeno al bajo potencial de trabajo.

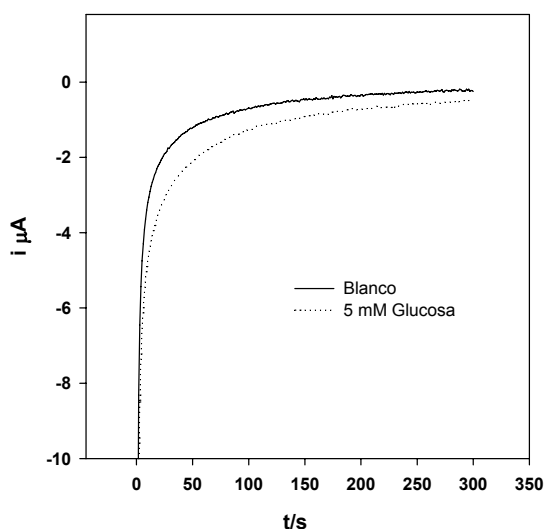


Figura 5.32. Respuestas cronoamperométricas para el biosensor IIPBGLA con 0.3 U.I. de GOD y CMC ($E=0$ mV).

5.3.2.4.4.1.1 Parámetros analíticos

A partir de los registros cronamperométricos se construyen las curvas de calibración cuyos parámetros muestran claramente la proporcionalidad de la corriente con respecto a la concentración de glucosa. Se encuentra un comportamiento lineal de 0 a 10 mM, un coeficiente de correlación de 0.99, un límite

de detección de 0.05 mM y una pendiente de 160 ± 0.23 nA/mM (Tab.5.11) (Fig. 5.32 y 5.33).

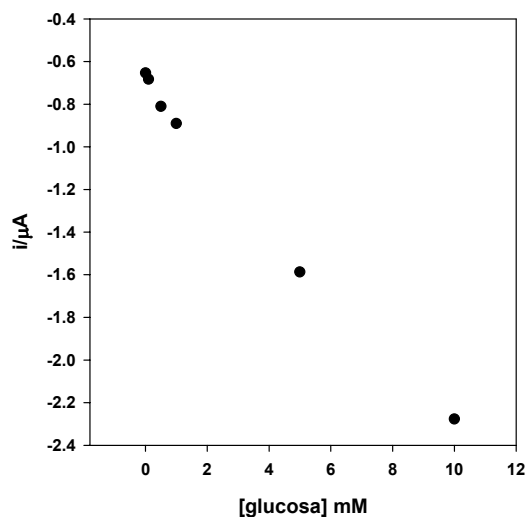


Figura 5.33 Curva de calibración amperométricas para el Biosensor para el biosensor IIPBGLA con 0.3 U.I. de GOD y CMC ($E = 0.0$ V)

Tabla 5.11 Resultados obtenidos en la curva de calibración de los biosensores amperométrico IIPBGLA

Sensibilidad nA/mM	IRL /[Colesterol]	Límite de detección	$r^2 \geq$
160 ± 0.23	0-10 mM	0.05 mM	0.99

5.3.2.4.4.2 Biosensor tipo IIPBCOA (transductor a 3 electrodos, Azul de Prusia)

Corroborado el funcionamiento del Azul de Prusia como elemento para reducir el potencial de trabajo de biosensores amperométricos basados en oxidasas se procedió a desarrollar el biosensor de colesterol (Ec.5.5)

El biosensor para colesterol desarrollado, presenta el decremento esperado en la intensidad de corriente a un potencial de trabajo de 0 mV. Para la evaluación del comportamiento del biosensor de colesterol se obtuvieron registros cronoamperométricos a diferentes concentraciones (Fig. 5.34).

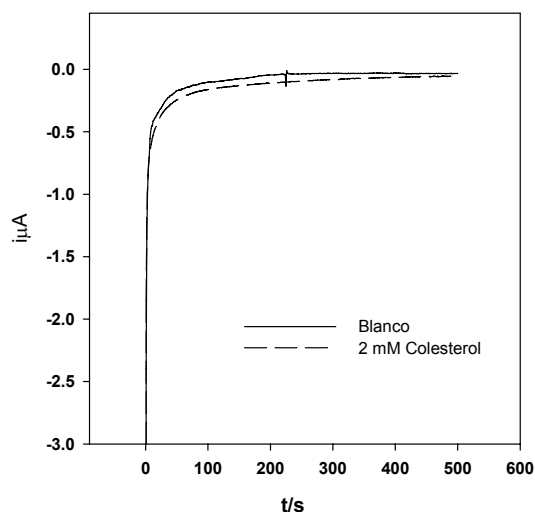


Figura 5.34. Respuestas cronoamperométricas para el biosensor IIPBCOA con 0.6 U.I. de COD y CMC ($E=0$ mV).

