



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENERÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA MULTIFUNCIONAL PARA EL
DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADA EN LA
FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO CON CONCANAVALINA A.**

TESIS QUE PRESENTA:

Q. ELVIS ORTIZ SANTOS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

ASESORES:

Dr. GUSTAVO RIVAS

Dra. LAURA GALICIA LUIS

SINODALES:

DRA. SILVIA GUTIÉRREZ GRANADOS

DRA. LAURA GALICIA LUIS

DRA. MARIA LUISA LOZANO CAMARGO



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENERÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA MULTIFUNCIONAL PARA EL
DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADA EN LA
FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO CON CONCANAVALINA A.**

TESIS QUE PRESENTA:

Q. ELVIS ORTIZ SANTOS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

ASESORES:

Dr. GUSTAVO RIVAS

Dra. LAURA GALICIA LUIS

CIUDAD DE MÉXICO A 14 DE DICIEMBRE DEL 2018

Este trabajo se realizó en la

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Físico Química

Córdoba Argentina

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Área de Electroquímica

CDMX (Ciudad de México), México

INDICE

Abreviaturas	9-10
Resumen	11-13
CAPITULO I INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1 INTRODUCCIÓN.....	15
1.2 Biosensores electroquímicos.....	16-17
1.2.1. Clasificación de los biosensores.....	18
1.2.1. A Clasificación en función del componente biológico.....	18-19
1.2.1. B Clasificación en función del componente transductor.....	19-20
1.3 BIOSENSORES ENZIMÁTICOS.....	21-23
1.4 MECANISMOS DE CATÁLISIS.....	23-24
1.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA: MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS-MENTEN.....	25-27
1.6 CINÉTICA DE MECANISMOS DONDE INTERVIENEN DOS SUSTRATOS.....	27
1.7 VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS BIOSENSORES ENZIMÁTICOS.....	28
1.8 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BIOMOLÉCULAS UTILIZADAS.....	28
1.8.1. Glucosa oxidasa (GOx).....	28-30
1.8.2 Concanavalina A.....	30-33
Objetivos.....	34
CAPÍTULO 2. TÉCNICAS Y MATERIALES EMPLEADOS	
2.1. TÉCNICAS EMPLEADAS.....	36
2.2. VOLTAMPEROMETRÍA CICLICA.....	36-38
2.3. AMPEROMETRÍA.....	39-40
2.4. INSTRUMENTACIÓN Y CELDAS ELECTROQUÍMICAS.....	41

2.5. LIMPIEZA, PRETRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE TRABAJO DE CARBONO VÍTREO.....	42
2.6. ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE UN BIOSENSOR.....	43-45
2.7. NANOTUBOS DE CARBONO EN EL MUNDO DE LOS BIOSENSORES.....	46-47
2.8. FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO.....	48-49

Capítulo 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. PREPARACIÓN DE LA DISPERSIÓN DE MWCNTS-CONCAVALINA A.....	51
3.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR.....	51
3.3. REACTIVOS.....	52
3.4. APARATOS.....	52

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. SELECCIÓN DEL SOLVENTE.....	54
4.2. CANTIDAD DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE MWCNTS.....	55
4.3. CONCENTRACIÓN DE CONCANAVALINA A.....	56
4.4. TIEMPO DE SONICADO.....	57
4.5. CONCENTRACIÓN DE GOX.....	58
4.6. TIEMPO DE INCUBACIÓN DE GOX.....	59
4.7. COMPARACIÓN DE DISTINTAS CONFIGURACIONES (FAD).....	60-62
4.8. RECUBRIMIENTO BIOACTIVO PARA GCE/MWCNTS-CON A/GOX.....	63-64
4.9. COMPARACIÓN DE DISTINTAS PLATAFORMAS DE DISPERSIÓN.....	65
4.10. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM).....	66-68
4.10. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL BIOSENSOR.....	69
4.11. ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD.....	70
4.12. ESTABILIDAD DE LA DISPERSIÓN.....	70-71

4.13. REUSABILIDAD GCE/MWCNT'S-CON A/GOX	72
4.14. ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR GCE/MWCNT'S-CON A/GOX EN FUNCIÓN DE TIEMPO ALMACENAMIENTO EN EL REFRIGERADOR.....	72
4.15. INTERFERENTES.....	73-74
4.16. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRAS REALES.....	75

CAPITULO5. CONCLUSIONES

Conclusiones generales.....	76
-----------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	77-80
---------------------------	-------

AGRADECIMIENTOS

En este momento de mi trayecto en el que todo está a punto de terminar, quiero agradecer a los que han estado conmigo durante todo este tiempo.

Para comenzar, quisiera agradecerle a mi familia. A mis padres Abel Ortiz y Venancia Santos porque sin su apoyo y esfuerzo a lo largo de mi vida nunca habría llegado a este punto en el que me encuentro. Por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis metas y anhelos.

A mis hermanos Lourdes, Asael, Edgar, Yanet y Ahida por su cariño y amor que me han dado y sobre todo por el apoyo incondicional que siempre me dan durante este proceso, a quienes quiero mucho y respeto, por siempre comprenderme en las buenas y en las malas, como solo ellos lo hacen. Y por apoyarme siempre a continuar adelante en todas mis metas que me planteo.

A mi asesora

Dra. Laura Galicia

Por su conocimiento y enseñanza que me ha transmitido, así como por su gran apoyo, motivación a seguir adelante, por su ayuda, consejos, paciencia y comprensión que me brindo en esta etapa tan importante de mi formación profesional y personal para la realización de este trabajo de maestría.

Dr. Gustavo A. Rivas

Agradezco la oportunidad que me brindo al formar parte de su grupo de trabajo, y por compartirme sus experiencias profesionales y por siempre estar allí cuanto necesitaba su apoyo. El resultado de mi tesis ha sido espectacular, mejor de lo que esperaba y una gran parte del desarrollo de ese excelente trabajo se lo debo a usted

Dra. María Luisa Lozano Camargo

Quien confió en mí brindándome su ayuda y conocimientos, así como sus consejos los cuales me permitió trabar con seguridad y sobre todo que me oriento en la investigación a seguir adelante.

Dr. Marcos Eguílaz Rubio

Con su experiencia permitió compartir conmigo sus conocimientos y ayudarme en todo el aspecto, siempre estar pendiente en el proceso de mi trabajo, y sobre todo por su amistad brindada.

A mis amigos:

Carolina

Gracias por ser mi amiga incondicional, por estar conmigo cuando más te necesite, por brindarme siempre tu apoyo y comprensión y abrirme las puertas de tu casa, y por estar en los momentos más difíciles de mi vida.

Juan Rodríguez, Juan Santos y Julián

Por ser uno de mis mejores amigos y por brindarme su amistad y estar siempre a tiempo en los momentos en que los demás solo venían si tenían tiempo y por la motivación y comprensión que me dan para seguir a delante en todas mis metas.

A mis amigos de la UAM-I

Antobeli, Amanda, Deni, Devora, Edrey, Ernesto, Geovany, Gilberto, Ibaldo, Miguel, Nayeli, Nelly, Perla, me siento afortunado de haber podido conocerlos, a unos los conozco desde inicio de la licenciatura, y nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional, y les agradezco por brindarme siempre su apoyo para que nunca me rindiera y siguiera adelante en mis metas tanto profesional como personal, y sobre todo por compartir risas donde tuvimos buenos momento, como también por los buenos consejos que me dio cada uno.

A mis amigos que conocí en Córdoba Argentina

Ale, Armando, Cami, David, Daya, Emma, Fabian, Julieta, Pablo, Pau, Pierre, Michael Gracias amigos por brindarme la oportunidad de conocerlos en esta etapa de mi vida, son unas maravillosas personas y les agradezco que hicieron de mi estancia fuera muy placentera y enriquecedora, de cada uno aprendí cosas diferentes, siempre llevare en mis pensamientos, esperó verlos muy pronto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico otorgado a través de la beca para realizar mis estudios.

A la Universidad Autónoma Metropolitana (**UAM**) por la beca que me otorgaron para el apoyo de transporte aéreo para la realización de mi estancia de movilidad.

ABREVIATURAS

GOx	Glucosa oxidasa
LOx	Lactosa oxidasa
ChOx	Colesterol oxidasa
Con A	Concanavalina A
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
FADH₂	Dinucleótido de Flavina y Adenina
CNT	Nanotubos de Carbono
SWNT	Nanotubos de Carbono de Pared Simple
MWCNT	Nanotubos de carbono de Pared Múltiple
GCE	Electrodo de Carbón Vítreo
SN	Desviación estándar de la respuesta
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
FCMO⁺	Ferroceno Metanol
$\Gamma_{\text{Electroactivo}}$	Recubrimiento Electroactivo
$\Gamma_{\text{Bioactivo}}$	Recubrimiento Bioactivo
CEA	Antígeno Carcinoembrionario
KDa	Kilodalton
V_o	Velocidad Inicial
V_{max}	Velocidad Máxima

VC	Voltamperometría Cíclica
WE	Electrodo de trabajo
RE	Electrodo de referencia
CE	Electrodo auxiliar o contraelectrodo
TEM (por sus siglas en inglés)	Microscopia Electrónica de Transmisión
SEM (por sus siglas en inglés)	Microscopia Electrónica de Barrido
Teq_04	Potenciostato
V	Volts
i	Corriente en μA ó A
A	Amperes
i_{pa}	Corriente de pico anódico
i_{pc}	Corriente de pico Catódico
nm	Nanómetro
j	Densidad de corriente

RESUMEN

En la sociedad en la que vivimos cada vez se hace más necesario el desarrollo de pequeños dispositivos de análisis que sean baratos, portátiles, fiables, selectivos, de fácil manejo y que requieran volúmenes pequeños de muestra para determinar un parámetro concreto. Cada vez es más frecuente que un paciente tenga la posibilidad de autocontrolar su medicación si puede medir con facilidad ese nivel plasmático que le interesa. Esta demanda social ha hecho posible que personas diabéticas hoy puedan conocer y esta manera controlar en cualquier momento su concentración de glucosa en sangre y abre la expectativa de que otros parámetros clínicos puedan ser obtenidos de forma similar.

El desarrollo de biosensores están llamados cada vez más a hacer realidad esta expectativa, es un área de creciente interés en muchas ramas de la ciencia debido a la potencialidad que estos dispositivos presentan para la detección y determinación de distintos tipos de analitos en muestras de interés ambiental, clínico o alimentario. Entre los biosensores electroquímicos, quizá los más prometedores, fundamentalmente en términos de sensibilidad, sean los biosensores amperométricos, y dentro de este tipo de sensores, los más utilizados son, sin lugar a dudas, los electrodos enzimáticos.

En el marco de este trabajo se propone que la Con A sea capaz de dispersar eficientemente los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) mediante el empleo de ultrasonificación y que, aun sufriendo algún grado de desnaturalización como consecuencia del tratamiento drástico de preparación de la dispersión, les confiera propiedades de biorreconocimiento que permitan la construcción de una plataforma multifuncional a ser usada para la obtención de distintos tipos de biosensores.

Se diseñó un biosensor mediante que la inmovilización de los nanotubos de carbono funcionalizados con concanavalina A sobre electrodos de carbono vítreo para crear una plataforma adecuada para el anclaje de la glicoproteína glucosa oxidasa que permita la cuantificación altamente sensible y selectiva de glucosa no sólo en soluciones puras sino también en muestras reales de interés clínico y alimentario; extendiéndose este esquema de preparación de biosensores electroquímicos a otras moléculas de biorreconocimiento.

Los resultados obtenidos en esta tesis de Maestría se presentan en los siguientes capítulos:

El capítulo 1, en la introducción se engloban los aspectos más generales e importantes a considerar durante el proceso de diseño y desarrollo de un biosensor, incluyendo la clasificación y definición de las diferentes metodologías existentes para llevar a cabo la inmovilización de biomoléculas sobre soportes sólidos para la fabricación de biosensores, con las ventajas e inconvenientes que conlleva cada una de ellas.

Capítulo 2. Se describen los fundamentos teóricos e instrumentales y las aplicaciones de las técnicas electroquímicas empleadas para el desarrollo de este trabajo. También se muestran las diferentes formas de inmovilización que presenta un biosensor. Debido a la importancia de los nanotubos de carbono hoy en día, los cuales son muy usados por su amplia gama de aplicaciones en: polímeros conductores, apantallamientos electromagnéticos, se emplean en chips de dispositivos electrónicos para disipar el calor, reduciendo la temperatura del microprocesador, componentes para membranas y células solares, química y actualmente en los biosensores, se discuten aspectos sobre los nanotubos de carbono y su funcionalización.

Capítulo 3. En este capítulo se describe la parte experimental, se detalla el procedimiento empleado para la preparación de la dispersión de los nanotubos de carbono de pared múltiple, así como también de los reactivos empleados, y el equipo empleado para la construcción de un biosensor que involucra nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) funcionalizados no covalentemente con Con A.

Capítulo 4. La funcionalización de nanotubos de carbono es un área en crecimiento dentro del campo de la nanotecnología que tiene como objetivo incrementar la afinidad de los tubos y mejorar su reactividad química con otras moléculas. Para llevar a cabo lo anterior, se han empleado diversas técnicas, las cuales pueden agruparse en dos categorías: funcionalización no-covalente y covalente. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos a partir de la construcción de un biosensor para la cuantificación de glucosa utilizando MWCNTs funcionalizados no covalentemente con Con A mediante tratamiento ultrasónico de alta potencia, empleando GCE como transductores, Glucosa oxidasa (GOx)

como elemento de biorreconocimiento (GCE/ MWNT-Con A/GOx). La respuesta de este biosensor se caracterizó a partir electroquímica del peróxido de hidrógeno enzimáticamente generado. Conociendo las condiciones experimentales del biosensor, se realizó el estudio para la determinación del recubrimiento electroquímico y bioactivo del electrodo, así como también, la estabilidad del biosensor en almacenado en refrigeración, y los posibles interferentes que pueden presentar durante la determinación de glucosa en muestras reales.

Capítulo 5. Aquí se presentan las principales conclusiones que se obtuvieron del presente trabajo de investigación en función de los objetivos planteados.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia el hombre ha tratado de comprender y controlar su vida y la del mundo que lo rodea desarrollando para ello distintas herramientas o metodologías de medición para compuestos químicos y bioquímicos. Estas metodologías han ido evolucionando logrando mejorar características como especificidad, sensibilidad, rapidez y costos en las determinaciones.

De esta manera se llega a la construcción de los sensores químicos y bioquímicos que reúnen el conocimiento de varias disciplinas tales como la física, química, electrónica, biología molecular y ciencia de polímeros y materiales entre otras. Como resultado de ello, surgen distintos dispositivos con lo que es posible reconocer una especie, una molécula específica o un determinado evento, convirtiendo ese reconocimiento en una señal medible [1].

Existe una gran diversidad de sensores que pueden ser utilizados en numerosos campos de la ciencia, lo que motiva día a día a los investigadores a seguir estudiándolos y mejorándolos, requiriéndose por ello dispositivos cada vez más eficientes para coleccionar e integrar la información obtenida.

Los sensores químicos se definen como dispositivos de medida que utilizan una reacción química o bioquímica para detectar y cuantificar un analito o un evento específico.

La diferencia entre sensores químicos y biosensores es compleja. Algunos autores tienden a distinguirlos basados en la naturaleza del analito estudiado, en tanto que otros los separan según la naturaleza de la reacción empleada para detectar el evento. Los sensores químicos poseen algún tipo de modificación superficial que puede ser específico para algún tipo de analito o compuesto electroactivo, y que además puede contener algún agente modificador de naturaleza no biológica. Esta capa reactiva que modifica la superficie del transductor interactúa de alguna manera con el compuesto de interés ya sea químicamente, físicamente o biológicamente. En cambio, los biosensores contienen moléculas de naturaleza biológica, tales como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores o células como componentes activos del evento de detección [1].

1.2. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

En los últimos 50 años el campo de los (bio)sensores ha experimentado un crecimiento muy importante en diversas áreas, desde la Química clínica a la bioseguridad, pasando por la Química medioambiental, la Química forense, la Química de los alimentos, la Química Farmacéutica y la Química toxicológica [2]. En este crecimiento, la química Bioelectroanalítica ha tenido un rol preponderante contribuyendo al diseño y preparación de nuevas plataformas (bio)sensoras altamente sensibles, reproducibles, robustas, miniaturizables, portables y capaces de cuantificar de forma rápida y selectiva diversos analitos [3]. Esto ha requerido de estrategias novedosas y multidisciplinarias, centradas en el desarrollo de nuevos materiales con características estructurales y propiedades electroanalíticas aptas para la preparación de transductores eficientes, así como de una inmovilización robusta y efectiva de biomoléculas sobre las superficies de dichos transductores [4].

Dentro de los biosensores, los electroquímicos representan una alternativa muy interesante debido a su relativo bajo costo, su capacidad de miniaturización y portabilidad y su versatilidad [5,6]. Con el advenimiento de la nanotecnología y más recientemente la nanotecnología y la nanomedicina, el campo de los biosensores recibió un importante impulso debido a las propiedades únicas de los nanomateriales asociadas fundamentalmente con sus dimensiones y estructura, sus características electrónicas y catalíticas y sus múltiples posibilidades de funcionalización [7,8]. En este contexto, entre los nanomateriales más extensamente empleados se encuentran los nanotubos de carbono (CNT) y el grafeno [8]. El desarrollo de múltiples estrategias y metodologías analíticas de cuantificación empleando nanoestructuras, les confirió selectividad y propiedades de reconocimientos específicas mediante el empleo de polímeros, proteínas, péptidos y enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos y aptámeros, entre otros [9].

La detección y cuantificación de biomarcadores reviste gran importancia en el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de diversas enfermedades, ya sean proteicos, cuya concentración aumenta en el torrente sanguíneo en el caso de algunas patologías, o genes con mutaciones puntuales asociadas con cáncer [10].

La preparación de sensores electroquímicos y biosensores basados en nanomateriales ha recibido una creciente atención en los últimos años, debido a sus excepcionales propiedades físicas y químicas [11]. En particular los CNT han demostrado tener un papel

relevante en el campo de los (bio)sensores electroquímicos debido a su estructura única, alta estabilidad térmica y química, y excelentes propiedades electrónicas.

La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un elemento transductor.

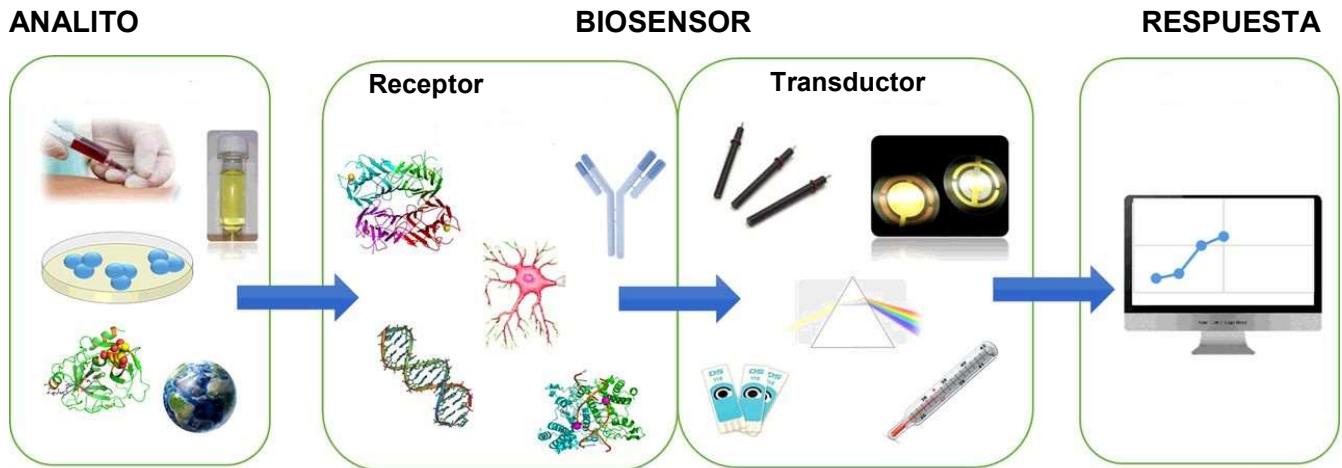


Figura 1.1 Esquema generalizado de un biosensor

Tal como se observa en la figura 1.1. El sistema de reconocimiento biológico debe inmovilizarse o retenerse sobre la superficie del transductor. En estas condiciones, la ventaja de la alta selectividad de estos sistemas se combina con la transducción directa a una señal fácilmente medible, hecho que permite detectar cambios de manera más sensible en la interfase transductor-receptor [12].

El reconocimiento de moléculas o grupos de moléculas constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos. De este modo, la naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas o estructuras biomoleculares capaces de reconocer con una gran selectividad alguna propiedad particular de una determinada especie entre un conjunto de ellas. Este fenómeno de reconocimiento selectivo de moléculas puede ser aprovechado con fines analíticos para el diseño y preparación de sensores de dichas especies. El transductor debe permitir la conversión de la reacción bioquímica que se produce entre el analito y el elemento de reconocimiento biológico en una respuesta que posteriormente es amplificada, procesada y convertida a la forma deseada, y que está relacionada con la concentración de la especie de interés. El transductor, por tanto, determina la eficacia en el procesamiento de la señal del biosensor, mientras que su selectividad viene principalmente

definida por la interacción del analito con el componente biológico. Idealmente, un biosensor debe responder continua y reversiblemente al analito de interés sin alterar la muestra, eliminando de este modo la necesidad de su pretratamiento de dicha muestra [12].

1.2.1 Clasificación de los biosensores

Los biosensores se pueden clasificar considerando distintos criterios, tanto del componente biológico, como del transductor. En general, existen dos tipos de clasificaciones: una en función de la naturaleza de la interacción del componente biológico con su sustrato, distinguiendo entre biosensores catalíticos y biosensores de afinidad; y otra en función del tipo de sistema de transducción, que engloba a los biosensores en cuatro grandes grupos: electroquímicos, ópticos, acústicos, térmicos, entre otros [13].

1.2.1.A Clasificación en función del componente biológico

Atendiendo a la naturaleza del proceso de reconocimiento biológico, se distinguen dos grupos: los biosensores catalíticos, cuyos sistemas biológicos pueden ser enzimas, tejidos o microorganismos, y los biosensores de afinidad entre los cuales se encuentran los inmunosensores, genosensores, magnetoinmunosensores.

