



Universidad de Oviedo

## **MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

# **Sensor enzimático de papel**

**Olaya Amor Gutiérrez**

Julio 2015, Oviedo





**AGUSTÍN COSTA GARCÍA**, Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado "SENSOR ENZIMÁTICO DE PAPEL"

ha sido realizado por la alumna OLAYA AMOR GUTIÉRREZ 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, 14 de JULIO de 2015

Fdo: AGUSTÍN COSTA GARCÍA



# Contenido

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Tendencias actuales en la Química Analítica .....	2
1.2. Electrodo serigrafiado .....	5
1.2.1. Proceso de fabricación de los electrodos serigrafiados .....	5
1.2.2. Características de los electrodos serigrafiados .....	7
1.2.3. Electrodo serigrafiado de carbono .....	7
1.3. Dispositivos analíticos de papel .....	9
1.4. Sensores y biosensores .....	11
1.4.1. Biosensores electroquímicos .....	12
1.4.2. Técnicas amperométricas .....	13
1.4.3. Biosensores electroquímicos enzimáticos .....	14
1.4.4. Glucosa oxidasa .....	14
1.4.5. Peroxidasas .....	16
1.4.6. Mediadores electroquímicos .....	17
1.5. Glucosa .....	19
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>21</b>
<b>3. EXPERIMENTAL</b> .....	<b>23</b>
3.1. Instrumentación, materiales, reactivos y disoluciones .....	24
3.1.1. Instrumentación .....	24
3.1.2. Material .....	24
3.1.3. Reactivos .....	26
3.1.4. Disoluciones .....	26
3.2. Procedimiento .....	27
3.2.1. Electrodo serigrafiado de carbono .....	27
3.2.2. Preparación del transductor .....	27
3.2.3. Fase sensora .....	29
3.2.4. Inmovilización de las enzimas .....	30
3.3. Resultados y discusión .....	32
3.3.1. Comportamiento electroquímico del ferrocianuro .....	32
3.3.2. Optimización del biosensor .....	33
3.3.3. Reproducibilidad .....	41

3.3.4.	Estudio de reutilización del transductor .....	44
3.3.5.	Estabilidad .....	45
3.3.6.	Estudio de interferencias .....	47
3.3.7.	Muestras reales.....	49
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. Tendencias actuales en la Química Analítica

El objetivo fundamental de la Química Analítica es determinar la composición química de una muestra con altos niveles de exactitud y precisión, dando la información lo más fiable posible e intentando minimizar el tiempo, coste y dificultad de los análisis. A lo largo de la historia, la Química Analítica ha ido experimentando grandes avances: hasta aproximadamente 1950, los análisis eran muy sencillos, utilizándose técnicas tan simples como volumetrías para análisis cuantitativos y los sentidos humanos para los análisis cualitativos. Entre 1950 y aproximadamente 1970 tuvo lugar la llamada Química Analítica “moderna”. En esa época se comenzó a desarrollar nueva instrumentación, lo que produjo un cambio radical en los métodos utilizados hasta ese momento. La etapa llamada “contemporánea” abarca desde 1970 hasta finales del siglo XX. En esta etapa, gracias a los avances en informática, se podía llevar a cabo un control de los sistemas analíticos y, por consiguiente, reducir la intervención humana, además de la introducción de sistemas de control de calidad y las ventajas que la informática supuso en la quimiometría.

Por último, la etapa de la Química Analítica más reciente y que Valcárcel y Cárdenas<sup>1</sup> denominan “futura”, implica la miniaturización de los sistemas analíticos y el avance en sistemas de respuesta rápida, sin que esto implique renunciar al resto de sistemas utilizados y desarrollados hasta el momento.

Las tendencias actuales en Química Analítica y en ciencia en general pueden resumirse básicamente en tres, y tienen objetivos muy concretos: automatización (reducción de la actividad humana en el proceso analítico), simplificación (reducción de la complejidad de dicho proceso) y miniaturización (reducción de tamaño). Otra característica importante e inherente a todas estas es la reducción de costes.

Como se puede observar en la **Figura 1.1**, estas tendencias no son independientes, sino que están relacionadas entre sí. Así, si se quiere miniaturizar un sistema, éste será más simple, y por consiguiente de fácil manejo. Además, supondrá un menor coste, tanto de reactivos como de materiales para la fabricación del mismo; y necesitará menor cantidad de muestra.



**Figura 1.1.** Relación entre las tendencias de la Química Analítica

Actualmente, los laboratorios de Química Analítica están experimentando notables cambios, no sólo debidos a estas tendencias, sino porque, poco a poco, se están desarrollando técnicas fiables para el análisis *in-situ*, de control remoto o de respuesta rápida, como por ejemplo los sistemas de *screening*<sup>2</sup>. Estos sistemas, que tienen una respuesta binaria de si/no, son cada vez más utilizados ya que pueden detectar si los analitos están presentes por encima o por debajo de un umbral de concentración, de manera que no todas las muestras necesitan ser analizadas por métodos más laboriosos que den un valor exacto, reduciendo así tiempo y costes. Otros dispositivos que cada vez son más comunes y también tienen una respuesta rápida, además de cumplir con las tendencias de miniaturización, simplificación y reducción de costes son los sensores, que se verán más adelante.

De todas las tendencias arriba mencionadas, la más importante es la miniaturización, ya que a partir de ella se pueden conseguir los objetivos de simplificar, economizar y automatizar. La reducción de tamaños en la ciencia ya la había propuesto Richard P. Feynmann en una conferencia dada en 1959 y titulada "There's plenty of room at the bottom". Feynmann, físico estadounidense considerado uno de los padres de la nanotecnología, habla sobre el avance de la ciencia hacia límites cada vez más pequeños, destacando las grandes aplicaciones que esto tendrá cuando se consiga llevar la ciencia a la microescala o incluso a la nanoescala. También

hace hincapié en el carácter multidisciplinar de la ciencia, ya que los grandes avances se producen gracias a aportaciones de todas las ramas del conocimiento<sup>3</sup>.

La miniaturización no sólo tiene el objetivo de mejorar sistemas ya conocidos, sino también de solucionar nuevos problemas analíticos que no habían podido ser planteados con anterioridad. Otro objetivo importante es la rapidez de análisis, lo que está íntimamente relacionado con la frecuencia de muestreo (muestras analizadas/unidad de tiempo) o con la posibilidad de llevar a cabo varias determinaciones en paralelo, lo que implica una reducción del tiempo de análisis y por tanto también del coste del mismo. La reducción del consumo de reactivos también es muy importante, no sólo por el ahorro de costes que supone, sino también porque implica una reducción de residuos generados. Asimismo, reducir la participación humana también es relevante ya que contribuye a minimizar errores del operador.

## 1.2. Electroodos serigrafiados

En el caso de las técnicas electroquímicas, la miniaturización de los sistemas presenta una serie de ventajas adicionales. Una de ellas es que, en los electrodos miniaturizados, las corrientes capacitivas son mínimas (la corriente capacitiva es la que no es debida al proceso electroquímico y por tanto no interesa) y la velocidad de transporte de masa entre el electrodo y la disolución es elevada, lo que da lugar a una excelente relación señal/ruido y por tanto a un aumento de la sensibilidad. Además, tienen una respuesta mucho más rápida y hacen posible trabajar en medios de baja conductividad.

Desde aproximadamente 1990, la tecnología de *screen-printing* o serigrafiado ha sido cada vez más utilizada para la producción de electrodos en serie de bajo coste, pequeñas dimensiones y con buenas características analíticas (reproducibilidad y fiabilidad) para la determinación electroquímica de una amplia variedad de especies de sustancias<sup>4</sup>.

Los electrodos serigrafiados, de película gruesa o *thick-film* (con un grosor del orden de micrómetros) son dispositivos que se fabrican impregnando diferentes tintas en superficies plásticas o cerámicas. Esta tecnología de serigrafiado ha sido adaptada de la industria gráfica, donde se utiliza para la fabricación de circuitos eléctricos impresos<sup>5</sup>.

Otra característica muy importante de este tipo de electrodos es su versatilidad: pueden ser modificados de múltiples formas, en función del tipo de aplicación que se requiera. Se puede modificar tanto la tinta impresa (con metales, polímeros, agentes complejantes, mediadores enzimáticos, etc) o, una vez fabricados, mediante la deposición de sustancias de naturaleza muy diversa, como pueden ser enzimas o nanomateriales.

Gracias a todas estas características, además de su facilidad de fabricación y de adaptación para diferentes aplicaciones, los electrodos serigrafiados son cada vez más utilizados en la fabricación de sensores en campos como el alimentario, el medioambiental o el análisis clínico y/o farmacológico.

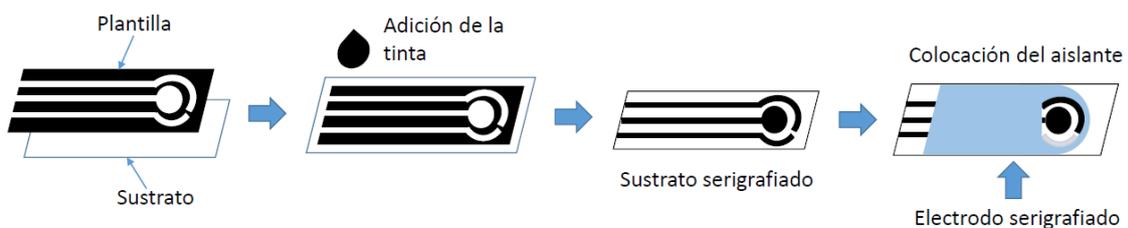
### 1.2.1. Proceso de fabricación de los electrodos serigrafiados

Existen diferentes procesos de fabricación de electrodos serigrafiados dependiendo de las aplicaciones que se requieran. No obstante, en todos los casos se presentan unas etapas comunes.

En primer lugar, es importante seleccionar el sustrato aislante, que suele ser un polímero o una resina, sobre la que se van a imprimir los electrodos. Una vez seleccionado el material que se utiliza como base, ha de diseñarse la pantalla que se utilizará para la impresión. Para ello, en primer lugar, se hace un patrón con el diseño de los electrodos, se fotografía y se utiliza la placa positiva para conseguir la plantilla con el diseño deseado. El positivo fotográfico se deposita sobre una emulsión fotoactiva que después se expone a la luz ultravioleta (UV) de forma que en las zonas donde el positivo no es opaco la emulsión se reblandece. De esta manera, la emulsión de esas zonas es fácilmente eliminada con agua<sup>6</sup>.

Una de las etapas más importantes en el proceso de fabricación de electrodos serigrafiados es la selección de la tinta. Existen muchos tipos de tintas comerciales, pero también se pueden elaborar en función de la aplicación que se le vaya a dar al transductor. Las tintas que se utilizan generalmente en electrodos serigrafiados o SPEs (*Screen Printed Electrodes*) están formadas por partículas sólidas, aglomerantes (polímeros, resinas *epoxi* o vidrios como borosilicatos o aluminosilicatos) y otros aditivos que optimizan el proceso de adhesión. También se utilizan disolventes para controlar la viscosidad de la tinta en el proceso de impresión<sup>7,8</sup>.

Por último, tiene lugar el proceso de serigrafado propiamente dicho. Para ello, colocando la plantilla encima del sustrato, se hace pasar la tinta seleccionada. Tras etapas de secado y curado a altas temperaturas, y para hacer su manejo más sencillo, se recubre con un aislante todo el sustrato excepto la zona de las conexiones y del electrodo. En la **Figura 1.2** se presenta un esquema del proceso de serigrafado<sup>9</sup>.



**Figura 1.2.** Proceso de serigrafado de un electrodo

El proceso de serigrafado puede llevarse de forma manual o automatizada. Como es obvio, cuanto más automatizado esté el proceso, mayor precisión se conseguirá y por tanto los electrodos serán más reproducibles.

### 1.2.2. Características de los electrodos serigrafiados

Además de las características mencionadas anteriormente, los electrodos serigrafiados poseen una serie de ventajas entre las que se pueden destacar las siguientes:

- Son fáciles de integrar con circuitos electrónicos
- Son flexibles en el diseño en función de las aplicaciones deseadas
- Pueden ser producidos en serie de forma masiva
- El proceso de fabricación es fácilmente automatizable
- Tienen bajo coste
- Tienen pequeñas dimensiones

Además, gracias a sus pequeñas dimensiones, se pueden derivar dos ventajas más. En primer lugar, el uso de volúmenes muy pequeños de muestra (del orden de  $\mu\text{L}$ ), en comparación con las celdas electroquímicas convencionales cuya capacidad es del orden de mililitros. Estas celdas no son necesarias para la utilización de electrodos serigrafiados, ya que se puede hacer la medida depositando la disolución directamente en forma de gota sobre la superficie de los electrodos. Por otro lado, son muy fáciles de transportar, lo que da lugar a la posibilidad de llevar a cabo análisis "*in situ*".

Por el contrario, el mayor inconveniente que este tipo de electrodos serigrafiados puede presentar es la baja reproducibilidad, debida fundamentalmente al proceso de fabricación. No obstante, como ya se ha indicado, este problema puede solucionarse escogiendo correctamente los materiales empleados y automatizando el proceso de producción.

### 1.2.3. Electrodos serigrafiados de carbono

Los electrodos serigrafiados de carbono (o SPCE, *Screen Printed Carbon Electrodes*) son de los más utilizados en el desarrollo de sensores electroquímicos, ya que son químicamente inertes en gran medida y permiten trabajar en un amplio rango de potenciales sin aumentar mucho la resistividad. Su estructura cristalina genera corrientes residuales mínimas, por lo que la relación señal/ruido es muy buena. Además, el grafito es un material de bajo coste y su producción es sencilla.