5.3.2.4.4.2 1 Parámetros analíticos

Las curvas de calibración muestran claramente la proporcionalidad de la corriente con respecto a la concentración de colesterol, presentándose un comportamiento lineal de 2 a 16 mM, con un coeficiente de correlación 0.98 un límite de detección de 1.29 mM y una pendiente de 41 ± 0.001 nA/mM (Fig 5.35 y Tab.5.12).

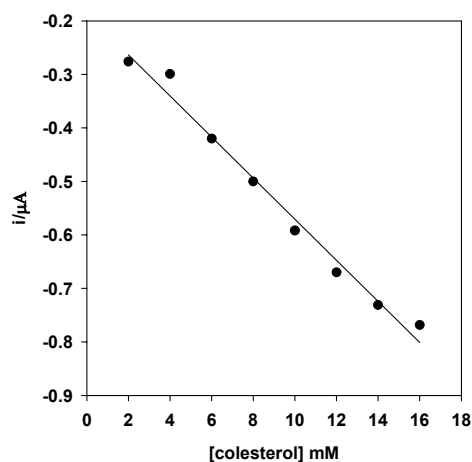


Figura 5.35 Curva de calibración amperométricas para el Biosensor IIPBCOA con 0.6 U.I.de COD y CMC ($E=0$ V)

Tabla 5.12 Parámetros analíticos de biosensores amperométricos IIPBCOA

Sensibilidad nA/mM	IRL /[Colesterol]	Limite de detección	$r^2 \geq$
41 $\pm$ 0.01	2-16 mM	1.29 mM	0.98

5.3.2.4.4.2.2. Constante de Michaelis-Menten

La constante aparente de Michaelis-Menten fue de 0.66 ± 0.02 mM; valor que supera el intervalo reportado para la COD 0.013-0.35 mM. Comparado con el biosensor construido con el de TCNQ la constante es mucho mayor lo que nos indica que la afinidad del biosensor se afecta por el mediador que se encuentra dentro de la pasta de grafito.

5.3.2.5 Biosensor tipo IIFRCOA (transductor a 3 electrodos, Ferrita)

La ferrita es un mineral de hierro constituido por óxido ferroso-diférrico (Fe_3O_4), con propiedades de conductividad y ferromagnéticas. Al igual que el PB se ha utilizado como un compuesto electrocatalítico en la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno, aunque sus reportes son escasos [Shinn, 2009; Lin 2005]. Con el objetivo de disminuir el potencial de trabajo para eliminar las posibles interferencia de especies electroattractivas, la estrategia consisten en mezclar el polvo de la ferrita con la tinta de impresión del electrodo.

5.3.2.5.1 Potencial de trabajo

Hasta el momento existen un solo reporte en que se use la ferrita como mediador, a pesar de ser considerado un compuesto de baja toxicidad (Shinh, 2009). El biosensor desarrollado, esta basado en el uso ferrita y el seguimiento de su reducción catalizada por el peróxido de hidrógeno. En primera instancia se evaluó el comportamiento del transductor mediante voltametría cíclica (Fig.5.36).

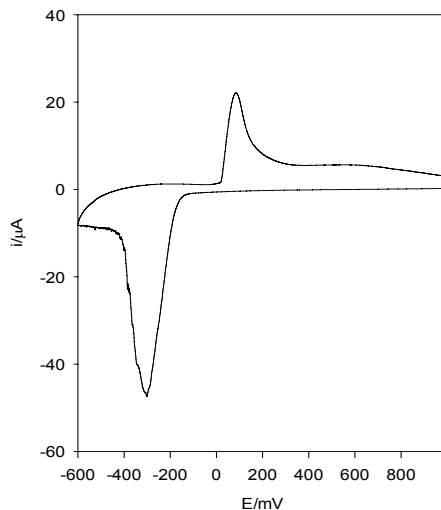


Figura 5.36. Voltamperograma cíclico del transductor plano tipo II con ferrita al 40% en solución blanco (PBSB) ($v=50$ mV/s).