Biosensores Catalíticos: el mecanismo de reconocimiento se basa en la unión y posterior reacción catalítica del sustrato específico de cada componente biológico. El seguimiento de la reacción se puede realizar mediante la detección de la formación de uno de los productos o de la desaparición de uno de los reactivos de inicio. Dentro de esta categoría se encuentran los biosensores enzimáticos y los celulares, siendo las enzimas el componente biológico más ampliamente utilizado para el desarrollo de biosensores catalíticos [14].

Las enzimas son biocatalizadores que se caracterizan por su elevada selectividad, siendo muy específica, tanto para el tipo de reacción que catalizan, como para el sustrato involucrado en dicha reacción. Entre las enzimas empleadas con mayor frecuencia se encuentran la glucosa oxidasa (GOx), lactato oxidasa (LOx), colesterol oxidasa (ChOx) y acetilcolinesterasa (AChE), las cuales han sido utilizadas para la fabricación de biosensores para la determinación de

glucosa, lactato, colesterol y acetilcolina, respectivamente, en análisis clínicos y alimentarios [15].

Biosensores de afinidad: se basan en la unión específica del analito al elemento de reconocimiento biológico mediante interacciones de afinidad, además, dicha unión permite la separación selectiva de determinados componentes de muestras complejas de biomoléculas. El seguimiento de las interacciones de afinidad se lleva a cabo a través de la medida de los cambios en las propiedades ópticas o eléctricas asociados a dichos interacciones. Este grupo está formado por los inmunosensores, cuyo componente biológico son los anticuerpos y están basados en las interacciones antígeno-anticuerpo, los genesensores, constituidos por secuencias de ADN o ARN y basados en su interacción con secuencias complementarias o moléculas que interactúan selectivamente con ADN de doble hebra; los aptasensores basados en el uso de aptámeros como elemento de biorreconocimiento y los glicobiosensores en los que se emplean lectinas como elemento de reconocimiento biomolecular [15].

1.2.1.B Clasificación en función del componente transductor

En la tabla 1 se resumen los tipos de transducción que pueden utilizar los sensores químicos y biosensores [15].

CATEGORÍA	TIPOS DE TRANSDUCCIÓN
ELECTROQUÍMICOS	Amperométrico
	Potenciométrico
	Conductimétrico
	Impedimétrico
ÓPTICOS	Absorbancia
	Quimioluminiscencia
	Fluorescencia
	Fibras ópticas
	Infrarrojo
	Raman

ACÚSTICO	Ondas acústicas de superficie Onda acústica plana Onda acústica curvada Onda acústica transversa
TÉRMICOS	Adiabático Conducción de calor
OTROS	Biomagnético Microscopía de barrido electrónico Sistemas de separación/ detección Luz medida potenciométricamente

Tabla 1. Modos de transducción de sensores electroquímicos.

A continuación, se hará una descripción de los tipos de transducción

- **Sensores ópticos:** Miden cambios de las propiedades ópticas tales como la absorbancia, reflectancia, quimioluminiscencia, fluorescencia, índice de refracción o dispersión de la luz.
- **Sensores electroquímicos:** Miden magnitudes eléctricas, pueden clasificarse a su vez en sensores potenciométricos, cuando la propiedad física que mide es el potencial, sensores amperométricos mide la intensidad de corriente, sensores impedimétricos donde se mide la resistencia de transferencia de carga o la capacidad y los sensores voltamperométricos, donde se mide la corriente de pico de oxidación o reducción.
- **Sensores másicos:** Generan una señal debido a un cambio de masa detectado por un material piezoeléctrico de soporte causado por acumulación selectiva de analito sobre éste.
- **Sensores térmicos:** Se mide el cambio de temperatura sobre la superficie del sensor debido a intercambios de calor producidos por reacciones donde interviene el analito.
- **Sensores magnéticos:** Se basan en el cambio de las propiedades paramagnéticas de las especies implicadas en la reacción de reconocimiento.

Actualmente los biosensores electroquímicos son los más utilizados. Este hecho se debe a una serie de ventajas [16]:

- La naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas hace que sea posible analizar fácilmente volúmenes pequeños de muestra. Esto hace que los biosensores electroquímicos sean especialmente adecuados para el análisis “in vivo”.
- La señal obtenida es eléctrica, y por tanto es viable la transducción directa de la velocidad de la reacción en la señal de lectura.
- Los límites de detección que se obtienen, son adecuados para la determinación de numerosos analitos de interés.
- La relativa simplicidad y el bajo costo de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

Dentro de los biosensores electroquímicos, los de mayor interés son los biosensores amperométricos, los cuales registran corrientes farádicas resultantes del intercambio electrónico entre el sistema de reconocimiento biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante apropiado. La corriente resultante se correlaciona con la concentración de la sustancia electroactiva o su relación dentro de la capa biocatalítica adyacente [16].

1.3 BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

Entre los biosensores catalíticos, los enzimáticos son lo más intensamente estudiados y comercialmente disponible para numerosas aplicaciones analíticas. Estas aplicaciones involucran enzimas que catalizan reacciones redox, donde la velocidad es proporcional a la concentración del analito. Generalmente, el curso de la reacción es seguido midiendo la velocidad de formación de los productos o desaparición de los reactantes. Si el producto o el reactante son electroactivos puede analizarse directamente su concentración. Muchas veces no es fácil medir el progreso de la reacción a través de reactantes o productos, en esos casos sigue la reacción de manera indirecta utilizando mediadores rédox o cofactores de las enzimas involucradas. Un ejemplo es la medición del consumo de oxígeno durante la reacción catalizada por enzimas oxidasas, o la aparición de peróxido de hidrógeno (se verá más adelante). Muchas otras enzimas utilizan al NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido oxidado) como cofactor, por lo que es necesario agregarlo y seguir su consumo, para luego relacionarlo con la concentración del analito presente en la muestra.

Los objetivos de incorporar una enzima a un sensor son varios, entre ellos se puede mencionar [15]:

- Conversión de un determinado analito, a través de una secuencia de reacciones, a una forma tal que pueda ser detectado electroquímicamente.
- Inactivación de los interferentes presentes en la muestra, ya sea electroquímicamente o enzimáticamente.
- Reciclado de los reactantes para mejorar la respuesta enzimática.

De acuerdo con la señal analítica empleada para realizar la determinación del analito de interés, los biosensores se dividen en [16].

- a) Biosensores de primera generación: se mide algún compuesto involucrado directamente en la reacción: sustrato/s, producto/s o el cofactor.
- b) Biosensores de segunda generación: se centra en la utilización de un mediador redox, distinto del oxígeno, que actúa como regenerador de la enzima. Así luego de reoxidar a la enzima el mediador se reduce, determinándose su reoxidación en la superficie del electrodo.
- c) Biosensores de tercera generación: consisten en la determinación del analito a través de la transferencia de carga directa desde el centro activo de la enzima al electrodo. Ésta no es una situación común, ya que es sumamente difícil lograr la transferencia de electrones desde la proteína al electrodo.

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas en los seres vivos. En estas reacciones enzimáticas, la molécula transformada se denomina sustrato y normalmente implica el uso de otro reactivo llamado cofactor para poder generar los correspondientes productos, previa formación del complejo enzima-sustrato.

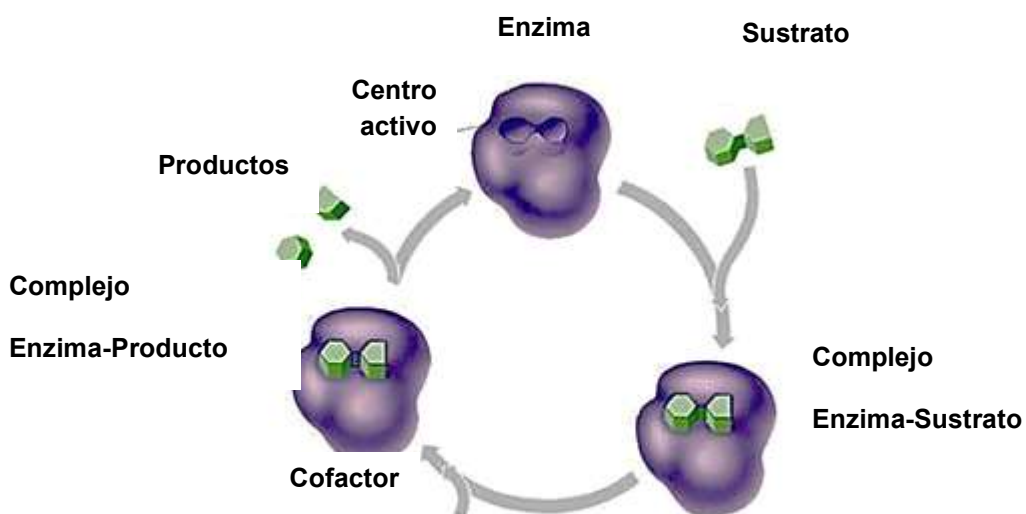


Figura 1.2. Esquema del funcionamiento de un sistema enzima-sustrato.

Alguna o todas las especies mencionadas pueden ser detectadas por medios fisicoquímicos como espectrométricos, electroanalíticos y cromatográficos proporcionando señales que, convenientemente procesadas, suministran la información requerida del analito. La reacción catalítica enzimática es eficiente y extremadamente selectiva, combinándose así los factores de reconocimiento particular y de amplificación, necesarios para la mayoría de las aplicaciones analíticas de estos sensores. Además, el carácter catalítico hace que, en su reacción con el sustrato, las enzimas se regeneren a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor [16].

1.4. MECANISMOS DE CATÁLISIS

En las reacciones catalíticas como en las que participan las enzimas, se forman intermediarios de reacción que poseen menor energía libre que la que tendrían si no estuviera presente el catalizador.

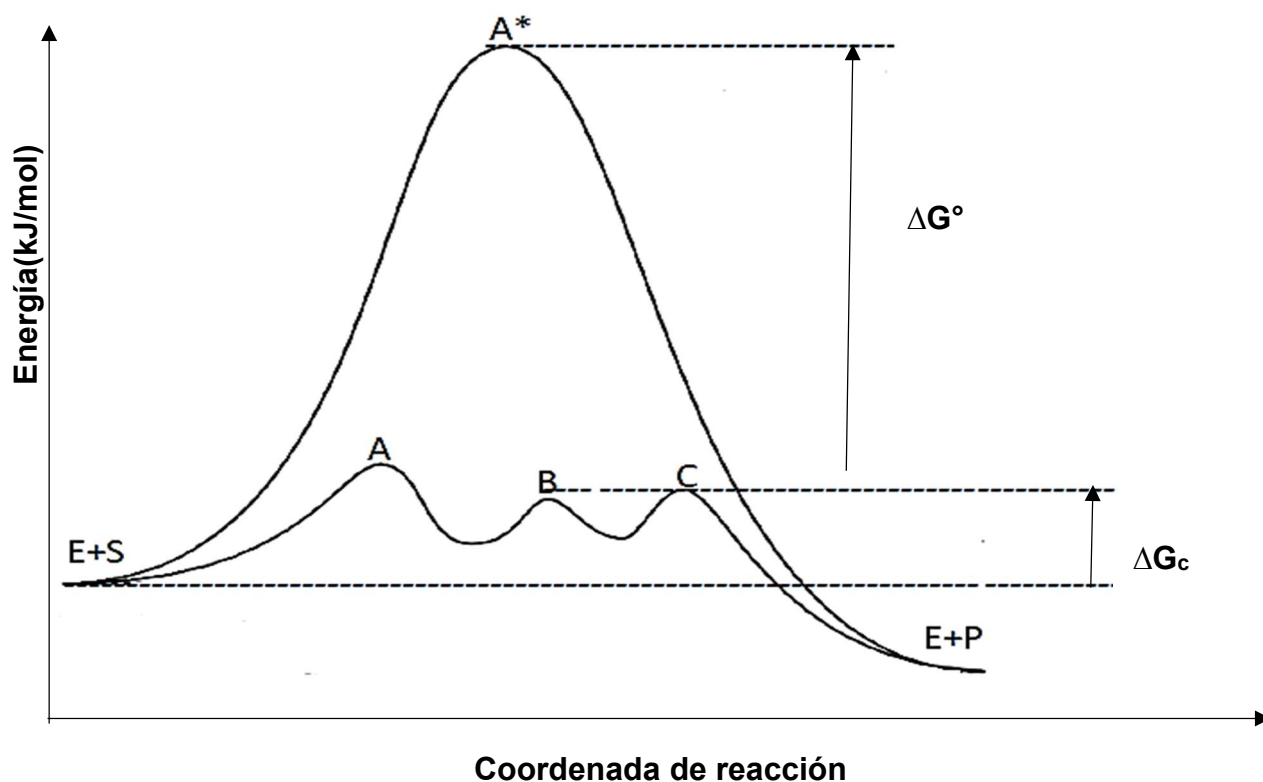


Figura 1.3. Diagrama esquemático que muestra los perfiles de energía libre durante el transcurso de la reacción catalizada por una enzima. A, B, C y representan los estados de transición en presencia de la enzima y A* el de la reacción en ausencia de la misma. ΔG_c = energía de activación en presencia de la enzima y ΔG° = energía de activación en ausencia de la enzima.

La reacción catalizada por la enzima transcurre a través de los estados de transición A, B y C (ver figura 1.3) y con una energía de activación ΔG_c , mientras que la reacción sin catalizador posee un ΔG° pasando por un estado de transición A*. En este ejemplo, la etapa que limita la velocidad de la reacción es la conversión del complejo enzima/sustrato en enzima/productos. Las reacciones que involucran varios sustratos y productos, o más intermediarios, son aún más complejas [15].

1.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA: MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS-MENTEN

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima. La velocidad de una reacción catalizada por una enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificarla o aislar la enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, fuerza iónica y presencia de cofactores, y se utilizan concentraciones saturadas de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (v_{max}). La cual puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos.

Para determinar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración de sustrato ($[S]$) en la velocidad inicial de la reacción (v_o), manteniendo la cantidad de enzima constante. Si se representa v_o en función de $[S]$ se obtiene una gráfica como la que se muestra en la figura 1.4. Cuando $[S]$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas $[S]$, la enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]$. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima (v_{max}).

Los estudios sistemáticos del efecto de la concentración inicial del sustrato sobre la actividad enzimática comenzaron a realizarse a finales del siglo XIX. Ya en 1882 se introdujo el concepto del complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis enzimática. En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron esta teoría y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de las enzimas [15].

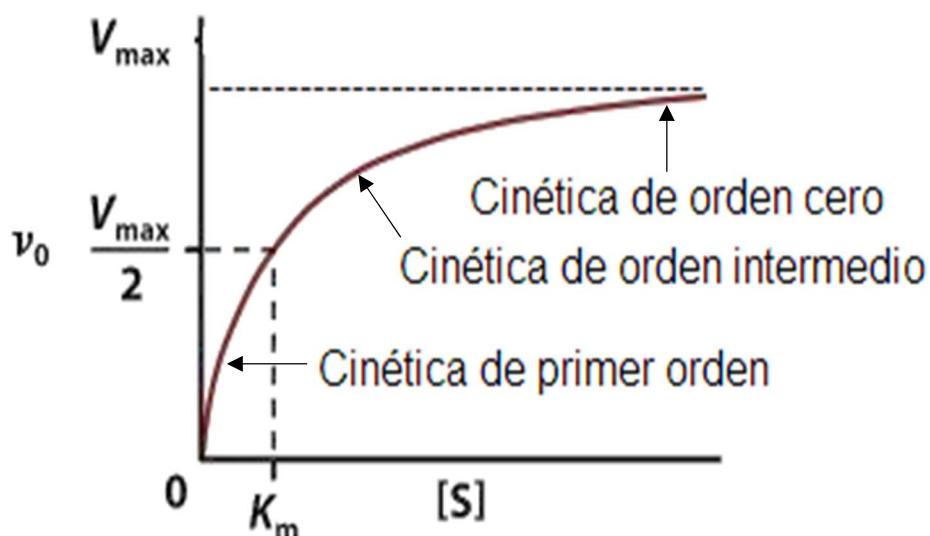
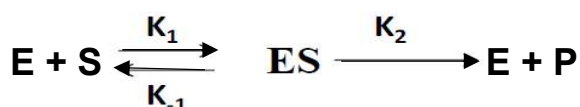


Figura 1.4. Perfil de la velocidad de reacción para enzimas con comportamiento Michaelis a una determinada concentración de enzima constante, donde v_{\max} corresponde al valor de velocidad máxima de la reacción y K_m es la constante de Michaelis –Menten.

Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración inicial de sustrato ($[S]$), Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas: en la primera etapa se forma el complejo enzima-sustrato y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto, liberando la enzima libre:



k_1 y k_{-1} son las constantes de formación del complejo ES y su inversa respectivamente, y la k_2 la de formación del producto. Mediante tratamientos matemáticos aplicando la hipótesis del estado estacionario, se obtiene la siguiente ecuación donde encontramos una relación directa entre la velocidad de formación del producto y la concentración de sustrato y enzima en solución:

$$v = \frac{k_2[E][S]}{K_M + [S]} \quad 1)$$

Donde K_M es la constante de Michaelis- Menten y se define como:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad 2)$$

Si se tiene en cuenta que la velocidad máxima (V_{max}) es igual $V_{max} = K_2[E]$, la ecuación 1 se puede expresar como:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad 3)$$

Donde V_{max} es la velocidad máxima de la reacción y K_M es la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima.

1.6. CINÉTICA DE MECANISMOS DONDE INTERVIENEN DOS SUSTRATOS

El mecanismo más simple para un sustrato es sólo aplicable en algunos sensores biocatalíticos. Hay, por lo tanto, otros mecanismos importantes particularmente cuando se utilizan enzimas oxidasas. El mecanismo propuesto para explicar la actividad de estas enzimas es el siguiente:



Este tipo de mecanismos es llamado “ping pong” y es solo una de las formas en que puede reaccionar una enzima con dos sustratos. Por ejemplo, para la enzima glucosa oxidasa:



Este mecanismo puede ser tratado utilizando las mismas aproximaciones que para un mecanismo simple, pero la ecuación básica de Michaelis Menten toma una forma diferente:

$$V = \frac{V_{max}[S_1][S_2]}{K_{MS_2}[S_1] + K_{MS_1}[S_2] + [S_1][S_2]} \quad 4)$$

Los K_M , en esta ecuación generalizadas, están compuestos por los K_M individuales de las diferentes reacciones que componen el mecanismo. Debido al gran interés en este tipo de catálisis para su aplicación en biosensores es que han sido publicados numerosos modelados de la respuesta, especialmente aplicados a biosensores electroquímicos [16].

1.7. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

Cuando se trabaja con enzimas, su actividad enzimática puede controlarse normalmente por el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la presencia de cofactores, de manera que pueden optimizarse estos factores con el fin de mejorar la cinética de las reacciones químicas catalizadas.

Aunque el tiempo de vida para un biosensor enzimático es una de sus mayores limitaciones, ya que su estabilidad suele ser baja, también puede aumentarse utilizando distintas técnicas como la estabilización química o mejorando los métodos de inmovilización.

Existen muchos tipos de enzimas, siendo las oxidorreductasas las más empleadas en el campo de los biosensores electroquímicos. Éstas catalizan reacciones enzimáticas en las que ocurren procesos de oxidación o reducción y necesitan de oxígeno u otros cofactores. Existen enzimas poco estables o difíciles de purificar y en estos casos, la estrategia que se lleva cabo es el uso de organelos celulares, células completas o tejidos que contengan las enzimas en su medio natural de forma más estable.

Así podemos resumir las ventajas del uso de enzimas en los siguientes puntos:

- Las enzimas presentan una elevada selectividad y sensibilidad
- Hay una variedad de enzimas disponibles
- Son autoregenerables
- Posibilidad de diseñar un biosensor enzimático de fácil manejo y control

1.8. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BIOMOLÉCULAS UTILIZADAS

1.8.1. Glucosa oxidasa (GOx)

Glucosa oxidasa es una oxidorreductasa y una glicoproteína que contiene un 16 % de azúcares neutros y un 2 % de aminoazúcares. Su estructura, mostrada en la figura 1.5, consta de dos dímeros idénticos que se encuentran unidos mediante enlaces disulfuro y presenta ciertas variaciones dependiendo de la fuente de la enzima [17,18]. La GOx obtenida del hongo *Aspergillus Níger* consiste en 2 subunidades idénticas con masa molecular de 80 kDa. Cada uno de los dímeros contiene el cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD), que actúa como aceptor de hidrógeno.

