



Universidad de Oviedo

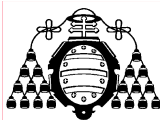
**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

**Diseño, construcción y puesta a punto  
de un sensor de colesterol**

**Alba Iglesias Mayor**

**Julio 2015, Oviedo**



**Agustín Costa García**, Catedrático de Química Analítica del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Diseño, construcción y puesta a punto de un sensor de colesterol” ha sido realizado por la alumna **Alba Iglesias Mayor** bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 13 de Julio de 2015

Fdo: Agustín Costa García

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Agustín Costa García, Catedrático de Química Analítica del Departamento de Química Física y Analítica, por haberme permitido realizar este Trabajo Fin de Máster bajo su dirección.

A Gabriel y a Julien por su continuo apoyo, por aconsejarme y guiarme a lo largo de este trabajo.

A mi familia y amigos por animarme y tranquilizarme a lo largo de este año y por apoyarme en todo momento.

## LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

A lo largo de la memoria se pueden encontrar las siguientes siglas y abreviaturas:

- **ChEt** (*Cholesterol Esterase*): Colesterol esterasa
- **ChOx** (*Cholesterol Oxidase*): Colesterol oxidasa
- **ECV**: Enfermedades Cardiovasculares
- **E<sub>ini</sub>**: *Potencial inicial*
- **E<sub>inv</sub>**: *Potencial de inversión*
- **E<sub>pa</sub>**: *Potencial de pico anódico*
- **E<sub>pc</sub>**: *Potencial de pico catódico*
- **E<sub>step</sub>**: *Potencial de escalón*
- **FADH<sub>2</sub>**: *Flavin Adenin Dinucleótido en su forma reducida*
- **HDL** (*High Density Lipoprotein*): Lipoproteína de alta densidad
- **HRP** (*Horseradish Peroxidase*): Peroxidasa de rábano silvestre
- **i<sub>pa</sub>**: *Intensidad de pico anódico*
- **i<sub>pc</sub>**: *Intensidad de pico catódico*
- **LDL** (*Low Density Lipoprotein*): Lipoproteína de baja densidad
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud
- **POCT** (*Point of Care Testing*): Dispositivos en cabecera del paciente
- **RSD** (*Relative Standard Deviation*): *Desviación estándar relativa*
- **SPCE** (*Screen Printed Carbon Electrode*): *Electrodo serigrafiado de carbono*
- **SPCnAuEs** (*Gold Nanostructured Screen Printed Carbon Electrodes*): *Electrodo serigrafiado de carbono nanoestructurado con Oro*
- **SPE** (*Screen Printed Electrode*): *Electrodo serigrafiado*
- **VLDL** (*Very Low Density Lipoprotein*): Lipoproteína de muy baja densidad

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	EL COLESTEROL .....	2
1.1.1.	Estructura y función.....	2
1.1.2.	Transporte a través del organismo.....	3
1.1.3.	Importancia clínica.....	4
1.1.4.	Determinación.....	5
1.2.	BIOSENSORES .....	7
1.2.1.	Diseño de un biosensor enzimático de colesterol .....	9
1.3.	ELECTRODOS SERIGRAFIADOS.....	13
1.3.1.	Tipos de electrodos serigrafados.....	14
1.4.	NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
3.	EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES.....	19
3.1.	INSTRUMENTACIÓN .....	20
3.2.	REACTIVOS Y DISOLUCIONES .....	22
3.2.1.	Reactivos.....	22
3.2.2.	Disoluciones reguladoras y otras disoluciones preparadas.....	22
3.3.	MATERIAL.....	23
4.	EXPERIMENTAL .....	24
4.1.	SELECCIÓN DEL POTENCIAL DE TRABAJO .....	26
4.2.	ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD.....	28
4.3.	DISEÑO FACTORIAL.....	31
4.4.	CALIBRADOS DE COLESTEROL LIBRE.....	35
4.5.	NANOESTRUCTURACIÓN CON ORO .....	40
4.5.1.	Influencia del potencial de nanoestructuración .....	40
4.5.2.	Influencia del tiempo de nanoestructuración .....	42
5.	CONCLUSIONES .....	45
6.	FUTURO DEL SENSOR.....	47
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	49
8.	ANEXOS .....	55
8.1.	ANEXO 1: DISEÑO FACTORIAL .....	56

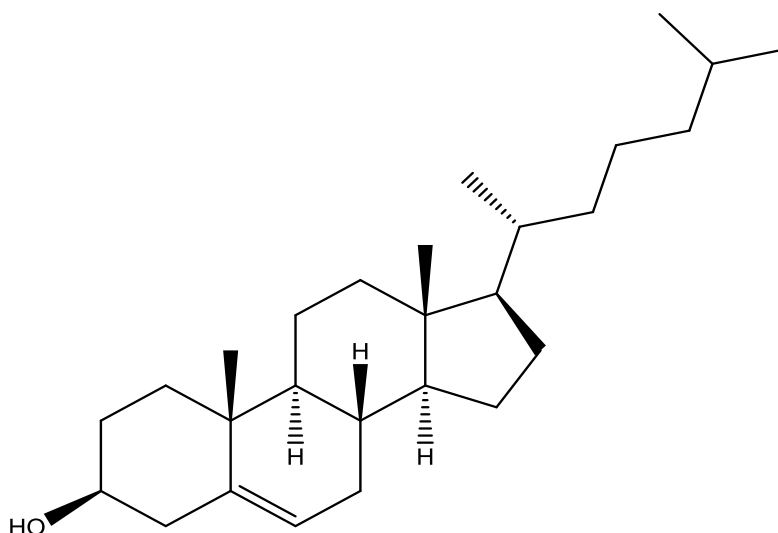
# 1.INTRODUCCIÓN

## 1.1. El colesterol

### 1.1.1. Estructura y función

El colest-5-en-3 $\beta$ -ol, comúnmente llamado colesterol, es el miembro más abundante y conocido de la familia de los esteroides y fue el primer esteroide que se aisló; lográndose su aislamiento en 1769 a partir de la vesícula biliar de cadáveres.

El colesterol fue descubierto en 1815 por el químico francés Michele Eugène Chevreul y su estructura se ha ido elucidando desde 1859. En 1888 Friedrich Reinitzer obtuvo la fórmula empírica exacta (C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O) de dicho compuesto, y no fue hasta 1930 cuando se estableció, mediante difracción de rayos X, la estructura que hoy se conoce (ver *Figura 1.1.1.*)<sup>1</sup>.



**Figura 1.1.1.** Estructura del colesterol.

El colesterol, tal y como se aprecia en la *Figura 1.1.1.*, es una molécula de perhidrociclopentanofenantreno que presenta varias sustituciones: un grupo hidroxilo en la posición C-3, una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6, dos radicales metilo en las posiciones C-10 y C-13 y una cadena alifática en la posición C-17. Esta estructura, en la que la parte apolar – constituida por los cuatro carbociclos y por los sustituyentes alifáticos – predomina frente al grupo polar hidroxilo, es la responsable de la baja solubilidad en agua del colesterol (0.095 mg/L a 30 °C)<sup>2</sup>.

En nuestro organismo el colesterol está presente en dos formas, libre (30 %) y esterificado (70 %), y puede proceder de la dieta (origen exógeno) o ser sintetizado por nuestras células (origen endógeno)<sup>3</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Este compuesto es sintetizado fundamentalmente por animales, aunque algunos organismos eucariotas como plantas y hongos también pueden sintetizar pequeñas cantidades del mismo.

El colest-5-en-3 $\beta$ -ol, el esteroles mayoritario en el hombre, forma parte de las membranas plasmáticas e intracelulares y es imprescindible para dar permeabilidad y fluidez a las mismas. El colesterol es asimismo un componente muy importante de nervios y neuronas cerebrales y juega un papel crucial en los sistemas inmune y nervioso. Además hace las funciones de precursor en la biosíntesis de hormonas esteroideas (estrógenos, aldosterona, progesteronas y glucocorticoides), ácidos biliares y vitamina D <sup>4</sup>.

### 1.1.2. Transporte a través del organismo

El colesterol circula con el torrente sanguíneo en el interior de unos complejos macromoleculares conocidos como lipoproteínas, pues su carácter hidrofóbico hace que sea insoluble en la sangre <sup>5</sup>.

Las lipoproteínas son agregados moleculares compuestos fundamentalmente por lípidos y proteínas que se clasifican en varios tipos según su grado de empaquetamiento, siendo las más importantes las de baja y las de alta densidad <sup>6</sup>.

Las lipoproteínas LDL (*Low Density Lipoprotein*) o de baja densidad son las encargadas de transportar el colesterol desde el hígado hasta los órganos o tejidos que lo necesiten para satisfacer sus funciones biológicas. Mientras que las lipoproteínas de alta densidad o HDL (*High Density Lipoprotein*) transportan el exceso de colesterol desde la periferia al hígado para su eliminación <sup>6</sup>.

Aproximadamente entre el 60 y el 80 % del colesterol total es transportado por las lipoproteínas LDL y entre el 15 y el 20 % por las HDL. El colesterol restante circula unido a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y a quilomicrones <sup>7</sup>.

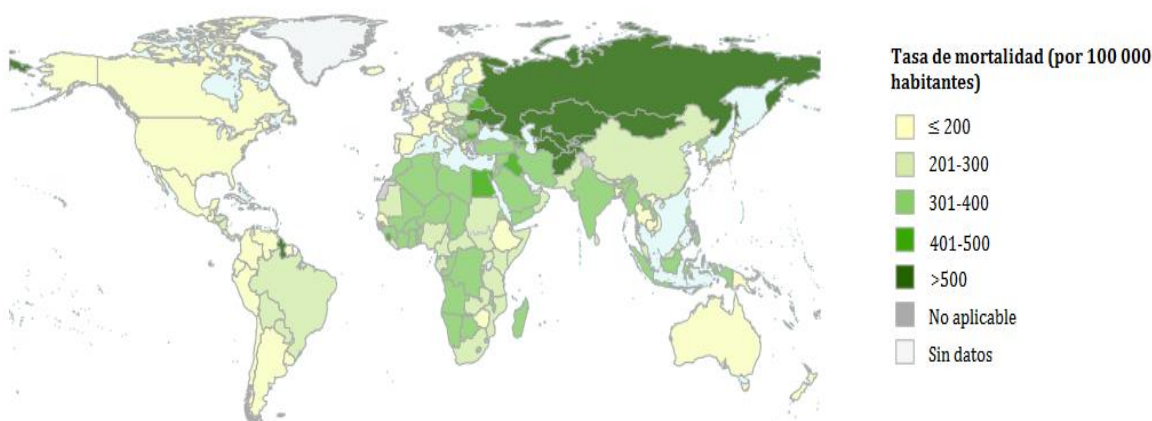
Comúnmente se habla de colesterol bueno o malo según sea transportado por lipoproteínas HDL o LDL respectivamente. Esto es una simplificación extrema e incorrecta científicamente, que hace pensar que sólo las lipoproteínas HDL son beneficiosas para la salud <sup>7</sup>.



### 1.1.3. Importancia clínica

El colesterol es un compuesto esencial para los mamíferos pero elevados niveles del mismo en el plasma no son beneficiosos para la salud. A pesar de no existir una sintomatología específica, una elevada concentración plasmática de colesterol se asocia con un mayor riesgo de sufrir enfermedades del sistema cardiovascular, fundamentalmente enfermedades cardiacas como angina de pecho y accidentes cerebrovasculares <sup>5</sup>.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las mayores amenazas de la sanidad a nivel global, debido a su incidencia, prevalencia y tasas de mortalidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el año 2012 murieron 17.5 millones de personas por esta patología, lo que representa un 31 % del total de defunciones registradas en el mundo en dicho año <sup>8</sup>.



**Figura 1.1.2.** Distribución mundial de la tasa de mortalidad estandarizada por ECV en 2000-2012 (Imagen modificada a partir de la existente en la página web de la OMS<sup>8</sup>)

En la *Figura 1.1.2.* se observa que la tasa de mortalidad por ECV es muy elevada en los continentes asiático y africano, mientras que en Europa dicha tasa es inferior. En concreto la tasa de mortalidad por ECV en el año 2012 en España fue de 96.8.

La Fundación Española del Corazón establece que el nivel de colesterol total en sangre (o colesterolemia) es óptimo si es inferior a 200 mg/dL y alto si supera los 240 mg/dL. Mientras que niveles de colesterol comprendidos entre 200 y 239 mg/dL constituyen el límite de riesgo <sup>9</sup>.

Uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares es la hipercolesterolemia y la prevalencia de esta patología en la población española es alta. Según la OMS en el año 2008 un 56.1 % de la población nacional con edad

## INTRODUCCIÓN

superior a veinticinco años tenía una colesterolemia igual o superior a 200 mg/dL y un 16.4 % igual o superior a 250 mg/dL.

La cuantificación del colesterol total presente en la sangre es de gran interés pues un nivel alto además de con las enfermedades cardiacas está directamente relacionado con otras enfermedades como son: diabetes mellitus, nefrosis, mixedema e ictericia obstructiva. Por otro lado, niveles bajos de colesterol están relacionados con enfermedades como hipotiroidismo, anemia y síndromes de mala absorción <sup>10</sup>.

Idealmente la concentración total de colesterol en sangre de un individuo sano debe ser superior a 140 mg/dL e inferior a 200 mg/dL. Asimismo en personas saludables la concentración de colesterol libre, sin esterificar, en sangre debe estar comprendida entre 40 y 85 mg/dL <sup>11</sup>.

### 1.1.4. Determinación

Desde que en 1872 el bioquímico y patólogo alemán Ernst Leopold Salkowski <sup>12</sup> describió la primera reacción de generación de color para la identificación de colesterol se ha desarrollado un gran número de métodos y procedimientos que permiten la determinación de dicho compuesto.

Tradicionalmente el colesterol se determinaba mediante métodos espectrofotométricos no enzimáticos, en los que se medía la absorción de luz de los compuestos coloreados generados a partir del analito. Uno de los métodos clásicos más utilizado es el basado en la reacción de Liebermann-Burchard, mediante la cual el colesterol reacciona con anhídrido acético y con ácido sulfúrico generando un ión pentaenílico con un máximo de absorción a 620 nm <sup>13</sup>.

Los métodos clásicos no enzimáticos no son adecuados para determinar el colesterol, pues la mayoría son inespecíficos y conllevan procedimientos complejos de extracción, saponificación y precipitación, que consumen bastante tiempo y dinero. Además presentan problemas de inestabilidad de los reactivos generadores de color.

Para la determinación de colesterol en fluidos biológicos también se han descrito análisis mediante cromatografía líquida-gaseosa <sup>14</sup> y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) <sup>15,16</sup>. Ambos métodos ofrecen mayor sensibilidad y selectividad que los métodos previamente comentados, pero no son adecuados para una detección rápida y de bajo coste.

## INTRODUCCIÓN

Los métodos enzimáticos - colorimétricos <sup>17,18</sup> y espectrofotométricos <sup>19,20</sup>- han desbancado a los métodos químicos gracias a su excelente especificidad. En la actualidad uno de los métodos más utilizados en los hospitales para la cuantificación del colesterol total es el método Trinder, un método espectrofotométrico enzimático en el que se genera un compuesto rojizo que absorbe radiación a 505 nm <sup>21</sup>.

Hoy en día la mayoría de las pruebas de rutina para la determinación de colesterol en sangre implican la toma de una muestra de sangre y el envío de la misma a un laboratorio para su análisis. Este análisis debe ser llevado a cabo por personal especializado y requiere emplear instrumentación a gran escala, lo que imposibilita la realización de determinaciones *in-situ* del nivel de colesterol en sangre por parte del paciente a nivel doméstico o por parte de médicos y/o enfermeras en las consultas o en las visitas a domicilio.