En dicha figura se muestra un pico de oxidación en 100 mV y un reducción en 280 mV, los cuales son atribuidos a la oxidación del Fe^{2+} y a la reducción del Fe^{3+} , así mismo corroborando el funcionamiento del transductor.

Para evaluar el comportamiento del transductor cargado con ferrita en el seguimiento de la concentración de peróxido de hidrógeno, se decidió fijar el potencial de trabajo en -250 mV. Aunque dicho potencial es menor al pico de reducción de la ferrita, el imponer potenciales mayores aumentaba la contribución en la corriente de la reducción de oxígeno y agua.

Siguiendo la señal de reducción al incrementar la concentración del peróxido de hidrógeno se construyeron curvas de calibración que reportan los siguientes parámetros analíticos: coeficiente de correlación de 0.9959, comportamiento lineal 0.0 a 8.0 mM, límite de detección de 0.6 mM (Fig 5.37).

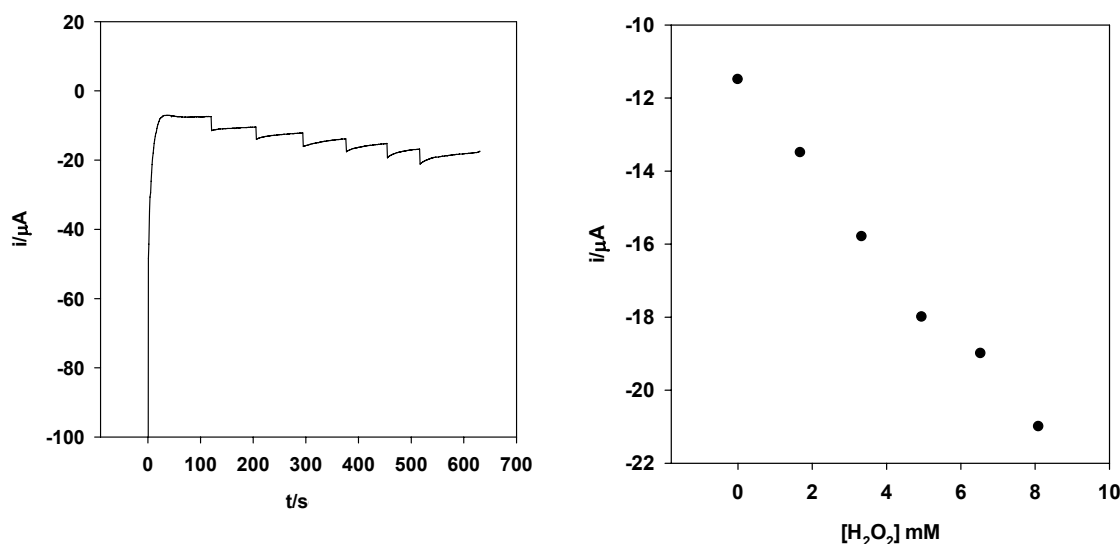


Figura 5.37 Izquierda: Respuestas cronoamperométricas de transductores de grafito con 40% ferrita. Derecha: curva de calibración amperométrica para peróxido de hidrógeno sobre el transductor plano con 40% de ferrita. $E_{\text{trabajo}} = (-0.25 \text{ V})$

Confirmado el buen comportamiento del transductor cargado con ferrita para seguir la concentración de H_2O_2 , el biosensor fue construido a partir de dicho transductor sobre el que se depositó y secó una membrana de carboximetil celulosa y colesterol oxidasa disueltos en PBS. El estudio se realizó imponiendo un potencial de -0.250 mV.

Los resultados obtenidos muestran claramente que el biosensor responde al colesterol incrementando la intensidad de corriente respecto al blanco (Fig.5.38)

5.3.2.5.2 Parámetros analíticos

Para obtener los parámetros analíticos del biosensor desarrollado, se realizaron curvas de calibración para colesterol a partir de los cronoamperogramas individuales de cada biosensor a los 100 segundos (Fig. 5.39). Los resultados obtenidos muestran excelente proporcionalidad de la corriente con respecto a la concentración de colesterol. El comportamiento lineal se cubre para concentraciones comprendidas en el intervalo 2-10 mM con un coeficiente de correlación de 0.99. El límite de

detección calculado a partir de la curva de calibración es de 0.29 mM. (Tab. 5.13). Es importante destacar que cada uno de los puntos de la curva de calibración se realiza con un biosensor diferente debido al carácter desechable y de un solo uso del dispositivo. Este hecho implica una buena reproducibilidad de las medidas.