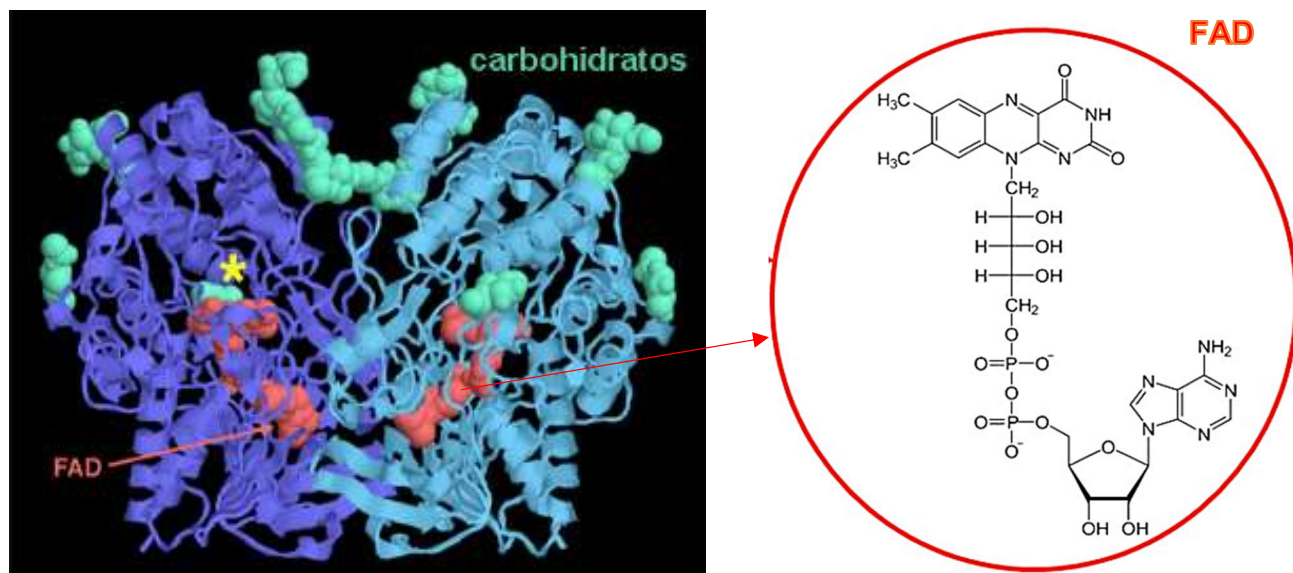
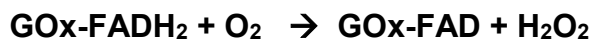


Figura 1.5. Estructura secundaria de GOx de *Aspergillus niger*. En verde claro se muestran las cadenas glicosídicas o glucosídico (es el enlace para unir monosacáridos con el fin de formar disacáridos o polisacáridos) y en rosa, los cofactores FAD

GOx cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona, la cual se hidroliza no enzimáticamente convirtiéndose en ácido glucónico, mientras que el cofactor FAD acepta los dos protones generados en la oxidación de la glucosa [19]. La regeneración de la enzima tiene lugar por acción de su mediador natural O_2 , el cual reoxida al cofactor enzimático, reduciéndose a H_2O_2 . En la figura 1.6 se muestra el mecanismo de reacción de la oxidación de glucosa. Debido a la importancia de la determinación de glucosa y a la estabilidad de la oxidasa que cataliza su oxidación, el mayor número de biosensores desarrollados, dentro de los electrodos enzimáticos, corresponde sin lugar a dudas a los que se basan en la inmovilización de glucosa oxidasa.



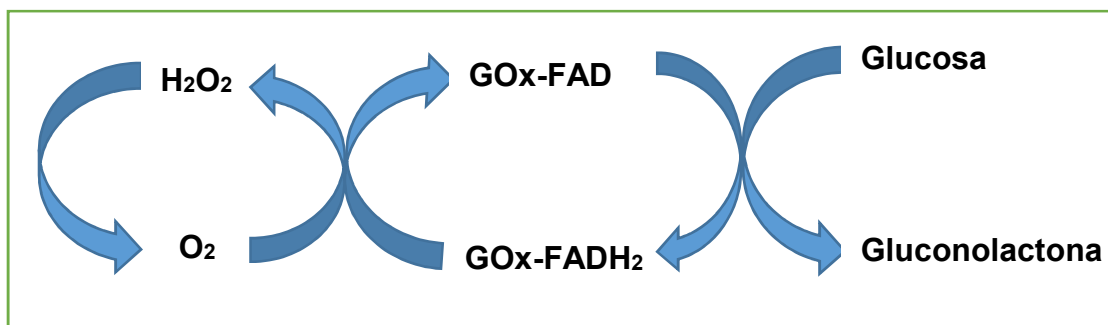


Figura 1.6. Representación esquemática de las reacciones que se generan durante la oxidación de glucosa a partir del peróxido de hidrógeno.

En los biosensores basados en GOx, la regeneración del cofactor FAD es vital para el ciclo catalítico, de lo contrario, la enzima actúa una vez y el ciclo enzimático se interrumpe. Esto se logra utilizando un aceptor de electrones, siendo el más habitual el mediador natural de la enzima O_2 . Existen otras alternativas de regeneración del cofactor, las cuales involucran la utilización de mediadores redox artificiales como los derivados del ferroceno [20].

La determinación electroquímica de peróxido de hidrógeno presenta el inconveniente que se requieren elevados sobrepotenciales para lograr su oxidación sobre electrodos de carbono que son los más empleados con ese fin. Por esta razón, se estudian nuevos materiales para la modificación de electrodos que permita disminución de dichos sobrepotenciales, tal que se elimine o disminuya la interferencia de compuestos fácilmente oxidables como ácido ascórbico y ácido úrico.

1.8.2. Concanavalina A

La concanavalina A (Con A) es una proteína globular de origen vegetal, que se obtiene a partir del frijol **Canavalia ensiformis**, cuyo contenido varía entre 1 y 3 % en peso. Debido a sus propiedades bioquímicas, la Con A fue clasificada por Sumner y Howell en 1936 como una lectina (proteína de unión a carbohidratos) [21]. Está formada por cuatro subunidades iguales lectinas, es decir, la concanavalina A es un homotetrámero, al igual que la mayoría de lectinas. No se deben confundir con las glicoproteínas: las lectinas reconocen carbohidratos, mientras que las glicoproteínas están formadas en parte por ellos. Tampoco deben confundirse con las lecitinas que son moléculas de lípidos con la que no guardan ninguna relación [20].

El papel principal de la Con A está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular. Cada subunidad lleva unidos átomos metálicos, generalmente magnesio y calcio.

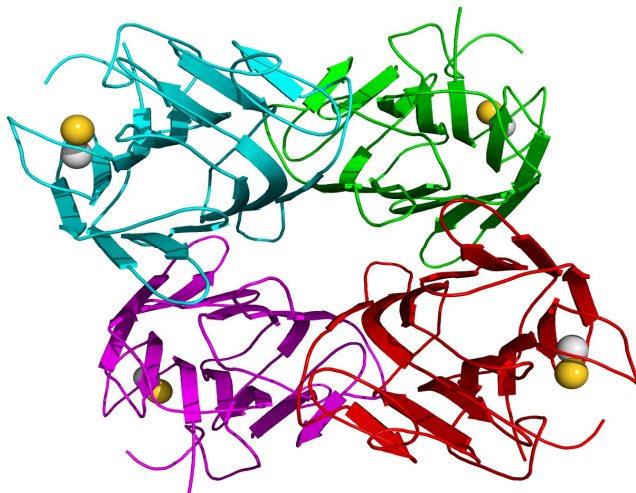


Figura 1.7. Estructura de un tetrámero de Concanavalina A (los monómeros se representan de color rojo, morado, verde y azul respectivamente). Los cationes de calcio (oro) y manganeso de color (gris) se representan como esferas.

La Con A tiene especificidad por α -D-piranosas como la D-glucosa y la D-manosa, que tiene grupos hidroxilos en la misma disposición espacial en C-3, C-4 y C-6 que pueden estar presentes en hidratos de carbono, glicoproteínas y glucolípidos. La molécula de Con A cuenta con cuatro sitios de unión, uno en cada subunidad [21].

La Con A fue la primera lectina disponible comercialmente y es muy utilizada en biología y bioquímica, por ejemplo, se utiliza en la caracterización de glicoproteínas y otras entidades que contienen azúcar en la superficie de varias células. También se usa para purificar macromoléculas glicosiladas en cromatografía de afinidad de lectina, así como para estudiar la regulación inmune de varias células inmunitarias.

Estructura y propiedades

Como la mayoría de las lectinas, Con A es un homotetrámero cada cadena de la subunidad de 235 aminoácidos y 26.5 KDa, cada eritromonómero tiene un lugar de unión a carbohidratos y dos lugares de unión para iones metálicos, típicamente Mn^{2+} y un Ca^{2+} y se necesita al menos uno de los dos cationes divalentes para que se produzca la unión con los carbohidratos[22]. Tiene simetría D_2 . En condiciones fisiológicas la Con A es un tetrámero, de

lo contrario, un dímero, como se muestra en la figura 1.8. Se une selectivamente a las glicoproteínas de la superficie celular que contienen residuos de α -manopiranosil y α -glucopiranosil (dos hexosas que difieren solo por el alcohol en el carbono 2) en la posición terminal de las estructuras ramificadas de glucanos (son un tipo de polisacáridos formados específicamente por unidades monómeras del monosacárido D-glucosa). Cuenta con 4 sitios de unión, correspondientes a las 4 subunidades. El peso molecular es 104-112 KDa y el punto isoeléctrico (pI) está en el rango de 4.5 - 5.5 [23].

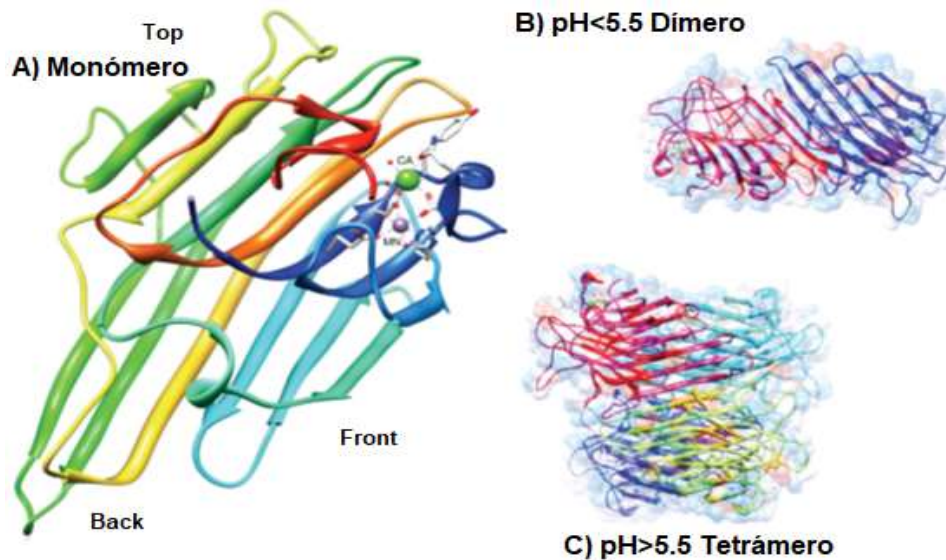


Figura 1.8. Estructuras moleculares de Con A. (A) Las estructuras primarias y secundarias de ConA; (B) La estructura tridimensional de cristal de ConA; (C) Estructura cuaternaria de la ConA

Estas propiedades lo hacen adecuado para una amplia gama biológica y aplicaciones biomédicas. La Con A es el miembro más estudiado de la familia de las lectinas. Se ha descubierto que esas proteínas ejercen profundos efectos en las células de los mamíferos, incluido el inicio de la aglutinación celular, la mitogénesis y la apoptosis [24].

Actividad biológica

La Con A se aisló por primera vez de Jack Bean por Sumner (1919), y posteriormente se demostró que aglutinaba eritrocitos (Sumner y Howell, 1935) y precipitaba diversos polisacáridos. La concanavalina A interactúa con diversos receptores que contienen hidratos de carbono de manosa, marcadores del grupo sanguíneo, receptores de insulina [24]. Las

inmunoglobulinas y el antígeno carcino-embriionario (CEA). También interactúan con las lipoproteínas.

Con A ha demostrado ser útil en aplicaciones que requieren la inmovilización en fase sólida de glicoenzimas, especialmente aquellas que han demostrado ser difíciles de inmovilizar mediante el acoplamiento covalente tradicional. Usando matrices de Con A-pareja, tales enzimas pueden inmovilizarse en grandes cantidades sin una pérdida concurrente de actividad o estabilidad. Dichos acoplamientos no covalentes de Con A-glicoenzima pueden revertirse con relativa facilidad mediante la competición con azúcares o a pH ácido. Si es necesario para ciertas aplicaciones, estos acoplamientos pueden convertirse en enlaces covalentes mediante manipulación química [24].

Concanavalina A, estudiada durante largo tiempo, hasta ahora ha generado una atención creciente por sus actividades antiproliferativas y antitumorales hacia diversos tipos de células cancerosas. Un informe de Taiwan (2009) demostró un potente efecto terapéutico de la ConA contra el hepatoma experimental (cáncer de hígado); en el estudio de Lei y Chang [24] se descubrió que la ConA estaba más secuestrada por las células tumorales hepáticas, en lugar de los hepatocitos normales circundantes. La internalización de Con A ocurre preferentemente a las mitocondrias después de la unión a las glicoproteínas de la membrana celular, lo que desencadena una muerte celular autofágica [24]. Estos hallazgos arrojan luz sobre nuevas perspectivas de la Concanavalina A como un potencial agente antineoplásico para la terapéutica del cáncer.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Objetivo general

Desarrollar una plataforma de biorreconocimiento multifuncional para la detección de diferentes eventos de bioafinidad a partir de la integración de transductores electroquímicos con materiales nanoestructurados funcionalizados y moléculas de biorreconocimiento, a fin de obtener biosensores para la cuantificación de marcadores de relevancia clínica.

Objetivos específicos

- Funcionalizar no covalentemente MWCNT con Concanavalina A aplicando ultrasonido de alta potencia
- Diseñar, construir y caracterizar estructuras jerárquicas para la obtención de (bio) sensores electroquímicos modelo, dirigidos a la cuantificación de (bio) marcadores de relevancia clínica empleando MWCNT funcionalizados.

CAPÍTULO 2
TÉCNICAS Y MATERIALES
EMPLEADOS

2.1. TÉCNICAS EMPLEADAS

Las técnicas electroquímicas están basadas en la medición de la corriente, el potencial o la carga, en relación con ciertos parámetros químicos de la especie en estudio. La utilización de estas mediciones con propósitos analíticos posee un amplio rango de aplicaciones que van desde el control ambiental y de la calidad industrial hasta los análisis biomédicos. En contraste con las mediciones químicas, las cuales involucran reacciones homogéneas en el seno de la solución, los procesos electroquímicos son heterogéneos y tienen lugar en la interfase electrodo/solución, donde la distribución de carga es diferente de la del seno de la solución y los procesos electródicos están afectados por la estructura de dicha región. Así, las diferencias entre las distintas técnicas electroanalíticas radican en el tipo de señal eléctrica utilizada para dar cuenta del proceso que está ocurriendo en esa interfase electrodo/solución [25].

En esta tesis se utilizaron técnicas electroquímicas de potencial controlado. Estas técnicas requieren del uso de un potenciostato para fijar el potencial y medir la corriente, y de una celda electroquímica, en el caso de este trabajo de tesis, de tres electrodos. De todas las técnicas instrumentales empleadas en la presente tesis, las técnicas electroquímicas son seguramente las más antiguas, conocidas, estudiadas y versátiles. En general son de fácil implementación y el instrumental asociado a las mismas es relativamente económico. Las principales técnicas electroquímicas son la potenciometría, la amperometría, la voltametría/polarografía, la coulombimetría y la conductimetría. Las técnicas electroquímicas que se discutirán en el siguiente capítulo son: Voltamperometría cíclica y Amperometría.

2.2. VOLTAMPEROMETRÍA CICLICA

En la voltamperometría cíclica (VC) se aplica sobre el sistema una variación lineal del potencial, a partir de un potencial inicial E_1 . En cada momento, el potencial aplicado, E , responde a la ecuación:

$$E = E_1 + vt \quad 5)$$

donde v es la velocidad de variación del potencial con el tiempo, dE/dt

En la Figura 2.1 se muestra la forma en la que puede variarse el potencial aplicado al electrodo de trabajo, en función del tiempo.

La voltamperometría engloba un grupo de técnica electroquímicas donde la información del analito en cuestión se logra mediante la medición de la intensidad de la corriente a medida

que se aplica una perturbación de potencial. Esta técnica es muy utilizada con el objetivo de realizar estudios fundamentales de procesos de oxidación y reducción en diversos medios, procesos de adsorción y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos modificados [25].

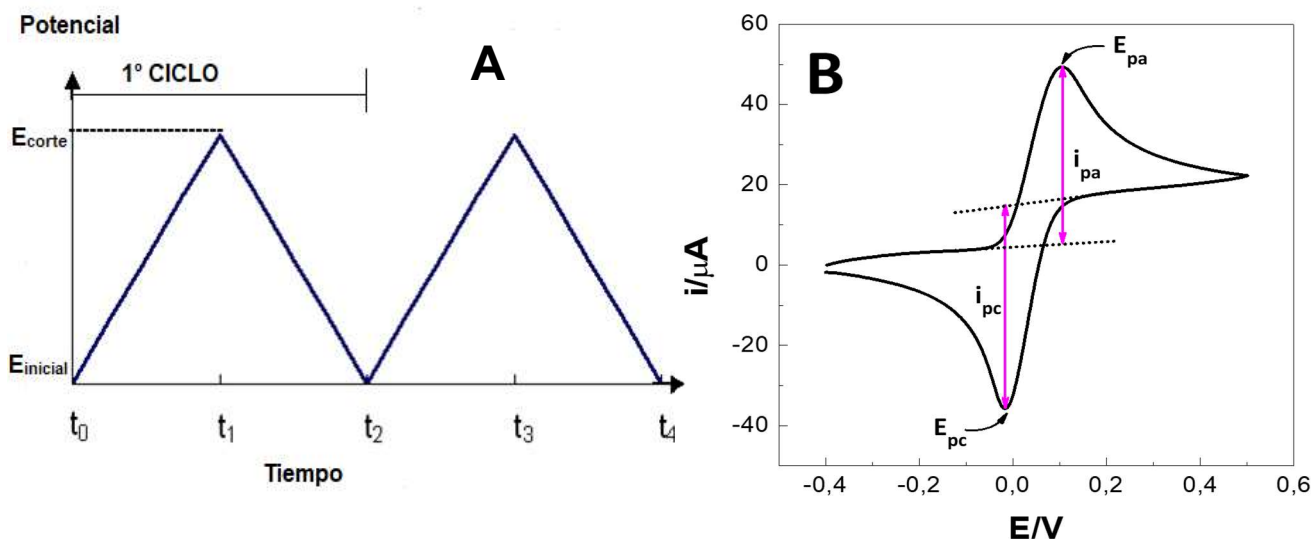


Figura 2.1: A) Señal de perturbación potencial-tiempo en experimentos de voltamperometría cíclica. B) Voltamperograma cíclico resultante.

El programa potencial-tiempo utilizado en VC se muestra esquemáticamente en la figura 2.1 A. El potencial del electrodo de trabajo es variado linealmente (a una velocidad constante v) desde un valor inicial, E_i , hasta un valor conocido como potencial de corte, E_λ , donde la dirección de barrido se invierte hasta el potencial final, E_f , que puede ser igual o distinto a E_i . Como respuesta a dicha perturbación se produce una corriente que se registra en función del potencial aplicado, dando lugar al voltamperograma cíclico para un proceso reversible (la reacción $R_{(ac)} \rightleftharpoons O_{(ac)} + n e^-$) mostrado en la figura 2.1 B. Dicha corriente, como lo muestra la ecuación 6, depende del gradiente de concentración de la especie electroactiva (C_R) sobre la superficie del electrodo, de su coeficiente de difusión D_R , del área electroactiva A y del número de electrones intercambiados n [25].

$$i(t) = n F A D_R \left[\frac{\partial C_R(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (6)$$

La concentración de la especie R en la superficie del electrodo dependerá del sobrepotencial aplicado, $E - E^0$, donde E^0 es el potencial de equilibrio. Para un sistema que contiene sólo la especie reducida R, si el barrido de potencial comienza a un E_i mucho menor que E^0 , no hay procesos de transferencia de carga y la corriente registrada es sólo debido al cargado de la doble capa (corriente capacitiva). Conforme E aumenta, R comienza a oxidarse provocando un aumento en el gradiente de concentración y un incremento en la corriente faradaica (ecuación 6). Cuando se alcanza el potencial de pico anódico (E_{pa}), el gradiente de concentración es máximo dado que la velocidad de oxidación es máxima. En estas condiciones la concentración de R disminuye a cero y se obtiene un valor de corriente máximo [25].

Para $E > E_{pa}$, sólo se formará O cuando R difunda de la solución, lo cual provoca un aumento del espesor de la capa de difusión (δ) con la consecuente disminución del gradiente y de la corriente. Luego de E_λ , cuando la dirección de barrido se invierte y se alcanza el potencial adecuado, ocurre el proceso inverso, donde ahora O se reduce a R y la extensión de este proceso dependerá de la reversibilidad de la reacción electroquímica.

En estos sistemas, donde la corriente se encuentra limitada por la difusión de la especie electroactiva se encuentra que la corriente de pico i_p (anódica o catódica) varía linealmente con $v^{1/2}$, según la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 7) [26].

$$i_p = -0,4463 \frac{(nF)^{\frac{3}{2}}}{(RT)^{\frac{1}{2}}} A C_R (D_R v)^{\frac{1}{2}} \quad 7)$$

A partir de los perfiles de VC pueden obtenerse diferentes parámetros que caracterizan al proceso redox que ocurre sobre el electrodo. Éstos son la corriente de pico anódica (i_{pa}) y catódica (i_{pc}), el potencial de pico anódico (E_{pa}) y el catódico (E_{pc}) y su diferencia (ΔE_p) [26]. Dichos parámetros se encuentran señalados en la figura 2.1.B.

Las relaciones entre las velocidades de transferencia de carga y masa determinan la reversibilidad electroquímica de los sistemas redox [27]. En procesos reversibles, la velocidad de la reacción electroquímica (dada por el valor de k_0) es más rápida que la transferencia de masa y las concentraciones de O y R siempre están determinadas por la ecuación de Nernst. Así, E_p no depende de v y $\Delta E_p = 0.059 \text{ V}/n$ (a 25°C). De la misma manera, se encuentra que para este tipo de procesos $i_{pa} / i_{pc} = 1$.

En un sistema con comportamiento irreversible, la velocidad de transferencia de masa es mayor a la de transferencia de carga. En estos sistemas, i_p es menor que el valor correspondiente a un sistema reversible, E_p depende de v , y no se observa pico catódico al invertir el barrido de potencial, entre otros criterios de diagnóstico [27].

Los sistemas cuyo comportamiento varía entre los extremos reversible e irreversible, según la velocidad de barrido empleada, se clasifican como cuasi-reversibles. En éstos, ΔE_p es mayor que 0,059 V y aumenta con v . El análisis de las curvas voltamperométricas también permite observar si existen procesos acoplados a los de oxidación y reducción, por ejemplo, procesos de adsorción o desorción de una especie electroquímicamente activa, o reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga [27].