En las últimas décadas, debido al aumento de la tasa de mortalidad por enfermedades como aterosclerosis, infarto de miocardio y trombosis cerebral la población ha ido tomando conciencia sobre la importancia de monitorizar el nivel de colesterol en sangre. Esto junto con las tendencias actuales de miniaturización y descentralización de los análisis hace que exista una demanda creciente de desarrollo y fabricación de dispositivos selectivos, exactos, precisos, rápidos, portátiles, desechables y de bajo coste para determinar la concentración plasmática de colesterol.

El desarrollo, construcción y comercialización de biosensores para la determinación de colesterol con fines terapéuticos ha ido evolucionando en los últimos años, y hasta la fecha la mayoría de los dispositivos comerciales disponibles están basados en métodos colorimétricos <sup>22-26</sup>.

Algunos ejemplos de dispositivos existentes en el mercado para la medida de colesterol en sangre son: *CardioChek®* de Polymer Technology Systems Inc. (PS-003528 ER1 1005), *CholesTrak® Total Cholesterol Test* de AccuTech, LLC, USA (US Pat. No. 5340539), *Roche's AccuChek Instant Plus Cholesterol Test Strips* (US Pat. Nos. 6866675 y 4869249) y *Biosafe's Total Cholesterol Test Kit* (US Pat. No. 6040135).

## 1.2. Biosensores

El desarrollo y diseño de biosensores es un campo multidisciplinar que comenzó su andadura en 1962 con el desarrollo de un biosensor de glucosa <sup>27</sup>. Este campo está en constante evolución gracias a los progresos en química, física, bioquímica y biología molecular, que permiten la creación de biosensores para un amplio rango de analitos. Además, los avances en campos como la ingeniería y la microelectrónica permiten desarrollar transductores de menor tamaño y coste y que proporcionen mejores relaciones señal/ruido.

Los biosensores son herramientas analíticas de bajo coste y de fácil operación que ofrecen soluciones viables a algunos de los problemas planteados por la industria sanitaria de la sociedad actual <sup>28</sup>. Estos dispositivos se caracterizan por su especificidad, lo que hace de ellos herramientas ideales para trabajar en muestras con matrices complejas como los fluidos corporales. Además representan un área de la tecnología emergente, que es ideal para los análisis POCT (Point-Of-Care-Testing).

Los biosensores, un tipo de sensores químicos, son dispositivos compuestos por un elemento de reconocimiento de origen biológico conocido como bioreceptor y un transductor físico-químico. Estos sistemas combinan la selectividad del bioreceptor con el poder procesador de la microelectrónica de los transductores.



**Figura 1.2.1.** Representación esquemática de un biosensor.

El principio de funcionamiento de los biosensores es, tal y como se ilustra en la *Figura 1.2.1.*, el reconocimiento específico del analito por el bioreceptor inmovilizado. Este proceso de reconocimiento molecular provoca un cambio físico-químico que el transductor convierte en una señal eléctrica cuantificable.

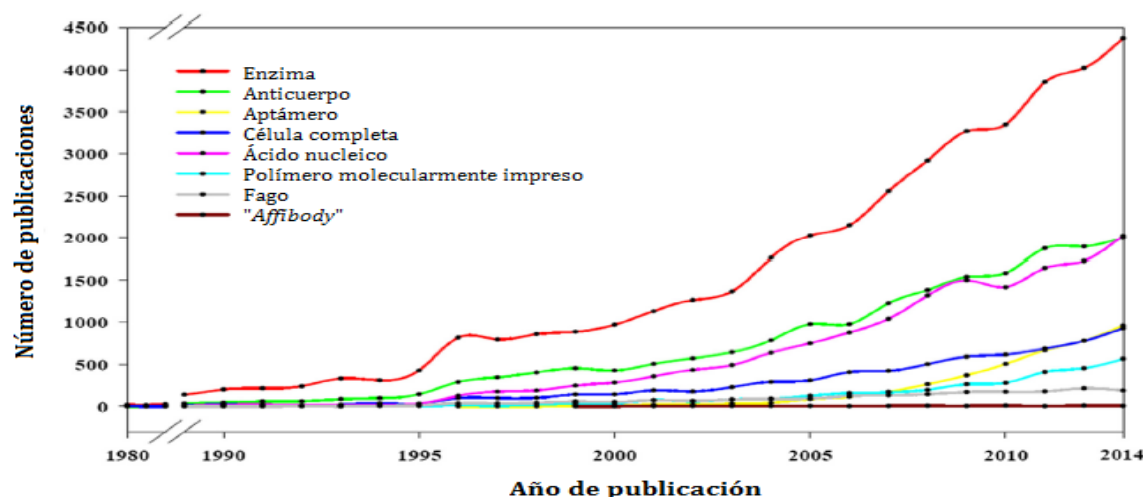
## INTRODUCCIÓN

Los biosensores pueden clasificarse en diferentes tipos según la naturaleza del bioreceptor: anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, células, secciones de tejido, etc. Se habla de biosensores de afinidad cuando el elemento de reconocimiento es un reactivo inmunológico (inmunobiosensor) o un ácido nucleico (genobiosensor). Mientras que cuando el elemento de reconocimiento son enzimas, células o tejidos los biosensores se conocen como catalíticos.

Los biosensores también se pueden catalogar en función de la naturaleza del transductor y del tipo de señal analítica que generan. En la construcción de un sensor pueden emplearse transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos o térmicos. Los transductores electroquímicos – que a su vez se subdividen en amperométricos, potenciométricos y conductimétricos - son los más frecuentes y numerosos.

Para diseñar y construir un biosensor, en primer lugar hay que seleccionar una biomolécula, que interaccione con una alta afinidad con el analito diana, como elemento de reconocimiento.

Una de las biomoléculas más empleadas como elemento de reconocimiento son las enzimas <sup>29</sup>(ver *Figura 1.2.2*). Las enzimas son reactivos de un precio relativamente alto que se caracterizan por presentar una selectividad elevada respecto a un analito dado y por proporcionar una respuesta rápida.



**Figura 1.2.2.** Progresión del número de publicaciones asociadas con diferentes elementos de reconocimiento (*Figura modificada a partir de la Fig 1<sup>29</sup>*)

El principal inconveniente de las enzimas es su inestabilidad en disolución, pero en los biosensores este problema se minimiza ya que las enzimas no están en disolución sino inmovilizadas sobre la superficie del transductor.

## INTRODUCCIÓN

De manera tradicional en los biosensores enzimáticos se empleaba únicamente una enzima, pero los avances en el desarrollo de los biosensores han hecho posible trabajar con sistemas multienzimáticos en los que se inmovilizan varias enzimas en una misma plataforma.

Un ejemplo de sensor multienzimático, concretamente bienzimático, es el sensor para la determinación de colesterol total <sup>30,31</sup>. En este sensor además de la enzima específica del colesterol (colesterol oxidasa) se emplea otra enzima (colesterol esterasa) que hidroliza los ésteres de colesterol.

Tras haber seleccionado el elemento de reconocimiento es necesario escoger el soporte sólido o matriz sobre el que inmovilizarlo, así como la metodología para llevar a cabo el proceso de fijación: adsorción física, atrapamiento en membranas permeables, inclusión en matrices poliméricas, uniones covalentes, entrecruzamiento.

En el desarrollo de biosensores de colesterol se ha empleado una gran variedad de matrices, desde superficies de carbón o metálicas modificadas con polímeros conductores <sup>32,33</sup> o con nanomateriales - como nanotubos de carbono <sup>34,35</sup> o nanopartículas <sup>36,37</sup>- hasta películas sol-gel <sup>38</sup> o hidro-gel <sup>39</sup> y monocapas autoensambladas <sup>40</sup>. Otras matrices utilizadas han sido: membranas de acetato de celulosa <sup>41</sup>, fibra <sup>42</sup>, cristal <sup>43</sup>, discos rotatorios <sup>44</sup>.

Al igual que sucede con la mayoría de sensores, en los biosensores de colesterol los sistemas de transducción más habituales son los electroquímicos; siendo las técnicas electroquímicas más utilizadas para la detección la amperometría <sup>31,34,45-47</sup> y la voltamperometría cíclica <sup>36,48,49</sup>.

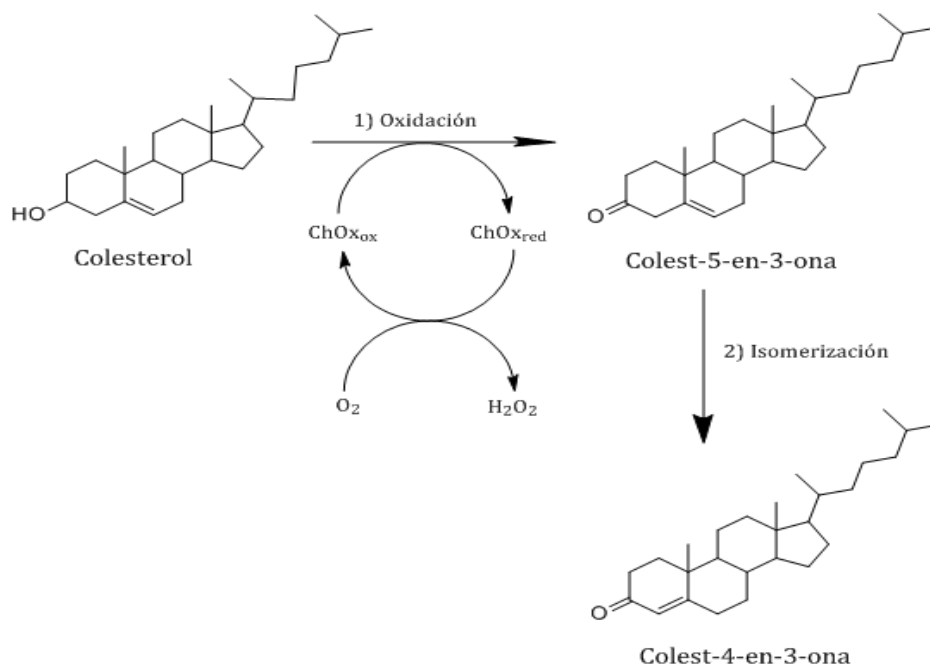
Aunque la transducción electroquímica sea la predominante en los biosensores de colesterol, existen algunas publicaciones en las que se utilizan otro tipo de transductores, como los ópticos <sup>50</sup> o los de onda acústica <sup>11</sup>.

### **1.2.1. Diseño de un biosensor enzimático de colesterol**

Puesto que el colesterol está presente en la sangre tanto libre como en forma de ésteres es posible desarrollar dos tipos de sensores de colesterol: uno que permita determinar el colesterol únicamente en su forma libre y otro cuyo propósito sea cuantificar el colesterol total presente en una muestra.

## INTRODUCCIÓN

En el diseño de ambos sensores hay una enzima clave, la colesterol oxidasa (ChOx). Esta enzima, del tipo alcohol oxidasa/deshidrogenasa, es una flavoproteína que en presencia de oxígeno cataliza dos reacciones (ver *Figura 1.2.3*).



**Figura 1.2.3.** Mecanismo de reacción catalizado por la enzima ChOx.

En primer lugar la colesterol oxidasa cataliza la deshidrogenación del grupo hidroxilo en posición C-3 del colesterol, y al mismo tiempo su cofactor en forma reducida (FADH<sub>2</sub>) transfiere electrones al oxígeno molecular, formándose peróxido de hidrógeno. La colesterol oxidasa además cataliza la isomerización  $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$  del compuesto carbonílico formado ( la colest-5-en-3-ona) <sup>51</sup>.

Para diseñar el biosensor se selecciona la transducción electroquímica como sistema de transducción. En los biosensores electroquímicos basados en la colesterol oxidasa las estrategias de detección más sencillas son:

- Medida del oxígeno consumido, empleando un sensor de oxígeno de Clark.
- Detección amperométrica del peróxido de hidrógeno generado.

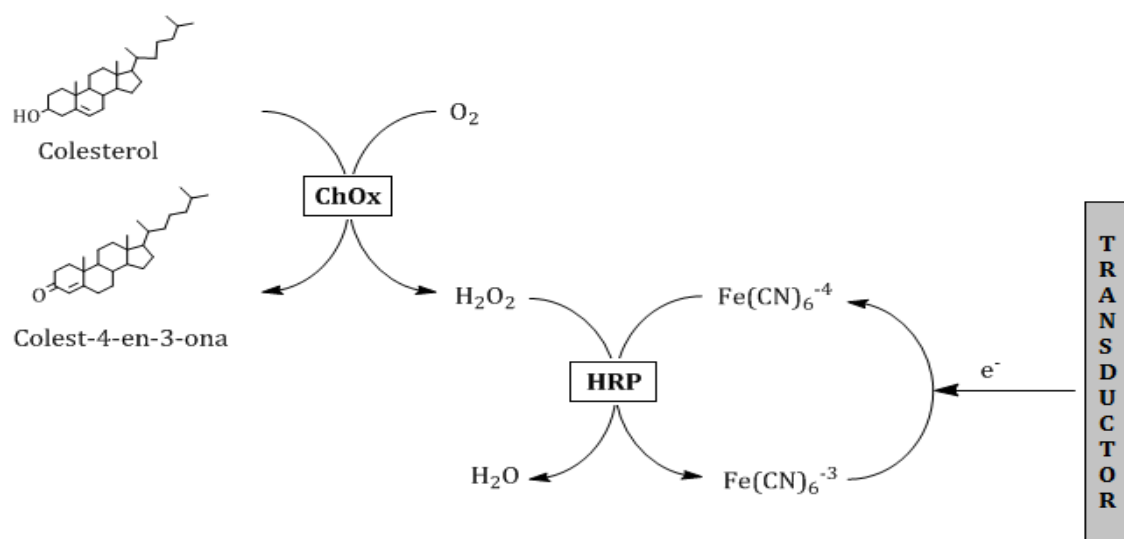
Sin embargo, dados los inconvenientes que presentan, estas estrategias no son las más adecuadas. En el primer caso los resultados dependen del contenido de oxígeno de la muestra, mientras que en el segundo es bastante probable que haya interferencias, pues la detección amperométrica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiere aplicar potenciales

## INTRODUCCIÓN

que pueden inducir la oxidación simultánea de otras especies electroactivas, como el ácido ascórbico o el ácido úrico, típicamente presentes en muestras biológicas <sup>31</sup>.

Con el fin de minimizar la contribución de especies interferentes se han estudiado varios enfoques que permiten reducir el elevado potencial a fijar en la detección: coinmovilización de peroxidasa de rábano silvestre (HRP) con colesterol oxidasa <sup>52,53</sup>, deposición de capas metálicas <sup>54</sup>, modificación de la superficie del electrodo con sustancias capaces de aumentar el área efectiva del mismo, como son nanotubos de carbono <sup>55</sup> o nanopartículas metálicas <sup>56,57</sup>, sustitución del aceptor natural de electrones ( $O_2$ ) por un mediador artificial <sup>58,59</sup>.

En este Trabajo Fin de Máster se ha optado por combinar dos de las opciones comentadas, siendo el biosensor a desarrollar un sistema bienzimático oxidasa-peroxidasa que utiliza el par redox ferrocianuro/ferricianuro como mediador de transferencia electrónica.



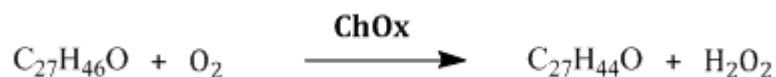
**Figura 1.2.4.** Esquema de reacciones del biosensor propuesto para determinar colesterol.