En la fabricación de electrodos serigrafiados de carbono es importante cómo se distribuye el material electródico, ya que de eso dependerá el comportamiento electroquímico de los mismos. Por ello, para los electrodos serigrafiados en general y para los de carbono en

particular, es de gran importancia la temperatura de curado. A bajas temperaturas, se obtienen superficies lisas debido a la baja evaporación del aglomerante y los disolventes. Por el contrario, temperaturas de curado muy altas pueden dar lugar a grietas en la superficie. Una mayor evaporación de los disolventes y del aglomerante puede dar lugar a una mejora del comportamiento electroquímico del electrodo<sup>4,10</sup>.

Debido a que este tipo de electrodos son de bajo coste y es posible una fabricación masiva de los mismos, pueden ser desechados tras cada uso. Esto elimina los errores producidos por la contaminación debida a su reutilización, manteniendo niveles adecuados de reproducibilidad. Además, al ser desechables, se eliminan las etapas de regeneración que, en función de la aplicación para la que se usen, pueden ser tediosas, y hacen que el tiempo total de análisis se incremente. Además, su pequeño tamaño y versatilidad permite su uso en multitud de campos (clínico, medioambiental, alimentario, etc).

### 1.3. Dispositivos analíticos de papel

Los dispositivos microfluídicos de papel ( $\mu$ PADs, *Microfluidic Paper-based Analytical Devices*) son actualmente uno de los campos de análisis más demandados, debido a la necesidad de desarrollar métodos de análisis rápidos, sensibles y económicos, así como sencillos y miniaturizados para analitos en el sector clínico, de la industria alimentaria o del control medioambiental<sup>11</sup>.

En base a esto, el papel es un material soporte muy útil para el desarrollo dispositivos *point-of-care*, es decir, sistemas de diagnóstico que pueden proporcionar de manera rápida resultados de análisis realizados por personas no cualificadas, sin necesidad de enviar las muestras a laboratorios con equipamiento y personal capacitado que además de mayor coste conlleva días de espera por los resultados<sup>12</sup>.

Además, este material es de bajo coste, lo que hace que sea muy interesante para aplicaciones sobre todo en países en vías de desarrollo, donde la escasez de medios impide realizar análisis laboriosos y costosos, y hay muy poca oferta de personal debidamente capacitado. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los dispositivos de diagnóstico para países en desarrollo deben cumplir el criterio que llaman *ASSURED*, que constituye las siglas en inglés de una serie de características: *affordable* (asequible), *sensitive* (sensible), *specific* (específico), *user-friendly* (fácil de usar), *rapid and robust* (rápido y robusto), *equipment free* (que no necesite instrumentación sofisticada) y *deliverable to end users* (distribuible a los usuarios)<sup>13</sup>.

Las ventajas que presenta el papel para el desarrollo de dispositivos analíticos de bajo coste son<sup>14</sup>:

- Es fino y ligero, y está disponible en un amplio rango de grosores.
- Es fácil de almacenar y transportar.
- La celulosa que lo compone es compatible con muestras biológicas.
- Puede ser modificado químicamente de manera fácil para que pueda unirse a proteínas, ADN o pequeñas moléculas.
- Normalmente es blanco, lo que lo hace muy útil en análisis colorimétricos.
- Es inflamable, por lo que puede desecharse fácilmente mediante incineración sin contaminar el medioambiente ya que es biodegradable.
- Está disponible comercialmente de muchas formas entre las que se puede escoger en función de las necesidades que se planteen.

Todas estas ventajas hacen al papel un material idóneo para la construcción de dispositivos que cumplan todos los requisitos que implican las tendencias actuales de la Química Analítica mencionadas previamente.

El tipo de papel más utilizado para la construcción de estos dispositivos es el papel cromatográfico, que está disponible en una gran variedad de grosores y tamaños de poro, está construido únicamente de celulosa y es de bajo coste. Sobre este tipo de papel se pueden imprimir barreras hidrofóbicas, de manera que las disoluciones de trabajo se encuentren sólo en el área delimitada para ello y no se extiendan por el resto del papel. De esta forma, el papel actúa como una plataforma microfluídica formada por fibras de celulosa que funcionan como canales<sup>15</sup>.

Para crear las barreras hidrofóbicas de cera se pueden utilizar muchos métodos, como fotolitografía o el grabado, pero la cada vez más utilizada y más apropiada para producir  $\mu$ PADs en gran escala es la impresión en cera. Para ello se utiliza una impresora en la que la tinta es sustituida por una cera sólida que se funde en el momento de la impresión. El proceso de fabricación implica tres operaciones básicas:

- Diseñar la plantilla de impresión.
- Imprimir sobre el papel seleccionado utilizando la impresora de cera.
- Fundir la cera en el papel para que difunda hacia la otra cara del papel y formar así las barreras hidrofóbicas, utilizando una placa calefactora a alta temperatura.

La impresión en cera es muy útil para fabricar dispositivos de papel de manera rápida, barata y en grandes cantidades<sup>14, 16</sup>.

Para acoplar estos dispositivos de papel a la detección electroquímica, se pueden modificar con tintas o pastas de carbono, de manera que conduzcan la electricidad y se puedan registrar señales conectándolos a un potenciostato. La detección electroquímica resulta ser una de las más adecuadas para su integración en estos dispositivos de papel debido a su capacidad de miniaturización y portabilidad, su bajo coste, sensibilidad y buena selectividad debido a la multitud de estrategias de detección existentes<sup>17</sup>.

## 1.4. Sensores y biosensores

Según el Diccionario de la Real Academia Española (RAE)<sup>18</sup>, un sensor es un “dispositivo que detecta una determinada acción externa, temperatura, presión, etc., y la transmite adecuadamente”. En la naturaleza hay multitud de sensores químicos, como puede ser el sentido del olfato, capaz de detectar la presencia de compuestos volátiles, que los desarrolladores tratan de imitar. De todos los sensores ya existentes, la mayor parte son sensores físicos, que miden propiedades como temperatura, humedad, presión, etc. Por otro lado, aunque en menor medida, se encuentran los sensores químicos, que son dispositivos miniaturizados que transforman en tiempo real información química, como la concentración de un analito dentro de una muestra compleja, en una señal analítica útil, de manera reversible y selectiva<sup>19, 20</sup>.

Generalmente, la interacción entre la especie química a medir y el sensor consta de dos fases: reconocimiento y amplificación de la señal producida en ese reconocimiento. Un sensor tiene por tanto, una fase sensora, donde se encuentra el receptor inmovilizado que se encarga del reconocimiento molecular. Este reconocimiento consiste en una interacción selectiva entre el analito y el receptor, que posee una gran afinidad por el mismo. La reversibilidad del sensor conlleva que éste resulte inalterado tras la interacción entre el analito y el sistema de reconocimiento. El otro componente básico de un sensor es el transductor, que se encarga de transformar la energía generada en la reacción entre el analito y la fase sensora en una señal medible. La forma en la que se construye el transductor determina el tipo de sistema de detección necesario<sup>20, 21, 22</sup>.

Los sensores químicos pueden clasificarse de diferentes maneras: en primer lugar, en función de la naturaleza de la fase sensora, pueden ser bióticos (o biológicos) o abióticos (sintéticos). Por otro lado, en función del sistema de transducción, pueden ser electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos o térmicos.

Aquellos sensores químicos cuya fase sensora es de origen biológico se conocen como biosensores. Según la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) un biosensor es un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células al completo para detectar compuestos químicos mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas, generalmente<sup>23</sup>.

El llamado “padre” de los biosensores, Leland C. Clarck, a mediados de 1950, intentó crear un sensor para medir la reducción del oxígeno en sangre con un electrodo de platino, consiguiendo medir la oxigenación en sangre relacionándola con la corriente medida en el

electrodo. Años después, en 1962, junto con Lyons, acoplaron a este electrodo de platino (también llamado electrodo de Clark) una membrana semipermeable con la enzima glucosa oxidasa, lo que permitía la determinación de la concentración de glucosa, creando el primer biosensor propiamente dicho. A partir de entonces, han sido investigados y desarrollados numerosos biosensores para medir un amplio abanico de parámetros bioquímicos<sup>22, 24</sup>.

En función de cuál sea el elemento de reconocimiento, los biosensores, a su vez, pueden clasificarse en diferentes tipos. Los biosensores biocatalíticos utilizan generalmente enzimas como elemento de reconocimiento. Por otro lado, están los biosensores de afinidad, que pueden ser de varios tipos: inmunosensores, cuando el reconocimiento consiste en una reacción inmunológica entre un antígeno y un anticuerpo; genosensores, cuando se utilizan reacciones de hibridación entre hebras de ADN; y aptasensores, cuando los receptores son ácidos nucleicos y la reacción que se produce es una interacción de afinidad entre un ácido nucleico y una molécula no nucleotídica<sup>25</sup>.

#### 1.4.1. Biosensores electroquímicos

Un sensor electroquímico es, según la IUPAC, un dispositivo autónomo e integrado capaz de proveer información analítica específica, bien cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico, en contacto directo con un elemento de transducción electroquímico<sup>26</sup>.

Los biosensores electroquímicos han sido ampliamente estudiados a lo largo del tiempo debido a las numerosas ventajas de la transducción electroquímica que hacen que sea una de las más extendidas<sup>27</sup>:

- Los volúmenes de muestra necesarios para cada medida son pequeños, lo que facilita la miniaturización y la simplificación, así como la posibilidad de realizar análisis *in situ*.
- La señal es eléctrica, por lo que se puede llevar a cabo la transducción en tiempo real.
- Los límites de detección que proporciona son suficientes para la detección de una gran cantidad de analitos de interés.
- La instrumentación necesaria es de bajo coste.

En los biosensores electroquímicos se miden las propiedades eléctricas de los analitos de interés al entrar en contacto con el elemento de transducción. Estas propiedades eléctricas medidas pueden ser de diferentes tipos, en función de si se miden cambios en el potencial (potenciometría), alteraciones de las propiedades conductoras del medio (conductimetría); o

cambios en la intensidad de corriente tras aplicar un potencial constante (amperometría). Otro tipo de técnicas electroquímicas que se han descrito últimamente en la bibliografía son las de efecto de campo, utilizando la tecnología de los transistores; o la espectroscopía de impedancias, utilizando una fuente de corriente alterna<sup>20</sup>.

Las medidas electroquímicas generalmente requieren tres electrodos: el electrodo de referencia, que se encarga de mantener un potencial constante; el electrodo de trabajo, en el que tiene lugar la reacción electroquímica; y el electrodo auxiliar o contraelectrodo, que establece una conexión con la disolución electrolítica para que se pueda aplicar corriente al electrodo de trabajo. El material del que deben estar fabricados estos electrodos ha de ser conductor y estable químicamente<sup>28</sup>.

Las enzimas oxido-reductasas son muy útiles en el diseño de biosensores electroquímicos debido a que en la reacción enzimática se generan sustancias electroactivas, las cuales, al entrar en contacto con el transductor, dan lugar a una reacción de transferencia de electrones<sup>29</sup>.

#### 1.4.2. Técnicas amperométricas

La amperometría es una técnica muy útil y sencilla para conocer de manera directa la concentración de alguna especie, habiendo trazado previamente una recta de calibrado. Por otro lado, también se puede utilizar para determinar el punto de equivalencia de valoraciones analíticas<sup>30</sup>.

Las técnicas amperométricas se basan en la medida de la intensidad de corriente para relacionarla con la concentración del analito de interés, sea o no electroactivo, siempre que éste participe, mediante una reacción química acoplada, en una reacción de transferencia de electrones en la superficie de un electrodo.

La forma de amperometría más utilizada en los biosensores electroquímicos es la amperometría directa. Para ello se parte de la hipótesis de Nernst y de la ecuación de difusión en régimen estacionario:

$$i_d = k C$$

donde  $C$  es la concentración del analito en la disolución y  $k$  el coeficiente de proporcionalidad entre la intensidad de difusión  $i_d$  y la concentración de analito, que tomará valores diferentes en función del electrodo empleado. Mediante esta ecuación podrá conocerse la concentración

del analito en la muestra, interpolando en la recta de calibrado la intensidad medida para dicha disolución de muestra.

#### 1.4.3. Biosensores electroquímicos enzimáticos

En los biosensores electroquímicos enzimáticos se utilizan enzimas que catalizan la transformación de un analito mediante un proceso de transferencia de electrones. La mayoría de los biosensores desarrollados hasta el momento consisten en depositar una o más enzimas sobre un electrodo, cuya reacción se puede detectar electroquímicamente mediante la transferencia de electrones que tiene lugar<sup>31</sup>.

En este tipo de biosensores se combina la alta especificidad de las enzimas con la respuesta rápida de la reacción producida en el transductor<sup>32</sup>. Además, la mayoría de las enzimas de interés para el diseño de biosensores se encuentran aisladas y disponibles comercialmente. En el caso contrario, se podrían utilizar células o tejidos que contengan la enzima deseada, aunque con los inconvenientes de menor sensibilidad y selectividad, y una respuesta más lenta.

Existen muchos grupos de enzimas<sup>27</sup>, de entre los cuales los más importantes son las oxidasas (catalizan reacciones generales de oxidación), las peroxidasas (catalizan la oxidación de diferentes compuestos utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante) y las deshidrogenasas, que utilizan un cofactor soluble (es decir, el componente no proteico de la enzima) como el NADH para llevar a cabo la catálisis.

Esta combinación entre las ventajas derivadas de la utilización de enzimas (alta selectividad, respuesta rápida y gran variedad disponible comercialmente, entre otras) y las ventajas que provienen de las técnicas electroquímicas para la construcción de biosensores (simplicidad, facilidad de miniaturización, sensibilidad suficiente para los analitos de interés, y bajo coste de la instrumentación) hace a los biosensores enzimáticos electroquímicos (y más concretamente los amperométricos) los más abundantes, así como los más estudiados e investigados con aplicaciones en el ámbito clínico, agroalimentario o medioambiental<sup>33</sup>.