2.3. AMPEROMETRÍA

La amperometría se basa en la medida de corriente bajo un voltaje constante aplicado y en estas condiciones es la concentración de analito la que determina la magnitud de la corriente [28]. La detección amperométrica directa es selectiva para analitos que pueden sufrir oxidación o reducción dentro de la ventana de potencial del electrodo, en otras palabras, compuestos electroactivos nativos. La selectividad de este método es ajustable, ya que el potencial aplicado se puede cambiar para discriminar contra analitos.

La amperometría consiste en aplicar un potencial al electrodo de trabajo desde un valor en el que no ocurre la reacción faradaica a un valor de potencial en el que la concentración de R es nula (para una reacción $R \leftrightarrow O + ne$).

$$i_{ee} = \frac{n F A C_R D_R}{\delta} \quad 8)$$

Una manera de mejorar el límite de detección es agitando la solución mediante convección controlada, la cual provoca que la capa de difusión (δ) no cambie con el tiempo [26]. El espesor de δ estará dado por la viscosidad de la solución y la velocidad de agitación. Así, el gradiente de concentración de R en $x = 0$ será constante, por lo que se alcanza una corriente de estado estacionario (i_{ee}), la cual es independiente de t (ecuación 8).

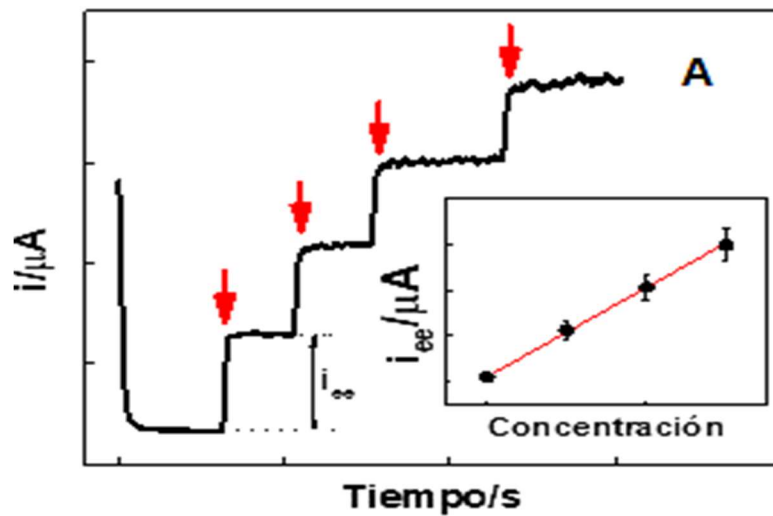


Figura 2.2. A. Registro amperométrico con convección forzada para sucesivos agregados de compuesto electroactivo, marcados con flechas rojas. Se muestra la curva de calibración correspondiente

El agregado del analito a la celda produce un aumento en la C_R en la superficie del electrodo y el consecuente incremento de i_{ee} , figura 2.2 B. La determinación de i_{ee} en función de t se conoce como registro amperométrico y permite conocer la concentración de analito en una solución problema y la sensibilidad con que el mismo es detectado en el electrodo [26], a partir de una curva de calibración como se muestra en el inserto de la figura 2.2 B.

2.4. INSTRUMENTACIÓN Y CELDAS ELECTROQUÍMICAS

En los experimentos electroquímicos se utilizó un sistema de 3 electrodos: uno de trabajo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3M (BAS, MR 1052 y MR 1208), y un alambre de Pt que sirvió como contraelectrodo o electrodo auxiliar. Los mismos se insertan en la celda electroquímica de vidrio (ver figura 2.3) a través de los orificios de la tapa de Teflón. La convección forzada en la amperometría se obtuvo mediante el empleo de una plancha de agitación y un agitador magnético en la celda.

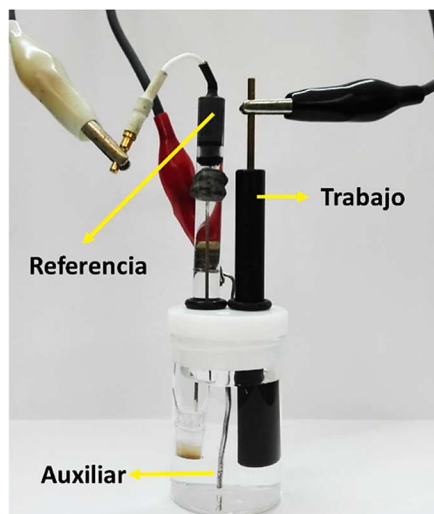


Figura 2.3. Celda electroquímica de trabajo con el sistema de 3 electrodos. La tapa de Teflón posee un orificio extra para la adición de un compuesto redox en las amperometrías.

Los componentes principales de una celda electroquímica de tres electrodos son los siguientes

- Electrodo de trabajo (WE, por sus siglas en inglés que significa Working electrode): Es el electrodo donde ocurre la reacción de interés. Debe ser de un material conductor, por ejemplo, mercurio, platino, oro y algunas formas de carbono como el vítreo.
- Electrodo de referencia (RE): un electrodo de referencia ideal, proporciona un potencial constante que no varía en el tiempo, lo que permite que el potencial del electrodo pueda ser medido. Existen varios electrodos de referencia y su elección depende del electrolito soporte utilizado.
- Electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE) es un electrodo no polarizable el cual está acoplado al electrodo de trabajo. Usualmente consiste en un alambre de platino u otro material inerte.

- d) Electrolito soporte: generalmente es un conductor iónico en disolución con una concentración molar mínima de 100 veces con respecto a la del analito, su principal función es proporcionar conductividad al medio y reducir el transporte por migración del analito para que difunda hacia la superficie del electrodo.
- e) Potenciostato: Es el instrumento con el que se aplica potencial al sistema para obtener una respuesta electroquímica

2.5. LIMPIEZA, PRETRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE TRABAJO DE CARBONO VÍTREO.

Los electrodos de carbono vítreo (GCE) son uno de los materiales de electrodo con mayor aplicación en electroquímica. El carbono vítreo se prepara sometiendo a diversos polímeros orgánicos (principalmente poliacrilonitrilo) a una serie de tratamientos térmicos a presión en atmósfera inerte hasta temperaturas cercanas a los 3000 °K. En estas condiciones los heteroátomos se evaporan hasta que sólo queda el carbono. El carbono vítreo es duro y altamente impermeable a gases y líquidos. Su estructura consiste en carbono sp^2 y posee regiones gráficas de no más de 100 Å entrelazadas entre sí a modo de cintas [27].

Desde el punto de vista electroquímico, el electrodo de carbón vítreo posee capacitancias del orden de los electrodos metálicos ($24 - 36 \mu F cm^{-2}$) y resistividades muy bajas en comparación a otros alótropos de carbono ($4,2 m\Omega cm$) [28]. Si bien la electroactividad de las superficies de GCE es altamente dependiente del proceso de síntesis del material y del pulido, el comportamiento electroquímico de pares redox de esfera interna suele ser entre reversible y cuasi-reversible ($k^0 = 0,005 - 0,45 cm s^{-1}$ para $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) [33].

En el presente trabajo de tesis se utilizaron GCE de 3 mm de diámetro. Para emplearlos como electrodos de trabajo es necesario realizar un acondicionamiento adecuado, ya que al estar en contacto con el aire se genera espontáneamente una película de óxido de grafito que provoca incrementos en la capacitancia [34]. De esta manera, la limpieza de estas superficies se realizó puliendo mecánicamente durante 1 minuto sobre papel esmeril #800 (Buehler). Luego, los electrodos se pulieron hasta “apariencia espejo” en suspensiones acuosas de alúmina 0,5 sucesivamente, sobre paño DP-Nap (Struers). Para remover las partículas de alúmina que quedan adsorbidas sobre la superficie, los GCE se lavaron con abundante agua MQ y se sonicaron durante 15 s.

2.6. ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN DE UN ELEMENTO DE BIORRECONOCIMIENTO

Uno de los pasos cruciales en la construcción de un biosensor es conseguir una buena inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. Los objetivos fundamentales de un buen proceso de inmovilización son:

- Permitir un íntimo contacto entre el elemento de reconocimiento biológico y el transductor, manteniendo inalterable, en la medida de lo posible, la estabilidad y la actividad de la biomolécula, evitando alteraciones conformacionales que pueda sufrir la misma en dicho proceso.
- Asegurar la orientación controlada de la biomolécula sobre superficie del electrodo.

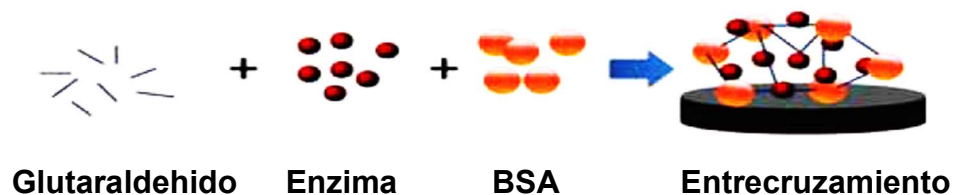
La fijación de este material en soportes sólidos es lo más habitual, ya que conlleva ventajas como el aumento de la sensibilidad de las medidas. Por ello cada vez más se desarrollan nuevos protocolos en los que se busca aumentar la estabilidad de la fijación. A continuación, se exponen las técnicas generales y más comunes de inmovilización en superficies sensoras.

- **Adsorción física:** Este protocolo se basa en la unión del material biológico mediante interacciones iónicas, fuerza de Van de Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc. Presentan ventajas como ser una técnica simple, de bajo coste y en que la actividad de las biomoléculas se mantiene prácticamente intactas. Sin embargo, es poco reproducible y estable, perdiendo sensibilidad con el uso por pérdida del material inmovilizado, además de su fácil alteración por cambios de pH, temperatura o fuerza iónica [29,30].

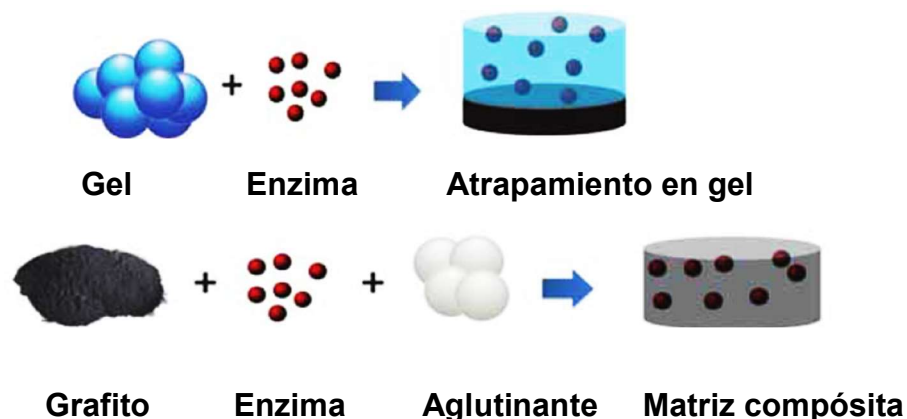


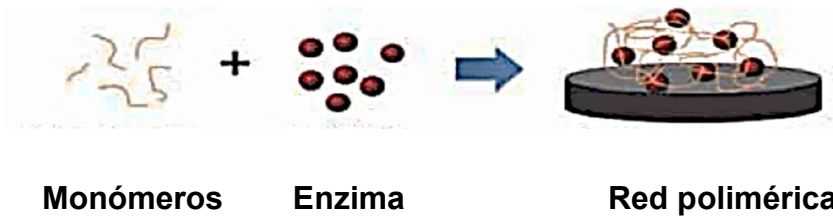
- **Entrecruzamiento:** Se consigue una mayor estabilidad que en el caso de la adsorción. Este método de inmovilización se basa en un atrapamiento físico del material biológico (generalmente enzimas) mediante la reacción con agente bifuncional como el glutaraldehido o diisocianato de hexametileno, entre otros [31].

Los dos grupos carbonilo terminales reaccionan con los grupos amino de las proteínas para dar agregados insolubles de elevada masa molecular, inmovilizando las biomoléculas por atrapamiento dentro de la matriz reticulada. Debido a que la actividad de las enzimas puede verse alterada en el proceso de entrecruzamiento, dado que el agente bifuncional puede enlazarse con sus centros activos, se reparte su efecto añadiendo proteínas no activas con las que reaccionar como albúmina de suero bovino (BSA). Aunque se puede controlar el grado entrecruzamiento variando la cantidad de agente bifuncional, las capas de membranas formadas en general presentan problemas en la difusión de los sustratos. Un inconveniente añadido es la toxicidad de los agentes bifuncionales empleados [32].

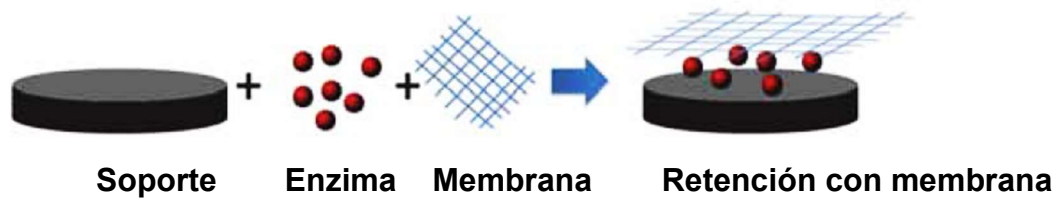


- Atrapamiento:** La inmovilización mediante atrapamiento se basa en la retención física o química de la biomolécula en el entramado de una matriz porosa, cuyos espacios intersticiales son lo suficientemente grandes como para permitir el paso de sustrato y productos, pero no permite el movimiento de la biomolécula [33]. Este método tiene la ventaja de preservar la actividad biológica del material que se retiene mediante atrapamiento físico en matrices de geles como agar, nylon, almidón, poliacrilamida, o en matrices electrónicas compósitas rígidas como el grafito-teflón o el grafito-resina epoxi. En el caso de los biosensores electroquímicos, la estrategia de atrapamiento de enzimas durante el proceso de electrodeposición de polímeros conductores electrónicos ha proporcionado excelentes resultados





- Retención con membranas:** Este método de inmovilización permite la retención de las biomoléculas utilizando membranas semipermeables al sustrato de porosidad variable. Se consigue así un buen contacto entre el material biológico y el transductor, se preservan sus propiedades, se minimiza la contaminación y la biodegradación, además de ser estable a los cambios de pH, temperatura, fuerza iónica y composición del medio. Algunos ejemplos son las membranas de acetato de celulosa que retienen las proteínas y retrasan la difusión de algunos iones interferentes, la de nafión que excluyen aniones.



- Unión Covalente:** Se basa en la formación de enlaces covalentes entre la superficie del sensor, previamente activada y los grupos funcionales de las proteínas (-NH₂, -COOH, -OH, -SH, -Ph-OH) que no estén directamente implicados en la acción catalítica o en la reacción de afinidad [34]. El mayor inconveniente de estos tipos de inmovilización es que en general, provocan una disminución de la actividad biológica, Sin embargo, en términos de estabilidad es una las técnicas de inmovilización con mejores resultados, obteniendo superficies modificadas biológicamente que forman parte de biosensores con largo tiempo de vida.



2.7. NANOTUBOS DE CARBONO EN EL MUNDO DE LOS BIOSENSORES

Desde 1985 que se llevara a cabo el descubrimiento del fullereno C_{60} por Curl, Kroto y Smalley [29], el estudio de las nanoestructuras derivadas del carbono se ha convertido en una de las áreas de investigación más destacadas en ciencia. La primera publicación sobre los nanotubos de carbono (CNT) en 1991 por Iijima [29] trajo a dicho nanomaterial al centro de la escena en la comunidad científica. Los nanotubos de carbono (CNT) son nanomateriales gráficos y forman parte de los alótopos de carbono (C) junto con el grafito, grafeno y fullerenos, entre otros (figura 2.6). Idealmente, su estructura consiste en una lámina de $C sp^2$ enrollada en forma de tubo con dos medios fullerenos en los extremos [35]. Los CNT poseen una elevada relación de aspecto dado que su diámetro se encuentra en las dimensiones nano (entre 0,7 y 40 nm), mientras que su largo es del orden de las micras [36].

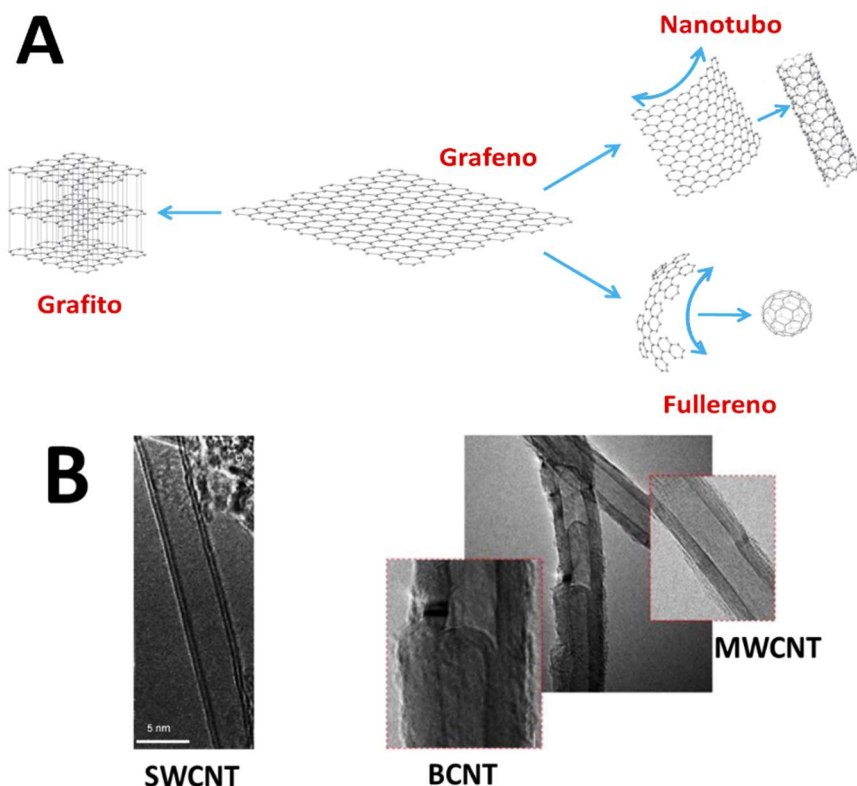


Figura 2.6 A Esquema de la estructura del grafito, grafeno y los alótopos derivados de éste, nanotubo y fullereno. B Imágenes TEM de CNT de pared simple (tomada de Ref. [4]) y de CNT de pared múltiple y tipo bamboo (tomada de Ref. [5]).

De acuerdo al número de láminas de grafito enrolladas se pueden clasificar en CNT de pared simple (SWCNT) o de pared múltiple (MWCNT), como se muestra en las imágenes TEM de la figura 2.6. B. Dependiendo de la densidad de defectos se puede distinguir entre CNT tipo

“hollow”, que presentan paredes laterales sin defectos; y CNT tipo “bamboo” (panel central inferior de la imagen TEM de la figura 2.6.B) caracterizado por tener defectos de borde transversales a intervalos regulares [38]. Las propiedades electrónicas de los CNT dependen fuertemente de su estructura: mientras los SWCNT pueden ser metálicos o semiconductores (dependiendo de la quiralidad con la que se enrolle la lámina de grafeno), los MWCNT son normalmente metálicos [37]. En el campo de la electroquímica, se ha reportado la aplicación de NTCs a la tecnología de baterías y supercondensadores y desde 1996 a los biosensores.

Hoy en día uno de los materiales orgánicos más utilizados en la fabricación de los biosensores son los nanotubos de carbono, dadas sus propiedades físico-químicas que los hacen muy sensibles, a su vez resistentes y buenos conductores eléctricos, adicional a esto es un material de baja toxicidad, por lo cual es muy utilizado en el campo de los biomateriales [38]. Los nanotubos de carbono se presentan como una opción interesante para la fabricación de sensores de pequeño tamaño, portátiles, rápidos y de bajo consumo. En muchos casos, se aprovecha la circunstancia de que las propiedades eléctricas de los nanotubos de carbono dependen fuertemente de su estructura atómica y electrónica y cualquier modificación de origen físico o químico que se produzca en ésta, provocará un cambio en dichas propiedades [38].

2.8. FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono como material para un electrodo tienen muchas ventajas, entre las cuales se incluyen buena conductividad eléctrica, amplio rango de potencial anódico y catódico, y además presentan una tasa de transferencia electrónica rápida y alta actividad electro-catalítica [38].

Entre sus ventajas para el electroanálisis, los nanotubos de carbono poseen gran área superficial (200–300 m² por gramo). Además, es posible modificarlos químicamente funcionalizando su superficie, metodología a partir de la cual se pueden construir electrodos modificados, sensores y biosensores. El proceso de modificación consiste en incorporar grupos funcionales o moléculas en la pared de los nanotubos. A través de este método, los nanotubos adquieren nuevas propiedades dependiendo de la cantidad y grupo funcional introducido en el nanotubo [39,40].

Más recientemente, la preparación de nanotubos de carbono funcionalizados ha recibido una considerable atención. Los procedimientos que se utilizan alteran la energía superficial de este material y de este modo mejoran su compatibilidad con el disolvente, reduciendo su tendencia a formar aglomerados. Además, la funcionalización permite incorporar distintas especies (polímeros, nanopartículas, biomoléculas) a la superficie de los nanotubos de carbono, bien enlazándolas covalentemente, o mediante interacción supramolecular [41,42].

Los métodos para la funcionalización de los nanotubos de carbono, están divididos en dos áreas generales, en covalentes y no covalentes [43].

- A. Modificación por enlace covalente: un grupo funcional está incorporado a la pared del nanotubo por un enlace covalente. [44-46].
- B. Modificación por adsorción a la pared del nanotubo: algunos compuestos se incorporan a los nanotubos por adsorción. [47,48]
- C. Métodos misceláneos de modificación: los nanotubos se incorporan en películas de polímeros

Actualmente, gracias a sus propiedades estructurales, los MWCNT se han empleado en áreas como: química [49], biología [50], energías renovables [51], ciencia de materiales, etc. Una desventaja es su baja compatibilidad con otras moléculas, es por esto que se recurre a la funcionalización o modificación de los MWCNT. Existen dos métodos diferentes para la modificación de MWCNT como son: la modificación covalente y no covalente [52].