En la *Figura 1.2.4* se recoge el esquema de reacciones en el que se basa el sensor a construir. En el diseño propuesto sobre la superficie del transductor se inmovilizan las enzimas ChOx y HRP y el mediador en su forma reducida ( $Fe(CN)_6^{-4}$ ).

La primera reacción que se produce al poner en contacto la fase sensora con una disolución de muestra es la oxidación, catalizada por la colesterol oxidasa, de colesterol ( $C_{27}H_{46}O$ ) a colest-4-en-3-ona ( $C_{27}H_{44}O$ ).



## INTRODUCCIÓN



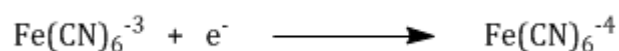
**Ecuación 1.** *Reacción de oxidación del colesterol, catalizada por la ChOx.*

El peróxido de hidrógeno generado en la reacción catalizada por la ChOx (ver *Ecuación 1*) se reduce sobre la superficie del transductor, a la vez que se oxida la forma reducida del mediador; siendo la reacción redox que se produce la que se muestra en la *Ecuación 2*.



**Ecuación 2.** *Reacción entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$  catalizada por la HRP.*

En la reacción catalizada por la HRP se genera ferricianuro, y este compuesto se reducirá (ver *Ecuación 3*) sobre la superficie del electrodo mediante una amperometría

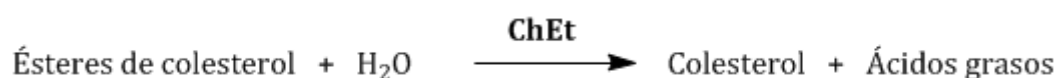


**Ecuación 3.** *Reducción de ferricianuro a ferrocianuro.*

En el sensor amperométrico a desarrollar la señal analítica es la intensidad de corriente del proceso de reducción del ferricianuro generado. Dicha intensidad de corriente es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

El esquema de reacciones comentado puede emplearse para construir un sensor de colesterol libre pero también para un sensor de colesterol total, si se añade una etapa previa de transformación de los ésteres de colesterol.

Para la cuantificación del colesterol total es necesario incorporar al diseño del biosensor una tercera enzima, la colesterol esterasa (ChEt). Esta serín-proteasa convierte los ésteres de colesterol en colesterol (ver *Ecuación 4*) y el colesterol liberado se incorpora junto con el colesterol libre de la muestra al esquema de reacciones mostrado en la *Figura 1.2.4*.



**Ecuación 4.** *Hidrólisis de los ésteres de colesterol catalizada por la enzima ChEt*

### 1.3. Electroodos serigrafiados

Una de las principales tendencias de la electroquímica es el desarrollo de sistemas miniaturizados y desechables, y uno de los enfoques más atractivos para lograrlo es la serigrafía.

La tecnología de serigrafía o de capa gruesa (*thick film*), una adaptación de la industria de la microelectrónica, se introdujo en el mundo hace más de mil años y comenzó a aplicarse a la fabricación de biosensores hacia la mitad de los años 80 <sup>61</sup>. Esta técnica permite una producción eficiente y a gran escala de electrodos planos sólidos, miniaturizados, mecánicamente robustos y de bajo coste. Además es una técnica muy versátil, que permite desarrollar diseños y configuraciones propias de electrodos.

El fundamento de la serigrafía es la deposición secuencial de tintas conductoras o no conductoras sobre un sustrato sólido inerte, utilizando una pantalla o malla para definir la geometría de los electrodos <sup>62</sup>.

Las principales ventajas que presentan los electrodos serigrafiados (SPE, *Screen Printed Electrodes*) respecto a los electrodos convencionales son: bajo coste, pequeñas dimensiones y variedad de diseños. Además los SPE pueden producirse en masa de manera automatizada.

Gracias a su pequeño tamaño, son portátiles y aptos para determinaciones *in-situ*. Asimismo, son ideales para determinaciones en las que la cantidad de muestra está limitada, pues el volumen requerido es del orden de microlitros.

El coste relativamente bajo de los SPE hace que puedan ser desechados tras su uso, evitando así algunos inconvenientes de los electrodos tradicionales como el efecto memoria o los pasos de limpieza, en ocasiones ineficientes, y que consumen tiempo.

En la construcción del biosensor se emplearán electrodos serigrafiados como transductor, debido a las buenas características electroanalíticas que han mostrado este tipo de electrodos en diversos sistemas de análisis tanto clínicos como medioambientales <sup>63</sup>

### 1.3.1. Tipos de electrodos serigrafiados

Dentro de la gran variedad de electrodos serigrafiados existentes, los de carbono (SPCE, *Screen Printed Carbon Electrodes*) son muy atractivos para la construcción de sensores electroquímicos. El gran interés por los SPCEs se debe tanto al bajo coste del carbono como a sus buenas características electrónicas: amplia ventana de potenciales, baja resistividad eléctrica y bajas corrientes de fondo.

Sin embargo, el carbono es un material químicamente inerte, difícil de modificar químicamente. Esto conlleva una baja capacidad de los SPCEs para retener material biológico y puede suponer problemas en el funcionamiento de los biosensores.

Otro material usado habitualmente en la construcción de biosensores electroquímicos es el oro. Este metal noble tiene un coste superior al del carbono y peores cualidades como material electrónico, pues no es fácilmente oxidable ni reducible en un amplio rango de potenciales. El oro es un material muy interesante pues no es inerte químicamente y las proteínas pueden inmovilizarse, directamente a través de sus residuos de cisteína, sobre superficies de dicho material <sup>64</sup>.

El empleo de superficies continuas de oro además de un elevado coste tiene el inconveniente de que se establece un elevado número de interacciones con el material proteico. Esto puede conllevar cambios drásticos en la estructura del material quimisorbido y una orientación poco selectiva.

Una posible solución al problema comentado pasa por utilizar nanoestructuras de oro, pues al reducir las dimensiones también lo hace el número de interacciones con el material proteico. Las nanoestructuras de oro tienen las mismas propiedades de reactividad que el oro a gran escala, pero ofrecen una mayor biocompatibilidad pues a nivel nanométrico el proceso de quimisorción tiene menor influencia en la estructura del material proteico quimisorbido.

A lo largo de este Trabajo Fin de Máster se utilizarán SPCEs y también electrodos serigrafiados de carbono nanoestructurados con Oro (SPCnAuEs), pues para construir sensores electroquímicos parece interesante disponer simultáneamente de las propiedades electrónicas de los SPCEs y de las propiedades químicas de las nanoestructuras de oro.

### 1.4. Nanopartículas de Oro

Las nanopartículas, tanto de oro como de otros metales, son clusters compuestos por un número variable de átomos (100-1000) y con dimensiones del orden de los nanómetros. Estos materiales poseen propiedades físicas – ópticas, magnéticas, eléctricas- y químicas únicas y muy diferentes a las que presenta el material macroscópico de igual composición <sup>65</sup>.

Las propiedades únicas de las nanopartículas de oro, como su elevada área superficial, proporcionan un ambiente adecuado para la inmovilización de biomoléculas al permitir que la concentración de la especie inmovilizada sea considerablemente mayor respecto a la inmovilización sobre superficies planas. Esto hace que las nanoestructuras de oro sean ampliamente utilizadas en la construcción de biosensores electroquímicos; obteniéndose mejores rendimientos analíticos que en otros diseños de biosensores <sup>66</sup>.

La excelente conductividad de las nanopartículas de oro hace que sean adecuadas para actuar como “cables electrónicos”, promoviendo la transferencia electrónica entre el elemento biológico y la superficie electródica. Esta propiedad de las nanopartículas proporciona mayores sensibilidades y permite reducir los sobrepotenciales de muchas reacciones de interés, como la oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>67</sup>.

En la bibliografía existen numerosas metodologías para sintetizar nanopartículas de oro sobre superficies electródicas, pero la que mejor resultado ha dado en nuestro grupo de investigación es la generación electroquímica *in-situ* de las nanopartículas.

La deposición electroquímica es un método rápido y adecuado para la preparación de nanopartículas de oro sobre superficies de sustratos conductores, pues el mecanismo de electrodeposición es muy similar a la cristalización y permite la electrodeposición de cristales con dimensiones en la escala nanométrica <sup>68</sup>.

Las técnicas electroquímicas permiten una modificación rápida, sencilla, eficaz y reproducible de la superficie electródica con nanopartículas de oro. Además existe una gran variedad de métodos que se pueden aplicar para generar nanopartículas: deposición a potencial controlado, deposición a intensidad de corriente constante, aplicación de pulsos de potencial.

## INTRODUCCIÓN

El método más común para electrodepositar nanopartículas de oro es la aplicación de un potencial constante durante un tiempo determinado a una disolución ácida de tetracloroaurato <sup>69</sup>. Durante el proceso de electrodeposición, el Au (III) se reduce a oro nativo [Au(O)] y se deposita en la superficie del electrodo, haciendo que dicho electrodo pase a tener las propiedades y ventajas de las nanopartículas.

## **2.OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Este trabajo se incluye dentro de una de las líneas de investigación de la empresa Healthsens S.L, cuyo objetivo es desarrollar, producir y comercializar un sensor enzimático electroquímico para determinar colesterol total en sangre periférica.

Para desarrollar el biosensor de colesterol total son necesarias varias etapas. Una de ellas consiste en desarrollar un biosensor para colesterol libre usando como transductor electrodos serigrafados (monosensores). La consecución de dicha etapa es el objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster.

Este objetivo principal puede dividirse en los siguientes objetivos específicos:

- Selección del potencial a fijar en la construcción del sensor con detección amperométrica. Para ello se estudiará el comportamiento electroquímico del par redox ferrocianuro/ferricianuro en el transductor de interés.
- Estudio de la metodología a seguir en la construcción del biosensor y elección del tiempo óptimo de medida. En este apartado se evaluará la respuesta analítica obtenida al construir el biosensor empleando diferentes órdenes de deposición de los reactivos. Además se seleccionará el tiempo de medida que proporcione la mejor señal analítica, considerando tanto el criterio de sensibilidad como el de reproducibilidad.
- Análisis de la influencia de los factores involucrados en la construcción del sensor en la señal analítica. Para lograr la consecución de este objetivo se hará un diseño factorial usando el programa Minitab®, el cual mediante un desarrollo estadístico proporcionará información sobre la dependencia existente entre cada uno de los factores y la señal analítica.
- Optimización de las condiciones analíticas. Se ensayarán varias combinaciones de los reactivos, construyendo en cada uno de los casos un calibrado con patrones de colesterol de diversas concentraciones.
- Evaluación del empleo de electrodos serigrafados de carbono nanoestructurados con oro como transductor.

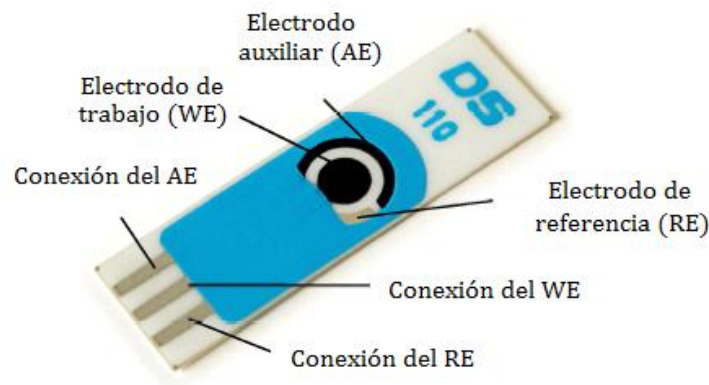
# **3.EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES**



### 3.1. Instrumentación

En el desarrollo de este trabajo se hizo uso de un bipotenciostato  $\mu$ SAT 200 (S/N: ST40010022) conectado a un ordenador. Tanto el bipotenciostato como el software Dropview 200 que controla el mismo fueron suministrados por DropSens (Oviedo, España).

Los electrodos serigrafiados de Carbono empleados a lo largo de este proyecto han sido suministrados por DropSens. En la *Figura 3.1.1* se muestra una representación esquemática de dichos electrodos.



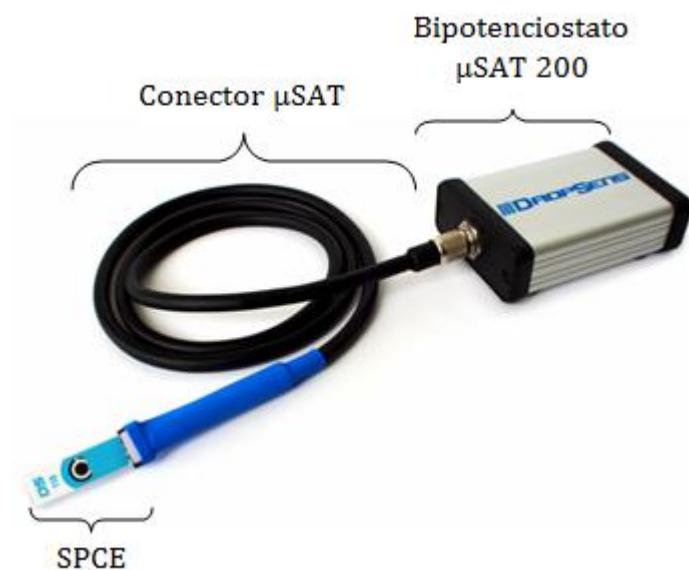
**Figura 3.1.1.** Electrodo serigrafiado de carbono (modelo DRP 110) de DropSens.

Los electrodos serigrafiados DropSens presentan una configuración convencional de tres electrodos que están serigrafiados sobre un sustrato cerámico, un soporte de alúmina, de dimensiones 3.4 x 1.0 x 0.05 cm (largo x ancho x alto).

El electrodo de trabajo es circular (diámetro 4 mm) y está constituido, al igual que el electrodo auxiliar, por una tinta de carbono. Mientras que el electrodo de referencia es un pseudo-electrodo de referencia de plata, al igual que los contactos eléctricos.

Las tarjetas están recubiertas con una capa aislante que deja expuestos los contactos eléctricos y un área de trabajo que hace las funciones de celda electroquímica, con un volumen de aproximadamente 50  $\mu$ L.

Para conectar los electrodos al potenciostato se empleó un cable conector  $\mu$ SAT modelo CAST de DropSens. La conexión entre el bipotenciostato y los electrodos serigrafiados de carbono se ilustra en la *Figura 3.1.2*.



**Figura 3.1.2.** *Interfase electrodo-potenciostato*

Además en el transcurso del proyecto se utilizó:

- Balanza analítica ( $\pm 0.001$  g) Acculab modelo VIC-303 del grupo Sartorius (Goettingen, Alemania).
- pH-metro Docu-pHmeter de Sartorius (Goettingen, Alemania).
- Agitador Vortex Mixer modelo F202A0175 de VELP Scientifica (Usmate, Italia).
- Baño termostático IDL-AG5 de Labolan (Navarra, España).

## 3.2. Reactivos y disoluciones

### 3.2.1. Reactivos

Los reactivos empleados en el transcurso de este proyecto son:

- Ferrocianuro potásico trihidratado (ref. P9387) de Sigma Aldrich (Estados Unidos)
- Colesterol (ref. C8667) de Sigma Aldrich (Estados Unidos)
- Triton™ X-100 (ref. X100) de Sigma Aldrich (Estados Unidos).
- Peroxidasa de rábano silvestre (HRP; ref. HRP4C) de BBI Solutions (Cardiff, Reino Unido)
- Colesterol oxidasa (ChOx; ref. CO5F) de BBI Solutions (Cardiff, Reino Unido)
- Agua ultrapura obtenida con un sistema de purificación Direct Q-5 ChemLabor de Millipore (Darmstadt, Alemania)
- Tabletas de disolución reguladora de fosfatos (Dulbecco A) de Oxoid (Hampshire, Inglaterra)
- Ácido tetracloroaúrico (III) trihidratado de Merck (Darmstadt, Alemania)
- Ácido clorhídrico fumante 37 % de Scharlau (Barcelona, España)

### 3.2.2. Disoluciones reguladoras y otras disoluciones preparadas

Las disoluciones de ferrocianuro potásico se prepararon en agua Milli-Q, mientras que las disoluciones de enzimas, HRP y ChOx, en PBS 0.1 M pH 6 y 7 respectivamente.