#### 1.4.4. Glucosa oxidasa

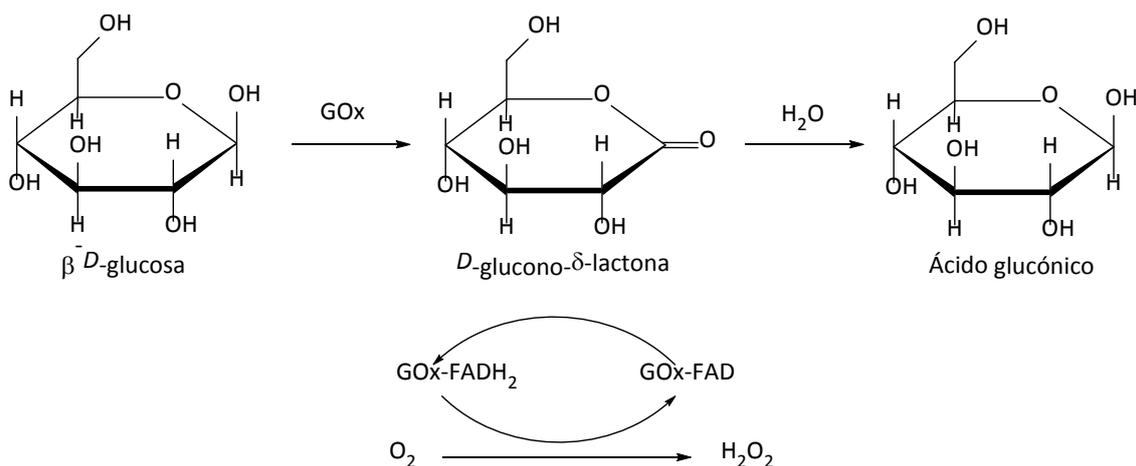
De todas las enzimas disponibles comercialmente, las oxidasas (dentro de las que se encuentra la glucosa oxidasa) son las más utilizadas. Este tipo de enzimas tienen la ventaja de ser estables, y en determinadas situaciones no requieren reactivos adicionales<sup>34</sup>.

Las oxidasas utilizan oxígeno molecular para la oxidación del sustrato dando peróxido de hidrógeno como subproducto. Esta reacción de oxidación se puede aprovechar de diferentes formas<sup>27</sup>:

1. Midiendo directamente el oxígeno consumido en la reacción, con el sensor de oxígeno de Clarck, observando la disminución de la corriente que se produce debida al oxígeno que se consume. Esto presenta el inconveniente de que puede haber variaciones de la corriente medida debido a cambios en la concentración de oxígeno disuelto, que no necesariamente dependen de la concentración de sustrato. Además, la reducción electroquímica del oxígeno con un electrodo de Clarck necesita potenciales muy negativos, lo que puede dar corrientes de fondo altas.
2. Midiendo el peróxido de hidrógeno generado mediante una oxidación que se puede monitorizar amperométricamente. Para ello hay que imponer al electrodo de trabajo un potencial suficientemente positivo para oxidar el peróxido de hidrógeno generado como consecuencia de la transformación enzimática del analito. No obstante, esto también presenta inconvenientes ya que el potencial que ha de aplicarse debe ser tan alto que puede dar lugar a la oxidación de otro tipo de especies presentes, lo que compromete en gran medida la especificidad del sensor.

Como solución a estos problemas se puede incorporar a la fase sensora un mediador de transferencia electrónica, del que se hablará más adelante.

La glucosa oxidasa (GOx) ha sido purificada a partir de diversos tipos de hongos; los más frecuentes son los del género *Aspergillus* y *Penicillium*, dentro de los cuales, la especie *Aspergillus niger* es la más utilizada para la producción de esta enzima. La glucosa oxidasa se compone de dos subunidades (de un peso molecular de aproximadamente 80000 Dalton cada una), y cada subunidad contiene una molécula de coenzima llamada FAD (flavin adenin dinucleótido), que es la parte electroactiva de la enzima<sup>35</sup>. Esta enzima cataliza la oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico dando como subproducto peróxido de hidrógeno. El mecanismo de reacción de la glucosa oxidasa se puede dividir en dos reacciones. En la primera, la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa en D-glucono- $\delta$ -lactona, que se hidroliza dando ácido glucónico. Al mismo tiempo, la FAD se reduce a FADH<sub>2</sub>. En el segundo paso, la GOx reducida se reoxida utilizando oxígeno, y da como subproducto peróxido de hidrógeno. El mecanismo de la reacción<sup>36</sup> se puede ver detalladamente en la **Figura 1.3**.



**Figura 1.3.** Reacción de la glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa se utiliza también en otro tipo de aplicaciones, como la mejora del color, sabor y vida útil de productos alimenticios, eliminación de oxígeno en zumos de frutas o bebidas envasadas, y prevención de la ranciedad en mayonesas. También se ha utilizado junto con la catalasa en kits automáticos de medida de glucosa; y más recientemente en biosensores para la estimación de la concentración de glucosa en disoluciones industriales o fluidos corporales como sangre u orina. Otros usos de esta enzima en la industria son en pastas de dientes o en sensores de glucosa para pacientes diabéticos<sup>36</sup>.

#### 1.4.5. Peroxidasas

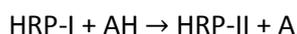
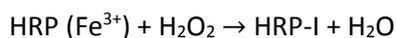
Las peroxidasas son un grupo de enzimas que utilizan peróxidos (del tipo ROOH) como aceptores de electrones para la catálisis de numerosas reacciones de oxidación. Hay muchos tipos de peroxidasas, en función de que tengan o no grupo hemo. Las peroxidasas que contienen un grupo hemo (con actividad redox) son las más frecuentes, y se pueden clasificar en función de que tengan origen animal o vegetal<sup>37</sup>.

Las más frecuentes son proteínas con grupos hemo, que contienen protoporfirina de hierro (III) como grupo prostético. Tienen pesos moleculares muy variados, entre 30000 y 150000 Da. La actividad peroxidasa ha sido a lo largo del tiempo identificada tanto en plantas como en animales, donde juegan papeles importantes como los procesos de lignificación o de defensa de tejidos dañados<sup>38</sup>.

En concreto, la peroxidasa de rábano silvestre (o HRP, *horseradish peroxidase*), es un polipéptido simple de 308 aminoácidos que se aísla del rábano silvestre, un arbusto perenne

cultivado en zonas con climas templados. La raíz de este vegetal contiene muchas enzimas peroxidadas diferentes, siendo la más abundante la llamada HRP C. Este tipo de HRP contiene dos tipos diferentes de centros metálicos: protoporfirina de hierro (III), también conocido como grupo hemo, y dos átomos de calcio. Ambos metales son esenciales para la integridad estructural y funcional de la enzima<sup>39</sup>.

El ciclo de la enzima tiene tres fases. En primer lugar, el peróxido de hidrógeno entra en el centro activo, reaccionando con el grupo hemo (HRP-Fe<sup>3+</sup>) de manera muy selectiva, dando agua y el intermedio inestable de hierro (IV) (HRP-I), que se reduce en un proceso de dos pasos. La siguiente etapa consiste en la reducción de la HRP-I a la especie HRP-II, una especie de hierro (IV) que se forma en el segundo proceso de reducción, y la consiguiente oxidación de una especie donadora de electrones (AH), que suelen ser amins aromáticas o compuestos fenólicos. Por último, la forma de HRP-II junto con otra especie donadora de electrones se reduce regenerando la enzima HRP nativa con hierro (III), y dando además la especie oxidada de AH (A) y agua. Las reacciones que tienen lugar se describen a continuación<sup>38, 39</sup>:



Una de las aplicaciones más importantes de las peroxidadas es su uso en sistemas multienzimáticos, es decir, utilizarlas junto con otras enzimas para la determinación de una gran variedad de compuestos, como por ejemplo glucosa en sangre. Otras aplicaciones en las que aparece la peroxidada son la eliminación de contaminantes fenólicos, decoloración de tintas sintéticas, síntesis de compuestos orgánicos o poliméricos, desodorización de estiércol de cerdo (que contiene gran cantidad de compuestos volátiles fenólicos), aplicaciones en la industria del papel, en kits de diagnóstico, análisis clínico o inmunoensayos enzimáticos<sup>38</sup>.

#### 1.4.6. Mediadores electroquímicos

Como se ha dicho antes, las enzimas oxidasas y peroxidadas, por sí solas, pueden dar problemas de interferencias, por lo que es frecuente utilizarlas junto con mediadores de transferencia de electrones. Estos mediadores son compuestos sintéticos, a menudo de hierro, como por ejemplo el par ferrocianuro/ferricianuro. El mediador se encarga de facilitar la transferencia de electrones entre la especie a oxidar (o reducir) y la superficie del electrodo, de manera que se puedan utilizar potenciales menores (en valor absoluto) para la detección. Los

mediadores son especies de pequeño tamaño y muy móviles, por lo que son capaces de reaccionar con rapidez<sup>28</sup>.

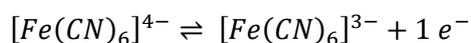
Las características ideales de un mediador electroquímico son:

- Deben reaccionar rápidamente.
- Deben dar lugar a un proceso de transferencia electrónica reversible.
- Su potencial formal debe ser bajo.
- Tienen que ser estables tanto en la forma oxidada como en la forma reducida.
- El proceso ha de ser idealmente independiente del pH.
- No deben reaccionar con oxígeno molecular ni con otras especies que puedan estar presentes.

El potencial seleccionado para las medidas ha de ser tal que el mediador, tras haber reaccionado en el ciclo catalítico, se regenere, dando lugar en esa regeneración a una corriente que pueda relacionarse con la concentración de analito. Este potencial está determinado por el potencial formal (semisuma de los potenciales de oxidación y de reducción) del par redox asociado al mediador.

Un mediador muy utilizado es el ión ferrocianuro o hexacianoferrato (II), de fórmula  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . En este anión, cada átomo de hierro está coordinado octaédricamente a seis ligandos cianuro a través de los carbonos y los nitrógenos<sup>40</sup>. Normalmente se encuentra disponible comercialmente en forma de ferrocianuro de potasio o de sodio,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  o  $\text{Na}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , respectivamente.

El ferrocianuro se oxida de manera altamente reversible a ferricianuro, la especie de hierro (III), y es en esta reacción en la que se basa su capacidad como mediador de transferencia electrónica:



## 1.5. Glucosa

De todos los compuestos biológicos existentes en la naturaleza, la glucosa es probablemente uno de los más importantes para la vida. Es uno de los reactivos principales en la glucólisis, además del responsable de la respiración tanto aeróbica como anaeróbica para la generación de energía. En plantas y algunas bacterias, la glucosa se produce a partir de agua y dióxido de carbono mediante la fotosíntesis, y se condensa para formar el almidón<sup>41</sup>. Debido a esto, a lo largo de las décadas, se han desarrollado multitud de métodos para el análisis de glucosa y el diagnóstico de la enfermedad que ésta produce en humanos, la diabetes.

La glucosa pertenece al grupo de los carbohidratos o hidratos de carbono, los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Es un monosacárido de seis carbonos que pertenece al grupo de los polihidroxialdehidos o aldosas, ya que tiene un grupo aldehído. Posee dos enantiómeros, la *D*-glucosa y la *L*-glucosa, siendo el enantiómero de *D*-glucosa el que se encuentra en la naturaleza. Su ciclación da dos hemiacetales: la *D*-glucofuranosa o la *D*-glucopiranososa<sup>42</sup>.

Aproximadamente 150 millones de personas en el mundo sufren diabetes<sup>43</sup>. Esta enfermedad consiste en una concentración anormal de glucosa en sangre y tejidos, que en personas sanas está entre 70 y 120 mg/dL (entre 4 y 8 mM). En personas que padecen diabetes este rango es mucho más amplio, entre 30 y 500 mg/dL (entre 2 y 30 mM). Debido a esto, y a que en todo el mundo se llevan a cabo aproximadamente 6 billones de análisis de glucosa al año, el estudio de métodos para monitorizar la concentración de glucosa y diagnosticar la diabetes es cada vez mayor, además de para el etiquetado de numerosos productos alimenticios<sup>43</sup>.

La *diabetes mellitus* es una enfermedad crónica causada por la baja producción de insulina, por la resistencia a ella o por ambas. La insulina es una hormona que produce el páncreas con la finalidad de controlar la concentración de glucosa en sangre. Existen tres tipos principales de diabetes<sup>44</sup>:

- Diabetes de tipo 1: diagnosticada generalmente en niños; en este caso el cuerpo produce una cantidad insuficiente de insulina, debido a la destrucción de las células del páncreas (también llamadas células  $\beta$ ).
- Diabetes de tipo 2: es la más común y generalmente se presenta en la edad adulta. Consiste en una respuesta de rechazo hacia la insulina producida por el páncreas.
- Diabetes gestacional: se diagnostica durante el embarazo de mujeres que no padecen diabetes.

Si los niveles de glucosa en sangre no se controlan con frecuencia, esta enfermedad puede tener efectos crónicos e incluso dramáticos a largo plazo. Los efectos más graves, aunque muy poco frecuentes, son debidos a la hipoglucemia e incluyen desmayos, coma o incluso muertes. Los efectos crónicos son más bien debilitantes, y son resultado de una alta concentración de glucosa persistente, como hipertensión, infecciones en la piel, nefropatía diabética, etc<sup>43</sup>.