La funcionalización no covalente de nanotubos de carbono constituye un método alternativo para la formación de complejos supramoleculares de gran estabilidad. Esto es debido a la simplicidad de los procedimientos y a que no afecta a la estructura de enlaces π conjugados de los nanotubos. Estos complejos se producen a través de interacciones $\pi - \pi$ o de tipo van der Waals entre el nanotubo y otras especies como derivados del pireno, tensioactivos, polímeros o ADN. Otro tipo de modificación no covalente es la funcionalización endoédrica. Los nanotubos de carbono, debido a su peculiar estructura, presentan una cavidad interna capaz de alojar diferentes especies como nanopartículas inorgánicas e incluso biomoléculas, lo cual es particularmente útil para integrar las propiedades de ambos componentes en un material híbrido con importantes aplicaciones analíticas [52].

La modificación se efectúa mediante energía de ultrasonido utilizando una sonda ultrasónica, para promover la buena dispersión de los MWCNT y generar distintos sitios activos en su superficie. Esta técnica tiene como ventaja que no produce daño adicional a las paredes de MWCNT, pero puede presentarse una baja cantidad de grupos modificantes en el material [53].

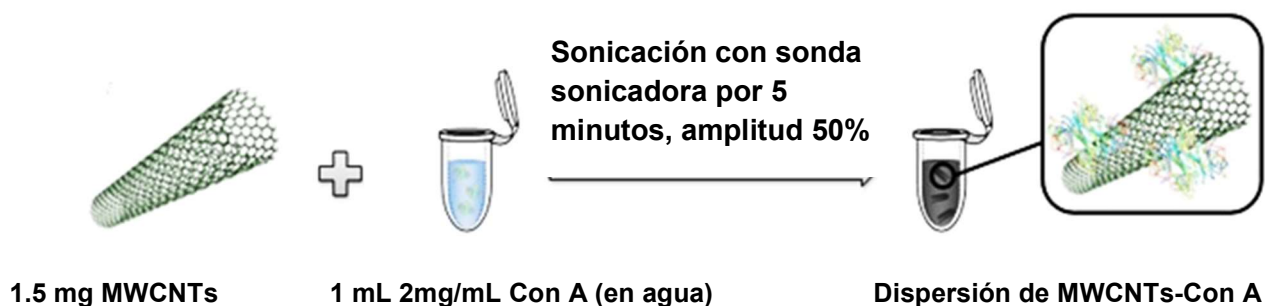
En el marco de este trabajo se plantea el diseño de una novedosa plataforma multifuncional basada en el empleo de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) funcionalizadas con concanavalina A a fin de desarrollar una plataforma multipropósito, que en este trabajo está dirigido a la construcción de un biosensor enzimático para glucosa.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. PREPARACIÓN DE LA DISPERSIÓN DE MWCNTS-CONCAVALINA A

1. La superficie de (GCE) se pulió con alúmina de 0.05 μm durante 1 minuto, luego se lavó cuidadosamente con agua ultra pura ($\rho = 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), obtenida con un sistema Millipore-MilliQ, se sonicó durante 30 segundos en agua mili Q, finalmente se seca bajo gas de N_2 .
2. Se mezclaron 1.5 mg de MWCNTs con 1,00 mL de una solución de concaivalina A de concentración a 2 .00 mg/mL.
3. Se sonicó durante 5 minutos con sonda ultrasónica. La amplitud utilizada fue del 50% y la muestra se mantuvo en un baño de hielo durante el tiempo de sonicación empleado.



3.2. PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR

1. **Se depositaron** 10 μL de la dispersión de MWCNTs/concaivalina A en agua sobre electrodo de trabajo y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente.
2. **Se colocaron** 20 μL de la solución de GOx 5 mg/mL sobre el electrodo de trabajo y se dejó interactuar durante 5 minutos, lavándose finalmente en buffer fosfato pH=7.4

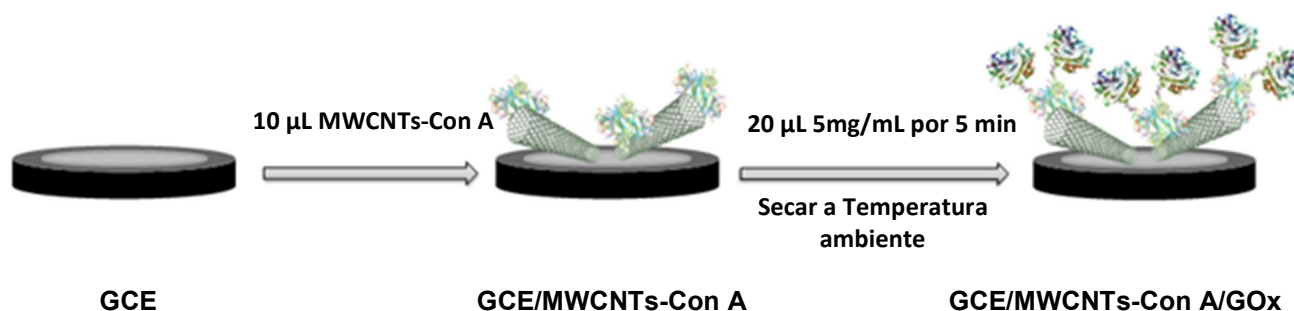


Figura 3.1 Representación esquemática de los pasos implicados en la preparación del biosensor GCE/MWCNT's-Con A/GOx.

3.3 REACTIVOS

Todos los reactivos usados en este estudio electroquímico fueron de grado analítico y no necesitaron de una purificación adicional.

- Peróxido de hidrógeno (30% v / v, solución acuosa) se adquirió de Baker.
- Glucosa oxidasa Sigma-Aldrich
- Nanotubos de carbono de pared múltiple de tipo hueco (MWCNT, diámetro (30±15) nm longitud 1-5 µm y pureza de 95%) NanoLab (USA).
- Agua ultrapura ($\rho = 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) de un sistema Millipore-MilliQ para preparar todas las soluciones.
- Hidroquinona ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) Sigma-Aldrich
- Ferroceno Metanol ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$)
- Azúcares como: Fructosa($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Galactosa($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Maltosa($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), Lactosa($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)
- Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)
- Ácido úrico($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$)

Todas las medidas electroquímicas se realizaron empleando solución buffer de fosfato (PB) 0.050M pH=7.40 como electrolito soporte.

3.4 APARATOS

Para la preparación de dispersiones se empleó un baño ultrasónico (TESLAB) VCX 130W (Sonics and Materials, Inc.) de 20 kHz de frecuencia con una micropunta de aleación de titanio (3 mm de diámetro) y un baño ultrasónico (TESTLAB, modelo TB04) de 40 kHz de frecuencia y 160 W de potencia nominal.

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo con un potencióstato Teq_04 conectado a una computadora personal provista del software Teq_04 para la adquisición de datos. Para La agitación por convección se empleó el equipo BAS C3 Cell Stand. Para la obtención de las medidas electroquímicas se utilizó un sistema convencional de tres electrodos con una celda BAS modelo M-1084 provista de una tapa de teflón perforada. Como electrodo auxiliar se empleó alambre de platino (Pt) y como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl, 3M NaCl, como electrodos de trabajo se utilizaron electrodos de carbono vítreo de 3mm de diámetro sin modificar con dispersiones de GCE/MWCNTs-Con A/GOx.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

En la actualidad el desarrollo de biosensores es de gran interés científico debido a su bajo coste y de fácil operación que ofrecen soluciones viables a algunos problemas planteados por la industria sanitaria de la sociedad actual.

En este capítulo se presentan los resultados logrados a partir de la construcción de un biosensor de MWCNTs funcionalizados no covalentemente con Con A, la modificación se efectuó mediante energía de ultrasonido utilizando una sonda ultrasónica, para promover la buena dispersión de los MWCNT y generar distintos sitios activos en su superficie, Esta técnica tiene como ventaja que no produce daño adicional a las paredes de MWCNTs [53], se optimizaron los parámetros experimentales tale como el tipo de solvente, concentración de MWCNT's, concentración de Con A, tiempo de sonicado de la dispersión de MWCNTs-Con A, concentración de GOx, tiempo de incubación de GOx. Teniendo los parámetros óptimos se procedió a realizar un estudio más detallado como ver la estabilidad del biosensor almacenado en el refrigerador, la reusabilidad y otros estudios como se detalla en el siguiente capítulo.

4.1 SELECCIÓN DEL SOLVENTE

Se evaluó el efecto del solvente en la dispersión MWCNT funcionalizados con Con A. A fin se prepararon dos dispersiones de MWCNT empleando Con A en H₂O y la otra en etanol/ H₂O 50/50 v/v. La preparación es la misma al del biosensor como se muestra en la figura 3.1, empleándose 1.00 mg/mL de MWNCT, y 1.00 mg/mL de Con A y 3.00 mg/mL GOx.

De la curva de calibración amperométrica para la dispersión GCE/MWCNTs-Con A en (Etanol-agua) y agua para la detección de H₂O₂ y C₆H₁₂O₆ se tienen los siguientes resultados de sensibilidad.

DISPERSIÓN	SENSIBILIDAD (µA/M)	
	H ₂ O ₂	Glucosa
MWCNTs-Con A en agua	$(7.3 \pm 0.2) \times 10^3$	$(7.2 \pm 0.5) \times 10^2$
MWCNTs-Con A en etanol-H ₂ O	$(6.8 \pm 0.8) \times 10^3$	$(8 \pm 1) \times 10^2$

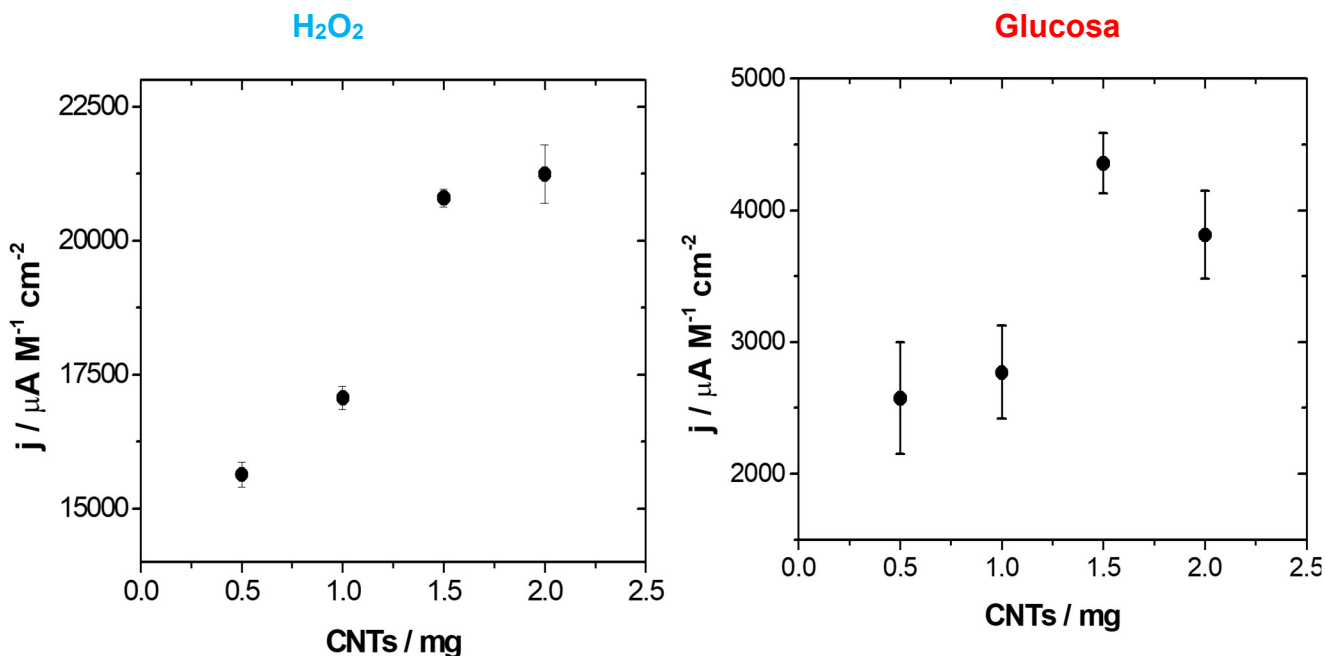
Tabla 2. Dispersiones empleadas con diferente solvente.

De acuerdo a la curva de calibración y de los datos obtenidos de sensibilidad para la dispersión de MWCNTs funcionalizado con Con A en agua y (etanol-agua) se observa un

margen de error mayor y de menor reproducibilidad en la dispersión de MWCNTs en etanol-agua. Un aspecto digno de resaltar es que al momento de hacer el depósito de GOx sobre la dispersión de MWCNTs/Con A en (Etanol-Agua), con el tiempo se desprende el depósito de la superficie, lo que hace que las mediciones sean irreproducibles. Por lo que en este estudio se determinó usar el agua como solvente de la dispersión de MWCNTs-Con A, ya que se obtienen resultados de mayor fiabilidad analítica y los biosensores son más estables.

4.2. CANTIDAD DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE MWCNTS

Una vez seleccionado el agua como el solvente para la dispersión de MWCNTs funcionalizados con Con A, se determinó la cantidad de MWCNTs óptimo para la dispersión. Se trabajó con (0.50, 1.00, 1.50 y 2.00) mg/mL de MWCNTs y se mantuvo constante la cantidad de Con A 2.00 mg/mL.

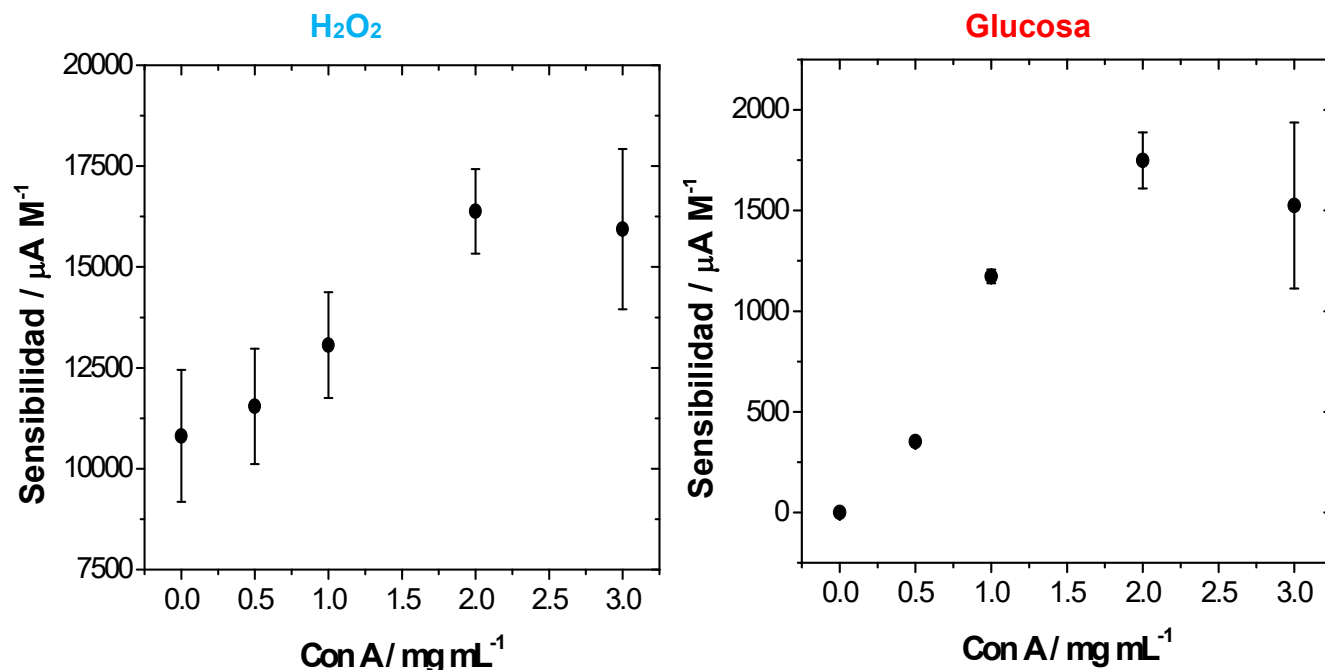


Gráfica 4.1. Densidad de corriente en función de la cantidad de MWCNT para la dispersión de GCE/MWCNTs-Con A(agua)/GOx, para agregados de glucosa $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ y Peróxido de hidrógeno $2 \times 10^{-4} \text{M}$ en una solución electrolítica de buffer de fosfato 0.05M $\text{pH}=7.4$.

La gráfica 4.1 muestra que tanto la sensibilidad para peróxido de hidrógeno, como para glucosa aumentan con la cantidad de MWCNTs hasta 1.50 mg/mL MWCNTs. Para valores mayores de sensibilidad no muestra cambios significativos. El valor seleccionado como óptimo fue 1.50 mg/mL de MWCNTs.

4.3. CONCENTRACIÓN DE CONCAVALINA A

Definida la cantidad de MWCNTs que se emplearía en la dispersión, se estudió el efecto de la cantidad de Con A más factible de utilizar. Para esto se prepararon varias dispersiones con concentraciones de Con A de (0.0, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00) mg/mL manteniendo constante la cantidad de 1.5 mg de MWCNTs.



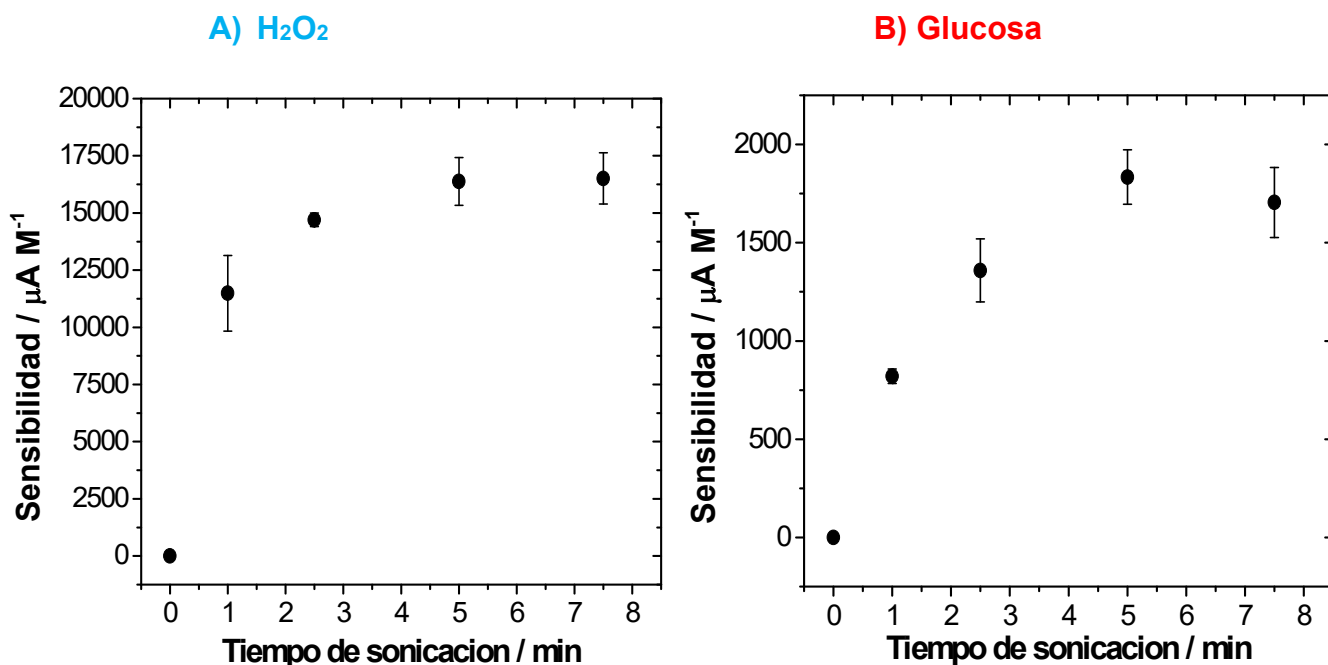
Gráfica 4.2. Sensibilidad en función de la concentración de Con A en una dispersión de GCE/MWCNTs-Con A (agua)/GOx, para agregados de glucosa $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ y Peróxido de hidrógeno $2 \times 10^{-4} \text{M}$ en una solución electrolítica de buffer de fosfato 0.05M $\text{pH}=7.4$.

La gráfica 4.2 muestra el efecto de la concentración de Con A en la dispersión sobre la sensibilidad obtenida a partir de un registro amperométrico para H₂O₂ y glucosa ($(1.6 \pm 0,1) \times 10^4$) $\mu\text{A/M}$ y $(2,22 \pm 0,03) \times 10^3$ $\mu\text{A/M}$, respectivamente. Se observa que en ambos casos aumenta la sensibilidad con el incremento en la concentración de Con A hasta 2,00mg/mL. Para valores mayores de la sensibilidad se mantiene constante.

4.4. TIEMPO DE SONICADO

La obtención de dispersiones de nanotubos de carbono requiere de la aplicación de una elevada energía durante un tiempo adecuado que la separación de éstos. En este sentido, las ondas de ultrasonido a través de un líquido originan un fenómeno de cavitación, formando micro burbujas que al implosionar liberan una gran energía que interacciona con los grandes agregados de nanotubos de carbono y los separa.

Se evaluó el tiempo de sonicado óptimo para la preparación de la dispersión de 1.5 mg/mL MWCNTs con 1.00 mL Con A 2.00 mg/mL. Los tiempos estudiados fueron 1.00, 2.50, 5.00 y 7.50 minutos.