La disolución madre de colesterol se preparó disolviendo, durante tres días a 65 °C en un baño termostatzado, el colesterol en PBS 0.1 M pH 7.5 y un 7,14 % de Triton™ X-100. Los patrones de colesterol se prepararon por dilución con PBS 0.1 M pH 7.5 a partir de la disolución madre.

Para la nanoestructuración con Oro se utilizó  $AuCl_4^-$  1 mM preparado diariamente por dilución con HCl 0.1 M a partir de  $AuCl_4^-$  10 mM en HCl 2 M.

### 3.3. Material

El material utilizado a lo largo de este trabajo ha sido:

- Material de vidrio de calidad analítica.
- Tubos Eppendorf (Hamburgo, Alemania) desechables de 1.5 mL de base cónica.
- Tubos tipo Falcón cónicos de 50 mL
- Micropipetas de 10, 20, 100 y 1000  $\mu\text{L}$  de VWR International (Pensilvania, Estados Unidos).

# **4. EXPERIMENTAL**

## EXPERIMENTAL

En primer lugar comentar que este proyecto se enmarca dentro de una de las líneas de investigación de la empresa Healthsens S.L, *spin-off* del Hospital Universitario Central de Asturias, y del grupo de investigación Inmuno electroanálisis de la Universidad de Oviedo, dirigido por el catedrático de Química Analítica D. Agustín Costa García.

Dado que este Trabajo Fin de Máster forma parte de un desarrollo ya comenzado, existen diversos parámetros que han sido previamente optimizados.

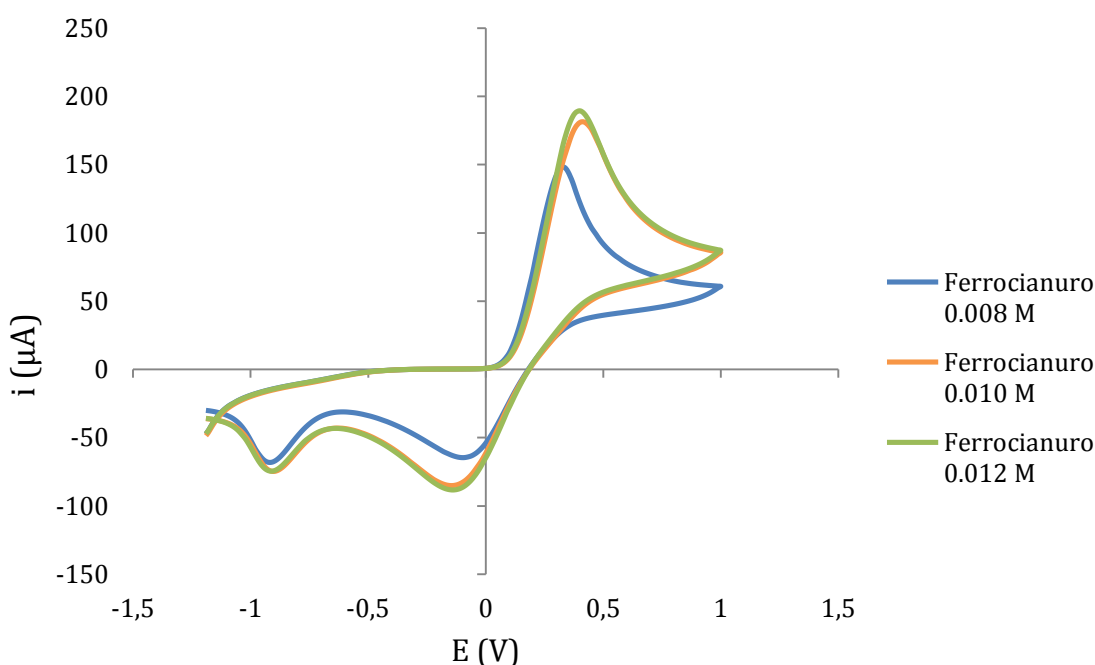
#### 4.1. Selección del potencial de trabajo

Tal y como se ha comentado en la *Introducción*, en el biosensor amperométrico a desarrollar la reacción de reducción de ferricianuro a ferrocianuro es el proceso redox en el que se fundamentan las medidas.

Con el fin de seleccionar el potencial de trabajo se estudió el comportamiento electroquímico del par redox  $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$  mediante voltamperometría cíclica. Este estudio se hizo empleando disoluciones acuosas de ferrocianuro potásico de tres concentraciones diferentes: 0.008, 0.010 y 0.012 M.

Para cada nivel de concentración se registraron cinco voltamperogramas entre  $-1.2$  y  $+1.0$  V con una velocidad de barrido de  $0.1$  V/s y un escalón de potencial de  $0.01$  V. En cada caso se depositaron  $40$   $\mu$ L de la disolución acuosa de ferrocianuro sobre la superficie de un SPCE.

En la *Figura 4.1.1* se recogen los voltamperogramas cíclicos promedio obtenidos para los tres niveles de concentración de ferrocianuro ensayados.

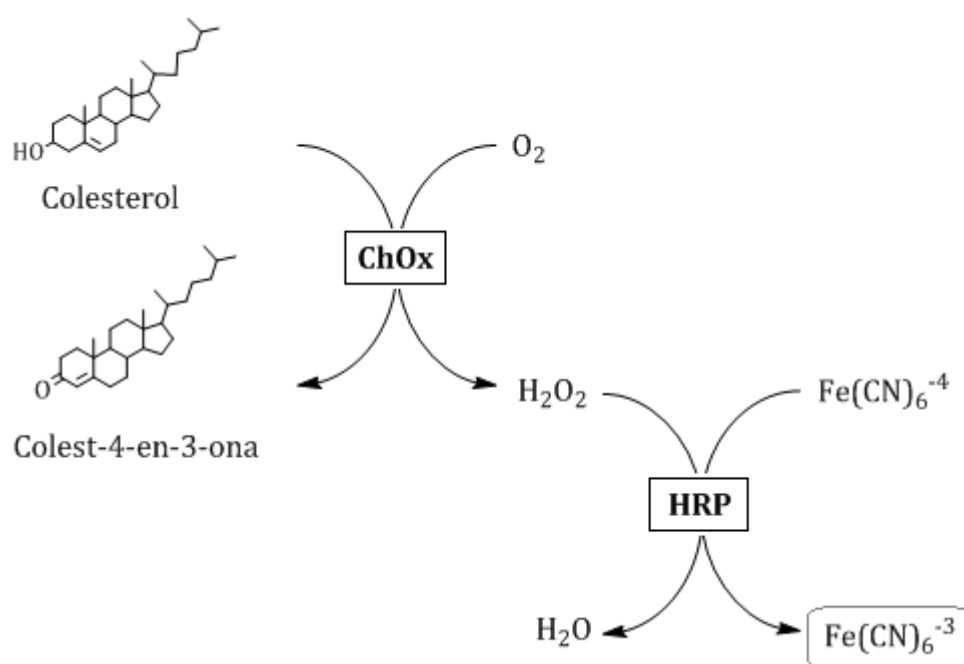


**Figura 4.1.1.** Voltamperogramas cíclicos [ $E_{ini}$  :  $-1.2$  V;  $E_{inv}$  :  $+1.0$  V;  $E_{step}$ :  $0.01$  V; Vel:  $0.1$  V/s] promedio de  $Fe(CN)_6^{4-}$  (ac) en SPCEs.

## EXPERIMENTAL

En la *Figura 4.1.1.* se aprecia que el potencial de pico catódico es negativo:  $(-0.10 \pm 0.01) V$  ,  $(-0.15 \pm 0.02) V$  y  $(-0.14 \pm 0.01) V$  para las disoluciones acuosas de ferrocianuro 0.008 , 0.010 y 0.012 M respectivamente.

En base a los potenciales de pico catódico y teniendo en cuenta los voltamperogramas cíclicos de la *Figura 4.1.1.* se decidió fijar el potencial de medida en  $-0.3 V$ , ya que al trabajar con un potencial más negativo que el de pico catódico se garantizará la reducción total del ferricianuro generado (ver *Figura 4.1.2.*).



**Figura 4.1.2.** Esquema de reacciones de la síntesis de ferricianuro en el sensor a desarrollar.



## 4.2. Estudio de reproducibilidad

Una vez fijado el potencial de medida se realizaron tres ensayos (A-C), variando la manera y el orden de depositar el mediador y las enzimas sobre la superficie del transductor.

El objetivo de este estudio es seleccionar las condiciones más reproducibles y que proporcionen las mejores señales, con el fin de emplear las mismas en los experimentos posteriores.

En todos los ensayos se depositó la misma cantidad de mediador y las mismas unidades de enzimas sobre la superficie del transductor. Estos parámetros se seleccionaron en función de datos obtenidos previamente por Healthsens S.L. La metodología seguida en los diferentes ensayos es la que se detalla a continuación:

➤ Ensayo A (Mezcla de mediador y enzimas)

Sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de una mezcla preparada combinando 20  $\mu\text{L}$   $K_4Fe(CN)_6$  0.1 M, 40  $\mu\text{L}$  HRP 3000 U/mL y 40  $\mu\text{L}$  ChOx 750 U/mL. Tras la deposición de la mezcla de reactivos sobre el electrodo, se dejó secar éste a temperatura ambiente durante al menos treinta minutos.

➤ Ensayo B (1º: mediador; 2º: mezcla de enzimas)

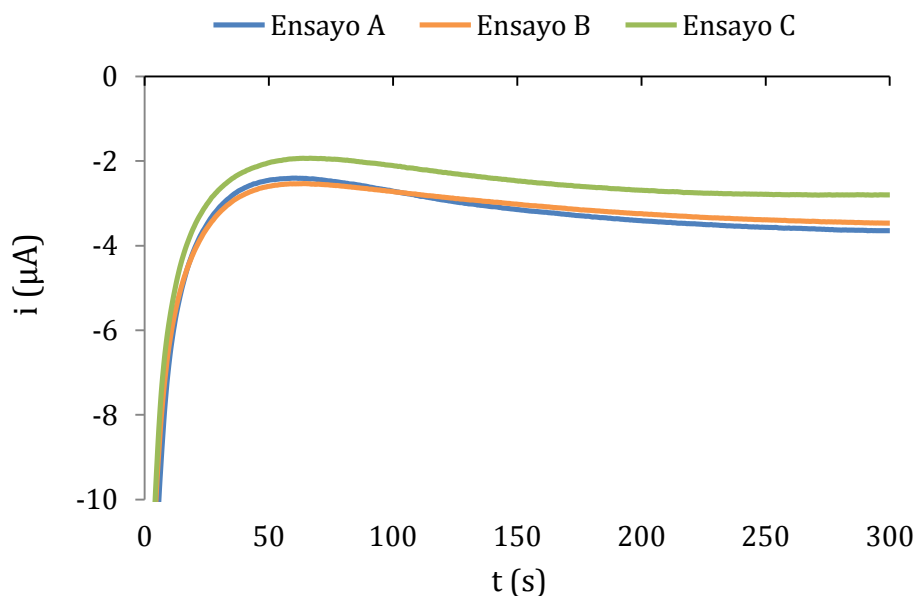
En este caso sobre la superficie del electrodo de trabajo se depositó 1  $\mu\text{L}$  de  $K_4Fe(CN)_6$  0.1 M y se dejó secar durante veinte minutos. Pasado este tiempo se comprobó que el electrodo estaba seco y se depositaron sobre el mismo 4  $\mu\text{L}$  de una disolución preparada mezclando volúmenes iguales de las disoluciones de enzimas (HRP 3000 U/mL y ChOx 750 U/mL). Al igual que en el ensayo A se dejó secar el electrodo durante treinta minutos a temperatura ambiente.

➤ Ensayo C (1º: mezcla de enzimas; 2º: mediador)

Este ensayo es análogo al B tanto en las disoluciones utilizadas como en los volúmenes empleados, pero varía el orden de deposición de los reactivos. En este caso se depositó en primer lugar la mezcla de enzimas y una vez seco el electrodo se depositó la disolución de ferrocianuro potásico.

## EXPERIMENTAL

Para cada uno de los ensayos se utilizaron doce SPCEs. Una vez depositado el mediador y las enzimas y tras la etapa de secado se depositaron sobre el electrodo 40  $\mu\text{L}$  de una disolución de colesterol de 200 mg/dL, a la que se le aplicó un potencial de  $-0.3\text{ V}$  durante 300 segundos. Los amperogramas promedio correspondientes a cada ensayo se recogen en la *Figura 4.2.1*.



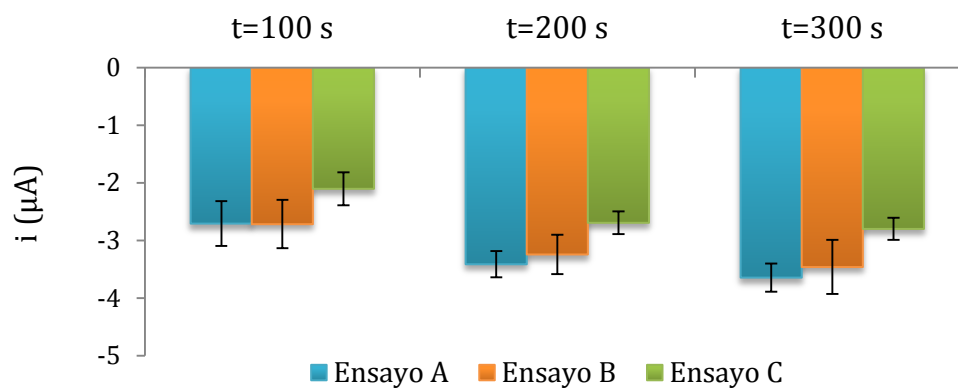
**Figura 4.2.1.** Amperogramas [AD:  $-0.3\text{ V}$  300 s, intervalo: 5 s] promedio de los ensayos A-C.

En cada amperograma se midió la intensidad de la señal a tres tiempos diferentes: 100, 200 y 300 segundos (ver *Tabla 4.2.1*.) En la *Figura 4.2.2*, se representan las intensidades promedio medidas a dichos tiempos en cada uno de los ensayos.

**Tabla 4.2.1.** Intensidades promedio y desviaciones estándar relativas correspondientes a las medidas hechas a tres tiempos (100, 200 y 300 s) en los amperogramas [AD:  $-0.3\text{ V}$  300 s, intervalo: 5 s] de los ensayos A-C.

		t=100 s	t=200 s	t=300 s
Ensayo A	$i_m$ ( $\mu\text{A}$ )	$-2.7 \pm 0.4$	$-3.4 \pm 0.3$	$-3.6 \pm 0.3$
	RSD (%)	14.34	6.73	6.71
Ensayo B	$i_m$ ( $\mu\text{A}$ )	$-2.7 \pm 0.4$	$-3.2 \pm 0.4$	$-3.4 \pm 0.5$
	RSD (%)	15.43	10.57	13.53
Ensayo C	$i_m$ ( $\mu\text{A}$ )	$-2.1 \pm 0.3$	$-2.7 \pm 0.2$	$-2.8 \pm 0.2$
	RSD (%)	13.65	7.29	6.81

## EXPERIMENTAL



**Figura 4.2.2.** Diagrama de columnas de las intensidades promedio medidas a 100, 200 y 300 s en los amperogramas [AD: -0.3 V 300 s, intervalo: 5 s] de los ensayos A-C

Se observa que en las condiciones del ensayo C se consigue la menor señal analítica, y por ello, siguiendo el criterio de sensibilidad, se decide descartar este ensayo. En los dos ensayos restantes (A y B) la intensidad de la señal es muy similar y para decidir qué condiciones son las más adecuadas se utilizó como criterio de selección la reproducibilidad obtenida, que como se recoge en la *Tabla 4.2.1.* es mejor en el ensayo A.