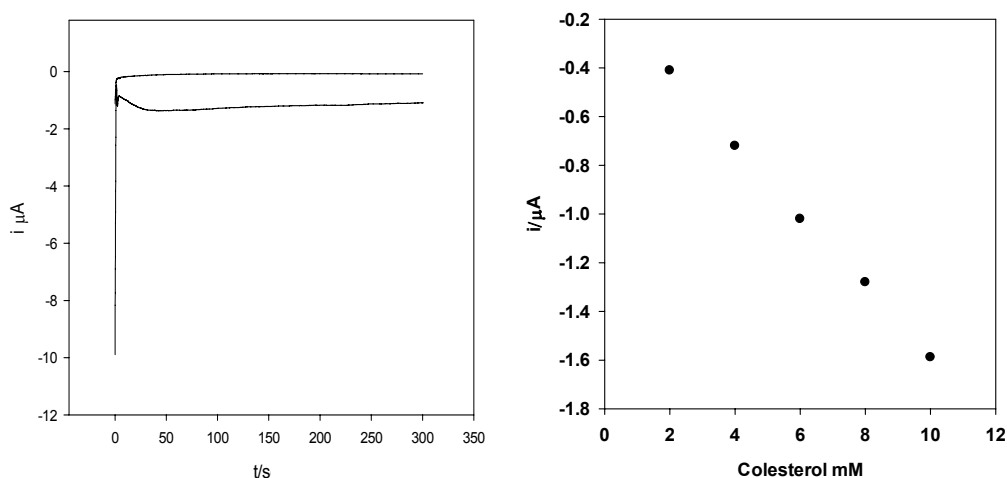


Figura 5.38 Izquierda: Respuestas cronoamperométricas para el biosensor tipo II G con 0.6 U.I. de COD y CMC Derecha: curva de calibración amperométrica el biosensor tipo II G con 0.6 U.I. de COD y CMC. $E_{\text{trabajo}} = (-0.25 \text{ V})$

Tabla 5.13 Resultados obtenidos en la curva de calibración de los biosensores amperométrico IIFRCOB.

Sensibilidad nA/mM	IRL / [Colesterol]	Limite de detección	$r^2 \geq$
132 ± 0.13	2-10 mM	0.29 mM	0.99

5.3.2.5.3 Constante de Michaelis-Menten

Conforme al modelo de Michaelis Menten y tomando la intensidad de corriente como la velocidad de la reacción, se encuentra que la K_m aparente es de $0.58 \pm 0.01 \text{ mM}$, ubicándose razonablemente cercana a los valores reportados para la enzima en solución 0.013-0.35 mM y en consecuencia indicando que la actividad de la enzima no ha sido afectada fuertemente por el proceso de inmovilización. (Vrielink y Ghisla, 2009).

5.3.2.5.4 Interferencias

La interferencia es siempre un tema importante para el desarrollo de un biosensor electroquímico. Los electrodos basados en el uso de la oxidasa de colesterol y medición de la liberación de peróxido de hidrógeno pueden ser afectados por la presencia de interferencia, tales como el ácido ascórbico, ácido úrico, creatinina, etc, que suelen estar presentes en los componentes biológicos, como muestras de sangre o fluidos corporales. Así, la interferencia de algunos de los compuestos electroactivos más representativos ha sido estudiada. Estas especies se agregaron a una solución 2.5 mM colesterol estándar ubicada en el intervalo de concentración fisiológica normal. Los interferentes adicionados fueron: glucosa 5.4 mM, urea. 3.3 mM, creatinina 1.7 mM, ácido ascórbico 1,1 mM y paracetamol 1,3 mM. Se encontró que la presencia de las especies interferentes estudiadas no cambia significativamente la corriente debida a colesterol obtenida en su ausencia. Los resultados se presentan en la Tabla 5.14.