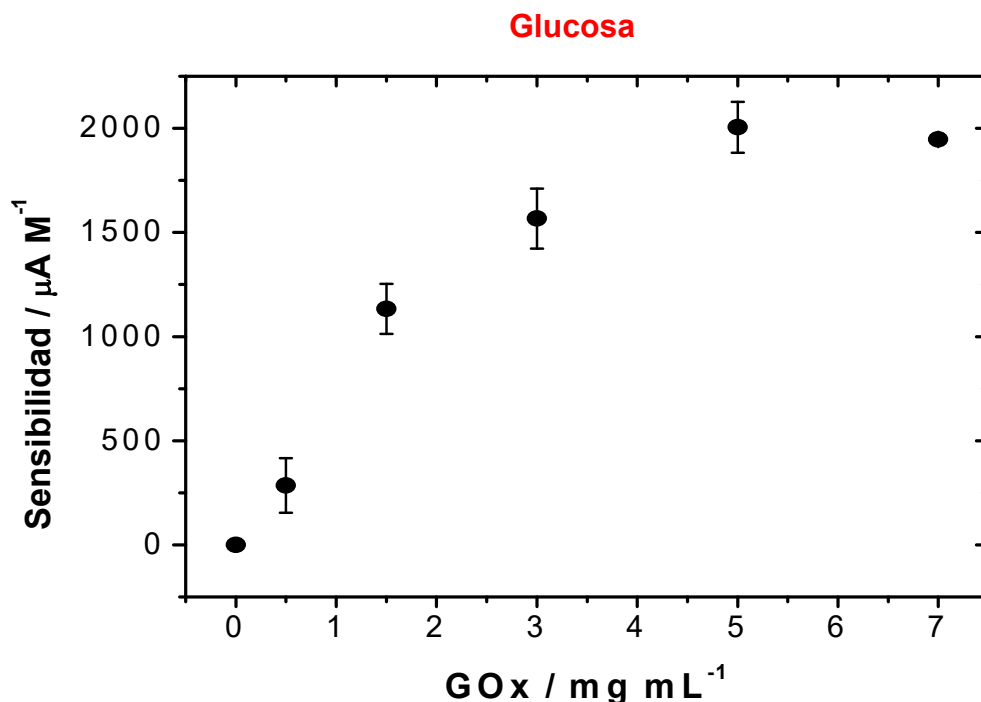


Grafica 4.3. Sensibilidad en función del tiempo de sonicado a partir de experimentos amperométricos en una dispersión GCE/MWCNTs-Con A (agua)/GOx en la dispersión de 1.5 mg WMCNT-2mg Con A en agua para agregados de glucosa de $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ en una solución electrolítica de buffer de fosfato 0.05M pH=7.4.

La gráfica 4.3 muestra el efecto del tiempo de sonicación en las sensibilidades para H₂O₂ y glucosa obtenidos a partir de registros amperométricos a $(1.6 \pm 0.1) \times 10^4$ y $(1.8 \pm 0.139) \times 10^3$. Se observa que la sensibilidad aumenta en ambos casos conforme incrementa el tiempo de sonicado hasta 5 minutos. Por lo tanto, el tiempo seleccionado fue 5 minutos.

4.5. CONCENTRACIÓN DE GOX

Conociendo las cantidades óptimas para la dispersión de MWCNTs/Con A y el tiempo de sonicado. Se evaluó la cantidad de GOx. La concentración de GOx que se empleó en este estudio fueron (0.00, 0.50, 1.50, 3.00, 5.00 y 7) mg/ML.

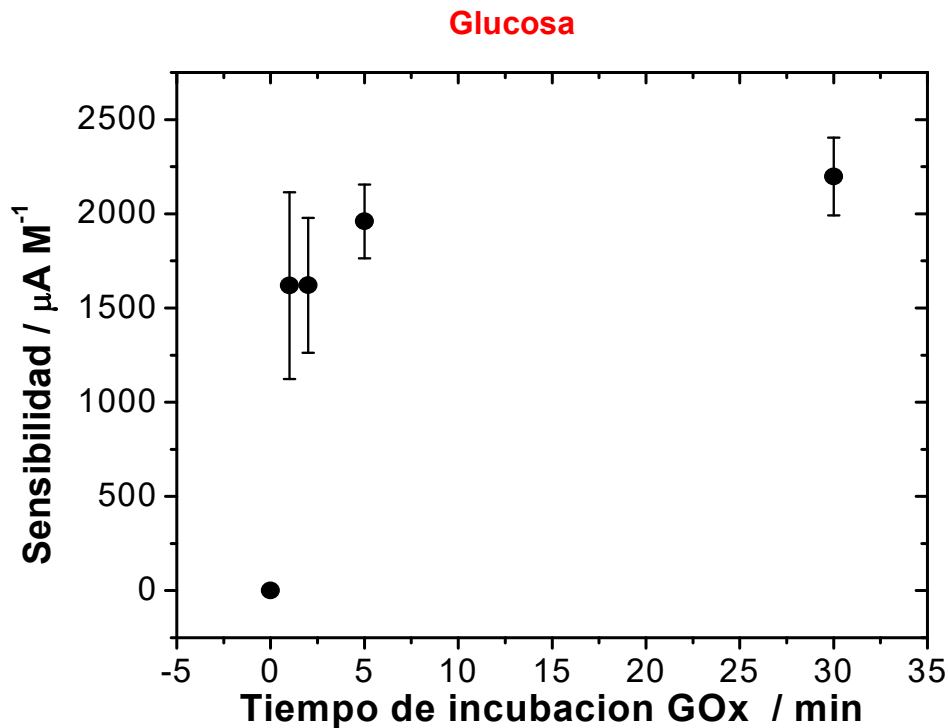


Gráfica 4.4. Sensibilidad en función de la concentración de GOx a partir de experimentos amperométricos en una dispersión GCE/MWCNTs-Con A (agua)/GOx en la dispersión de 1.5 mg WMCNT-2mg Con A en agua para agregados de glucosa de $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ en una solución electrolítica de buffer de fosfato 0.05M pH=7.4.

A partir de la gráfica anterior se aprecia un incremento en la sensibilidad conforme aumenta la cantidad de GOx. Para concentraciones mayores que 5.00 mg/mL se mantiene constante la sensibilidad. Se seleccionó 5.00 mg/mL de GOx como el valor óptimo para la concentración del biosensor.

4.6. TIEMPO DE INCUBACIÓN DE GOX

En el siguiente estudio se determinó el tiempo de interacción GCE/MWCNTs-Con A con GOx como se muestra en la gráfica 4.5, la interacción de GOx con la plataforma es rápida alcanzándose valores máximos de sensibilidad a partir de 5 minutos.



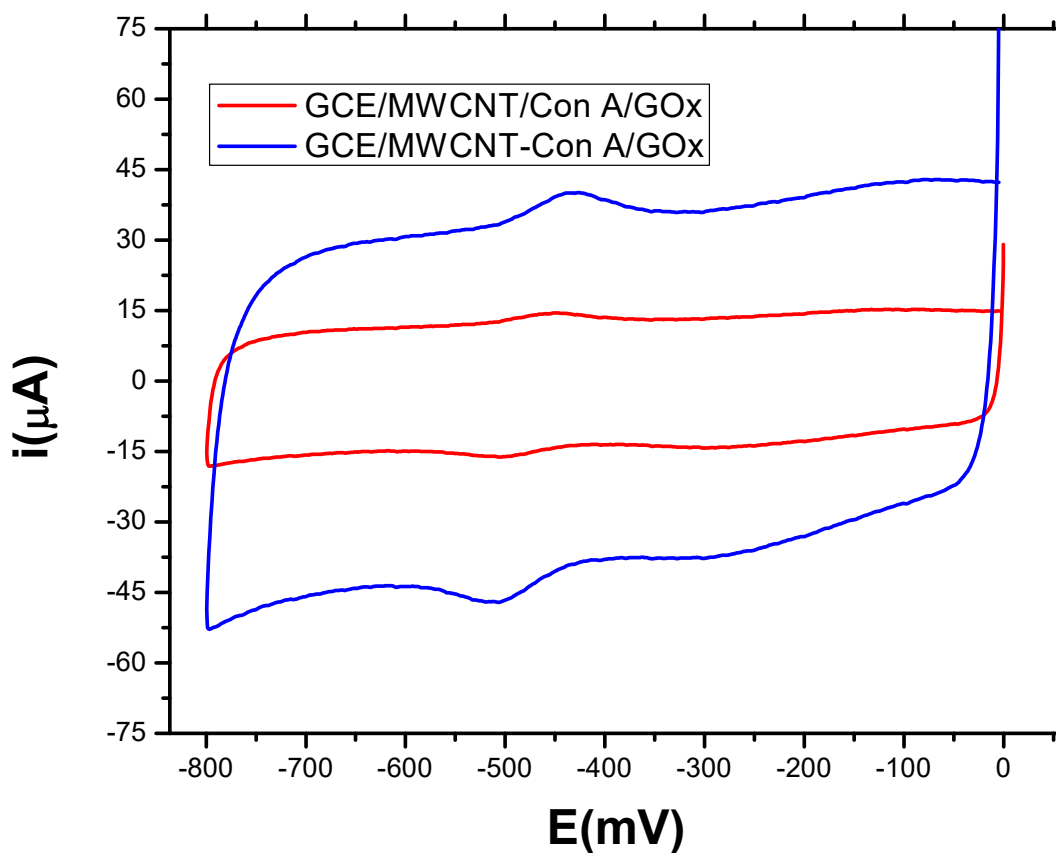
Grafica 4.5. Sensibilidad en función del tiempo de incubación de la GOx a partir de experimentos amperométricos en una dispersión GCE/MWCNTs-Con A (agua)/GOx en la dispersión de 1.5 mg WMCNT-2mg Con A en agua para agregados de glucosa de $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ en una solución electrolítica de buffer de fosfato 0.05M pH=7.4.

De acuerdo a la gráfica 4.5 se observó que el tiempo que presenta el mejor comportamiento en sensibilidad y reproducibilidad es 5 minutos para tiempos mayores de encontró que la sensibilidad no cambia.

Una vez evaluado el efecto de las cantidades a emplear de MWCNTs, Con A y Gox, y tiempos de sonificación e incubación, así como el tipo de solvente para dispersar los nanotubos de carbono MWCNTs, se prepararon electrodos empleando una dispersión con las óptimas cantidades de los componentes del biosensor.

4.7. COMPARACIÓN DE DISTINTAS CONFIGURACIONES

Se evaluó la influencia del recubrimiento electroquímico y de la cinética electroquímica, usando las cantidades adecuadas de la dispersión óptima, en donde se emplearon dos dispersiones, la primera de GCE/MWCNTs-Con A/GOx (A) y la segunda cuando se deposita una dispersión de los MWCNTs en agua en GCE y posteriormente se inmoviliza la Con A y GOx GCE/MWCNTs(agua)/Con A. Se realizaron estudios a distintas velocidades de barrido de potencial 10, 25, 50, 70, 100, 200, 300 y 500 mV/s.

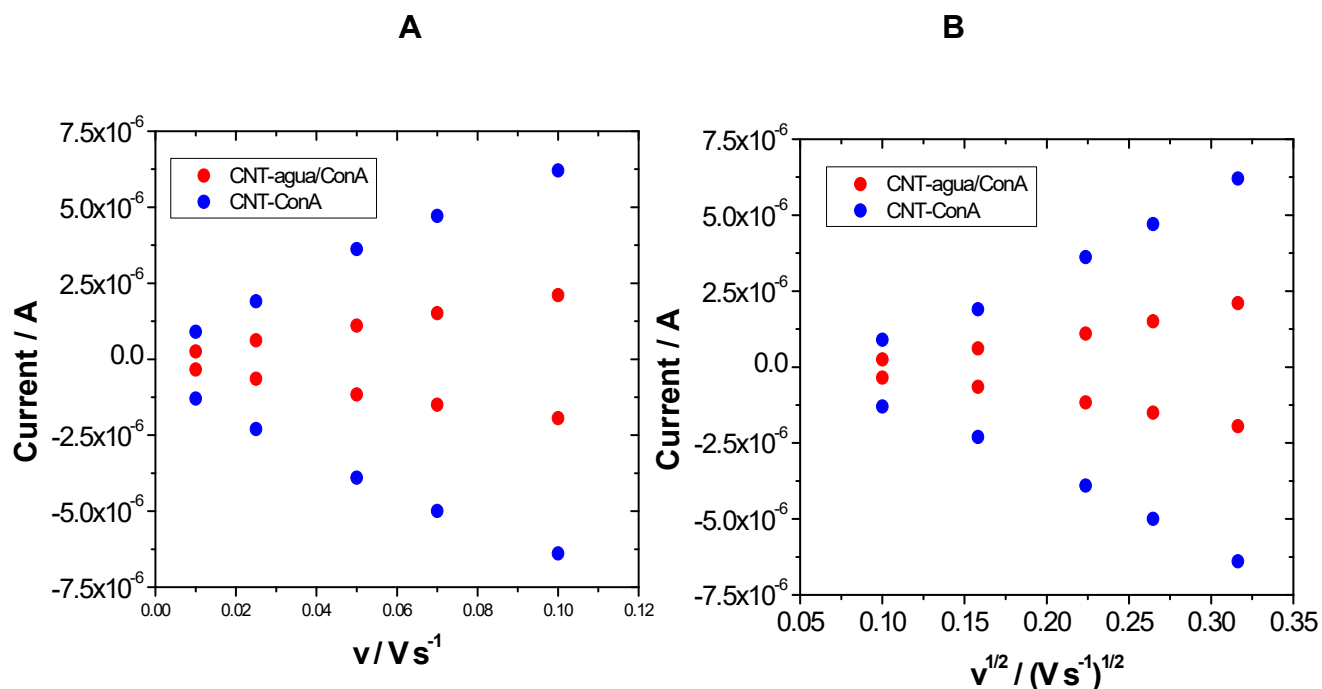


Gráfica 4.6. Voltamperometría cíclico para la dispersión de GCE/MWCNTs-Con A/GOx en agua y GCE/MWCNTs-agua/Con A/GOx obtenidos a una velocidad de barrido de 100 mV/s a un potencial de reducción de -800 a 0 mV en una solución electrolítica 0.05 M de buffer de fosfato pH=7.4.

En la gráfica 4.6, el voltamperograma cíclico de color rojo representa la respuesta del electrodo modificado por la adición por separado de la dispersión de MWCNTs-(Agua) y Con A. Se observa un proceso redox debida a la reducción de FAD de GOx y su correspondiente reoxidación, con un potencial del pico anódico a $E_{pa} = -448mV$ y una corriente de pico anódico

$i_{pa} = 2.10 \mu A$ y potencial de pico catódico $E_{pca} = -505mV$ y corriente de pico catódico $i_{pca} = 1.95 \mu A$. El voltamperograma cíclico de color azul representa respuesta obtenida con el electrodo modificado GCE/MWCNTs-Con A(Agua)/GOx preparado con la dispersión con las cantidades de óptima de los componentes del biosensor. Se observa un pico anódico a un valor de potencial de $E_{pa} = -430mV$ y una corriente de pico anódico $i_{pa} = 6.20 \mu A$ y potencial de pico catódico $E_{pca} = -512mV$ con corriente de pico catódico $i_{pca} = 6.40 \mu A$. Se observa que la dispersión de MWCNTs en ConA permite una mayor exfoliación de MWCNTs y por ende las corrientes capacitivas aumentan y se facilita la reducción/oxidación de FAD/FADH₂ de la GOx, indicando también una interacción facilitada con la GOx cuando la Con A se encuentra en íntimo contacto con los MWCNTs.

Se obtuvieron voltamperogramas cíclicos aplicando diferentes velocidades de barrido de potencial y se construye un gráfico de corriente de pico anódico (i_{pa}) y catódica (i_{ca}) en función de la velocidad de barrido (v) y de la raíz cuadrada de la velocidad ($v^{1/2}$) como se muestra en la gráfica 4.7.



Gráfica 4.7. A) Dependencia de la corriente anódica y catódica en función de la velocidad de barrido. B) corriente del pico anódico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Como puede observarse, en la gráfica 4.7 existe una dependencia lineal entre las intensidades de pico y la velocidad de barrido, lo que pone de manifiesto que se trata de un proceso redox superficial del proceso electroquímico, quedando confirmado la inmovilización MWCNTs-Con A(Agua)/GOx estable de la sobre la superficie del GCE.

El recubrimiento superficial (Γ) de GOx inmovilizada sobre la superficie del electrodo GCE / MWCNTs-Con A se calculó a partir de la pendiente de la representación i_p vs v , teniendo en cuenta la ecuación de Laviron [53]:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma A v}{4RT} \quad 1)$$

Donde

v = Velocidad de barrido (Vs^{-1})

n = Número de electrones involucrados en el proceso redox en este caso $n=2$

F = constante de Faraday 96500 C/mol

A = Área del electrodo cm^2

R = Constante de los gases ideales 8.31J/molK

T = Temperatura (K), la temperatura empleada es de 298 K

Γ = Recubrimiento electroactivo mol/cm^2

De acuerdo a la gráfica 4.7 A) se obtiene una relación lineal y de la pendiente se tiene

$$m = \frac{n^2 F^2 \Gamma A}{4RT} \quad \text{despejando } \Gamma \text{ se tiene la siguiente ecuación}$$

$$\Gamma = \frac{m4RT}{n^2 F^2 A} \quad 2)$$

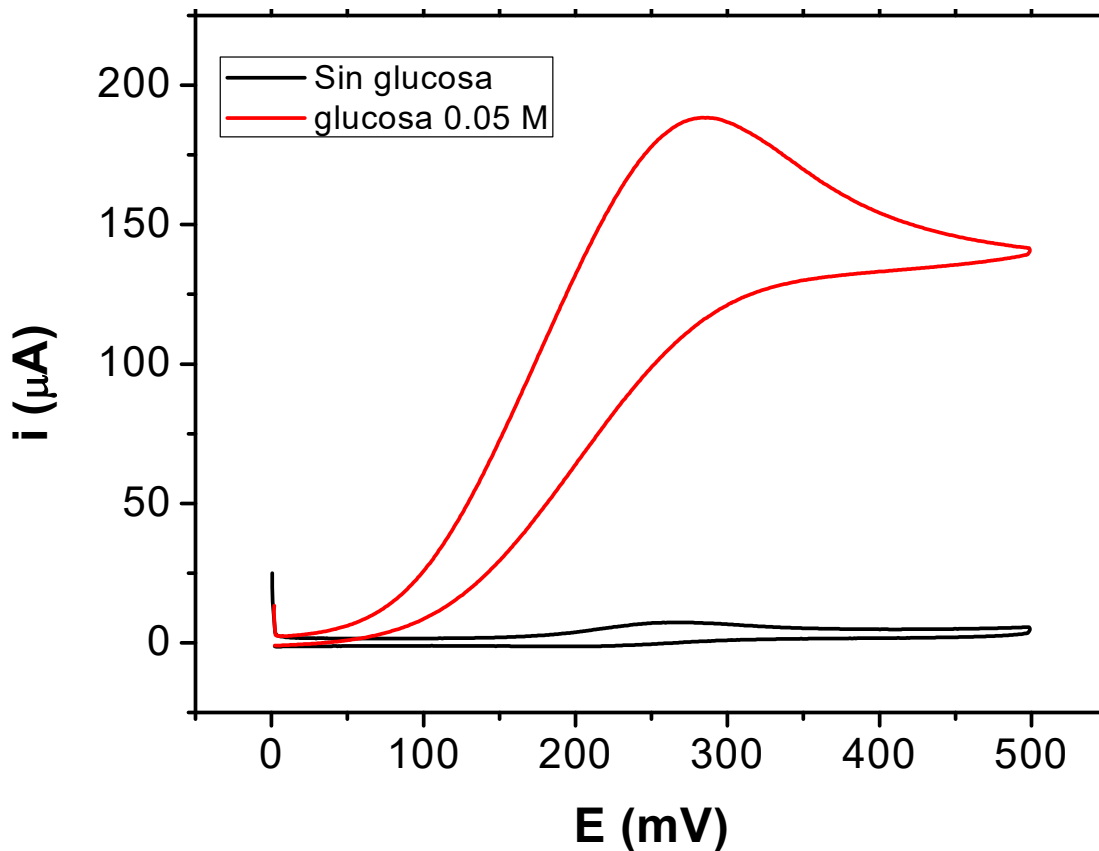
Se obtuvo los siguientes datos de recubrimiento

Plataforma	$\Gamma_{\text{electroactivo}}$
GCE/MWCNTs/Con A/GOx	$1.07 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$
GCE/MWCNTs-Con A/GOx	$2.33 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$

De los datos obtenidos y de la ecuación 1 se calcula el recubrimiento electroquímico de GOx, sobre GCE /MWCNT-Conc A(agua), se obtiene un valor 2.2 veces más que si la GOx se inmoviliza sobre GCE/MWCNTS/Con A.

Estos resultados muestran la ventaja de incorporar la Con A en el biosensor mediante la funcionalización de los MWCNTs que permite un íntimo contacto con las nanoestructuras y facilita la interacción con GOx.

4.8. RECUBRIMIENTO BIOACTIVO PARA GCE/MWCNTS-CON A/GOX



Grafica 4.8. Voltamperograma cíclico de GCE/MWCNTs-Con(A)/GOx en solución electrolítica de buffer de fosfato 0.05M a pH=7.4, con agregado de Ferroceno metanol 5×10^{-4} M.

Bajo las condiciones óptimas, el recubrimiento superficial de GOx bioactivo (Γ_{GOx}) en la plataforma de GCE/MWCNTs-Con A/ GOx está con la fracción de la enzima disponible para la transferencia de carga, se evaluó usando 5.0×10^{-4} M ferroceno metanol ($FCMO^+$) como regenerador enzimático.

La $\Gamma_{GOx} = \Gamma_{bioactivo}$ se calculó a partir de la respuesta del biosensor utilizando la siguiente ecuación 2, [42].

$$i_{cat} = \frac{nFAK_3\Gamma_{GOx}^*[FcMO^{+}]}{1+k_3[FcMO^{+}]\left[\left(\frac{1}{k_2}\right)+\left(\frac{1}{k_{red}[Glu]}\right)\right]} \quad 2)$$

Donde $[FcMO^{+}]$ y $[Glu]$ son concentraciones del mediador oxidado y el sustrato, respectivamente, $K_{red} = k_1k_2/(k_{-1}+k_2)$, i_{cat} es corriente catalítica determinada en GCE/ MWCNTs-Conc A/GOx como la diferencia entre la corriente obtenida en ausencia y en presencia de glucosa 0.05M a 0.50 V. Los valores de las constantes utilizados para el cálculo fueron tomados del trabajo pionero de "Bourdillon" [42] bajo las condiciones experimentales similares. $k_2 = 780 \text{ s}^{-1}$, $k_3 = (6.2 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y $K_{red} = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [43]. En nuestras condiciones experimentales para el ensamble GCE/MWCNTs-Con A/GOx, el valor obtenido es $\Gamma_{bioactivo} = \Gamma_{GOx} = 4.2 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$. Calculando el porcentaje de recubrimiento bioactivo se obtiene un valor de 18%.