Los síntomas que causa la diabetes pueden ser<sup>45</sup>:

- Fatiga
- Sed excesiva
- Pérdidas de peso
- Micción frecuente
- Hambre
- Visión borrosa

Todo esto hace a la *diabetes mellitus* una de las enfermedades cuyo diagnóstico y control ha sido uno de los más estudiados e investigados a lo largo del tiempo.

## 2. OBJETIVO

---

El objetivo del presente Trabajo Fin de Máster consiste en el desarrollo de un sensor enzimático para la determinación de glucosa utilizando un dispositivo electródico de papel. El uso del papel como material soporte para el desarrollo del sensor se enmarca dentro del interés creciente en la última década por desarrollar plataformas analíticas de papel.

El dispositivo electródico de papel que se usa en este Trabajo Fin de Máster ha sido desarrollado anteriormente en el grupo, donde se construyó y se optimizó el diseño mediante la aplicación de diversas técnicas voltamétricas a especies electroactivas. En este Trabajo, este dispositivo de papel se utiliza para la construcción de un biosensor. Para el desarrollo del mismo, se partió de un procedimiento para la construcción de un sensor de glucosa ya desarrollado anteriormente en el grupo, que consistía en la adsorción de las enzimas glucosa oxidasa (GOx) y peroxidasa de rábano silvestre (HRP) sobre un electrodo serigrafiado de carbono en cuyo electrodo de trabajo venía ya incluido el mediador redox<sup>46</sup>. Se adaptó este procedimiento al dispositivo electródico de papel, adecuando y optimizando cada etapa de su construcción, con el objetivo de obtener un biosensor amperométrico que permitiese la determinación de glucosa. Al mismo tiempo, se fue desarrollando un biosensor sobre electrodos serigrafiados de carbono utilizando el mismo procedimiento que para el desarrollado sobre el transductor de papel, con el fin de comparar las ventajas y desventajas del dispositivo electródico de papel.

El objetivo general de este trabajo se puede desglosar en los siguientes objetivos más específicos:

- Optimización de las concentraciones de enzimas utilizadas para cada transductor.
- Optimización del procedimiento para añadir el mediador ferrocianuro en cada transductor.
- Estudios de reproducibilidad y estabilidad de los biosensores desarrollados.
- Estudio de posibles interferentes.
- Aplicación de los biosensores en muestras reales.
- Comparación de las características de cada biosensor: ventajas e inconvenientes que aporta el uso del papel en este biosensor.

## 3. EXPERIMENTAL

---

### 3.1. Instrumentación, materiales, reactivos y disoluciones

#### 3.1.1. Instrumentación

- Potenciostato modelo  $\mu$ AUTOLAB Type II (**Figura 3.1**), controlado mediante un *software* llamado "Autolab GPES" versión 4.9 para *Windows XP*.
- Baño de ultrasonidos modelo Elmasonic P, de Elma, para la preparación de la tinta de carbono, y placa calefactora modelo RCT Classic, de IKA.
- Impresora modelo ColorQube 8570 de XEROX para la impresión en cera. Los diseños se realizan mediante el *software Inkscape*.
- Balanza analítica modelo AB54 de Mettler Toledo.
- pHmetro CRISON modelo micro-pH 2001 provisto de un electrodo de vidrio para la preparación de disoluciones reguladoras. También se usa un agitador magnético modelo MR 2000 de Heidolph.
- Sistema de purificación de agua Milli-Q plus de Merck Millipore con filtro Progard® 2.
- Frigorífico SANYO y congelador LIEBHERR.



**Figura 3.1.** Potenciostato  $\mu$ AUTOLAB Type II

#### 3.1.2. Material

- Tubos de plástico tipo *Eppendorf* de base cónica de 0,5, 1,5 y 2 mL.
- Material de vidrio: vasos de precipitados y matraces aforados.
- Pipetas *Pasteur* de plástico.
- Micropipetas de *Eppendorf* y de *Biohit* de 20, 100 y 1000  $\mu$ L.
- Electrodo serigrafiados de carbono de *Dropsens*<sup>47</sup> (referencia DRP-110).
- Conector de *Dropsens* (referencia DRP-DSC), que actúa de interfase entre el electrodo y el potenciostato (**Figura 3.2**).

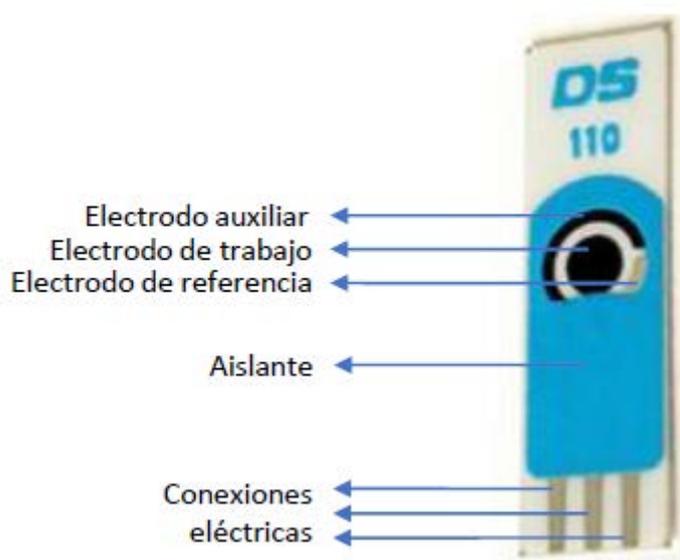
- Papel cromatográfico de la marca Whatman™, de dimensiones 100 x 300 mm.
- Perforadora para recortar los electrodos de papel.
- Adhesivo en *spray*.



**Figura 3.2.** Conector con el electrodo serigrafiado

### 3.1.2.1. Electrodo serigrafiados de carbono

Los SPCEs utilizados en este trabajo fueron adquiridos a Dropsens<sup>47</sup>. Consisten en electrodos serigrafiados sobre un soporte cerámico de alúmina de dimensiones 33 x 10 x 0,5 mm. Constan de un electrodo de trabajo de carbono circular con un diámetro de aproximadamente 4 mm, y a su alrededor se encuentran un electrodo auxiliar también de carbono y un electrodo de *pseudo*-referencia de plata. En la **Figura 3.3** se puede ver el diseño de estos electrodos.



**Figura 3.3.** Fotografía de un electrodo serigrafiado de carbono

Hay dos parámetros importantes en el diseño de electrodos serigrafiados: el diámetro del electrodo de trabajo, ya que delimita el área de trabajo; y la distancia entre el electrodo de trabajo y el de referencia (entre los que se mide el potencial) y entre el electrodo de trabajo y el auxiliar (entre los que se mide la intensidad de corriente).

### 3.1.3. Reactivos

- Trizma® base (*tris*(hidroximetil)aminometano,  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ , de SIGMA-ALDRICH.
- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) de pureza 69 %, de NORMAPUR.
- *N, N*-dimetilformamida (DMF,  $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ ), de NORMAPUR.
- *D*(+)-Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), de MERCK.
- Glucosa Oxidasa sólida (GOx), de 149800 U/g, de SIGMA-ALDRICH (referencia G2133).
- Peroxidasa de rábano silvestre sólida (HRP), de 1280 U/mg, de SIGMA-ALDRICH (referencia P6782).
- Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado (ferrocianuro,  $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ), de SIGMA-ALDRICH.
- *D*(-)-Fructosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), de SIGMA-ALDRICH.
- Ácido Ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), de SIGMA-ALDRICH.
- Pasta de Carbono de *Gwent Group*.

### 3.1.4. Disoluciones

- Disolución reguladora *tris*- $\text{HNO}_3$  0,1 M y pH = 7,00, preparada cada semana.
- Disoluciones patrón para calibrar el pHmetro de pH 7,00 y 9,00.

## 3.2. Procedimiento

### 3.2.1. Electrodo serigrafiado de carbono

En este trabajo se hace uso de electrodos serigrafiados de carbono (SPCE, *Screen Printed Carbon Electrodes*) con dos finalidades:

- Actuar como conexión entre el electrodo de papel y el potenciostato, además de aportar el electrodo auxiliar y el de referencia a la celda electroquímica.
- Desarrollar un biosensor de glucosa utilizando el mismo procedimiento que para el dispositivo de papel con el fin de comparar ventajas e inconvenientes.

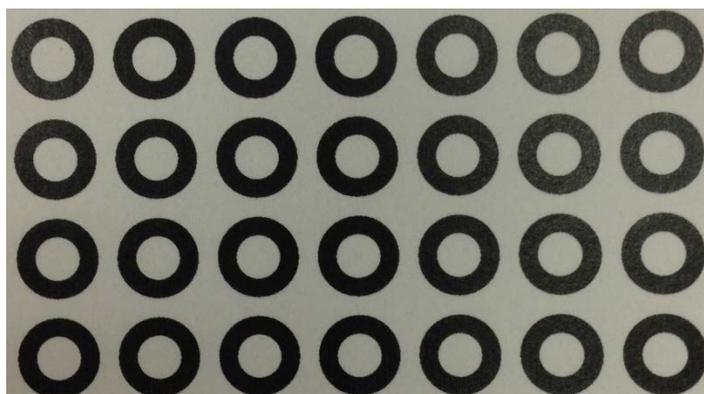
A lo largo de este trabajo, el procedimiento para llevar a cabo las medidas en los SPCEs es muy sencillo: se colocan 40  $\mu\text{L}$  de la disolución a medir sobre la superficie del electrodo, asegurándose de que los tres electrodos (trabajo, referencia y auxiliar) estén en contacto con la disolución. A continuación, utilizando el *software* adecuado, se impone un potencial determinado o un barrido de potenciales, en función de la técnica electroquímica a utilizar.

La técnica escogida para realizar la determinación de glucosa es la cronoamperometría, en la que se mide la intensidad de corriente con respecto al tiempo a un potencial de trabajo constante.

### 3.2.2. Preparación del transductor

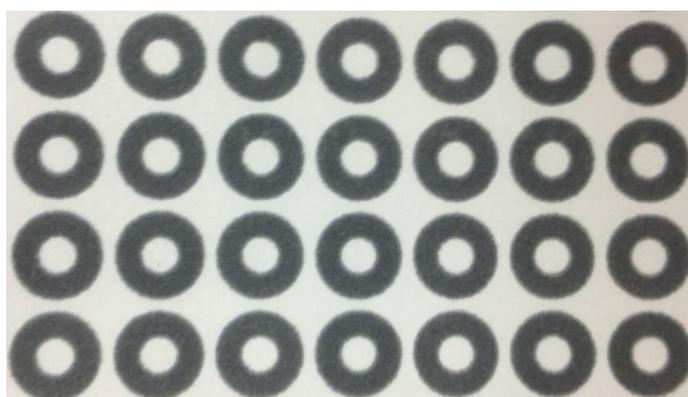
Como se ha mencionado, a lo largo de este trabajo se utiliza un dispositivo electrónico construido con papel para el desarrollo del biosensor de glucosa. Este dispositivo consiste en un electrodo de trabajo de carbono de papel que se adhiere a un electrodo serigrafiado; de esta manera, el electrodo serigrafiado aporta los electrodos auxiliar y de referencia además de servir como conexión para el electrodo de papel. A continuación se detallan los pasos necesarios para el desarrollo de este sistema electrónico, que como se ha indicado anteriormente, ya han sido optimizados previamente en el grupo.

En primer lugar, y haciendo uso de la impresora de cera XEROX, se imprime en el papel cromatográfico el patrón de impresión (**Figura 3.4**) diseñado mediante el *Inkscape*.



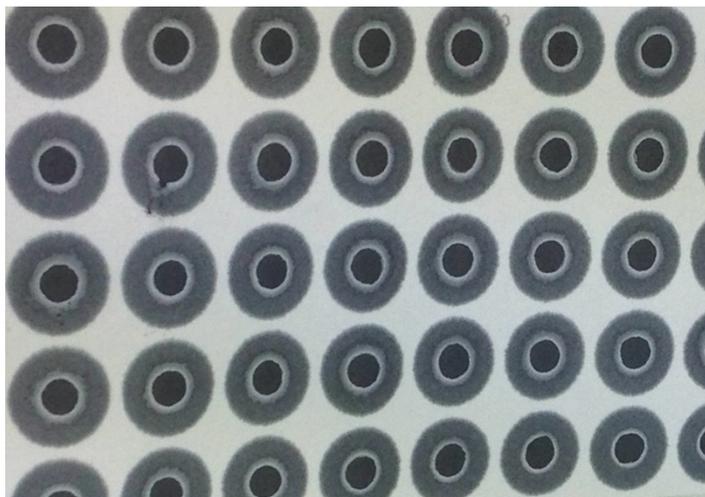
**Figura 3.4.** Patrón impreso en papel cromatográfico

Tras haber realizado la impresión con cera, es necesario calentarla en la placa calefactora a aproximadamente 100 °C, para que la cera difunda a través del papel y se cree la barrera hidrofóbica, con el resultado que se puede ver en la **Figura 3.5**. El diámetro interno resultante es de aproximadamente 4 mm.