Tabla 5.14. Interferencias

Compuesto interferente	Interferencia %^(a)	RDS %^(b)
glucosa	-0.06	2.13
urea	-1.28	0.76
creatinina	-2.20	0.51
paracetamol	+2.55	2.32
ácido ascórbico	+0.44	1.56

(a) $\text{Interferencia} = (I - I_0) / I_0 \times 100\%$; Donde I es la respuesta de compuesto interferente y I_0 es la respuesta de la solución de colesterol

(b) (N=3) La concentración estándar de colesterol 1.58 % RSD

5.4 Conclusiones

De acuerdo al trabajo realizado podemos concluir que el grado de miniaturización que es posible alcanzar mediante la construcción de biosensores electroquímicos de colesterol por tecnología screen printing, hace posible integrar en un sola estructura los 3 electrodos necesarios para realizar medidas amperométricas. Este hecho

permite fabricar biosensores de fácil manejo y reducido tamaño adecuados para el análisis clínico descentralizado. Los biosensores amperométricos de glucosa y colesterol desarrollados en configuración a 2 y 3 electrodos integran en una misma estructura un electrodo de pseudo-referencia de Ag/AgCl, un electrodo auxiliar de grafito y el correspondiente electrodo de trabajo (biosensor).

Para evaluar los posibles efectos de la integración de los electrodos de pseudo-referencia y auxiliar sobre el biosensor, se construyó y caracterizó un transductor amperométrico en configuración a dos y tres electrodos. A partir de los resultados obtenidos con este dispositivo, se puede concluir que si existe diferencia entre ambos tipos de transductores.

Así mismo, podemos concluir que existen pocos reportes de biosensores para la cuantificación de colesterol en configuración plana [Tab. 5.15], sin embargo muchos de ellos utilizan como transductor a metales costos como oro y platino, en comparación con los biosensores desarrollados que son de bajo costo y cubre el intervalo de concentración de interés clínico.

Tabla 5.15 Características de biosensores de colesterol en configuración plana.

Transductor	Mediador o agente electrocatalítico	Sensibilidad (nA mM ⁻¹ mm ⁻²)	Referencias
Oro	Sin mediador	17	[Shen., 2007]
Grafito / Nanotubos de carbono	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	37	[Li., 2005]
Grafito	Fe ₃ O ₄	87	[Shih, 2009]
Citocromo P450	Grafito, rodio, oro y nanotubos de carbono	1,120	[Carrara, 2008]

Los biosensores contruidos con TCNQ y Ferrita muestran una sensibilidad superior a la mayoría de los biosensores de colesterol reportados. Sin embargo, el biosensor construido con Azul de Prusia muestra una sensibilidad baja, aunque aún competitiva con algunos desarrollos reportados.

La constante de Michaelis Menten en todos los biosensores desarrollados se ubica por arriba del intervalo reportado, indicando que la metodología de inmovilización

utilizada afecta la afinidad de la enzima por su sustrato. En este sentido es importante mencionar que la metodología de inmovilización es compatible con la fabricación en serie de biosensores y que en algunos casos la K_m no es muy superior a la reportada por lo que la afinidad no fue afectada dramáticamente y en consecuencia pueden ser utilizados los desarrollos.

5.5 Referencias

A. T. Markas, Gilmartin, and J. P. Hart, Fabrication and characterization of a screen printed, disposable, amperometric cholesterol biosensor, *Analyst.*, 119, 2331-2336. (1994).

Ana Maria Gurban, Thierry Noguer, Camelia Bala, Lucian Rotariu, *Improvement of NADH detection using Prussian blue modified screen-printed electrodes and different strategies of immobilization*, Sensors and Actuators B 128 536-544 (2008).

Arya, S. K., Datta, M., Malhotra, B. D., *Recent advances in cholesterol biosensors*, Biosensors and Bioelectronics, 23 1083-1100 (2008)

B. Sean, N. S. Dyer, and G. Anthony, *Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane*, *Anal. Chem. Acta.*, 448, 27-36 (2001).

Balasubramanian and Burghard, *Biosensor base on carbon nanotubes. Review*. *Anal. Bioanal Chem*) 385: 452- 468 (2006).

C.A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Dominguez and S. Alegret, *Thick-Film Biosensors*, Biosensors and Their applications, edit by Yang and Ngo, Klumber Academic/plenum Publishers, New York 1999.