El ensayo A además de una mayor sensibilidad y una mejor reproducibilidad presenta una ventaja adicional respecto a los ensayos B y C. Esta ventaja es una disminución en el tiempo de construcción del sensor, pues en el ensayo A sólo existe una etapa de deposición de reactivos frente a las dos etapas que presentan los ensayos B y C. Considerando todo lo anterior se decidió depositar el mediador y las enzimas de manera conjunta sobre la superficie del electrodo en los experimentos futuros.

En la *Figura 4.2.2.* se aprecia que la intensidad medida aumenta con el tiempo, siendo 300 segundos el tiempo al que se obtiene una mayor señal analítica y el que se va a emplear, por tanto, en los siguientes experimentos.

### 4.3. Diseño factorial

Tras haber seleccionado la manera de depositar los reactivos y el tiempo de medida se decidió estudiar, mediante un diseño factorial, la influencia en la señal analítica de la concentración de mediador y de la concentración de enzimas.

El diseño factorial se llevó a cabo con el propósito de reducir costes, es decir, de evitar realizar ensayos de la manera tradicional, variando todos los parámetros implicados en el diseño del sensor.

El diseño factorial se hizo empleando el programa Minitab® y para llevar a cabo el mismo se fijaron dos niveles de concentración, tanto de mediador como de enzimas (ver *Tabla 4.3.1*).

**Tabla 4.3.1.** Factores y niveles fijados en el diseño factorial.

Factor	Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)
<b>A:</b> $[Fe(CN)_6]^{-4}$ (M)	0.02	0.2
<b>B:</b> [HRP] (U/mL)	1500	5000
<b>C:</b> [ChOx] (U/mL)	375	1500

Los niveles de concentración fijados se seleccionaron en función de las condiciones empleadas en el estudio de reproducibilidad, de tal forma que las mismas se encontraran en la zona central del intervalo establecido.

En base a las condiciones de la *Tabla 4.3.1*, el programa Minitab® propuso los experimentos que se detallan en la *Tabla 4.3.2*. Cada uno de ellos se hizo por triplicado y de forma aleatoria, siguiendo el orden indicado por el programa.

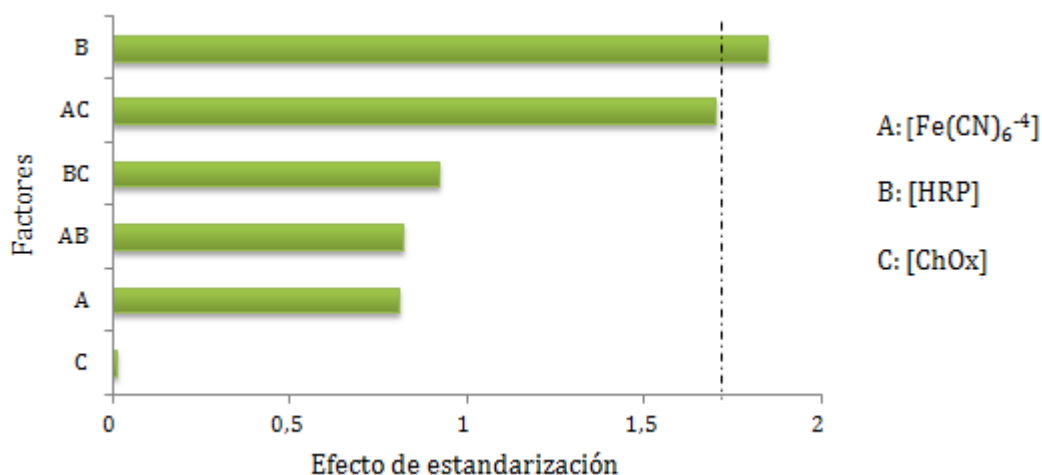
**Tabla 4.3.2.** Condiciones de los experimentos que conforman el diseño factorial.

Experimento	$[Fe(CN)_6]^{-4}$	[HRP]	[ChOx]
A'	+	+	-
B'	+	-	-
C'	+	+	+
D'	-	-	-
E'	+	-	+
F'	-	+	+
G'	-	-	+
H'	-	+	-

## EXPERIMENTAL

En todos los experimentos sobre la superficie del electrodo de trabajo se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de una mezcla 1:2:2 de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ , HRP y ChOx. Una vez secos los electrodos se depositaron sobre ellos 40  $\mu\text{L}$  de una disolución de colesterol 200 mg/dL y se hizo una amperometría aplicando un potencial de  $-0.3\text{ V}$  durante 300 segundos.

A partir de las intensidades medidas (ver *Tabla 8.1.1.* en *Anexos*) el programa desarrolla el modelo e indica qué factores o combinaciones de los mismos tienen una mayor influencia sobre la señal analítica.

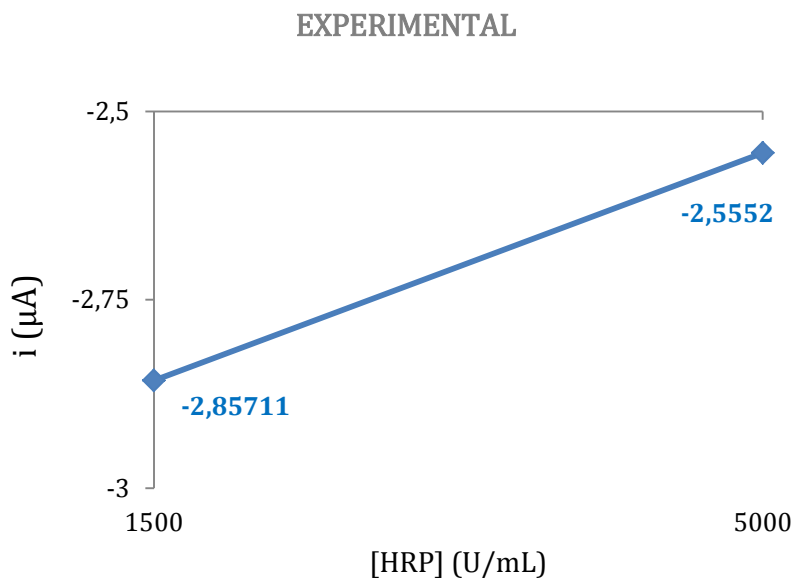


**Figura 4.3.1.** Diagrama de Pareto de los efectos de estandarización.

En la *Figura 4.3.1.* se observa que el factor B es el único que se encuentra por encima del 10 % del nivel de significación (definido por la línea punteada). La concentración de HRP es el único parámetro que influye de manera significativa en la señal analítica.

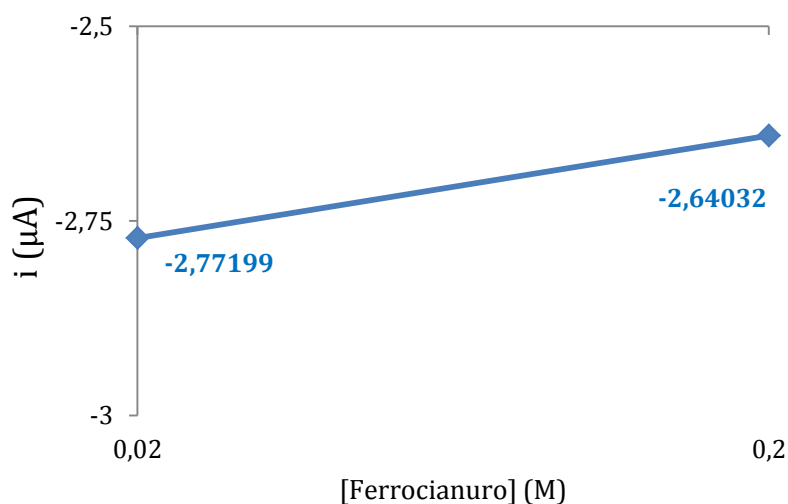
A partir del diagrama de la *Figura 4.3.1.* puede concluirse que los otros dos factores (concentración de mediador y concentración de colesterol oxidasa) no tienen influencia sobre la señal analítica. Sin embargo, la combinación de los mismos sí que afecta a la señal analítica aunque no de forma significativa, pues en el diagrama de Pareto la barra correspondiente a la combinación AC aparece por debajo del 10 % del nivel de significación.

En las siguientes figuras se ilustra cómo varía la señal analítica con los tres factores fijados así como con la combinación de factores A y C.



**Figura 4.3.2.** *Influencia del factor B en la señal analítica.*

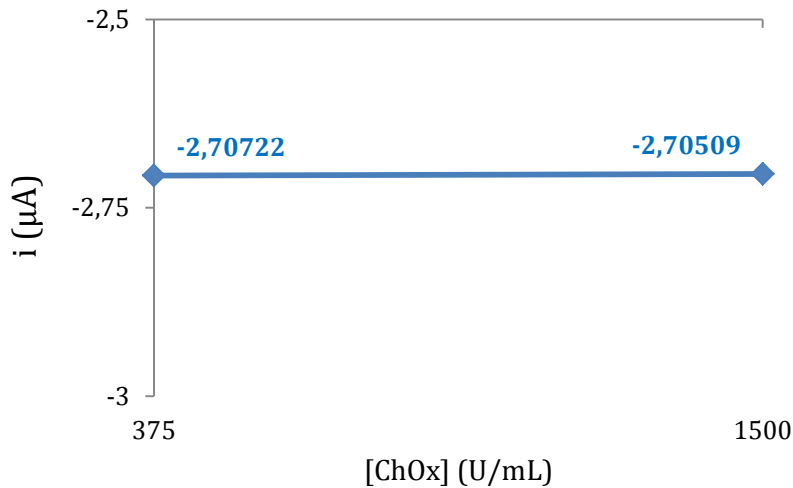
En la *Figura 4.3.2.* se aprecia que la intensidad de la señal analítica disminuye al aumentar la concentración de peroxidasa y que la máxima señal se consigue cuando se emplea la disolución de HRP de concentración 1500 U/mL.



**Figura 4.3.3.** *Influencia del factor A en la señal analítica*

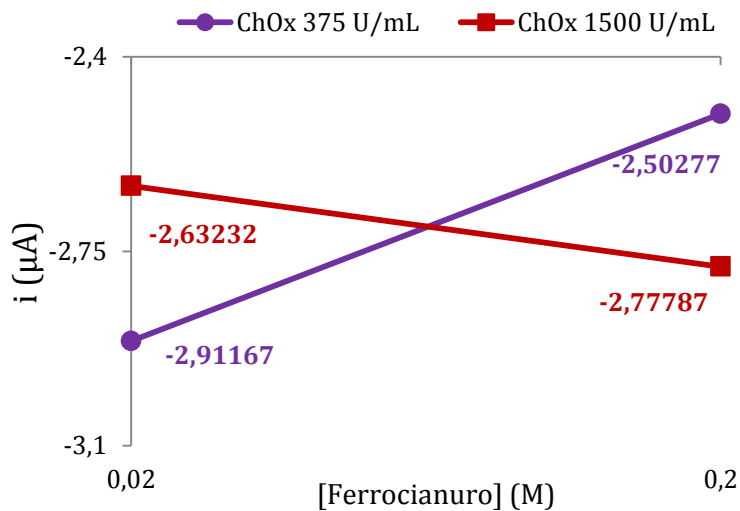
Al igual que sucede con la peroxidasa, una mayor concentración de ferrocianuro proporciona menores señales. Aunque la variación que se observa en la señal analítica es más notable al modificar la concentración de peroxidasa que al alterar la de ferrocianuro.

### EXPERIMENTAL



**Figura 4.3.4.** Influencia del factor C en la señal analítica

Como se ve en la *Figura 4.3.4.* un cambio en la concentración de colesterol oxidasa no conlleva ninguna variación en la señal analítica.



**Figura 4.3.5.** Influencia de la combinación de los factores A y C en la señal analítica.

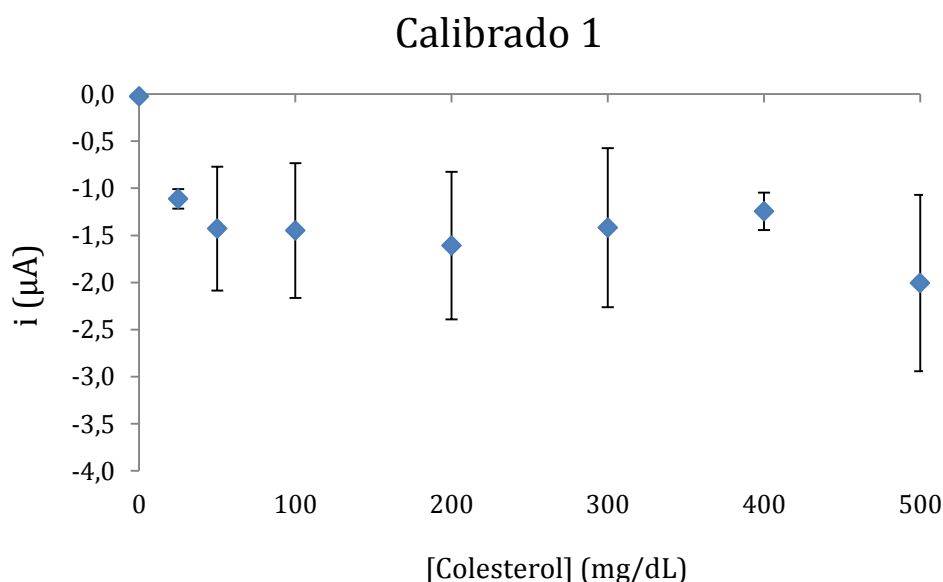
De la *Figura 4.3.5.* se deduce que las mayores señales se consiguen cuando se trabaja bien con los niveles inferiores o bien con los niveles superiores del mediador y de la enzima. La máxima señal se obtiene con los niveles inferiores de ferrocianuro y de colesterol oxidasa, 0,02 M y 375 U/mL respectivamente.

Según el informe proporcionado por el programa Minitab® las modificaciones de los diferentes factores explican el 41 % de la variación en la respuesta, y la mayor señal analítica se consigue cuando se trabaja con los niveles inferiores de los tres factores.

#### 4.4. Calibrados de colesterol libre

En base a las concentraciones de mediador y de enzimas óptimas según el diseño factorial (Ferrocianuro 0.02 M, HRP 1500 U/mL y ChOx 375 U/mL), se hizo un calibrado de colesterol libre entre 0 y 400 mg/dL por triplicado, empleando patrones de colesterol de concentración: 0, 25, 50, 100, 200, 300 y 400 mg/dL.

El calibrado (ver *Figura 4.4.1.*) se hizo en SPCEs sobre los que se depositaron 5  $\mu$ L de mezcla 1:2:2 de ferrocianuro 0.02 M, peroxidasa 1500 U/mL y colesterol oxidasa 375 U/mL. La detección se hizo en las condiciones seleccionadas en los *apartados 4.1 y 4.2* (AD - 0.3 V 300 s).



**Figura 4.4.1.** Calibrado 1 de colesterol libre en SPCEs  
[ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$  0.02 M; HRP 1500 U/mL y ChOx 375 U/mL]

En la *Figura 4.4.1.* se observa que, al trabajar con las condiciones propuestas por el diseño factorial, el sensor satura a partir de una concentración de colesterol de 25 mg/dL (siendo ésta la concentración correspondiente al punto más bajo del calibrado).