**Figura 3.5.** Patrón impreso tras difundir la cera

Una vez se tiene la barrera hidrofóbica formada, se deposita en la circunferencia interna de los discos la tinta de carbono. Esta tinta se prepara al 23 % en DMF, a partir de pasta de carbono comercial. Después de una hora en el baño de ultrasonidos a una frecuencia de 37 kHz y tras comprobar que la tinta resultante es homogénea, ya se puede depositar sobre los discos de papel. Se depositan 2  $\mu\text{L}$  de esta tinta en el interior de cada disco, y se deja secar aproximadamente unas 12 horas (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6.** Electrodos de papel secos

Una vez seca la tinta, se cubre la zona donde se encuentra la tinta de carbono con un plástico protector de su mismo tamaño para protegerla, y se añade el adhesivo en *spray* sobre los discos. Así se logra que, al retirar el protector, el disco hidrofóbico quede cubierto de adhesivo y el área con la tinta de carbono se mantenga limpia, ya que este círculo de papel con tinta de carbono será el electrodo de trabajo. Por último, se recorta un área que abarca la zona con la tinta de carbono junto con un pequeño reborde de la parte hidrofóbica que contiene adhesivo, de manera que se pueda adherir al electrodo serigrafiado que servirá de conexión. El electrodo de papel se pega al SPCE con la tinta de carbono hacia abajo para conseguir que exista una conexión entre el electrodo de trabajo de papel y el resto de electrodos.

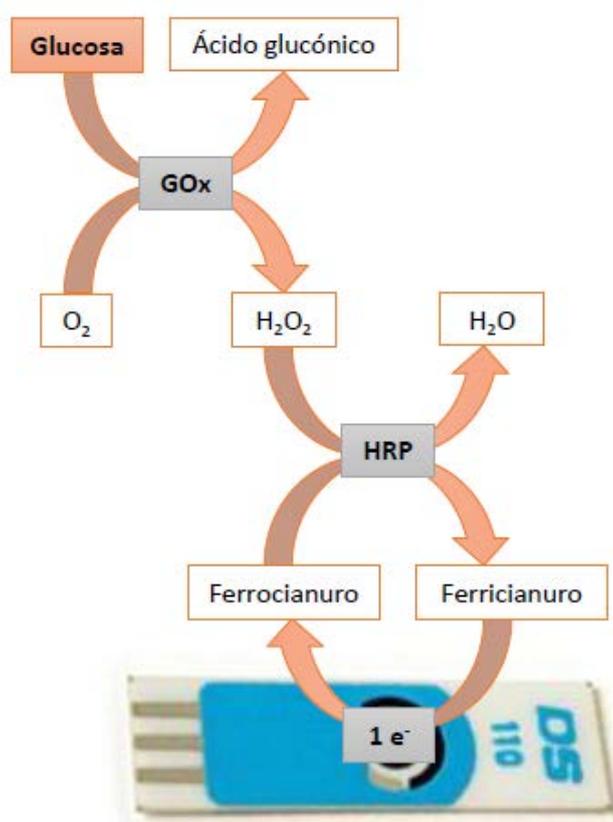
A la hora de realizar las medidas, se añaden 40  $\mu\text{L}$  de disolución de medida de manera que cubra el electrodo de trabajo de papel así como el de referencia y el auxiliar del electrodo serigrafiado. Una vez realizada la medida se despega el electrodo de trabajo de papel, desechándolo y lavando el electrodo serigrafiado con disolución reguladora. De esta manera, el SPCE queda listo para su reutilización con más electrodos de trabajo de papel (se puede reutilizar al menos 10 veces).

### 3.2.3. Fase sensora

La fase sensora de este biosensor es un sistema bienzimático, formado por las enzimas glucosa oxidasa (GOx) y peroxidasa de rábano silvestre (HRP), en el que se utiliza ferrocianuro como mediador redox. En este ciclo catalítico, la GOx cataliza la oxidación de la glucosa, dando ácido glucónico y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A continuación, la HRP cataliza la oxidación de ferrocianuro a ferricianuro, consumiendo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado previamente. La intensidad de corriente observada será, por

tanto, debida a la regeneración del ferrocianuro mediante la reducción del ferricianuro en la superficie del electrodo. Esta intensidad está relacionada con la concentración de glucosa presente en la disolución medida. Esta cadena de reacciones se puede ver de forma esquemática en la **Figura 3.7**.

La disolución utilizada para la preparación de las disoluciones necesarias y para el lavado de los electrodos es una disolución reguladora *tris*-HNO<sub>3</sub> 0,1 M de pH = 7,00. Los rangos de pH óptimo para la GOx y la HRP son entre 4,00 y 7,00; y entre 5,00 y 9,00, respectivamente<sup>46,48</sup>. Por ello, el pH = 7,00 parece un pH adecuado para que las enzimas utilizadas cumplan su función correctamente en este biosensor.



**Figura 3.7.** Esquema de las reacciones enzimáticas que se producen en la superficie del electrodo

#### 3.2.4. Inmovilización de las enzimas

La inmovilización de las enzimas en la superficie electródica se lleva a cabo mediante adsorción. Para ello, sobre la superficie del electrodo de trabajo (bien en el electrodo serigrafiado o en el electrodo de papel), se depositan 10 µL de la mezcla de enzimas o de la

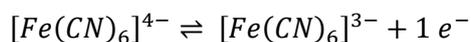
mezcla de enzimas con mediador, según el caso, previamente preparada. Tras ello, se deja secar durante aproximadamente una hora.

Una vez los electrodos estén secos, las enzimas ya se encuentran inmovilizadas, por lo que el biosensor ya estará listo para su utilización o almacenamiento.

### 3.3. Resultados y discusión

#### 3.3.1. Comportamiento electroquímico del ferrocianuro

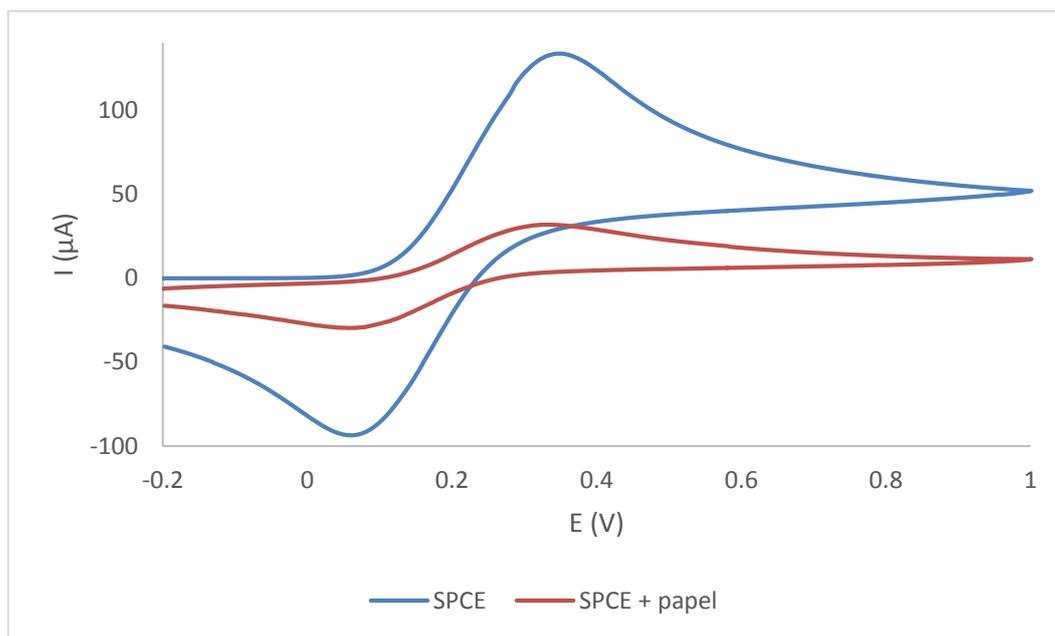
Como se ha visto en el **Apartado 1.4.6** de la **Introducción**, el ferrocianuro se comporta electroquímicamente de manera reversible, según la reacción:



Así, aplicando un potencial adecuado, se puede reducir el ferricianuro para dar la especie inicial, el ferrocianuro.

Inicialmente, para comparar cómo se comporta el ferrocianuro sobre el electrodo serigrafiado y el dispositivo de SPCE+papel, se realizan voltamperometrías cíclicas en el intervalo de potenciales entre  $-0,2$  y  $+1$  V a una velocidad de barrido de  $0,05$  V·s<sup>-1</sup>.

En la **Figura 3.8** se pueden ver los voltamperogramas cíclicos correspondientes a una disolución  $0,01$  M de ferrocianuro en disolución reguladora *tris*-HNO<sub>3</sub>  $0,1$  M y pH  $7,00$ , depositando  $40$  μL de la disolución en el electrodo correspondiente.

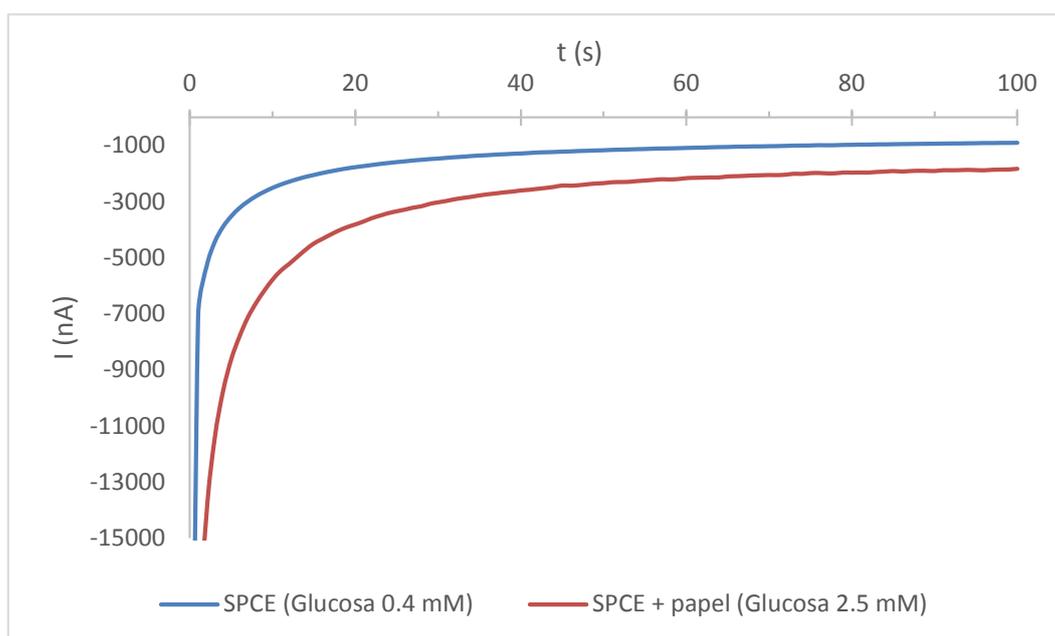


**Figura 3.8.** Voltamperogramas cíclicos para el ferrocianuro  $0,01$  M en *tris*-HNO<sub>3</sub>  $0,1$  M y pH  $7,00$ , en electrodo serigrafiado y de papel

A partir de estos voltamperogramas se puede deducir el potencial adecuado para realizar las cronoamperometrías en el biosensor. Como se dijo en el **Apartado 1.4.6** de la **Introducción**, el potencial escogido debe hacer que el mediador se regenere mediante una reacción de transferencia de electrones. En este caso, el potencial escogido es  $-0,1$  V porque

produce la reducción del ferricianuro generado a partir de la reacción catalítica del HRP y asegura que no oxida al ferrocianuro presente en la fase sensora, ya que la oxidación del ferrocianuro debe ser exclusivamente debida a la acción de la HRP. De esta manera, la intensidad de reducción medida se deberá exclusivamente a la glucosa presente en la disolución de medida. El hecho de que los picos tanto anódico como catódico sean menos intensos cuando se utiliza el electrodo de trabajo de papel puede ser debido a un área efectiva menor en este biosensor.

A lo largo de todo el trabajo la señal analítica que se recoge es la intensidad de corriente medida al registrar un cronoamperograma a un potencial de  $-0,1$  V durante 100 segundos, tiempo más que suficiente para que la señal se estabilice. En la **Figura 3.9** se puede ver la forma de estas cronoamperometrías, tanto en electrodos serigrafados como de papel.



**Figura 3.9.** Cronoamperogramas obtenidos para una disolución de 0.4 mM de glucosa en SPCEs (con concentraciones de GOx 1,6 U/ $\mu$ L, de HRP 2,5 U/ $\mu$ L y de ferrocianuro 0,05 M) y 2.5 mM de glucosa en electrodo de papel sobre SPCE (con concentraciones de GOx 1,6 U/ $\mu$ L, de HRP 2,5 U/ $\mu$ L y de ferrocianuro 0,05 M)

### 3.3.2. Optimización del biosensor

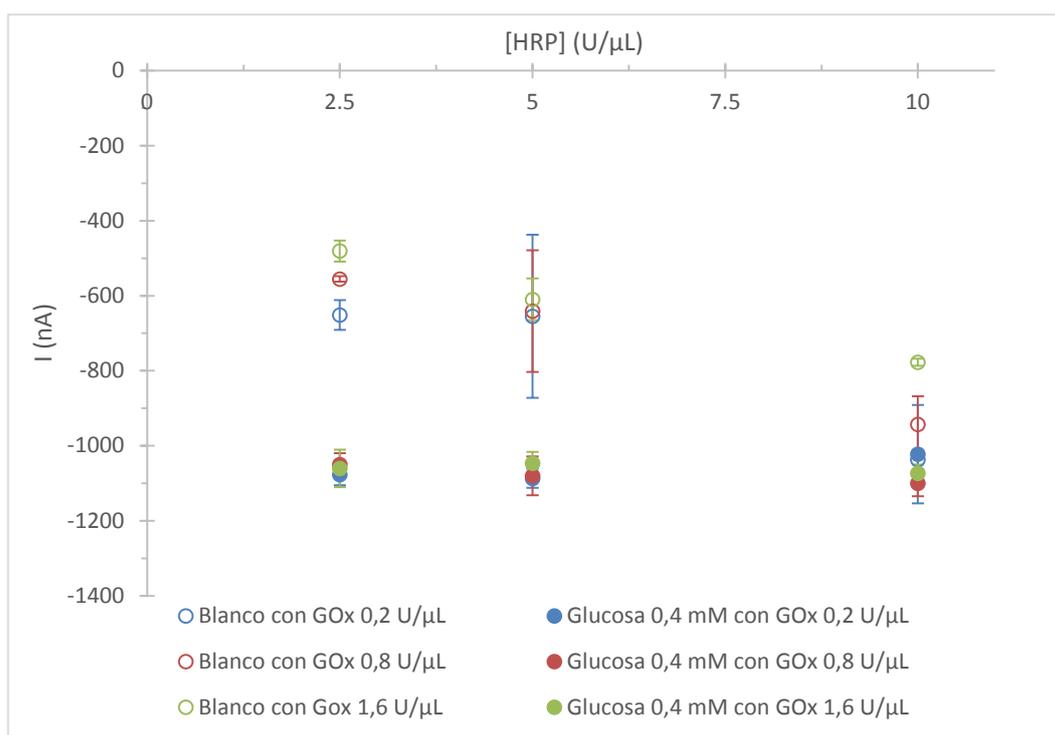
En este trabajo se desarrollan en paralelo dos biosensores enzimáticos para la determinación de glucosa: uno utilizando como transductor un SPCE y otro utilizando como transductor el dispositivo compuesto por un electrodo de trabajo de papel sobre un SPCE. Para ello se realizan diversos estudios de optimización tanto de concentraciones de enzimas y de

ferrocianuro como del procedimiento para incorporar el ferrocianuro. A continuación se muestran las diferentes optimizaciones realizadas así como los calibrados obtenidos para cada biosensor.