Galán-Vidal Carlos A., Javier Muñoz, Carlos Dominguez, Salvador Alegret, *Chemical sensors, biosensors and thick film technology*, Trends in analytical chemistry, 14 225 (1995).

Carrara, S., Shumyantseva, V. V., Archakov., A. I., Samori, B., *Screen-printed electrodes based on carbon nanotubes and cytochrome P450sc for highly sensitive cholesterol biosensors*, Biosensors & Bioelectronics, 24 (1) 148-150 (2008).

Daniel C. Harris, *Análisis Químico Cuantitativo*, “2da Edición, Editorial Reverte, Barcelona 460 (2001).

Domínguez, R.O., Alonso-Lomillo, M.A., Arcos M. M. J., *Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications*, Talanta, 73 202-219 (2007).

Gilmartin, M. y Hart, J., *Fabrication and characterization of a screen-printed, disposable, amperometric cholesterol biosensor*, Analyst, 119(11) 2331-2336 (1994).

Itaya, Nobuyoshi Shoji and Isamu Uchida, *Catalysis of the reduction of molecular oxygen to water at Prussian blue modified electrodes*, J Am che. Soc, 106, 3423-3429 (1984)

J. C. Vidal, E. Garcia and Juan - R. Castillo, *Development of a platinized and ferrocene mediated cholesterol amperometric biosensor based on electropolymerization of polypyrrole in a flow system*, AnalSci., 18. 537-545, (2002).

Juan C. Vidal, Javier Espuelas, Esperanza Garcia-Ruis, Juan R. Castillo, *Amperometric colesterol biosensors base don the electropolymerization o pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-blue layers helped with self-assembled monolayers*, Talanta 64655-664. (2004)

Juan C. Vidal, Javier Espuelas, Esperanza Garcia-Ruiz, Juan R. Castillo, *Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-Blue layers helped with self-assembled monolayers*, Talanta 64 655-664, (2004)

Karyakin, Karyakina and Gorton, *Amperometric Biosensor for Glutamate using Prussian Blue-based "artificial peroxidase" as a trasducer for hydrogen peroxide*, Anal. Chem 72, 1720-1723, (2000),

Kulys, J., Simkeviciene, V., Higgins, I. J., *Concerning the toxicity of 2 compounds used as mediators in biosensor devices - 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) and tetrathiafulvalene (TTF)*. Biosensors and Bioelectronics, 7 495-501 (1992).

Li and Gu, *A selective Cholesterol Biosensor Based on Composite Film Modified electrode for amperometric detection*, Journal of the Chinese society, 53, 575-582. (2006)

Li and Peng, *A cholesterol biosensor based on entrapment of cholesterol oxidase in a silicic sol-gel matrix at a Prussian blue modified electrode*, Electroanalysis, 15 1031, (2003)

Li, G, Liao J. M., Hu, G. Q., Ma N. Z., Wu P.J., *Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood*, Biosensors & Bioelectronics 20 2140-2144 (2005).

Lundgren and Murray, *Observations on the composition of Prussian blue films and their electrochemistry*, Inorg. Chem, 27, 5 933-939 (1988).

Manuel Cano, Beatriz Palenzuela, Rafael Rodriguez, *A TTF-TCNQ electrode as a voltammetric analogue of ion-selectibe electrode*, Electroanalysis, 18 1068-1074 (2006).

Manuel Cano, J. Luis Avila, Manuel Mayen, M.L. Mena, J. Pigarron, Rafael Rodriguez, *A nex, third generation, PVC/TTF-TCNQ composite amperometric biosensor for glucosa determination*, Journal of Electroanalytical Chemistry 615 69-74, (2008)

Mattos, Lukachova, Gorton, Laurell and Karyakin, *Evaluation of glucose biosensors based on Prussian blue and Lyophilised, crystalline and cross-linked glucose oxidase*, Talanta, 54 963-974 (2001).

Miguel Arroyo, *Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications*
Pratima R. Solanki, Sunil K Arya, S.P. Shingh, M.D. Pandey, B. D. Malhotra, Application of electrochemically prepared poly-N-methylpyrrole-p-touene sulphonate films to cholesterol biosensor, Sensors and Actuators B, 123, 829-839, (2007).