Según el diseño factorial en el calibrado anterior debería obtenerse la máxima señal analítica. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos se cree que éstos se incluyen dentro del 59 % de la variación en la respuesta que no es explicado por el diseño factorial. Por este motivo se decidió descartar la información proporcionada por el diseño factorial y realizar los siguientes ensayos de la manera tradicional (prueba y error).



## EXPERIMENTAL

La rápida saturación de la señal que se observa en la *Figura 4.4.1* puede ser debida a la pequeña cantidad de mediador depositada en la superficie del electrodo (1  $\mu\text{L}$  de ferrocianuro 0.02 M), lo que hace que dicho reactivo sea el limitante en lugar de estar en exceso como le corresponde en su función de mediador.

Para tratar de obtener un mayor rango lineal en la zona de interés se optó por aumentar la concentración de mediador. Se decidió trabajar con disoluciones de ferrocianuro entre cinco y diez veces más concentradas que la empleada en el calibrado 1.

Para cada uno de los niveles de concentración de ferrocianuro (0.1, 0.15 y 0.2 M) se hicieron dos calibrados. En uno se emplearon las disoluciones de enzimas utilizadas en el nivel inferior del diseño factorial, mientras que en el otro se utilizaron las del nivel superior.

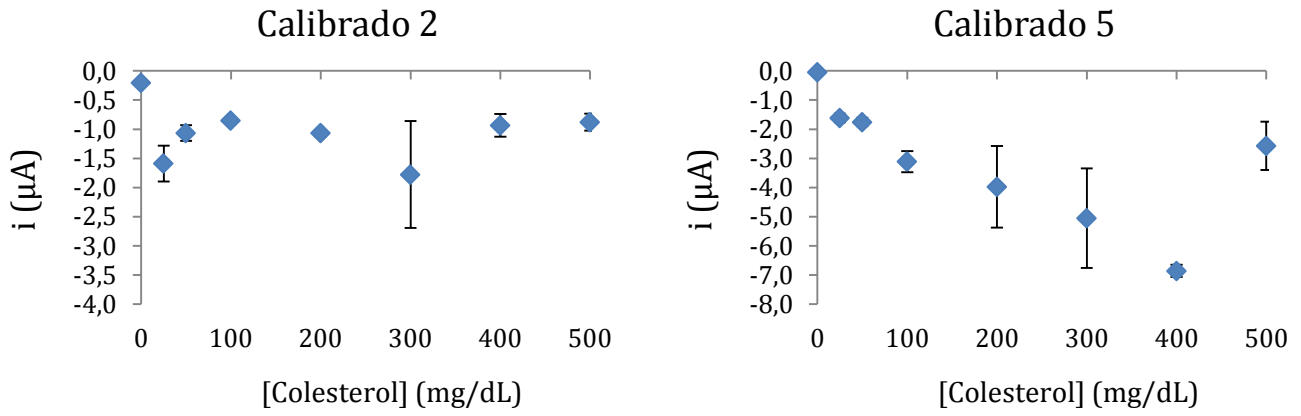
En todos los casos se emplearon SPCEs sobre los que previamente se habían depositado 5  $\mu\text{L}$  de una mezcla 1:2:2 de ferrocianuro potásico, peroxidasa de rábano silvestre y colesterol oxidasa de la concentración correspondiente (ver *Tabla 4.4.1*.)

**Tabla 4.4.1.** Concentraciones de mediador y enzimas empleadas en los calibrados 2-7.

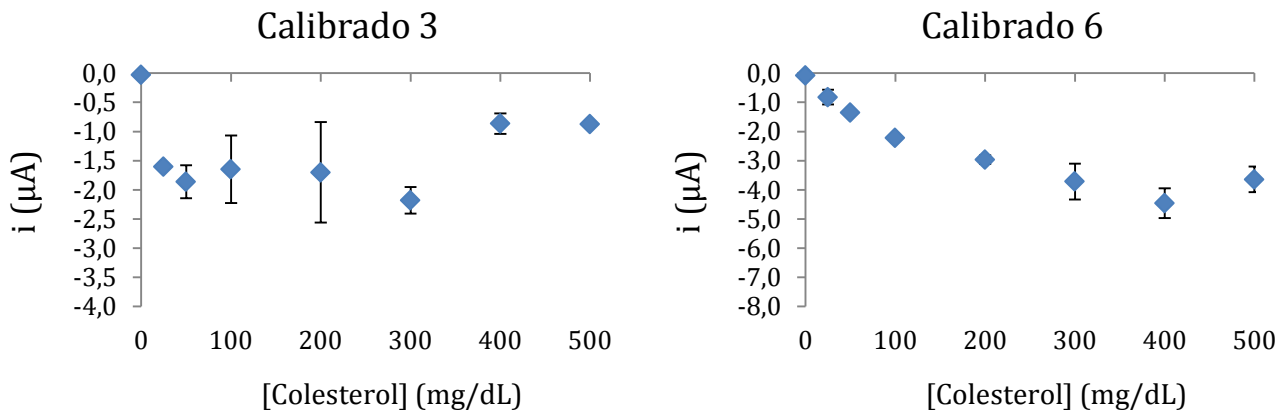
Nº Calibrado	$[\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}]$ (M)	[HRP] (U/mL)	[ChOx] (U/mL)
2	0.10	1500	375
3	0.15	1500	375
4	0.20	1500	375
5	0.10	5000	1500
6	0.15	5000	1500
7	0.20	5000	1500

Los calibrados se hicieron por triplicado, empleando 40  $\mu\text{L}$  de patrones de colesterol de concentración 0, 25, 50, 100, 200, 300 y 400 mg/dL preparados por dilución a partir de una disolución madre de colesterol 500 mg/dL. Para la detección se hizo una amperometría aplicando - 0.3 V durante 300 segundos. En las figuras siguientes (4.4.2. - 4.4.4.) se muestran los resultados obtenidos en los seis calibrados.

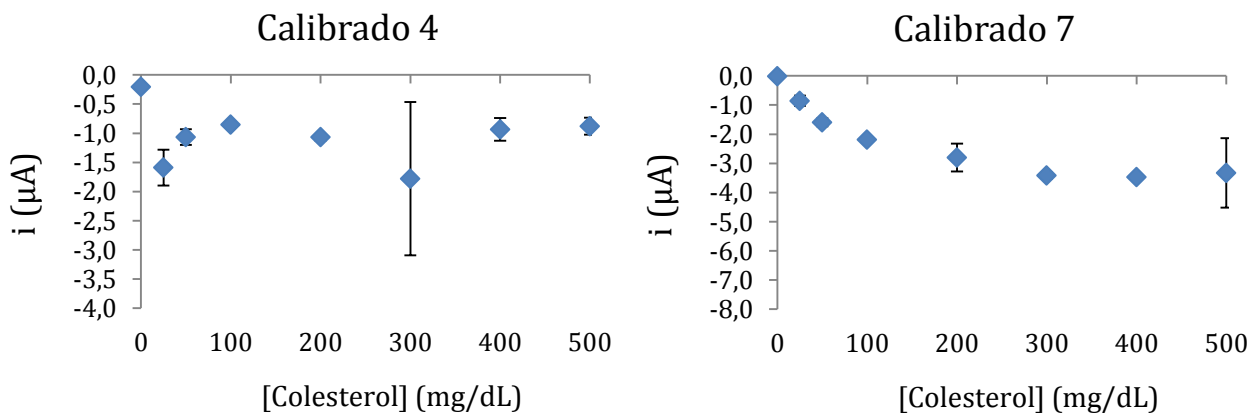
EXPERIMENTAL



**Figura 4.4.2.** Calibrados 2 [ $Fe(CN)_6^{4-}$  0.1 M; HRP 1500 U/mL; ChOx 375 U/mL] y 5 [ $Fe(CN)_6^{4-}$  0.1 M; HRP 5000 U/mL; ChOx 1500 U/mL] de colesterol libre en SPCEs



**Figura 4.4.3.** Calibrados 3 [ $Fe(CN)_6^{4-}$  0.15 M; HRP 1500 U/mL; ChOx 375 U/mL] y 6 [ $Fe(CN)_6^{4-}$  0.15 M; HRP 5000 U/mL; ChOx 1500 U/mL] de colesterol libre en SPCEs

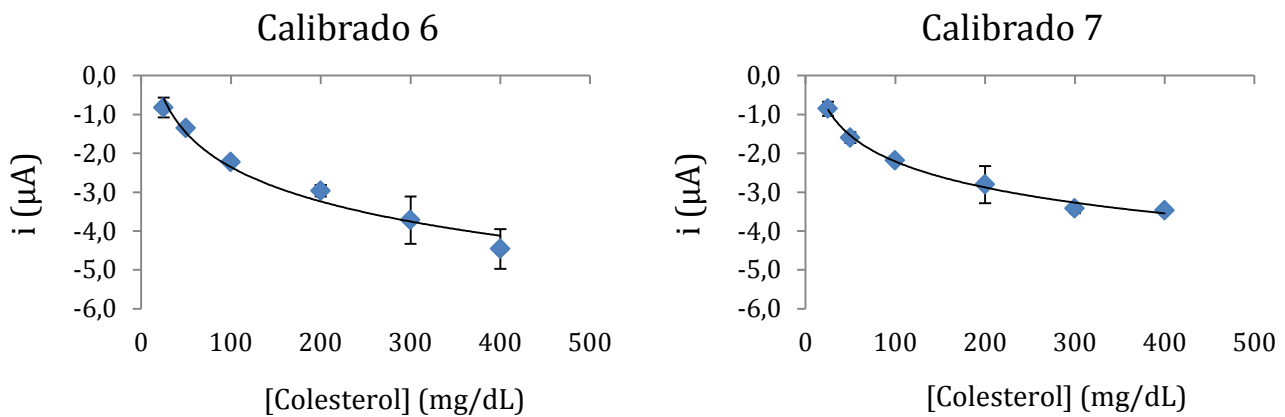


**Figura 4.4.4.** Calibrados 4 [ $Fe(CN)_6^{4-}$  0.20M; HRP 1500 U/mL; ChOx 375 U/mL] y 7 [ $Fe(CN)_6^{4-}$  0.20M; HRP 5000 U/mL; ChOx 1500 U/mL] de colesterol libre en SPCEs

## EXPERIMENTAL

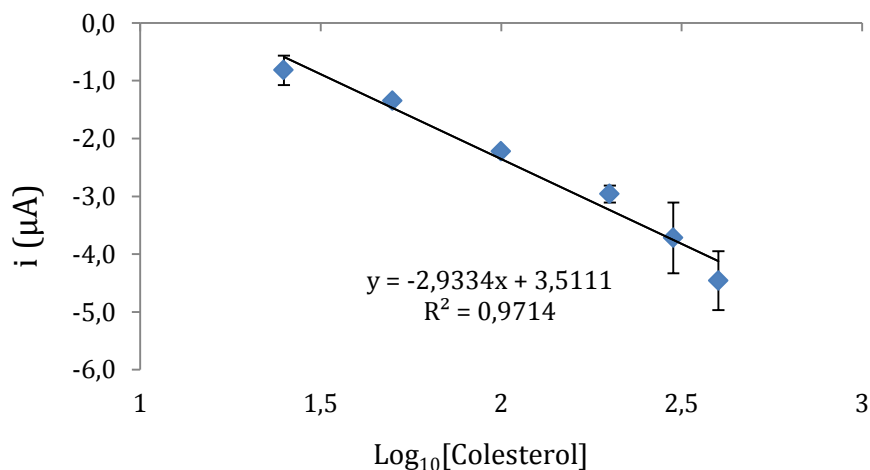
En las Figuras 4.4.2., 4.4.3. y 4.4.4. se aprecia que al trabajar con las disoluciones de enzimas del nivel inferior de concentración del diseño factorial el sensor no responde a un aumento en la concentración de colesterol y, por tanto, no calibra. Mientras que al utilizar las disoluciones de enzimas del nivel superior de concentración del diseño factorial se observa una relación de proporcionalidad entre la concentración de colesterol y la intensidad medida.

En los calibrados 6 y 7 se aprecia que, hasta 400 mg/dL, la intensidad de la señal analítica aumenta de manera logarítmica con la concentración. En la Figura 4.4.5. se muestra la línea de tendencia correspondiente a la regresión logarítmica de dichos calibrados.



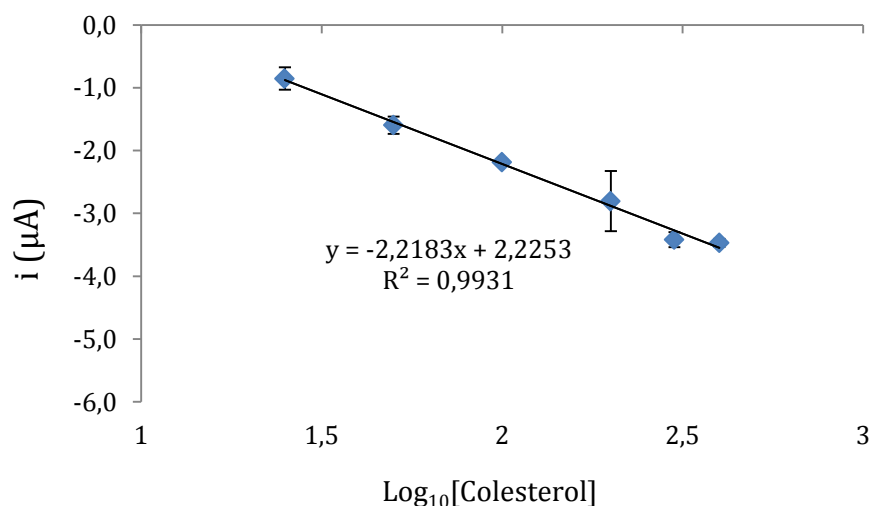
**Figura 4.4.5.** Ajuste logarítmico, entre 25 y 400 mg colesterol/dL, de los calibrados 6 y 7.

Una vez comprobado que existe dependencia logarítmica entre la señal analítica y la concentración de colesterol, se trataron los datos adecuadamente para ajustarlos a una regresión lineal (ver Figuras 4.4.6. y 4.4.7.).



**Figura 4.4.6.** Intensidades correspondientes a los patrones de colesterol (25-400 mg/dL) del calibrado 6 frente al logaritmo decimal de dichas concentraciones.

## EXPERIMENTAL



**Figura 4.4.7.** Intensidades correspondientes a los patrones de colesterol (25-400 mg/dL) del calibrado 7 frente al logaritmo decimal de dichas concentraciones.

Puede concluirse que las mejores condiciones son las correspondientes a la representación mostrada en la *Figura 4.4.7.*, ya que con ellas se obtiene un mayor coeficiente de determinación aunque hay una ligera pérdida de sensibilidad respecto a la regresión recogida en la *Figura 4.4.6.*

El siguiente paso en la optimización sería realizar ensayos con las concentraciones óptimas de enzimas (HRP 5000 U/mL y ChOx 1500 U/mL) variando la concentración de ferrocianuro entre 0.15 y 0.20 M, y seleccionar aquellas con las consiga la mejor regresión lineal, con la menor pérdida de sensibilidad.

Además, puesto que se ha visto que la intensidad de la señal analítica aumenta al hacerlo la concentración de enzimas deberían realizarse ensayos incrementando la concentración de las mismas.

Estaba previsto haber realizado dichos ensayos durante este Trabajo Fin de Máster, pero una demora en la entrega de un pedido de colesterol oxidasa lo hizo imposible. Este retraso es debido a que la casa comercial no poseía la colesterol oxidasa en *stock*, siendo necesario sintetizarla.

## 4.5. Nanoestructuración con Oro

Con el propósito de conseguir una mejor interacción entre el material proteico y la superficie electródica, y un aumento de la señal analítica se decidió utilizar SPCnAuEs como transductor en la construcción del sensor.