### 3.3.2.1. Optimización de las concentraciones de GOx y HRP

Para la optimización de las concentraciones de enzimas GOx y HRP, se depositan sobre el electrodo de trabajo del transductor 10  $\mu\text{L}$  de mezclas de GOx, HRP y ferrocianuro con diferentes concentraciones de enzimas y una concentración fija de ferrocianuro (0,1 M).

En el caso del biosensor en SPCE, las concentraciones estudiadas fueron 2,5, 5 y 10 U/ $\mu\text{L}$  para HRP y 0,2, 0,8 y 1,6 U/ $\mu\text{L}$  para GOx. Para cada mezcla de enzimas se realizan cronoamperometrías de blancos (disolución reguladora) y de glucosa 0,4 mM. En la **Figura 3.10** se representan los valores de intensidad de corriente para los blancos y para la disolución de glucosa con respecto a la concentración de HRP para cada concentración de GOx.

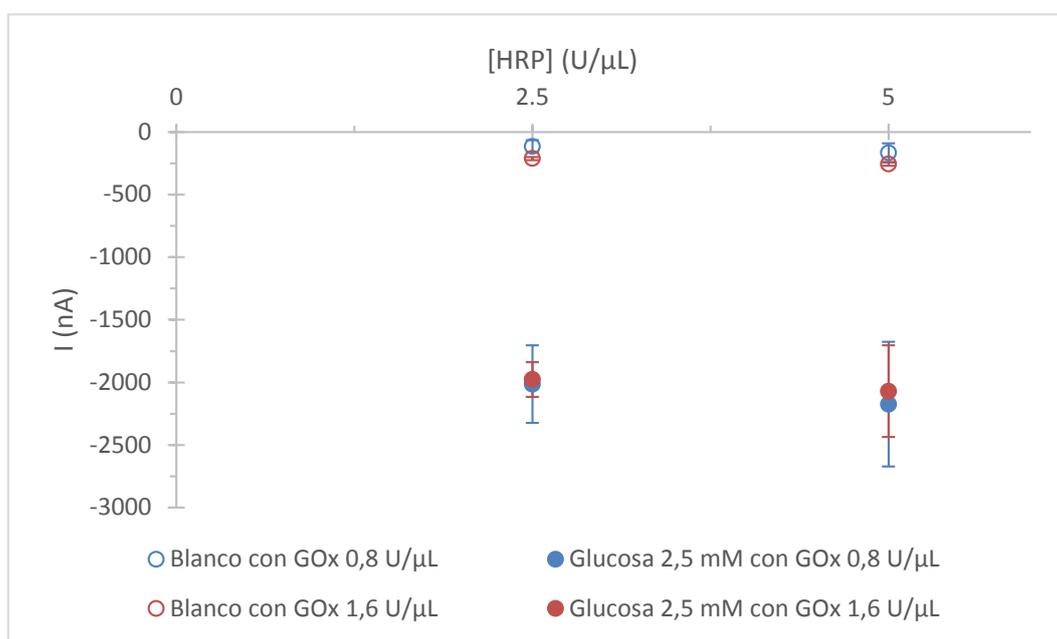


**Figura 3.10.** Intensidades de corriente de blancos de disolución reguladora y glucosa 0,4 mM para concentraciones de HRP 2,5, 5 y 10 U/ $\mu\text{L}$  y de GOx 0,2, 0,8 y 1,6 U/ $\mu\text{L}$ , en SPCE (n=3)

Observando la **Figura 3.10**, se puede ver que las intensidades para la disolución de glucosa, en valor absoluto, son similares para todas las mezclas, mientras que los blancos aumentan al aumentar la concentración de HRP; siendo los blancos más pequeños (en valor

absoluto) y más reproducibles los que da el HRP 2,5 U/ $\mu$ L. En el caso de la GOx con HRP 2,5 U/ $\mu$ L, los menores blancos se obtienen para GOx 1,6 U/ $\mu$ L, mientras que las señales son prácticamente iguales, por lo que se escoge la mezcla de GOx 1,6 U/ $\mu$ L y HRP 2,5 U/ $\mu$ L.

A continuación, y siguiendo el mismo procedimiento, se llevó a cabo la optimización de concentraciones de enzimas utilizando los electrodos de trabajo de papel. Se estudiaron diferentes concentraciones de enzimas (2,5 y 5 U/ $\mu$ L para HRP y 0,8 y 1,6 U/ $\mu$ L para GOx) fijando también la concentración de ferrocianuro en 0,1 M. En este caso se midieron blancos (disolución reguladora) y glucosa 2,5 mM. En la **Figura 3.11** se representan los valores de intensidad de corriente para los blancos y para la disolución de glucosa con respecto a la concentración de HRP para cada concentración de GOx.



**Figura 3.11.** Intensidades de corriente de blancos de disolución reguladora y glucosa 2,5 mM para concentraciones de HRP 5 y 10 U/ $\mu$ L y de GOx 0,8 y 1,6 U/ $\mu$ L, con electrodo de trabajo de papel ( $n=3$ )

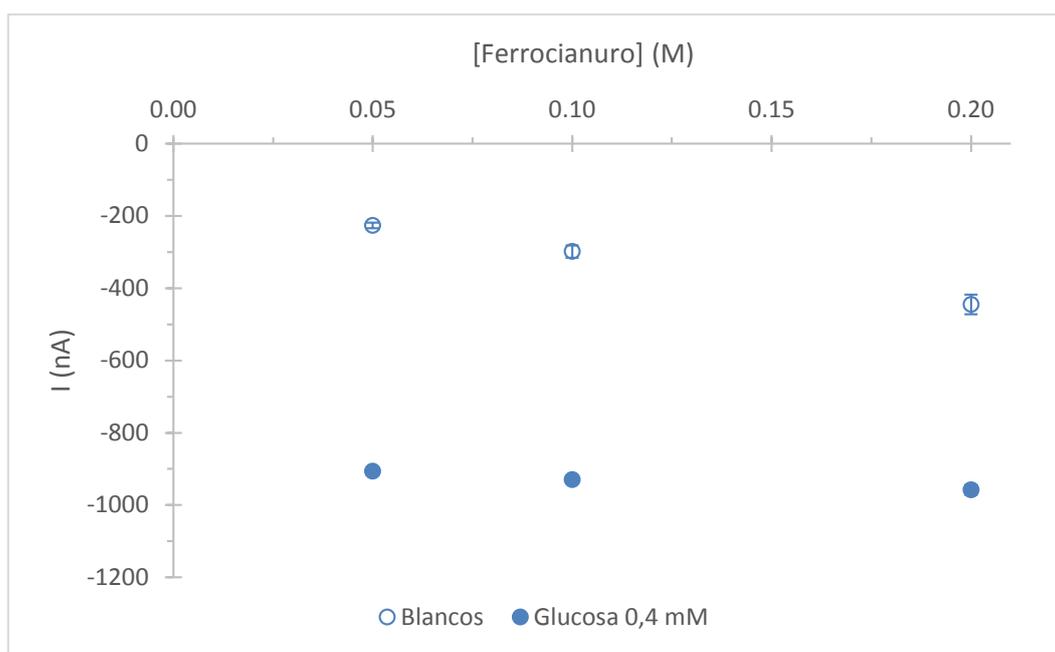
En el caso del electrodo de trabajo de papel, se vuelve a observar una tendencia por parte del HRP a aumentar los blancos, mientras que las señales de glucosa siguen siendo muy similares. Por lo tanto, aunque la mezcla de enzimas para la cual el blanco es menor y la señal de glucosa mayor, en valor absoluto, corresponde a 0,8 U/ $\mu$ L de GOx y 2,5 U/ $\mu$ L de HRP, se escoge la mezcla con 1,6 U/ $\mu$ L de GOx y 2,5 U/ $\mu$ L de HRP, cuya señal neta es similar a la anterior y más reproducible.

### 3.3.2.2. Optimización de la concentración de ferrocianuro

Una vez seleccionadas las concentraciones de enzimas, se optimiza la concentración de ferrocianuro que actúa como mediador. Para ello se ensayan diferentes concentraciones de mediador usando las concentraciones de enzimas optimizadas anteriormente.

En primer lugar se optimiza la concentración del mediador para el biosensor en SPCE. Para ello se preparan diferentes biosensores utilizando mezclas de enzimas con ferrocianuro en las que se fijan las concentraciones de GOx y HRP (1,6 y 2,5 U/ $\mu$ L respectivamente) y se varía la concentración del mediador. Se prueban tres concentraciones de ferrocianuro: 0,05, 0,1 y 0,2 M, y para cada caso se mide blanco (disolución reguladora) y glucosa de concentración 0,4 mM.

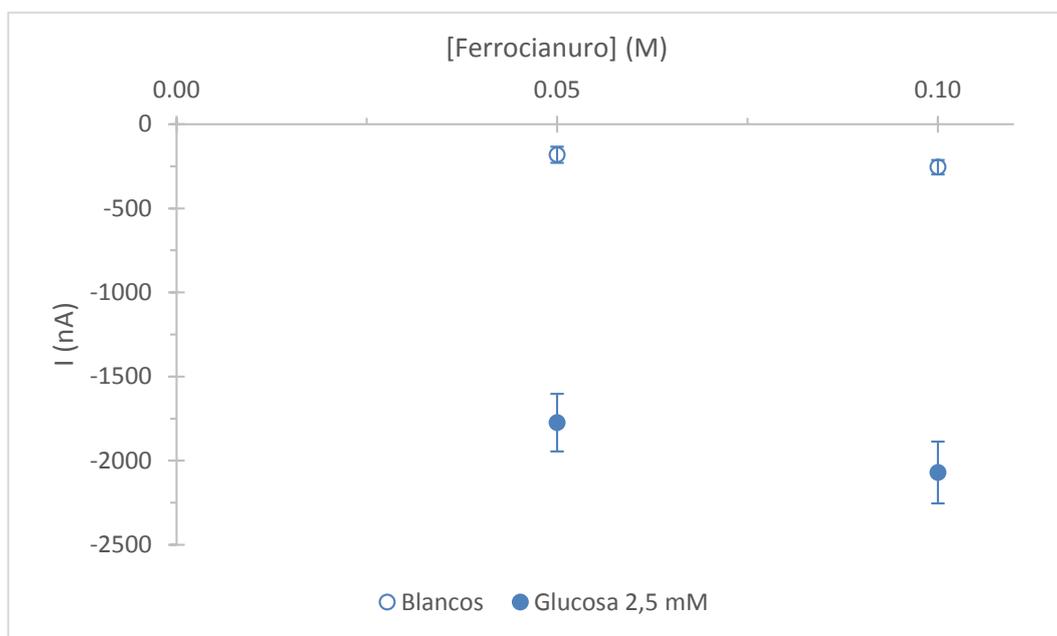
En la **Figura 3.12** se representan las intensidades de corriente para blancos (disolución reguladora) y glucosa 0,4 mM en función de la concentración de ferrocianuro, con concentraciones fijas de enzimas.



**Figura 3.12.** Intensidades de corriente de blancos de disolución reguladora tris- $\text{HNO}_3$  y glucosa 0,4 mM para ferrocianuro 0,05, 0,01 y 0,2 M utilizando HRP 2,5 U/ $\mu$ L y GOx 1,6 U/ $\mu$ L en SPCE (n=3)

Como se puede observar, las señales para la glucosa, en valor absoluto, prácticamente no varían con la concentración de ferrocianuro, mientras que la intensidad de corriente en valor absoluto para los blancos sí disminuye al disminuir la concentración del mediador en la mezcla. Por tanto, la concentración de ferrocianuro escogida como óptima es 0,05 M, ya que da una señal neta mayor.

En el biosensor utilizando electrodos de trabajo de papel se ensayaron dos concentraciones de ferrocianuro: 0,05 y 0,1 M, tanto en blancos de disolución reguladora como en glucosa 2,5 mM, preparando mezclas con concentraciones fijas de enzimas (1,6 U/ $\mu$ L para GOx y 2,5 U/ $\mu$ L para HRP) y ferrocianuro. Los datos se pueden ver representados en la **Figura 3.13**.