Ricci, Amine, Tuta, Ciucu and Lucarelli, *Prussian blue and enzyme bulk-mofified screen printed electrodes for hydrogen peroxide and glucose determination with improved storage and operational stabiltiy*, Analytica Chimica Acta, 485, 111-120, (2003)

Richmond, W., Analytical reviews in clinical biochemistry - The quantitative-analysis of cholesterol, Annals of Clinical Biochemistry, 29, 577-597 (1992).

Robert Bohinski, *Bioquímica* 5a Edición. Addison Welesy, México (1998).

Robin, *The color and electronic configurations of prussian blue*, Inorg Chem 1, 2 337-342, (1962).

Shen and Liu, Development of a screen-printed cholesterol biosensor: Comparing the performance of gold and platinum as the working electrode material and fabrication using a self-assembly approach, Sensors and Actuators B 120, 417-425, (2007).

Shen, J. y Liu C. C., *Development of a screen-printed cholesterol biosensor: Comparing the performance of gold and platinum as the working electrode material and fabrication using a self-assembly approach*, Sensors and Actuators B-Chemical, 120(2) 417-425 (2007)

Shih, W. C., Yang, M. C., Lin, M. S., *Development of disposable lipid biosensor for the determination of total cholesterol*, Biosensors and Bioelectronics, 24 1679-1678 (2009).

Skoog, Douglas A.; Donald M. West, F. James Holler. *Fundamentals of Analytical Chemistry* (7th edición). Harcourt Brace College Publishers, (1995).

T. Wolfgang, I. Lioni, and M. Mascini, Cholesterol biosensors prepared by electropolymerization of pyrrole, *Electroanalytical*, 5, 753-763 (1993).

Vrielink. A. y Ghisla S., *Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features*, FEBS Journal 276 6826–6843 (2009).

Capítulo 6

Conclusiones y
proyecciones

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

6.1 Conclusiones

Mediante el desarrollo del presente trabajo se logró desarrollar y caracterizar sensores y biosensores electroquímicos para la determinación de colesterol basados en diferentes características de construcción y estrategias de detección.

Con la intención de desarrollar sensores potenciométricos para colesterol se exploraron las siguientes estrategias:

- Impresión molecular de colesterol con polipirrol
- Impresión molecular de colesterol con polianilina
- Impresión molecular de colesterol con β -ciclodextrina
- Competencia entre colesterol y β -ciclodextrina por plomo con electrodos potenciométricos de plomo

En cuanto a la primera estrategia se encontró que el electrodo respondía mayoritariamente al alcohol utilizado para solubilizar el colesterol; por otra parte con polianilina la necesidad de trabajar a pH's ácidos hace que se protone el SDS e imposibilita incrementar la solubilidad del colesterol y en consecuencia seguir su concentración potenciométricamente; esta misma situación fue exhibida al utilizar β -ciclodextrina. Finalmente al hacer competir el Pb y el colesterol por la CD, se manifestó mayor afinidad del primero, razón por la cual no fue posible seguir el cambio de potencial esperado al adicionar colesterol. En resumen, no fue posible desarrollar un dispositivo potenciométrico eficiente para cuantificar colesterol.

Los sensores voltamperométricos para colesterol basados en la adsorción del colesterol y la oxidación sobre gota de mercurio, demostraron proporcionalidad entre la corriente y la concentración de colesterol; sin embargo, los intervalos de respuesta lineal encontrados se encuentra muy alejados de aquellos de interés clínico, además de ser señales poco reproducibles. Así, su utilidad práctica para el análisis de colesterol es limitada y hace imposible su aplicación en campo.

Los biosensores de colesterol exhiben un desempeño competitivo respecto a lo reportado en la literatura, siendo eficientes en la determinación de la concentración de colesterol, cabe mencionar que la corriente es pequeña para este tipo de biosensores debido a la necesidad de incorporar diversos tensoactivos para emulsionar el colesterol; así como la escasa actividad de la enzima disponible en el mercado en comparación con la glucosa oxidasa. No obstante, los dispositivos desarrollados presentan una sensibilidad detectable y competitiva, particularmente si se considera que éste no incorpora materiales costosos en su fabricación como nanotubos de carbono, mediadores sofisticados o transductores de metales preciosos. Las especificaciones encontradas para todos los biosensores desarrollados se resume en la tabla 6.1