En base a la experiencia previa del grupo de investigación se optó por generar electroquímicamente las nanoestructuras de oro sobre la superficie de los SPCEs. El procedimiento general seguido para preparar los SPCnAuEs consiste en:

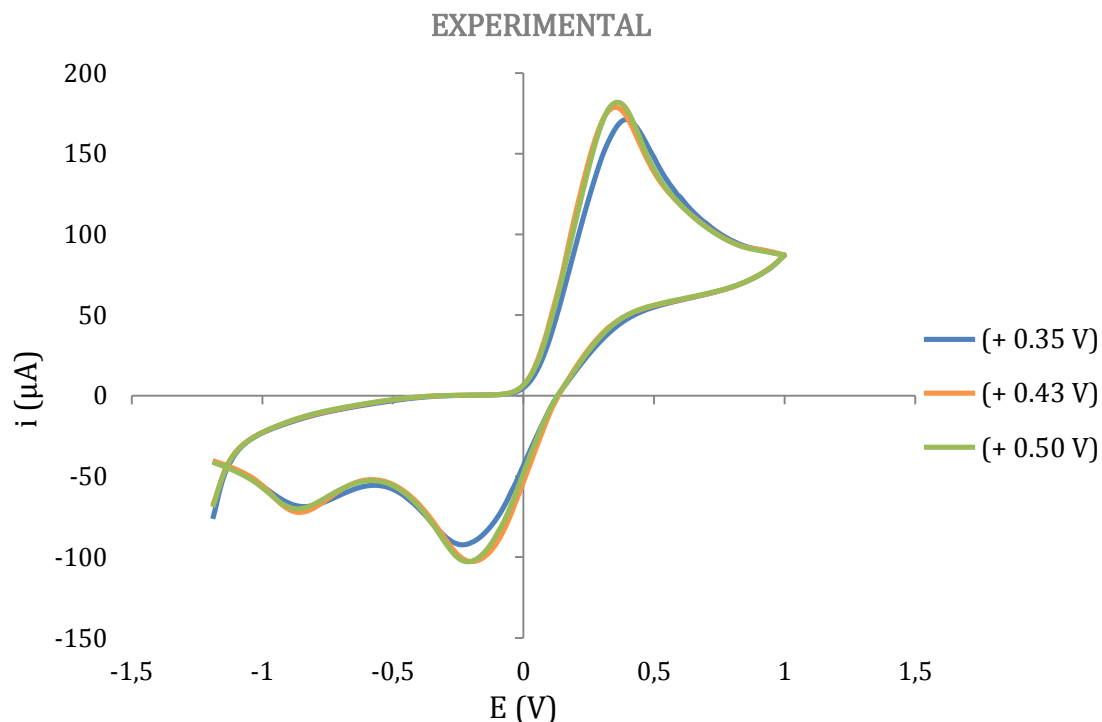
- 1- Depositar una gota de 40  $\mu\text{L}$  de disolución ácida (HCl 0.1 M) de  $\text{AuCl}_4^-$  1 mM sobre la superficie del SPCE.
- 2- Aplicar un potencial constante durante un tiempo determinado; produciéndose durante esta etapa la electrodeposición.
- 3- Aplicar, usando la misma gota, un potencial de + 0.1 V durante 60 segundos.
- 4- Lavar el electrodo abundantemente con un chorro de agua del grifo y después con agua Milli-Q.

Con el fin de seleccionar las condiciones de nanoestructuración más adecuadas se llevaron a cabo una serie de experimentos, modificando el potencial y el tiempo de electrodeposición.

Para cada una de las condiciones se prepararon cinco electrodos. Sobre la superficie de cada SPCE se depositó una gota de 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  0.01 M y se hizo una voltamperometría cíclica entre - 1.2 y + 1.0 V, con una velocidad de barrido de 0.1 V/s y un escalón de potencial de 0.01 V.

### 4.5.1. Influencia del potencial de nanoestructuración

Se prepararon tres lotes de electrodos, nanoestructurados a + 0.35 V, + 0.43 V y + 0.50 V durante 300 segundos. Los voltamperogramas cíclicos promedio de la disolución de ferrocianuro potásico registrados con cada tipo de electrodos se muestran en la *Figura 4.5.1*.

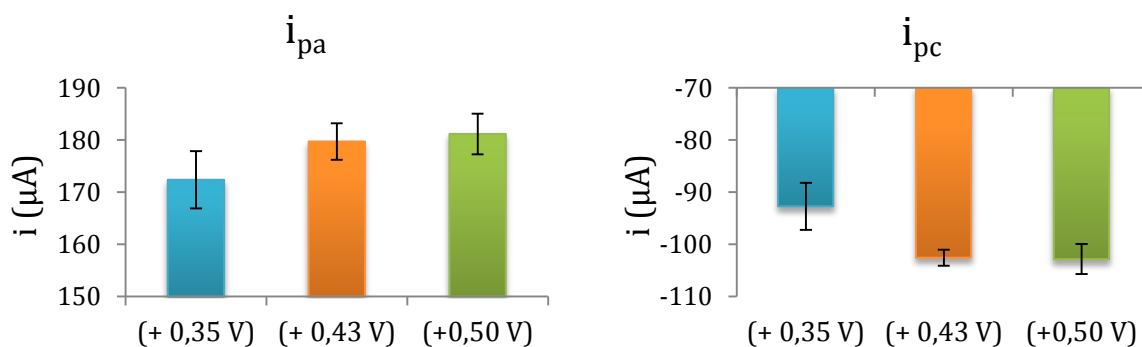


**Figura 4.5.1.** Voltamperogramas cíclicos [ $E_{ini}$ : -1.2 V;  $E_{inv}$ : +1.0 V;  $E_{step}$ : 0.01 V; Vel: 0.1 V/s] promedio de  $Fe(CN)_6^{4-}$  (ac) 0.01 M en SPCnAuEs nanoestructurados a tres potenciales diferentes (+ 0.35, + 0.43 y + 0.50 V) durante 300 segundos.

En cada voltamperograma se midieron las intensidades de pico anódico y catódico (ver *Tabla 4.5.1*). En la *Figura 4.5.2* se representan las intensidades de pico promedio medidas con cada lote de SPCnAuEs.

**Tabla 4.5.1.** Intensidades de pico promedio de los voltamperogramas cíclicos [ $E_{ini}$ : -1.2 V;  $E_{inv}$ : +1.0 V;  $E_{step}$ : 0.01 V; Vel: 0.1 V/s] de  $Fe(CN)_6^{4-}$  (ac) 0.01 M hechos en SPCnAuEs nanoestructurados a tres potenciales diferentes (+ 0.35, + 0.43 y + 0.50 V) durante 300 segundos.

		+ 0.35 V	+ 0.43 V	+ 0.50 V
$i_{pa}(\mu A)$	Valor	172 ± 6	180 ± 4	182 ± 4
	RSD (%)	3.27	1.82	2.15
$i_{pc}(\mu A)$	Valor	- 93 ± 5	- 103 ± 2	- 103 ± 3
	RSD (%)	4.54	1.16	2.26



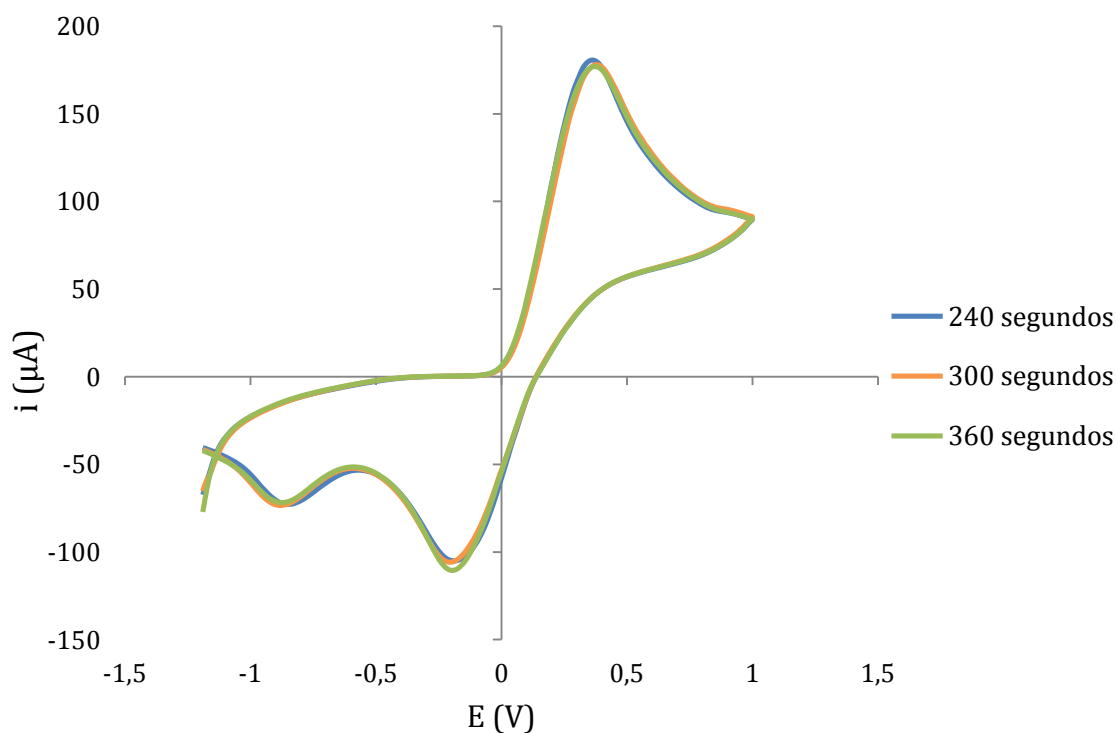
**Figura 4.5.2.** Intensidades de pico anódico y catódico medidas en los voltamperogramas cíclicos [ $E_{ini}$ : -1.2 V;  $E_{inv}$ : +1.0 V;  $E_{step}$ : 0.01 V; Vel: 0.1 V/s] de  $Fe(CN)_6^{4-}$  (ac) 0.01 M hechos en SPCnAuEs nanoestructurados a tres potenciales diferentes (+ 0.35, + 0.43 y + 0.50 V) durante 300 segundos.

## EXPERIMENTAL

En la *Figura 4.5.2* se observa que cuando se nanoestructura a + 0.35 V se obtiene una menor señal analítica que al nanoestructurar a + 0.43 V ó a + 0.50 V, con los que se consigue una señal analítica muy parecida. Se descarta la nanoestructuración a +0.35 V y entre los dos potenciales restantes se decide trabajar a + 0.43 V pues con el mismo se consiguen mejores reproducibilidades, tal y como se ve en la *Tabla 4.5.1*.

### 4.5.2. Influencia del tiempo de nanoestructuración

Una vez seleccionado + 0.43 V como potencial de nanoestructuración, se estudió cómo afectaba el tiempo de electrodeposición a la señal analítica. Se ensayaron tres tiempos de nanoestructuración diferentes: 240, 300 y 360 segundos.



**Figura 4.5.3.** Voltamperogramas cíclicos [ $E_{ini}$ : -1.2 V;  $E_{inv}$ : +1.0 V;  $E_{step}$ : 0.01 V; Vel: 0.1 V/s] promedio de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  (ac) 0.01 M en SPCnAuEs nanoestructurados a + 0.43 V a tres tiempos diferentes (240, 300 y 360 segundos)

En la *Figura 4.5.3* no se aprecian diferencias significativas entre los voltamperogramas, y para seleccionar qué tiempo de electrodeposición es el más adecuado se consideró la información recogida en la *Tabla 4.5.2*.

## EXPERIMENTAL

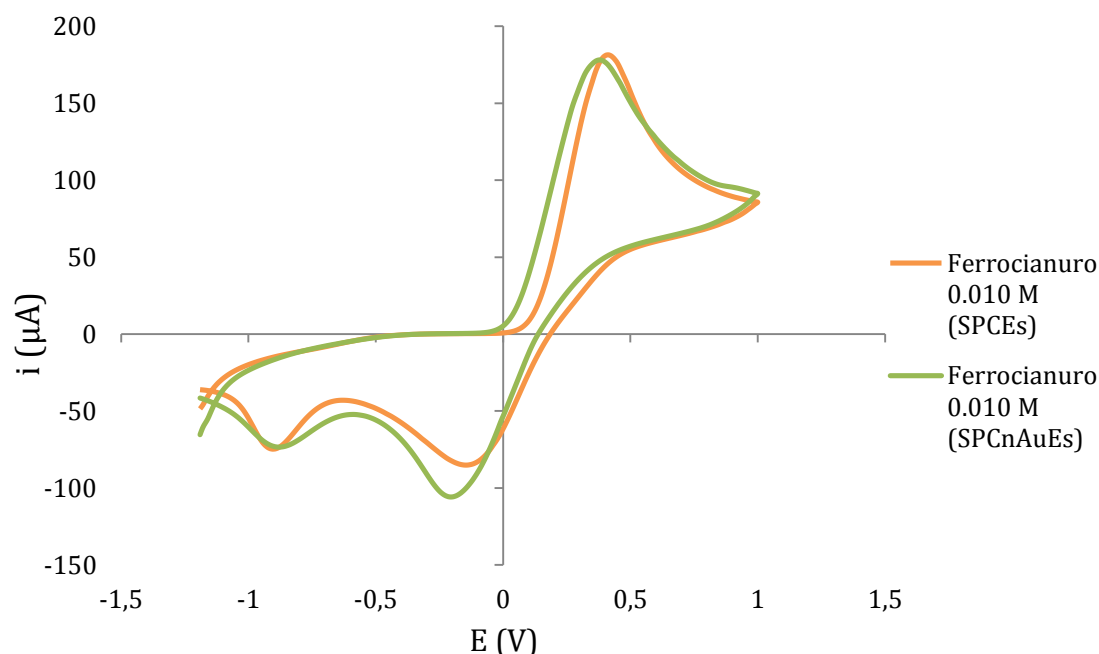
**Tabla 4.5.2.** Intensidades de pico promedio de los voltamperogramas cíclicos [ $E_{ini}$ : -1.2 V;  $E_{inv}$ : +1.0 V;  $E_{step}$ : 0.01 V; Vel: 0.1 V/s] de  $Fe(CN)_6^{4-}$  (ac) 0.01 M hechos en SPCnAuEs nanoestructurados a + 0.43 V a tres tiempos diferentes (240, 300 y 360 segundos)

		240 s	300 s	360 s
$i_{pa}(\mu A)$	Valor	$197 \pm 7$	$200 \pm 5$	$199 \pm 7$
	RSD (%)	3.24	2.59	3.10
$i_{pc}(\mu A)$	Valor	$-108 \pm 4$	$-110 \pm 4$	$-106 \pm 5$
	RSD (%)	3.65	3.25	4.16

Si se comparan los valores de RSD mostrados en la *Tabla 4.5.2.* se puede concluir que el tiempo de nanoestructuración más adecuado son 300 segundos. Además a este tiempo se obtienen señales ligeramente superiores a las logradas nanoestructurando durante 240 y 360 segundos.

Por tanto, las condiciones más adecuadas para preparar los SPCnAuEs son aquellas en las que se generan nanopartículas de oro aplicando un potencial de + 0.43 V durante 300 segundos.

En la *Figura 4.5.4.* se comparan los voltamperogramas cíclicos promedio correspondientes a la disolución de  $K_4Fe(CN)_6$  0.01 M obtenidos empleando SPCEs y SPCnAuEs (nanoestructurados a +0.43 V durante 300 segundos) como transductor.