**Figura 3.13.** Intensidades de corriente de blancos de disolución reguladora y de glucosa 2,5 mM para ferrocianuro 0,05 y 0,1 M, utilizando 1,6 U/ $\mu$ L de GOx y 2,5 U/ $\mu$ L de HRP en electrodo de trabajo de papel (n=3)

A la vista de la **Figura 3.13**, se deduce que la concentración de ferrocianuro más adecuada es 0,1 M ya que, en valor absoluto, da la mayor señal neta para la glucosa además de la mejor reproducibilidad.

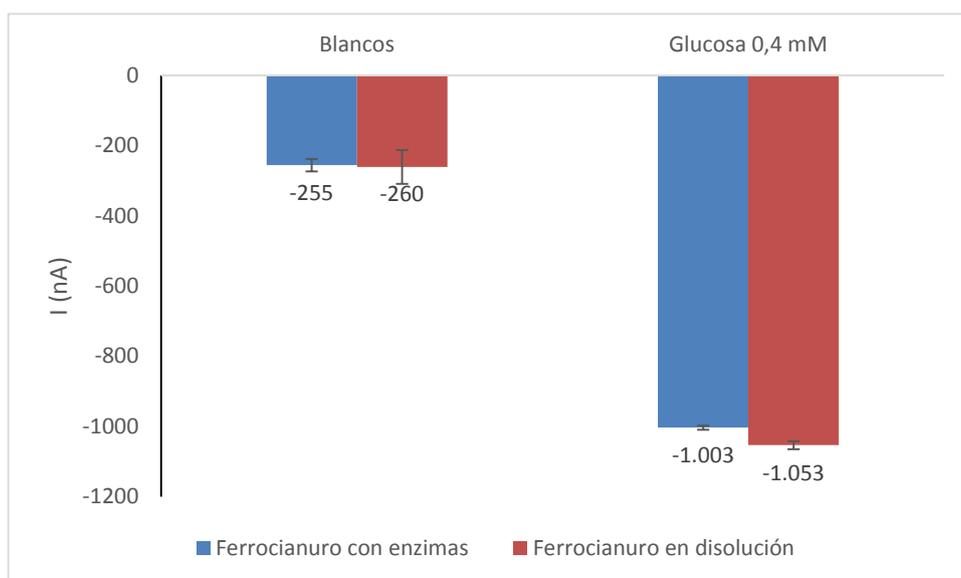
### 3.3.2.3. Procedimiento para añadir el ferrocianuro al sistema

Teniendo en cuenta que la mezcla de enzimas y mediador se deja secando al aire durante una hora, se pensó que una parte del ferrocianuro podría oxidarse en ese tiempo. Esta oxidación provocaría un aumento sobre todo de los blancos, debido a la reducción de ese ferrocianuro que se habría oxidado al aire y no enzimáticamente.

Para comprobar si el hecho de dejar el ferrocianuro al aire tiene efecto en las señales dadas por los biosensores, se ensaya otro método para incorporar el ferrocianuro a la cascada de reacciones enzimáticas. Se comparan blancos y señales para el sensor construido como en el

apartado anterior (depositando mezcla de enzimas y ferrocianuro sobre el electrodo de trabajo) y para el sensor construido depositando sobre el electrodo de trabajo una mezcla sólo de enzimas que se deja secar al aire, sobre la que luego se realiza la cronoamperometría añadiendo el ferrocianuro a la disolución de medida. De esta manera, se consigue que el mediador no esté expuesto a la posible oxidación por el oxígeno durante el tiempo de secado. Además, antes de aplicar el potencial de cronoamperometría durante 100 segundos, se deja el biosensor con las enzimas junto con la gota con la disolución a medir que incluye el ferrocianuro reaccionar durante 30 segundos, para conseguir que el ferrocianuro se una a las enzimas y tenga lugar la cascada de reacciones enzimáticas.

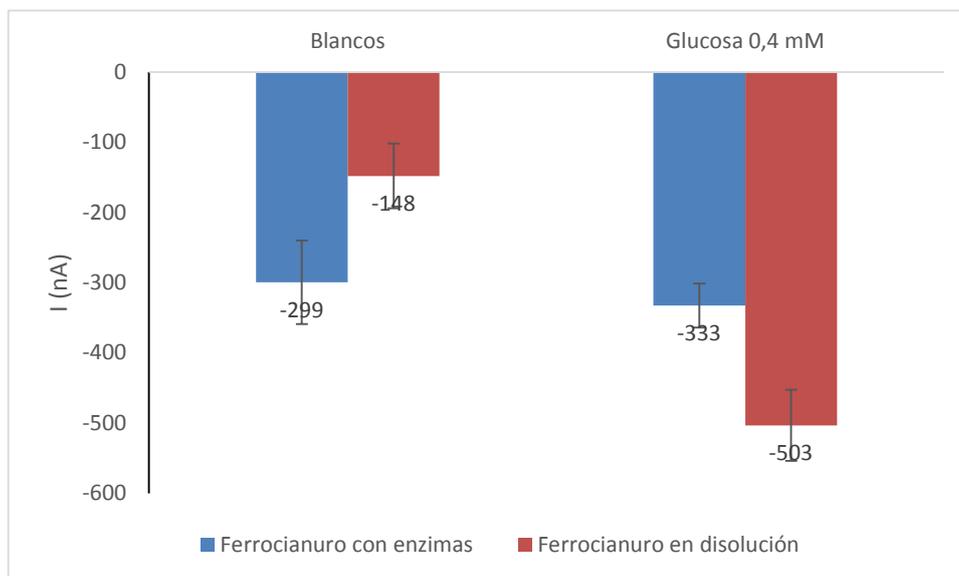
En el caso del biosensor usando SPCEs, y como se puede ver en la **Figura 3.14**, no se aprecia apenas diferencia entre un método u otro, por lo que se opta por incorporar el ferrocianuro junto con las enzimas como se había estado haciendo hasta el momento, ya que es el método más cómodo para construir el biosensor.



**Figura 3.14.** Estudio del método para la incorporación del ferrocianuro en el biosensor usando SPCE: blancos y señales de glucosa 0,4 mM utilizando GOx 1,6 U/  $\mu$ L, HRP 2.5 u/  $\mu$ L y ferrocianuro 0,05 M (n=3)

Cuando el biosensor se construye con el electrodo de trabajo de papel, se puede observar en la **Figura 3.15** que existen claras diferencias entre un método y otro para incorporar el ferrocianuro. Cuando el ferrocianuro se añade a la disolución de medida se ve como, en valor absoluto, aumentan las señales y disminuyen los blancos, por lo que éste es el método de incorporación del ferrocianuro que se decide usar a partir de ahora. Este comportamiento puede ser debido a que el ferrocianuro depositado sobre el papel, al dejarlo al aire durante una hora,

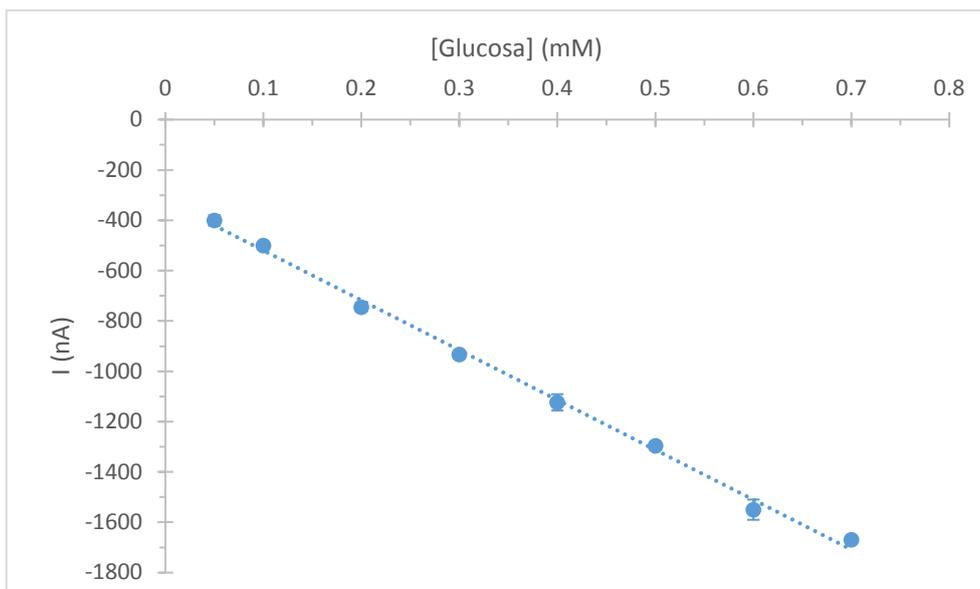
se oxida porque está más expuesto al oxígeno del aire ya que los poros del papel hacen que éste tenga más área superficial que el electrodo de trabajo del SPCE.



**Figura 3.15.** Estudio del método para la incorporación del ferrocianuro en el biosensor usando electrodo de trabajo de papel: blancos y señales de glucosa 0,5 mM utilizando GOx 1.6 U/ $\mu$ L, HRP 2.5 u/ $\mu$ L y ferrocianuro 0,1 M (n=5)

#### 3.3.2.4. Rectas de calibrado

Una vez realizadas las optimizaciones detalladas en los apartados anteriores, y para conocer cómo responden los biosensores desarrollados a diferentes concentraciones de glucosa, se realiza un calibrado en los electrodos serigrafiados y de papel con concentraciones comprendidas entre 0,05 mM y 10 mM. En la **Figura 3.16** se muestra la recta de calibrado obtenida con el biosensor construido utilizando SPCE.



**Figura 3.16.** Recta de calibrado para glucosa en disolución reguladora tris- $\text{HNO}_3$  para biosensor en SPCE, con 1,6 U/ $\mu\text{L}$  de GOx, 2,5 U/ $\mu\text{L}$  de HRP y 0,05 M de ferrocianuro ( $n=3$ )

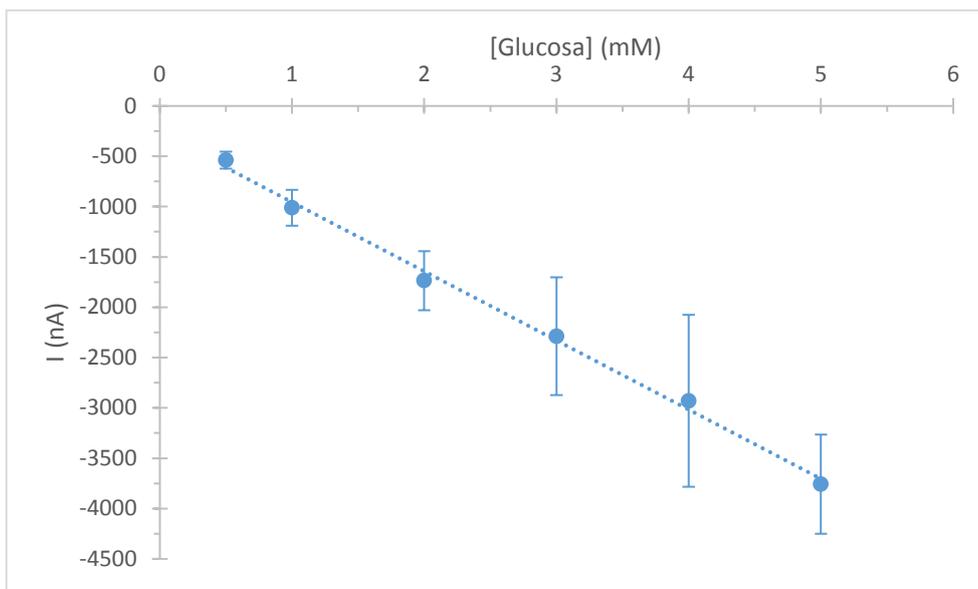
La ecuación de la recta de calibrado anterior es:

$$I \text{ (nA)} = -1983 \text{ (nA/mM)} [\text{Glucosa}] \text{ (mM)} - 321 \text{ (nA)}$$

$$R^2 = 0,996$$

El intervalo lineal va desde 0,05 mM hasta 0,7 mM; y el límite de detección, calculado como tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen dividido entre la pendiente es de 0,03 mM.

En la **Figura 3.17** se puede ver el calibrado para el biosensor construido con el electrodo de trabajo de papel. Se observa que este calibrado abarca concentraciones mucho mayores que el biosensor con SPCE.



**Figura 3.17.** Recta de calibrado para glucosa en disolución reguladora *tris*-HNO<sub>3</sub> para biosensor en electrodo de trabajo de papel, con 1,6 U/μL de GOx, 2,5 U/μL de HRP y 0,1 M de ferrocianuro (n=5)

La recta de calibrado sigue la ecuación:

$$I \text{ (nA)} = -687 \text{ (nA/mM)} [\text{Glucosa}] \text{ (mM)} - 270 \text{ (nA)}$$

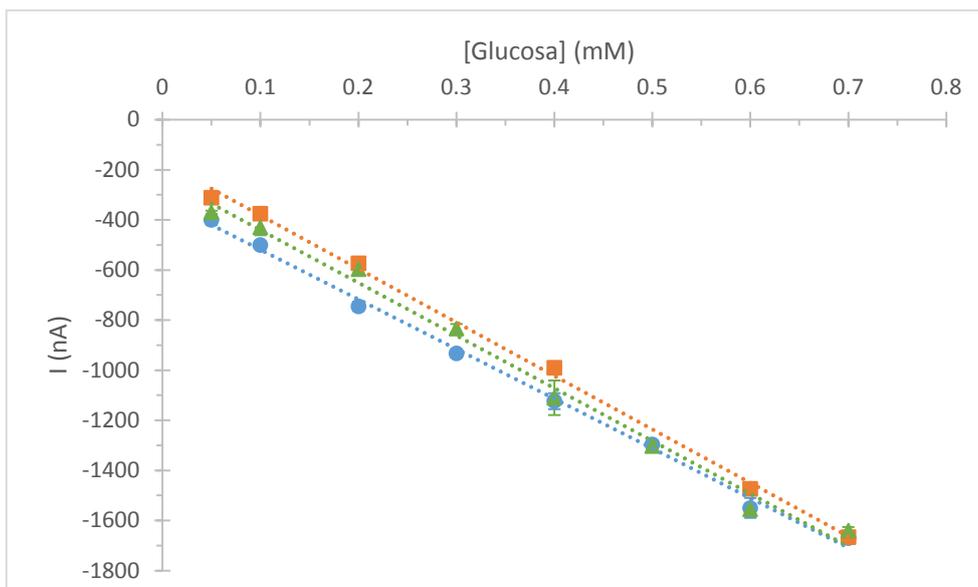
$$R^2 = 0,995$$

El intervalo lineal va desde 0,5 hasta 5 mM; y el límite de detección, calculado de la misma manera que en el caso anterior, es de 0,29 mM.