4.9. COMPARACIÓN DE DISTINTAS PLATAFORMAS DE DISPERSIÓN

Mediante el estudio de amperometría y de acuerdo a las curvas de calibración se obtuvo los datos de sensibilidad para diferentes plataformas, como se muestra en la siguiente tabla.

DISPERSIÓN	SENSIBILIDAD ($\mu\text{A/M}$)	
	Glucosa	
GCE/ MWCNTs/GOx	30 \pm 18	
GCE/ MWCNTs/Con A/GOx	(4.90 \pm 0.3) $\times 10^2$	
GCE/MWCNTs-ConA/GOx	(2.22 \pm 0.03) $\times 10^3$	
DISPERSIÓN	H ₂ O ₂	
GCE/ MWCNTs	(1.1 \pm 0.16) $\times 10^4$	
GCE/ MWCNTs-Con A	(1.74 \pm 0.10) $\times 10^4$	

Tabla 3. Comparación de distintas plataformas para glucosa y H₂O₂.

De la tabla 3, se observa que la respuesta a peróxido de hidrógeno es mayor sobre la plataforma obtenida por modificación de GCE con la dispersión de MWCNTs-Con A, reafirmando una vez más la importancia de la presencia de la proteína para una eficiente exfoliación de las nanoestructuras. De un modo equivalente, cuando se inmoviliza GOx, se obtiene una mayor respuesta sobre el electrodo modificado con la dispersión de MWCNTs-Con A.

4.10. ANALISIS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para observar directamente la morfología que se presenta sobre GCE utilizando las dispersiones de MWCNTs-Agua, MWCNTs-Con A y MWCNTs-Con A/GOx. Las micrografías proporcionan una imagen tridimensional de la superficie de la plataforma con un nivel detallado y profundidad de campo muy superiores a la microscopía óptica convencional. El haz de electrones, al recorrer la muestra, arranca electrones secundarios de la misma que son captados y convertidos en tonos más claros o más oscuros en función de su intensidad. Dicha intensidad está relacionada directamente con la orientación de las distintas superficies hacia el captador, por lo que girando e inclinando la muestra podemos adaptar a nuestro gusto la dirección de las luces y sombras de forma que destaquen los detalles más significativos de la muestra.

Las micrografías mediante SEM de los MWCNTs sin modificar se presentan en la figura 5.1.

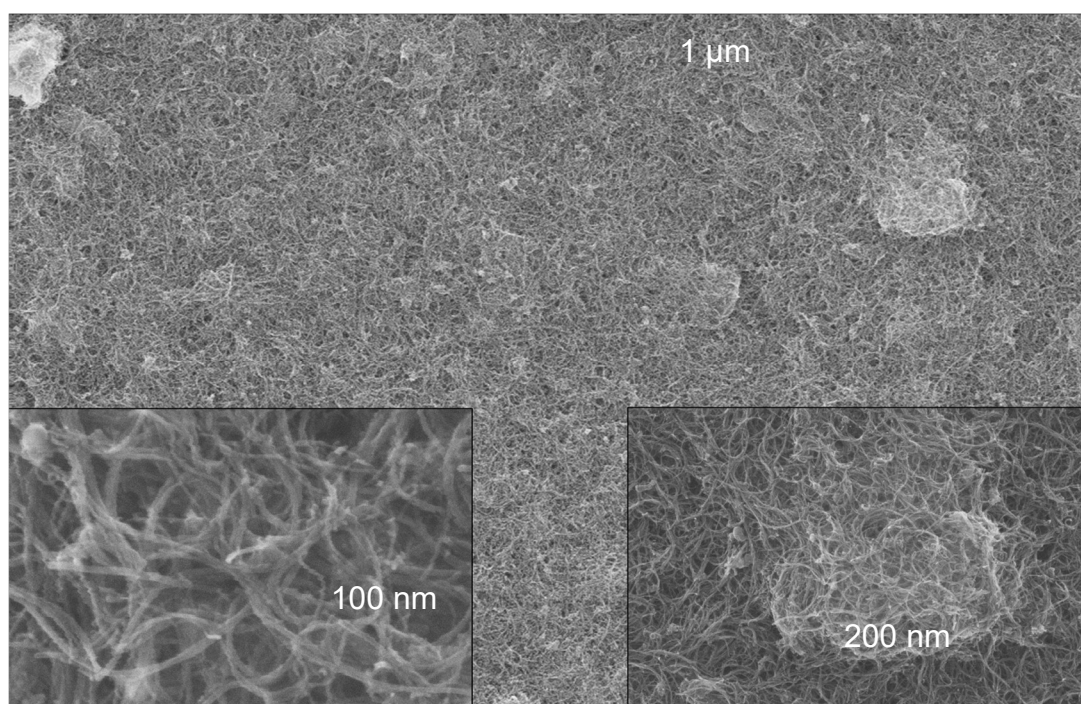


Figura 4.10.1 Micrografía SEM de disco de carbono vítreo modificados con dispersión de GCE/MWCNTs (en agua).

Las imágenes SEM de los GCE/MWCNTs (figura 4.10.1) mostraron que la superficie GCE está cubierta en su mayoría de MWCNTs, que se muestran en forma pequeños paquetes, lo que presentan una superficie limpia y sin ningún recubrimiento.

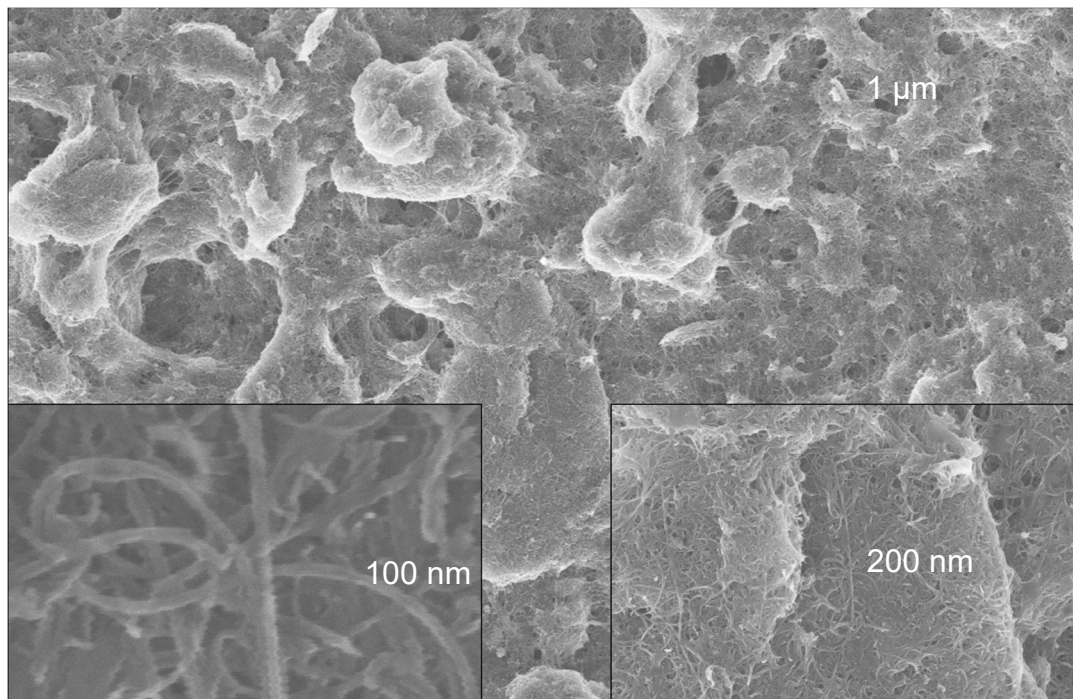


Figura 4.10.2 Micrografía SEM de disco de carbono vítreo modificados con dispersión de GCE/MWCNTs-Con A, 1.5 mg de MWCNTs + 1mL de 2mg/mL Con A (agua)

De las imágenes SEM de la dispersión de GCE/MWCNTs-Con A de la figura 4.10.2, podemos observar que hay un recubrimiento sobre toda la superficie de GCE por la modificación de la dispersión de MWCNT-Con A, esto nos indica que si se llevó a cabo una modificación superficial de los MWCNT por su funcionalización con la Con A.

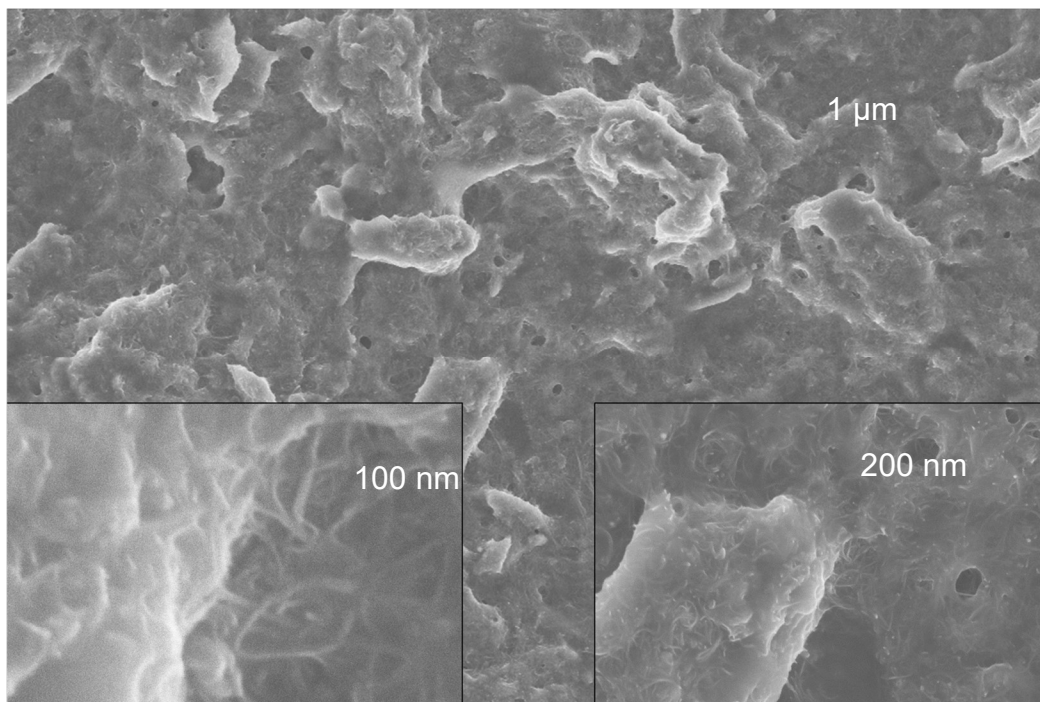


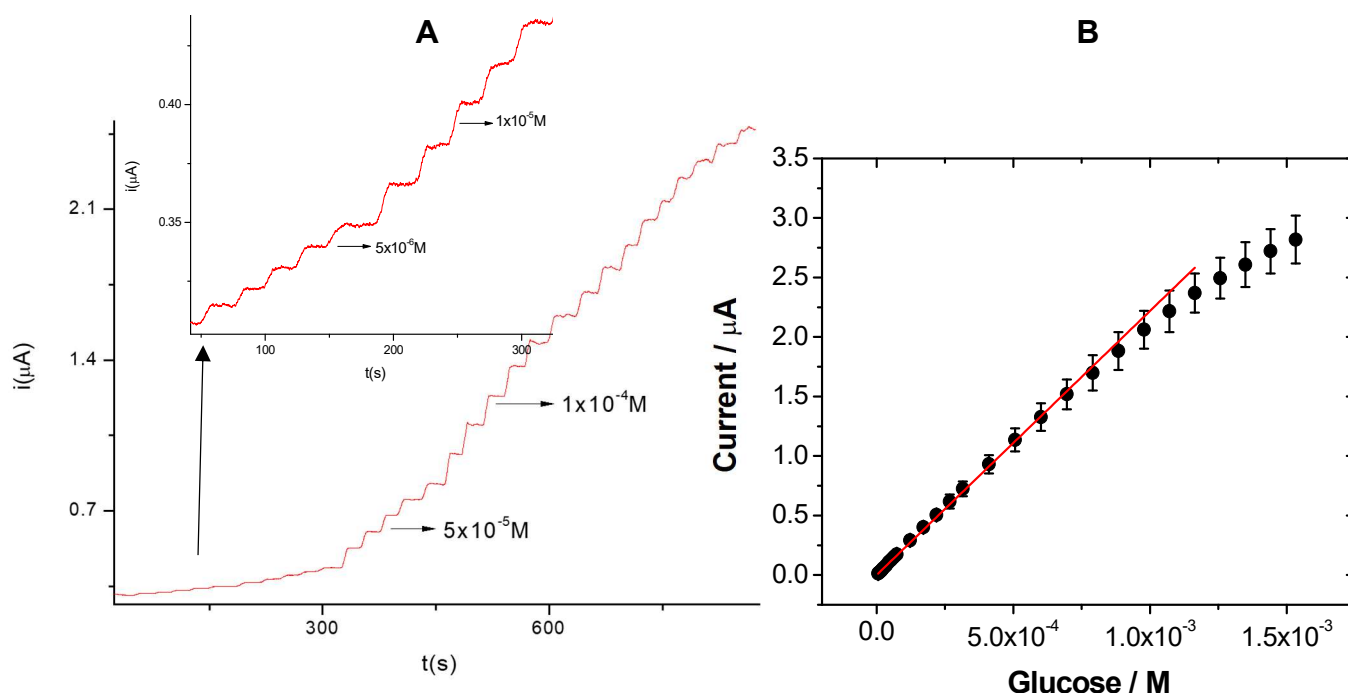
Figura 4.10.3 SEM Micrografía SEM de disco de carbono vítreo modificados con dispersión de GCE/MWCNTs-Con A/GOx, 1.5 mg de MWCNTs + 1mL de 2mg/mL Con A (agua) en GCE con depósito de 20 μ L 5mg/mL GOx por 5 minutos.

Las imágenes SEM de la figura 4.10.3 se observan la estructura que presenta la dispersión de GCE/MWCNTs-Con A/ GOx en el cual se alcanza apreciar una modificación en la superficie de GCE por la cantidad de Con A presente en la funcionalización de los MWCNTs y también por la cantidad de GOx depositados en la dispersión.

Se puede ver que la superficie del electrodo GCE se encuentra completamente cubierta con MWCNTs, sin evidenciarse cambios significativos respecto de GCE/MWCNTs-ConA.

4.11. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL BIOSENSOR

La gráfica 4.9.A. muestra la respuesta amperométrica obtenida con el biosensor GCE/MWCNTs-Con A/GOx aplicando un potencial de oxidación de 700 mV vs Ag/AgCl. Para agregados de glucosa, se observa una clara definición de la señal analítica de glucosa de rápida respuesta aún para agregados de glucosa 5.0×10^{-6} M. La figura 4.9 B muestra los calibrados correspondiente a la aplicación del biosensor GCE/MWCNTs-Con A/GOx a 700 mV



Grafica 4.9. A) Registro amperométrico obtenido con GCE/MWCNTs-Con A/GOx para distintos agregados de glucosa (5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} M. B) Curva de calibración obtenida. $E_{app} = 700$ mV.

A partir de la curva de calibración se obtiene una sensibilidad de $(2.218 \pm 0.026) \times 10^3$ el LOD es de $1.6 \mu\text{M}$ y LQ de $4.8 \mu\text{M}$.

Ecuaciones empleadas para determinar el Límite de detección y el Límite de cuantificación

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \times S_N}{b}$$

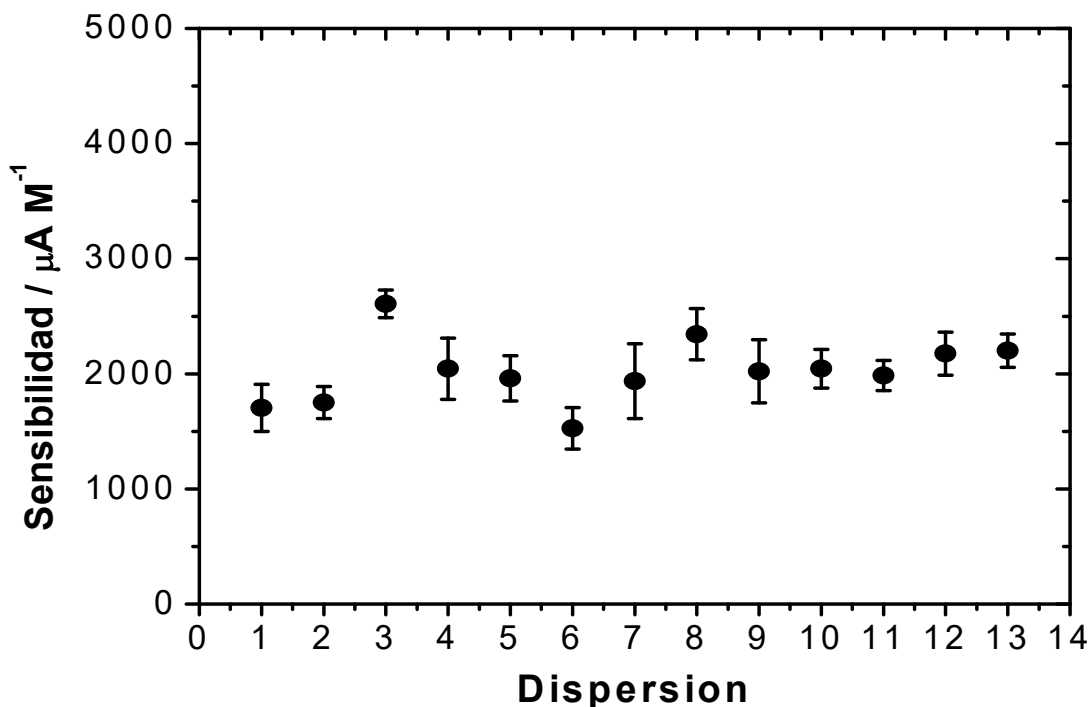
$$\text{LQ} = \frac{10 \times S_N}{b}$$

Dónde: S_N = Desviación estándar de la respuesta

b = sensibilidad

4.12. ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD

Esta parte del estudio se pretende ver la reproducibilidad que presenta cuando se preparan diferentes dispersiones óptimas en días diferentes. Como puede observarse en la figura 4.10, el valor de la desviación estándar relativa (RSD) obtenido es 9.2% para 11 dispersiones, lo que pone de manifiesto la buena reproducibilidad de las medidas amperométricas.

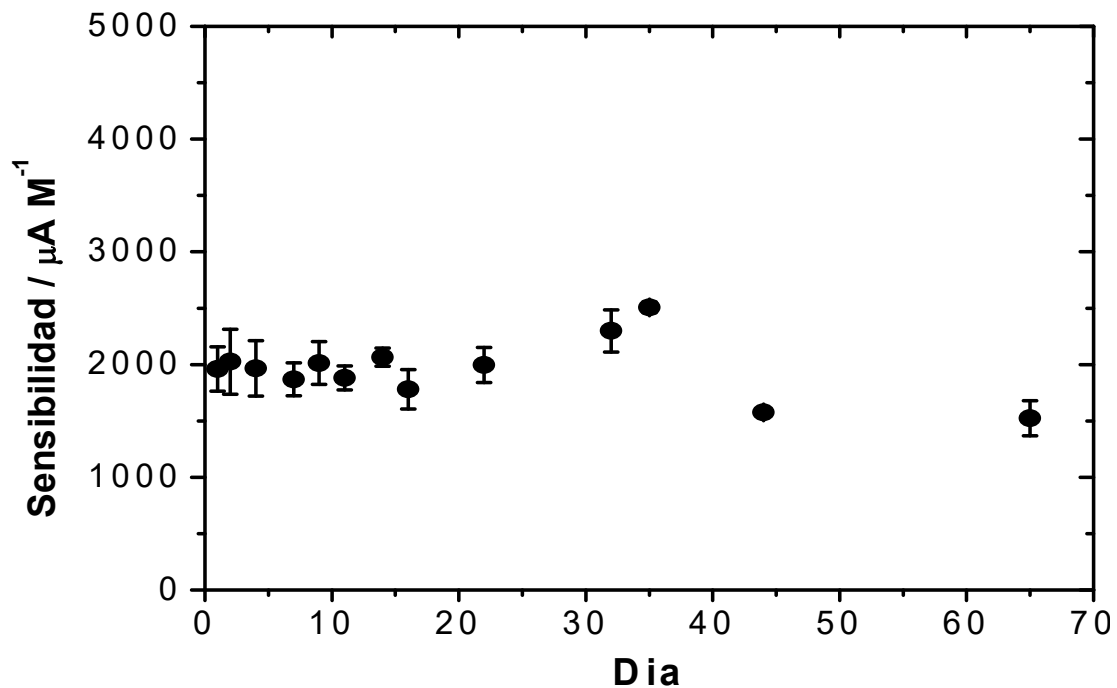


Gráfica 4.10. A) Registro amperométrico obtenido con GCE/MWCNTs-Con A con agregados de glucosa de 2.5×10^{-4} M en una solución electrolítica de buffer de fosfato 0.05M pH=7.4 $E_{app} = 700$ mV.

4.13. ESTABILIDAD DE LA DISPERSIÓN

Uno de los aspectos más importantes que se estudia cuando se desarrolla un biosensor electroquímico es su estabilidad, es decir, es necesario evaluar su utilización con respuestas reproducibles entre medidas. La estabilidad de la respuesta es un factor crítico a la hora de determinar las posibilidades de selección de un biosensor para aplicaciones en control de procesos y análisis rutinarios. Por ello, éste es uno de los aspectos más importantes a investigar cuando se desarrolla un biosensor electroquímico.

Se evaluó la estabilidad de la dispersión óptima almacenada en el refrigerador a 4° C. La figura 4.11.A muestra la variación de la sensibilidad a glucosa empleando GCE modificado con la dispersión MWCNTs-Con(A) almacenada a 4° C.



Gráfica 4.11. A) Registro amperométrico obtenido con GCE/MWCNTs-Con A con agregados de glucosa de 2.5×10^{-4} M en una solución electrolítica de buffer de fosfato 0.05M pH=7.4, $E_{app} = 700$ mV

Como puede observarse, de acuerdo a la gráfica 4.11, la señal amperométrica permanece prácticamente constante entre 1 y 22 días. También se aprecia que a partir del día 44 se hay una disminución progresiva de la respuesta. De acuerdo a la sensibilidad se observa que en el día 44: mantiene 80% su señal inicial y hasta el día 65 mantiene un 78% de la señal inicial, lo que nos permite decir, que la dispersión almacenada en el refrigerador puede mantener sus propiedades químicas hasta el día 44 almacenando a 4°C y que el tiempo de vida útil del biosensor es de aproximadamente 65 días.