Tabla 6.1 Biosensores desarrollados para la cuantificación de colesterol

Configuración	analito	mediador	E/V	R ²	I.L. (mM)	L.D (mM)	Sensibilidad nA/mM
Cilíndrico	colesterol	Ferricianuro	0.6 0	0.99	2.8-11.4	0.80	1830 ± 0.29
plano	colesterol	Ferricianuro	0.60	0.99	2-8	0.76	38 ± 0.34
	colesterol	TCNQ	0.15	0.99	0-14	0.40	7 ± 0.80
	colesterol	PB- G 10%	0.00	0.98	2-16	1.29	41 ± 0.01
	colesterol	TCNQ-G 5%	0.15	0.99	2-12	1.56	221 ± 1.94
	colesterol	Ferrita 40%	-0.25	0.99	2-10	0.29	132 ± 0.13

Por lo anteriormente expuesto este trabajo establece el desarrollo de biosensores amperométricos de colesterol con características de respuesta competitivas y compatibles con la producción en masa. Los dispositivos son de tipo desechable siendo un prometedo desarrollo para la cuantificación descentralizada de colesterol, ya que el intervalo de concentración encontrado incluye el de interés clínico (3.5-6.5 mM) y el volumen requerido para el análisis es mínimo.

El biosensor que mostró los mejores resultados en cuanto a sensibilidad es el desarrollo utilizando al TCNQ como mediador; mediador no reportado hasta el momento en biosensores de colesterol (Tab. 6.1).

El grado de miniaturización que es posible alcanzar mediante la construcción de los biosensores electroquímicos desarrollados, hace posible integrar en una sola estructura los 3 electrodos necesarios para realizar medidas amperométricas. Este hecho, permite fabricar sensores de fácil manejo y reducido tamaño adecuados para el análisis descentralizado, pudiéndose extender sus aplicaciones a diversos ámbitos como el clínico, medioambiental e industrial.

Considerando que una de las limitantes para el uso de los electrodos voltamperométricos desarrollados son las interferencias, se resalta que los biosensores con TCNQ y ferrita no presentan respuesta significativa a los interferentes comúnmente encontrados en muestras de interés biológico.

Las ventajas que se tienen con el desarrollo del biosensor para colesterol con respecto a los comerciales, es el tiempo de análisis y el costo de manufactura. Sin embargo el tiempo de vida debe ser ampliado, ya que para los comerciales es aproximadamente de 3 años y en nuestro caso de un mes.

6.2 Proyecciones

La escasa solubilidad del colesterol en medio acuoso constituye uno de los principales retos para incrementar la sensibilidad de los dispositivos electroquímicos ya que hace necesaria la adición de tensoactivos y alcoholes que pasivan la superficie de los electrodos y en el caso de los biosensores afectan la actividad enzimática. Asimismo, en el caso particular de los biosensores de colesterol, la escasa actividad de la enzima disponible comercialmente contribuye a la baja sensibilidad de los dispositivos.

No obstante que este trabajo contribuye aportando dispositivos con buena sensibilidad y bajo costo, aún es necesario incrementarla; en este sentido lograr solubilizar el colesterol con aditivos inocuos a la enzima es una de las líneas de trabajo que deben seguirse. De igual manera, incorporar en la fabricación colesterol

oxidasa más activa, probablemente mediante modificación genética, mejoraría indudablemente la sensibilidad del dispositivo.

Para continuar este trabajo, debe incorporarse la enzima colesterol esterasa, a fin extender la determinación a el colesterol total y aplicar en muestras reales como sangre y alimentos.

Por otra parte, es necesario realizar la fabricación de los biosensores con equipos automatizados para contribuir en la mejora de la reproducibilidad; en esta dirección el perfeccionamiento del método de inmovilización es una actividad de gran relevancia.

Finalmente es importante llevar a cabo evaluaciones del desempeño de los dispositivos desarrollados en campo mediante su integración con la instrumentación electroquímica portátil disponible en el mercado. Esta actividad validará la importancia y utilidad del trabajo desarrollado.

El éxito de los biosensores desarrollados y el haber establecido una plataforma electroquímica basada en diversos mediadores hace relativamente más sencillo incorporar otras enzimas para cuantificar otros analitos de interés como triglicéridos, ácido úrico, glucosa, etc. La integración de biosensores de colesterol, triglicéridos y glucosa en un mismo chip, permitirá desarrollar un dispositivo de utilidad clínica para obtener el perfil diabético de pacientes en el consultorio.