**Figura 4.5.4.** Voltamperogramas cíclicos [ $E_{ini}$ : -1.2 V;  $E_{inv}$ : +1.0 V;  $E_{step}$ : 0.01 V; Vel: 0.1 V/s] promedio de  $Fe(CN)_6^{4-}$  (ac) 0.01 M en SPCEs y en SPCnAuEs nanoestructurados a + 0.43 V durante 300 segundos.



## EXPERIMENTAL

**Tabla 4.5.3.** *Parámetros analíticos de los voltamperogramas cíclicos [ $E_{ini}$ : -1.2 V;  $E_{inv}$ : +1.0 V;  $E_{step}$ : 0.01 V; Vel: 0.1 V/s] de  $Fe(CN)_6^{4-}$  (ac) 0.01 M hechos en SPCEs y en SPCnAuEs nanoestructurados a + 0.43 V durante 300 segundos.*

		SPCEs	SPCnAuEs
$E_{pa}$ (V)	Valor	$0.41 \pm 0.02$	$0.38 \pm 0.02$
	RSD (%)	5.00	3.72
$i_{pa}$ ( $\mu A$ )	Valor	$182 \pm 5$	$179 \pm 6$
	RSD (%)	2.28	3.32
$E_{pc}$ (V)	Valor	$-0.15 \pm 0.03$	$-0.21 \pm 0.02$
	RSD (%)	16.13	6.30
$i_{pa}$ ( $\mu A$ )	Valor	$-85 \pm 4$	$-106 \pm 3$
	RSD (%)	4.36	2.16
$ E_{pa} - E_{pc} $ (V)	Valor	$0.56 \pm 0.05$	$0.58 \pm 0.02$
	RSD (%)	7.80	3.27

En la *Tabla 4.5.3.* se observa que de manera general se consiguen mejores reproducibilidades al trabajar con los electrodos nanoestructurados. Además cuando se emplean éstos el sistema ferrocianuro-ferricianuro tiene un comportamiento prácticamente reversible, pues su  $\Delta E$  es muy próximo a 0,59 V.

# **5.CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas al término de este Trabajo Fin de Máster son las siguientes:

- En base al comportamiento electroquímico del par redox ferrocianuro/ferricianuro en SPCEs se ha seleccionado  $-0.3$  V como potencial a aplicar en la detección amperométrica del biosensor.
- El orden de deposición de los reactivos sobre la superficie electródica tiene influencia en la señal analítica; siendo la deposición conjunta del mediador y las enzimas la que proporciona los mejores resultados.
- El tiempo óptimo de medida, que proporciona la mayor señal analítica, es de cinco minutos.
- La información proporcionada por el diseño factorial no es coherente con los resultados obtenidos *a posteriori*, y por ello no se tuvo en cuenta la misma.
- La optimización de las concentraciones de reactivos a utilizar sigue siendo una asignatura pendiente en el desarrollo del sensor.
- Las condiciones óptimas para modificar la superficie de los SPCEs con nanopartículas de oro son: aplicar un potencial constante de  $+0.43$  V durante un tiempo de cinco minutos.

# **6. FUTURO DEL SENSOR**

## FUTURO DEL SENSOR

El futuro del sensor de colesterol libre pasa por optimizar las concentraciones de las disoluciones de reactivos a depositar en la superficie del transductor, SPCEs y SPCnAuEs. Se estudiará cómo afecta el empleo de nanopartículas de oro a las características analíticas del sensor, y se seleccionará aquel transductor con el que se consigan las mejores propiedades.

Una vez desarrollado el sensor de colesterol libre se construirá un sensor que responda también a los ésteres de colesterol. Para ello, al diseño previamente optimizado se le incorporará una tercera enzima, la colesterol esterasa, y se optimizarán las unidades de la misma a depositar en la superficie electródica.

Finalmente el sensor de colesterol total desarrollado en electrodos monosensores se trasladará a un formato de electrodos bisensores, con el fin de reducir los efectos de matriz ocasionados por las especies interferentes presentes en una matriz tan compleja como la sangre.

# **7.BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Morzycki, J. W. Recent advances in cholesterol chemistry. *Steroids* 83, 62-79 (2014).
2. Compound Summary for CID 5997. en <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997>>
3. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. (John Wiley & Sons, Inc, 2010).
4. *The structure of biological membranes*. (Taylor & Francis Group, 2012).
5. High cholesterol: Overview. en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072502/>>
6. What is cholesterol and how does arteriosclerosis develop? en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072511/>>
7. The cholesterol myths. en <<http://www.ravnskov.nu/cholesterol.htm>>
8. Global Health Observatory Data Repository: Cardiovascular diseases. en <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.A865CARDIOVASCULAR?lang=en>>
9. Fundación Española del Corazón: colesterol y riesgo cardiovascular. en <<http://www.fundaciondelcorazon.com/prevencion/riesgo-cardiovascular/colesterol.html>>
10. Ahmadalinezhad, A. & Chen, A. High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. *Biosens. Bioelectron.* 26, 4508-4513 (2011).
11. Martin, S. P., Lamb, D. J., Lynch, J. M. & Reddy, S. M. Enzyme-based determination of cholesterol using the quartz crystal acoustic wave sensor. *Anal. Chim. Acta* 487, 91-100 (2003).
12. Ernst Salkowski, 1844-1923. *J. Am. Med. Assoc.* 81, 1792 (1923).
13. Arranz, M., Esteban, M. & Palacios, M. Métodos recomendados para la determinación de la concentración de colesterol en suero o plasma y en otros especímenes biológicos. *Química Clínica* 13, 496-503 (1994).
14. Blomhoff, J. P. Serum cholesterol determination by gas-liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 43, 257-265 (1973).
15. Hojo, K., Hakamata, H. & Kusu, F. Simultaneous determination of serum lathosterol and cholesterol by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 879, 751-755 (2011).

## BIBLIOGRAFÍA

16. Hojo, K. *et al.* Determination of total cholesterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* 1166, 135-141 (2007).
17. Allain, C. & Poon, L. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 470-475 (1974).
18. Qureshi, R. ., Kok, W. T. & Schoenmakers, P. . Fractionation of human serum lipoproteins and simultaneous enzymatic determination of cholesterol and triglycerides. *Anal. Chim. Acta* 654, 85-91 (2009).
19. Pires, C. ., Reis, B. ., Galhardo, C. . & Martelli, P. . A multicommuted flow procedure for the determination of cholesterol in animal blood serum by chemiluminescence. *Anal. Lett.* 36, 3011-3024 (2003).
20. Krug, A., Gobel, G. & Kellner, R. Flow-injection analysis for total cholesterol with photometric detection. *Anal. Chim. Acta* 287, 59-64 (1994).
21. Barham, D. & Trinder. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97, 142-145 (1972).
22. Crossman, D. D. & Mumford, E. J. Blood Sampling Devices. (1989).
23. Allen, M. . & Jeong, H. . Non-instrumented cholesterol assay. (1994).
24. Perez, E. P. Lancet device having capillary action. (2005).
25. Anaokar, S., Crispino, M. . & Crabtree, E. . Test strip for determining concentration of multiple analytes in a single fluid sample. (2005).
26. Anaokar, S., Crispino, M. . & Crabtree, E. . Method for determining concentration of multiple analytes in a single fluid sample. (2009).
27. Clark, L. . & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29-45 (1962).
28. Malhotra, B. D. & Chaubey, A. Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors Actuators, B Chem.* 91, 117-127 (2003).
29. Justino, C. I. L., Freitas, A. C., Pereira, R., Duarte, A. C. & Rocha Santos, T. a. P. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* 68, 2-17 (2015).
30. Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Roychoudhuri, U. & Chakraborty, R. Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry* 70, 375-379 (2007).
31. Singh, S., Chaubey, A. & Malhotra, B. D. Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole film. *Anal. Chim. Acta* 502, 229-234 (2004).



## BIBLIOGRAFÍA

32. Rahman, M. M. *et al.* A cholesterol biosensor based on a bi-enzyme immobilized on conducting poly(thionine) film. *Sensors Actuators, B Chem.* 202, 536-542 (2014).
33. Vidal, J. C., García-Ruiz, E. & Castillo, J. R. Design of a multilayer cholesterol amperometric biosensor for preparation and use in flow systems. *Electroanalysis* 13, 229-235 (2001).
34. Guo, M., Chen, J., Li, J., Nie, L. & Yao, S. Carbon nanotubes-based amperometric cholesterol biosensor fabricated through layer-by-layer technique. *Electroanalysis* 16, 1992-1998 (2004).
35. Li, G., Liao, J. M., Hu, G. Q., Ma, N. Z. & Wu, P. J. Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2140-2144 (2005).
36. Zhou, N., Wang, J., Chen, T., Yu, Z. & Li, G. Enlargement of gold nanoparticles on the surface of a self-assembled monolayer modified electrode: A mode in biosensor design. *Anal. Chem.* 78, 5227-5230 (2006).
37. Yang, M. *et al.* Attachment of nickel hexacyanoferrates nanoparticles on carbon nanotubes: Preparation, characterization and bioapplication. *Anal. Chim. Acta* 571, 211-217 (2006).
38. Singh, S., Singhal, R. & Malhotra, B. D. Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase onto sol-gel films for application to cholesterol biosensor. *Anal. Chim. Acta* 582, 335-343 (2007).
39. Brahim, S., Narinesingh, D. & Guiseppi-Elie, A. Bio-smart hydrogels: Co-joined molecular recognition and signal transduction in biosensor fabrication and drug delivery. *Biosens. Bioelectron.* 17, 973-981 (2002).
40. Song, M.-J., Yun, D.-H., Min, N.-K. & Hong, S.-I. Electrochemical biosensor array for liver diagnosis using silanization technique on nanoporous silicon electrode. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 32 (2007).
41. Wang, S., Li, S. & Yu, Y. Immobilization of cholesterol oxidase on cellulose acetate membrane for free cholesterol biosensor development. *Artif Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol* 32, 413-425 (2004).
42. Lin, C. & Yang, M. Cholesterol oxidation using hollow fiber dialyzer immobilized with cholesterol oxidase: effect of storage and reuse. *Biomaterials* 24, 549-557 (2003).
43. Malik, V. & Pundir, C. . Determination of total cholesterol in serum by cholesterol esterase and cholesterol oxidase immobilized and co-immobilized on to arylamine glass. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 191-197 (2002).
44. Salinas, E. *et al.* Multienzymatic-rotating biosensor for total cholesterol determination in a FIA system. *Talanta* 70, 244-250 (2006).

## BIBLIOGRAFÍA

45. Brahim, S., Narinesingh, D. & Guiseppi-Elie, A. Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane. *Anal. Chim. Acta* 448, 27-36 (2001).
46. Tan, X., Li, M., Cai, P., Luo, L. & Zou, X. An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film. *Anal. Biochem.* 337, 111-120 (2005).
47. Vidal, J. C., Espuelas, J. & Castillo, J. R. Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor. *Anal. Biochem.* 333, 88-98 (2004).
48. Kumar, S., Singh, J., Agrawal, V. V., Ahamad, M. & Malhotra, B. D. Biocompatible self-assembled monolayer platform based on (3-glycidoxypopyl)trimethoxysilane for total cholesterol estimation. *Anal. Methods* 3, 2237 (2011).
49. Singh, S., Solanki, P. R., Pandey, M. K. & Malhotra, B. D. Cholesterol biosensor based on cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase immobilized onto conducting polyaniline films. *Sensors Actuators, B Chem.* 115, 534-541 (2006).
50. Wu, X. . & Choi, M. M. . Hydrogel network entrapping cholesterol oxidase and octadecylsilica for optical biosensing in hydrophobic organic or aqueous micelle solvents. *Anal. Chem.* 75, 4019-4027 (2003).
51. Arya, S. K., Datta, M. & Malhotra, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1083-1100 (2008).
52. Cai, X., Gao, X., Wang, L., Wu, Q. & Lin, X. A layer-by-layer assembled and carbon nanotubes/gold nanoparticles-based bienzyme biosensor for cholesterol detection. *Sensors Actuators, B Chem.* 181, 575-583 (2013).
53. Kumar, A., Pandey, R. R. & Brantley, B. Tetraethylorthosilicate film modified with protein to fabricate cholesterol biosensor. *Talanta* 69, 700-705 (2006).
54. Vidal, J. C., Garcia-ruiz, E. & Castillo, J. R. Strategies for the improvement of an amperometric cholesterol biosensor based on electropolymerization in flow systems: use of charge-transfer mediators and platinization of the electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, 51-63 (2000).
55. Yang, M., Yang, Y., Yang, H., Shen, G. & Yu, R. Layer-by-layer self-assembled multilayer films of carbon nanotubes and platinum nanoparticles with polyelectrolyte for the fabrication of biosensors. *Biomaterials* 27, 246-255 (2006).
56. Nantaphol, S., Chailapakul, O. & Siangproh, W. Sensitive and selective electrochemical sensor using silver nanoparticles modified glassy carbon electrode for determination of cholesterol in bovine serum. *Sensors Actuators B Chem.* 207, 193-198 (2015).

## BIBLIOGRAFÍA

57. Saxena, U., Chakraborty, M. & Goswami, P. Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples. *Biosens. Bioelectron.* 26, 3037-3043 (2011).
58. Nakaminami, T., Kuwabata, S. & Yoneyama, H. Electrochemical Oxidation of Cholesterol Catalyzed by Cholesterol Oxidase with Use of an Artificial Electron Mediator. *Anal. Chem.* 69, 2367-2372 (1997).
59. Foster, R., Cassidy, J. & O'Donoghue, E. Electrochemical diagnostic strip device for total cholesterol and its subfractions. *Electroanalysis* 12, 716-721 (2000).
60. *Handbook of Reference Electrodes.* (2013). doi:10.1007/978-3-642-36188-3
61. Matthews, D. R. *et al.* Pen-sized digital 30-second blood glucose meter. *Lancet* 329, 778-779 (1987).
62. Li, M., Li, Y. T., Li, D. W. & Long, Y. T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review. *Anal. Chim. Acta* 734, 31-44 (2012).
63. Hart, P., Crew, A., Crouch, E., Honeychurch, K. C. & Pemberton, R. M. Some recent designs and developments of screen printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses. *Anal. Lett.* 37, 789-830 (2004).
64. Ansari, S. A. & Husain, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol. Adv.* 30, 512-523 (2012).
65. Kumar, S., Ahlawat, W., Kumar, R. & Dilbaghi, N. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosens. Bioelectron.* 70, 498-503 (2015).
66. Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P. & González-Cortés, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* 53, 5848-5866 (2008).
67. D'Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. *Clin. Chim. Acta* 412, 1749-1761 (2011).
68. Martínez-Paredes, G., González-García, M. B. & Costa-García, A. In situ electrochemical generation of gold nanostructured screen-printed carbon electrodes. Application to the detection of lead underpotential deposition. *Electrochim. Acta* 54, 4801-4808 (2009).
69. Martínez-Paredes, G. Electroodos serigrafados de carbono nanoestructurados con oro como transductores de biosensores. (2009).

# 8.ANEXOS

## 8.1. Anexo 1: Diseño factorial

**Tabla 8.1.1.** Intensidades medidas en los diferentes experimentos del diseño factorial.

BLOQUE	CONDICIONES	i (μA)
2	A'	-2,4424
	B'	-2,8064
	C'	-2,3387
	D'	-2,8064
	E'	-2,9702
	F'	-2,1827
	G'	-2,6271
	H'	-2,4166
1	D'	-3,6328
	A'	-2,6505
	F'	-2,9078
	C'	-2,861
	G'	-2,8454
	B'	-2,9078
	H'	-2,8376
	E'	-3,9603
3	F'	-2,1438
	D'	-2,939
	E'	-2,097
	B'	-1,6058
	C'	-2,44
	A'	-2,6037
	H'	-2,8376
	G'	-3,0871