4.14. REUSABILIDAD DE LA MISMA SUPERFICIE GCE/MWCNT'S-CON A/GOX

Desde el punto de vista de la utilización de los biosensores, éstos pueden diferenciarse entre biosensores desechables o de un solo uso, y biosensores reutilizables, los cuales se desarrollan para llevar a cabo varias medidas con el mismo dispositivo. Por ello es importante saber cuánto tiempo puede funcionar el biosensor proporcionando señales reproducibles, dado que un mayor tiempo de vida útil del biosensor permitirá un ahorro de tiempo y de costos.

Se estudió la respuesta de **GCE/MWCNTs-Con A/Gox** realizando calibrados sucesivos. Para 5 calibrados consecutivos, las sensibilidades obtenidas arrojaron un valor RSD de 3%. A partir del sexto calibrado, la sensibilidad cambia de manera significativa, por lo que el biosensor puede ser reutilizado 5 veces.

4.15. ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR GCE/MWCNT'S-CON A/GOX A LO LARGO DEL TIEMPO ALMACENADO EN EL REFRIGERADOR.

También se evaluó la estabilidad que presenta un biosensor GCE/MWCNTs-Con A/GOx cuando se almacena en el refrigerador a una temperatura de 4°C, obteniéndose un 82 % de la señal inicial después de 5 días y del 64 % después de 10 días. Estos resultados pueden atribuirse el cambio de temperatura que sufre diariamente el biosensor al pasar de la temperatura de almacenamiento (4°C) a la temperatura de trabajo y viceversa, y a la hidratación del biosensor durante las determinaciones amperométricas, lo que puede dar una pérdida de la actividad enzimática.

4.16. INTERFERENTES

Se estudió el efecto que ejerce sobre los valores de la intensidad de corriente, la presencia de otras especies consideradas como posibles interferentes. Para llevar a cabo este estudio se eligieron una serie de sustancias, posibles interferentes, como: fructosa, galactosa, maltosa, lactosa, ácido ascórbico y ácido úrico. Se evaluó la influencia de estos compuestos sobre la señal obtenida para glucosa $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ con el biosensor enzimático, para diferentes niveles de concentración de interferente ($5 \times 10^{-6} \text{M}$, $25 \times 10^{-6} \text{M}$ y $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$). Para conocer el efecto de estos interferentes sobre la respuesta de glucosa, se efectuaron tres estudios; el primero se realizó sin la adición de Nafión y a los otros dos se les agregó con un porcentaje de 0.5% y 1% de Nafión, la presencia de Nafión tuvo como finalidad crear una barrera anti-interferente protectora para el biosensor de glucosa.

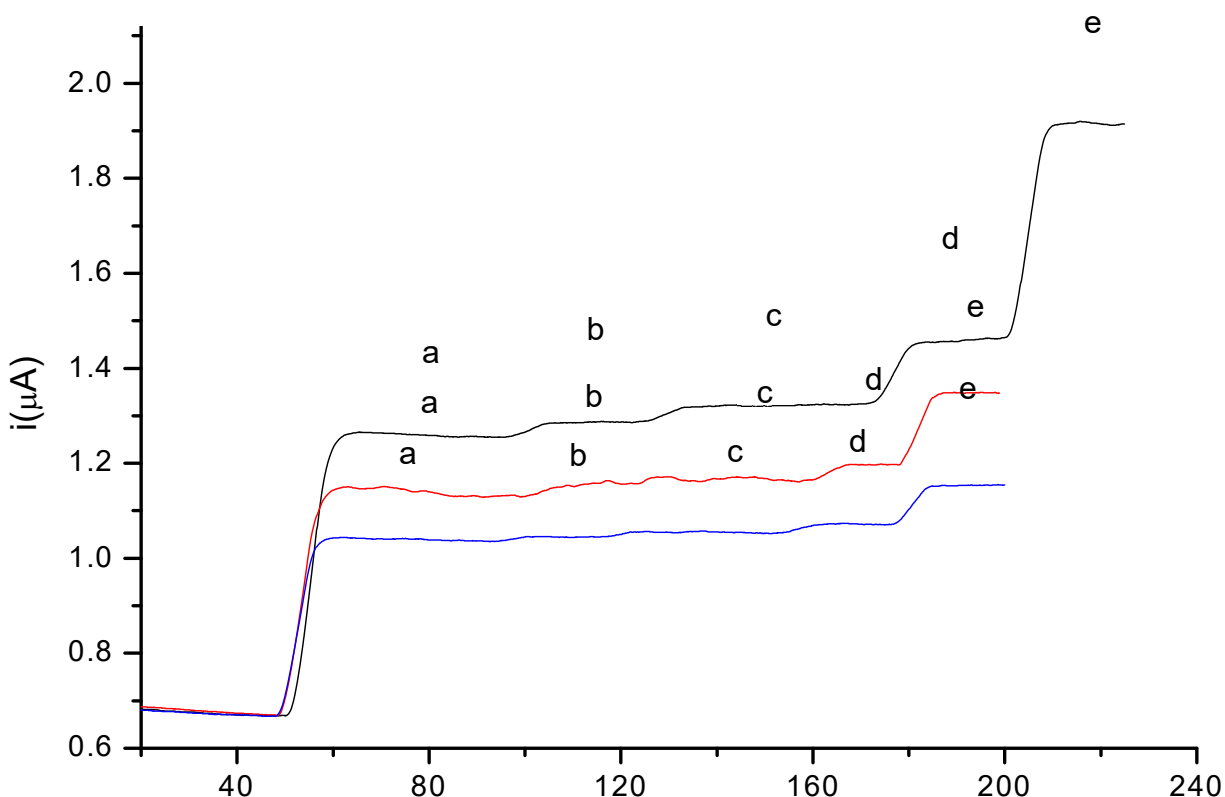


Figura 4.12. Registros amperométricos para adiciones a) Glucosa b) Galactosa, c) Maltosa a $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ d) Ácido ascórbico $5 \times 10^{-6} \text{M}$, e) Ácido úrico $25 \times 10^{-6} \text{M}$ en $1000 \mu\text{L}$ de buffer de fosfato en GCE/MWCNTs-ConA/GOx a 700 mV en solución electrolítica de buffer de fosfato 0.050 M a $\text{pH}=7.4$.

Analito	Corriente/ μA		
	Sin Nafion	Nafion 0.5 %	Nafion 1%
Glucosa	0.5941	0.4607	0.3743
Fructosa	No se observa	No se observa	No se observa
Galactosa	0.0302	0.0256	0.007
Maltosa	0.0356	0.0081	0.0095
Lactosa	No se observa	No se observa	No se observa
Ácido Ascórbico	0.1357	0.0323 (24%)	0.0173 (12.8%)
Ácido Úrico	0.4546	0.1514 (33%)	0.0823 (18%)

Tabla 4. Estudio de interferencias sobre la intensidad de corriente en glucosa $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} , pH 7.4. Los valores entre paréntesis son los porcentajes de interferencia.

Como se puede observar, en las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de fructosa y lactosa, éstas no afectan la señal analítica de la glucosa para ninguna de las relaciones de concentración ensayadas. Sin embargo, la presencia de ácido úrico y ácido ascórbico sí tuvo influencia sobre la señal de corriente. Se procede a utilizar una membrana anti-interferente de Nafión al 0.5% y 1%. Este polímero con carga negativa se usa ampliamente como barrera para la difusión de pequeñas especies interferentes con carga negativa o neutra, como el ácido ascórbico y el ácido úrico. En nuestro caso observamos que para cuando se utiliza Nafión al 0.5% se observa una interferencia de ácido ascórbico del 24%, y para ácido úrico 33% en el caso de Nafión al 1% el porcentaje de interferencia de ácido ascórbico es 12.75 %, ácido úrico es 18%. Estos porcentajes están referidos a la respuesta en corriente para estos analitos sobre la plataforma sin membrana anti-interferente, lo cual indica que al aumentar la cantidad de Nafión se disminuye la interferencia, pero también se pierde la señal de glucosa.

4.17. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRAS REALES

La aplicabilidad analítica del biosensor desarrollado se evaluó determinando el contenido de glucosa por dosis aplicada del spray nasal Avamys. Para la determinación del analito de glucosa en un spray comercial nasal se usó la técnica de amperometría aplicando un potencial de 700 mV.

Preparación de la muestra del spray

Se depositaron 5 disparos de spray comercial en un matraz de 5.00 mL y se aforó con una solución de buffer de fosfato pH=7.40. La gráfica de amperometría obtenida se muestra en la figura 4.13.

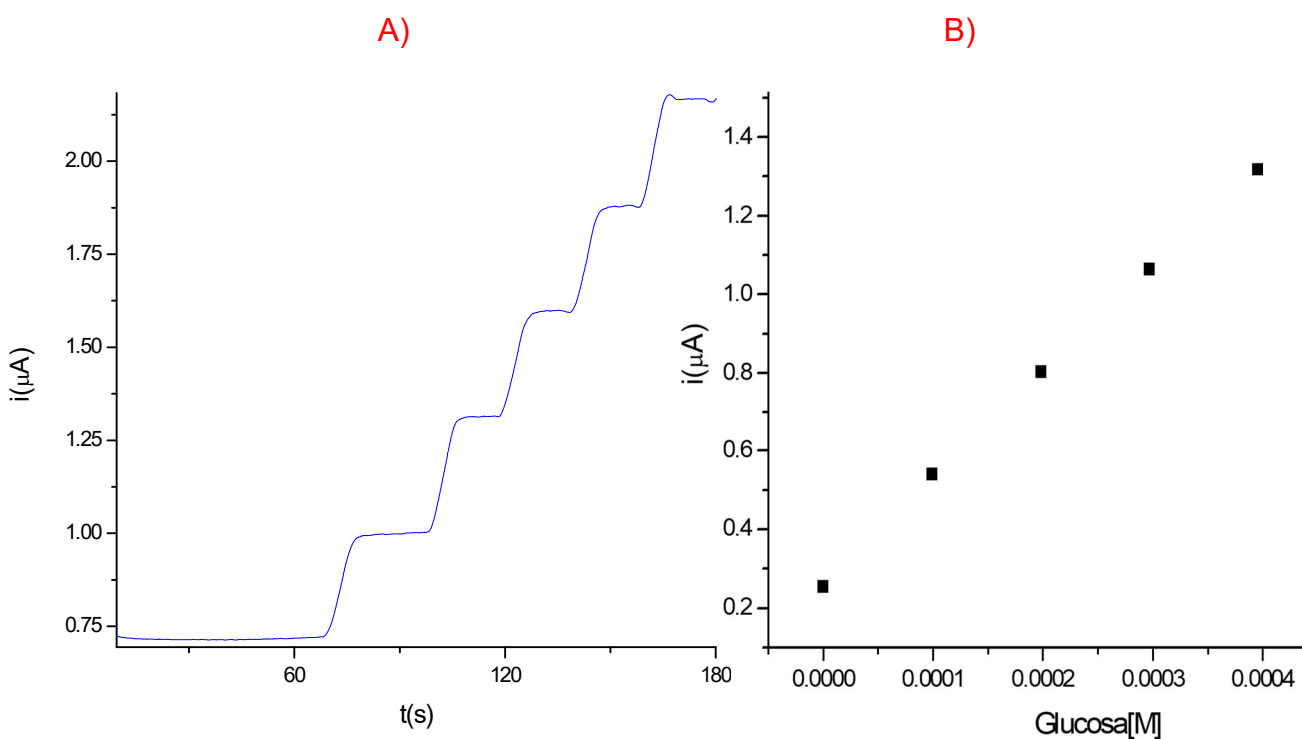


Figura. 4.13 A) Respuesta amperométrica para GCE/MWCNTs-(ConA)/GOx primer agregado de spray comercial (Avamys) 0.01526 M y los cuatro sucesivos agregados de glucosa 2.5×10^{-4} M B) Calibrado promedio obtenido para cinco calibrados realizados con el mismo electrodo.

La cantidad de glucosa presente en la muestra del spray fue de (2.78 ± 0.09) mg/disparo ($n=6$) con un RSD: 3.2%, siendo el valor informado de 2.75 mg/disparo. Esto nos permite decir que nuestro biosensor pudo ser usado eficientemente para determinar glucosa en el Spray comercial.

5. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis se propuso el diseño y caracterización de una plataforma multifuncional para la detección de diferentes eventos de bioafinidad, los resultados más relevantes del estudio fueron:

- Funcionalizar eficientemente los MWCNT's con la Concanavalina A de manera no covalente lo que permitió una eficiente dispersión de los nanotubos ya modificados suficientemente.
- Se obtuvieron las condiciones óptimas para la preparación de un nuevo biosensor, estas son: 10 μ L de la dispersión de 1.5 mg MWCNTs y 1mL de 2mg/mL Con A en GCE, secado a temperatura ambiente, después se deposita 20 μ L de 5mg/mL de GOx y dejar secar por 5 minutos.
- Se presenta la utilidad multifuncional de la plataforma MWCNTs-Con A para el desarrollo de un biosensor de glucosa a través de eficiente interacción de la lectina con la glicoproteína GOX que permitió un eficiente anclaje de la molécula de biorreconocimiento.
- La Concanavalina A soportada sobre nanotubos de carbono de pared múltiple MWCNTs, permitió una mejor respuesta para la inmovilización de GOx haciendo posible la detección de glucosa a niveles μ M a partir de la oxidación de H₂O₂ enzimáticamente formado, obteniéndose una señal de sensibilidad para glucosa de $(2.218 \pm 0.026) \times 10^3$ μ A/M.
- El biosensor fue aplicado para la detección de glucosa en una muestra real (spray nasal comercial de Avamys), con un excelente acuerdo entre el valor informado y el obtenido con el biosensor. El valor informado (2.78 ± 0.09) mg/disparo y reportado: 2.75 mg/disparo en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. E. Bahadir, M Sezgintürk, Talanta 132 (2015) 162.
2. J. Ji, H. Choi, M Colosas, D. Kim, Biosens, bioelectron. 80 (2016) 543
3. C.Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, Y. Lin, Anal. Chem. 87 (2015) 230.
4. J.M. Pingarrón Carrazón, P. Sánchez Batanero, Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones, Ed. Síntesis, Madrid, España, 1999.
5. J. Janata, "Principles of Chemical Sensors", Ed. Plenum Press, New York and London, 1989.
6. J.J. Davis, R. J. Coles, H.A.O. Hill, J. of Electroanal. Chem. 440.1997,279
7. E. Bahadir, M Sezgintürk. Trends Anal. Chem, 76 (2016)1
8. S. Kumar, W. Ahalawat, R Kumar, N Dilbaghi. Biosens. Bioelectron. 70 (2015) 498
9. C. Justino, a. Freitas, R. Pereira, A duarte, et al. Trends Anal.Chem. 68 (2015) 2
10. D. Zheng, X. Liu. H. Hu, S. Hu. Biosens. Bioelectron. 80 (2016) 543
11. P. Monaghan, S. Lord, A. St John, S. Sandberge, C Cobbaert, et al, Clin. Chim. Acta 460 (2016) 211.
12. P.J. Britto, K. S. V. Santhanam, P. M. Ayajan, Bioelectrochem. and Bioenergetics 41, 1996,121.
13. Q. Liu, Q. Zhou, G. Jiang. Trends Anal. Chem. 58 (2014) 10.
14. Ji. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li, Z. Gu, Electrochim. Acta 47, 2001, 651.
15. Lange, J. Thomas, K., & Wittmann, C. (2002) comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and life Science, 779(2), 229-239.
16. A. E. G. Cass, Biosensors. A Practical Approach, Ed. IRL Press, Oxford University Press, New York, 1990.
17. T Fujigaya, N Nakashima, Sci. Technol. Adv. Mater. 16 (2015) 024802.
18. H. Tsuge, O. Natsuaki, K. Ohashi. *J. Biochem.*, 78 (1975) 835-843
19. S. Oliveira, G. Bisker, N Bakh, S. Gibbs, et al. Carbon 95 (2015) 767.
20. Z. Ma, N. Liu. Expert Rev. Mol. Diagn. 15 (2015)1075.
21. Goldstein, I. J.; Poretz, R. D. **1986**. *The Lectins* (Liener, I. E.; Sharon, N.; Goldstein, I. J. eds) pp. 35-244, Academic Press, Inc., New York

22. W. Min, A.J. Dunn, D.H. Jones (Apr 1992). "Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage". *The EMBO Journal*. **11** (4): 1303–7
23. B. Wang, J.I. Anzai, Recent Progress in Lectin-Based Biosensors. *Materials* 2015, **8**, (12), 5478.
24. S.A. Ansari, Q. Husain, Lactose hydrolysis by beta galactosidase immobilized on Concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **63** (2010) 68–74
25. A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 2001.
26. C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
27. G.A. Mabbott, An introduction to cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.* **60** (1983) 697–702.
28. H.H. Girault, *Analytical and Physical Electrochemistry*, EFPL Press, Lausana, 2004.
29. N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of thecnologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for inmobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2015, **29**, (2), 205-220.
30. F. Van de Velde, N.D. Lourenco, H.M. Pinheiro, M. Bakker, Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for inmobilisation Techniques. *Advanced Synthesis & Catalysis* 2002, **344**, (8), 815-83.
31. E.K. Yan, H.L. Cao, C.Y. Zhang, Q.Q. Lu, Y.J. Ye, J. He, L.J. Huang, D.C. Yin, Cross linked protein Crystals by glutaraldehyde and their applications. *RSC Advance* 2015, **5**, (33), 26163-26174.
32. D. Cui, S.R. Jia, optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenge. *Critical Reviews in Biotechnology* 2015, **35**, (1), 15-28.
33. D. Brady, J. Jordan, Advances in enzyme immbolisation. *Biotechnology Letter* 2009, **31**, (11), 1639.
34. O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R.C. Rodriguez, R. Fernandez-Lafuente, Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional

- Immobilization Protocols To Opportunities in Tuning Enzyme Properties. *Biomacromolecules* 2013, 14, (8), 2433-2462.
35. S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. Pingarrón. *Electrochim. Acta* 230 (2017) 271.
36. S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*. 354 (1991) 56–58.
37. A.T. Lawal, Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors, *Mater. Res. Bull.* 73 (2016) 308–350.
38. A.J.P. and F.D. and S.I. and K. Morokuma, Insights into carbon nanotube and graphene formation mechanisms from molecular simulations: a review, *Reports Prog. Phys.* 78 (2015) 36501.
39. B.R. Stoner, B. Brown, J.T. Glass, Selected topics on the synthesis, properties and applications of multiwalled carbon nanotubes, *Diam. Relat. Mater.* 42 (2014) 49–57.
40. A. Jorio, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, *Carbon Nanotubes - Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications*, 1st ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg, 2008.
41. Y. Fu, R. Ma, Y. Shu, Z. Cao, X. Ma, *Materials Letters* 2009, 63, 1946.
42. H.Q. Zhu, Y. M. Zhang, L. Yue, W. S. Li, G. L. Li, D. Shu, H.Y, Chen. *Journal of Power Sources* 2008, 184, 637.
43. V. Gupta, N. Miura, *Electrochimica Acta* 2006, 52, 1721.
44. E. Frackowiak, F. Béguin, *Carbon* 2002, 40, 1775
45. C. Li, E.T. Thostenson, T.W, Chou. *Composites Science and Technology* 2008, 68, 1227.
46. J. Wang, M. Musameh, Y. Lin, *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125, 2408.
47. D.W. Kimmel, G. LeBlanc, M.E. Meschievitz, D.E. Cliffel, *Analytical Chemistry* 2011, 84, 685.
48. X. Peng, J. Jia, X. Gong, Z. Luan, B. Fan, *Journal of Hazardous Materials* 2009, 165, 1239.
49. C. A Mitchell, J. L Bahr, S. Arepalli, J. M Tour, R. Krishnamoorti, *Macromolecules* 2002, 35, 8825.

50. G.G. Wildgoose, C.E. Banks, H.C. Leventis, R.G. Compton, *Microchimica Acta* 2006, 152, 187.
51. M. Pulikkathara, V. Khabashesku, *Russian Chemical Bulletin* 2008, 57, 1054. (65)
52. M. Liu, Y. Yang, T. Zhu, Z. Liu, *Carbon* 2005, 43, 1470. (66)
53. L. Zeng, L. Alemany, C. Edwards, A. Barron, *Nano Research* 2008, 1, 72.
54. S. Shahrokhian, H. Zare-Mehrjardi, H. Khajehsharifi, *Journal of Solid State Electrochemistry* 2009, 13, 1567. (68).
55. R.J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *Journal of the American Chemical Society*
56. V. Cruz, C. Avila, O. Perez, M. Garcia, *Ideas Conacyteg.* 2011, 6, 72. 3.
57. A. Ruhai, J.S. Rana, S. Kumar, A. Kumar, *Int. J. Modern Eng.* 2012, 2, 1310. 4.
58. C.A. Fernando, W.T. Priyankara, I.M. Harmadas, *Renew. Energ.* 2002, 25, 69.
59. G. Gonzalez, C. Albano, V. Herman, I. Boyer, A. Monsalve, J.A Brito, *Mater. Charact.* 2012, 64, 96.
60. E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.*, 1980, 112, 1.
61. Y. Hao, J. Yuguang, F. Peng, H. Wang, J. Yang, *J Phys. Chem.* 2008, 112, 6758.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00091

Matrícula: 2171801373

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA MULTIFUNCIONAL PARA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADA EN LA FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO CON CONCAVALINA A.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 14 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. SILVIA GUTIERREZ GRANADOS
DRA. MARIA LUISA LOZANO CAMARGO
DRA. LAURA GALICIA LUIS



ELVIS ORTIZ SANTOS
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: ELVIS ORTIZ SANTOS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Apróbar

REVISÓ

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTA

DRA. SILVIA GUTIERREZ GRANADOS

VOCAL

DRA. MARIA LUISA LOZANO CAMARGO

SECRETARIA

DRA. LAURA GALICIA LUIS