A la vista de los calibrados obtenidos, se observa que las diferencias más destacables entre el biosensor construido con SPCE y el construido con electrodo de trabajo de papel son que este último mide concentraciones en un rango mayor; y las intensidades de corriente de los blancos, en valor absoluto, son más bajas, como se puede observar en la ordenada en el origen. Además, el biosensor construido con SPCE es más sensible debido a que su pendiente es mayor. Ambos biosensores presentan buena linealidad.

### 3.3.3. Reproducibilidad

La reproducibilidad de los sensores construidos se estudia mediante la comparación de tres calibrados realizados en días diferentes, con disoluciones diferentes de *tris*-HNO<sub>3</sub>, enzimas, mediador y glucosa. En la **Figura 3.18** se pueden observar los calibrados para el biosensor construido con SPCE (el representado en color azul es el hallado en el **Apartado 3.3.2.4**).



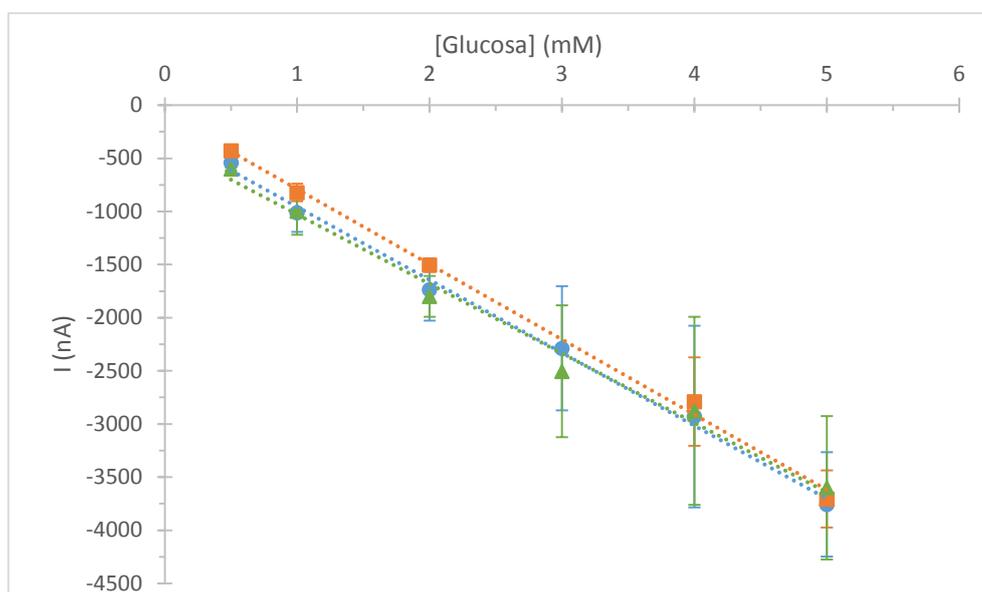
**Figura 3.18.** Estudio de reproducibilidad para el biosensor en SPCEs: rectas de calibrado para glucosa en disolución reguladora tris- $\text{HNO}_3$  obtenidas en diferentes días con GOx 1,6 U/ $\mu\text{L}$ , 2,5 U/ $\mu\text{L}$  y ferrocianuro 0,05 M (n=3)

En la **Tabla 3.1** se pueden ver los valores de las pendientes, de la ordenada en el origen, del coeficiente de regresión  $R^2$  y del intervalo lineal para los tres calibrados anteriores. A simple vista se observa que la reproducibilidad es más que aceptable, lo que se corrobora con un valor de 3,9 % para la DER (Desviación Estándar Relativa) de las pendientes. Además, hay que tener en consideración que para cada calibrado están presentes las barras de error de cada punto (3 réplicas por concentración y calibrado) aunque no se aprecien con claridad, lo que indica que la desviación entre medidas dentro de un mismo calibrado es pequeña.

**Tabla 3.1.** Estudio de reproducibilidad: características de los tres calibrados de glucosa llevados a cabo con el biosensor sobre SPCE con GOx 1,6 U/ $\mu\text{L}$ , 2,5 U/ $\mu\text{L}$  y ferrocianuro 0,05 M

Recta	Pendiente (nA/mM)	Ordenada en el origen (nA)	$R^2$	Intervalo lineal (mM)
—●—	- 1983	- 321	0,996	0,05 – 0,7
—■—	- 2136	- 168	0,997	0,05 – 0,7
—▲—	- 2105	- 230	0,991	0,05 – 0,7
<b>Promedio</b>	- 2075			
<b>Desviación estándar</b>	81			
<b>% DER</b>	3,9			

A continuación se lleva a cabo el mismo estudio, pero este caso para el sensor con el electrodo de trabajo de papel. La **Figura 3.19** muestra la comparación de los tres calibrados para este sensor (el representado en color azul es el obtenido en el **Apartado 3.3.2.4**).



**Figura 3.19.** Estudio de reproducibilidad en electrodos de trabajo de papel: rectas de calibrado para glucosa en disolución reguladora tris- $\text{HNO}_3$  obtenidas en diferentes días con GOx 1,6 U/ $\mu\text{L}$ , 2,5 U/ $\mu\text{L}$  y ferrocianuro 0,1 M (n=5)

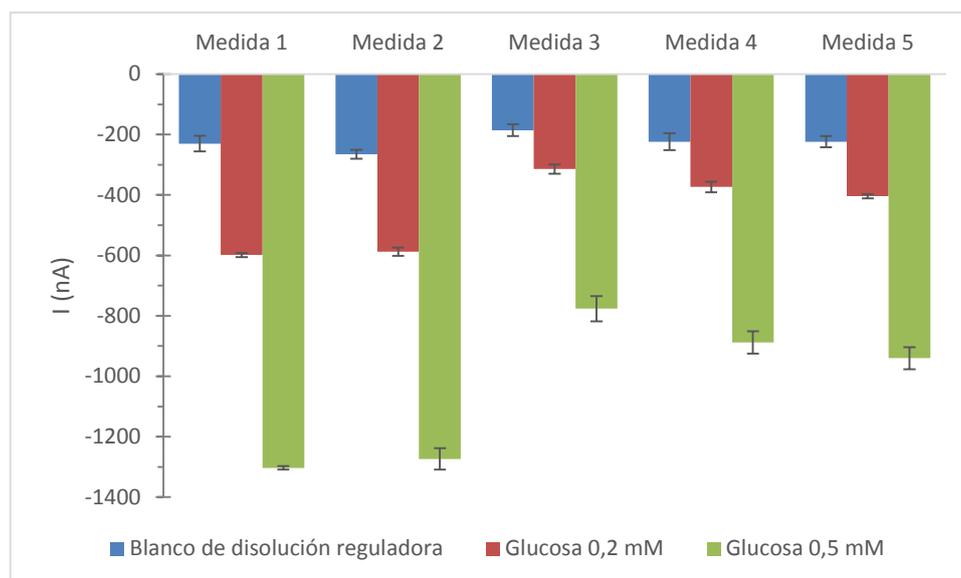
En la **Tabla 3.2** se pueden ver los valores de las pendientes, de la ordenada en el origen, del coeficiente de regresión  $R^2$  y del intervalo lineal, observando que la reproducibilidad es buena, como corrobora la DER (%) de la media de las pendientes.

**Tabla 3.2.** Estudio de reproducibilidad: características de los tres calibrados de glucosa llevados a cabo con el biosensor con electrodo de trabajo de papel con GOx 1,6 U/ $\mu\text{L}$ , 2,5 U/ $\mu\text{L}$  y ferrocianuro 0,1 M

Recta	Pendiente (nA/mM)	Ordenada en el origen (nA)	$R^2$	Intervalo lineal (mM)
—●—	- 687	- 270	0,995	0,5 – 5
—■—	- 707	- 83	0,996	0,5 – 5
—▲—	- 654	- 374	0,98	0,5 – 5
<b>Promedio</b>	- 683			
<b>Desviación estándar</b>	27			
<b>% DER</b>	3,9			

### 3.3.4. Estudio de reutilización del transductor

Por otro lado, en el biosensor con SPCE también se ha estudiado si el transductor permite su reutilización. Para ello, se preparan varios biosensores con los que se miden blancos de disolución reguladora y dos disoluciones de glucosa de concentraciones 0,2 y 0,5 mM. Una vez hechas las medidas, los SPCE se lavan con abundante agua y se secan. A continuación, y sobre esos mismos SPCE, se vuelve a depositar la mezcla de enzimas y ferrocianuro, y se deja secar. Tras ello se realizan las mismas medidas de blanco y de glucosa pero alternando los transductores, es decir, los biosensores con los SPCEs que se habían utilizado para medir blanco ahora se utilizan para medir una disolución de glucosa, y así sucesivamente, rotando los transductores con el objetivo de comprobar si hay efecto memoria en los SPCEs al reutilizarlos. En la **Figura 3.20** se pueden observar las intensidades de corriente para cada disolución en los SPCEs reutilizados.



**Figura 3.20.** Estudio de reutilización del transductor en los biosensores construidos con SPCE con GOx 1,6 U/ $\mu$ L, 2,5 U/ $\mu$ L y ferrocianuro 0,05 M: medidas de blanco y glucosa 0,2 mM y 0,5 mM en disolución reguladora tris-HNO<sub>3</sub> repetidas 5 veces utilizando los mismos SPCE

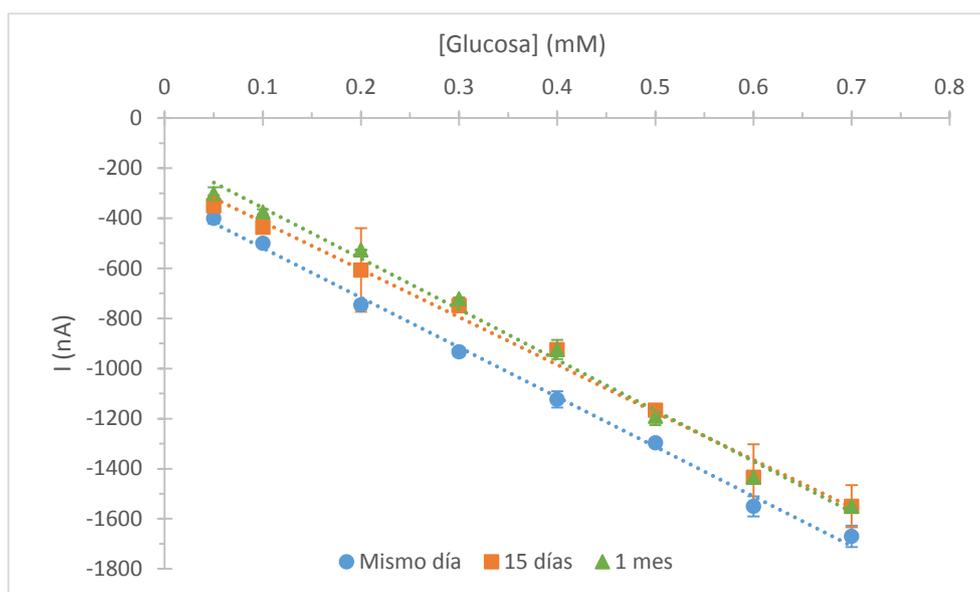
A la vista de los resultados, se puede decir que los electrodos serigrafados de carbono no son reutilizables más de dos veces como transductor para este biosensor. En cambio, en el caso del biosensor con el electrodo de trabajo de papel, como ya se indicó en el **Apartado 3.2.2**, el electrodo SPCE que sirve como conexión se puede reutilizar para varias medidas. Este SPCE se puede reutilizar sin observar cambios significativos para al menos 10 medidas aproximadamente, lo que se traduce en un gran ahorro en costes (puede que haya que

desecharlo antes si se observa deterioro del mismo, pero en ocasiones puede soportar alguna medida más de las que aquí se indican).

### 3.3.5. Estabilidad

Otra característica importante que ha de tener un biosensor es estabilidad, es decir, que mantenga su capacidad de respuesta tras un tiempo de almacenamiento. Para estudiar la estabilidad del biosensor se hace el siguiente ensayo: se preparan biosensores con SPCE y con electrodo de papel, y se almacenan durante un periodo de tiempo determinado a 4 °C y protegidos de la luz. Al cabo de 15 días y un mes de almacenamiento, se realizan calibrados utilizando estos biosensores. Estos calibrados se comparan con los expuestos para cada biosensor en el **Apartado 3.3.2.4**.

En la **Figura 3.21** se pueden ver los calibrados para el biosensor con SPCE realizados en el mismo día de la preparación del biosensor y después de 15 días y un mes de almacenamiento tras su preparación.



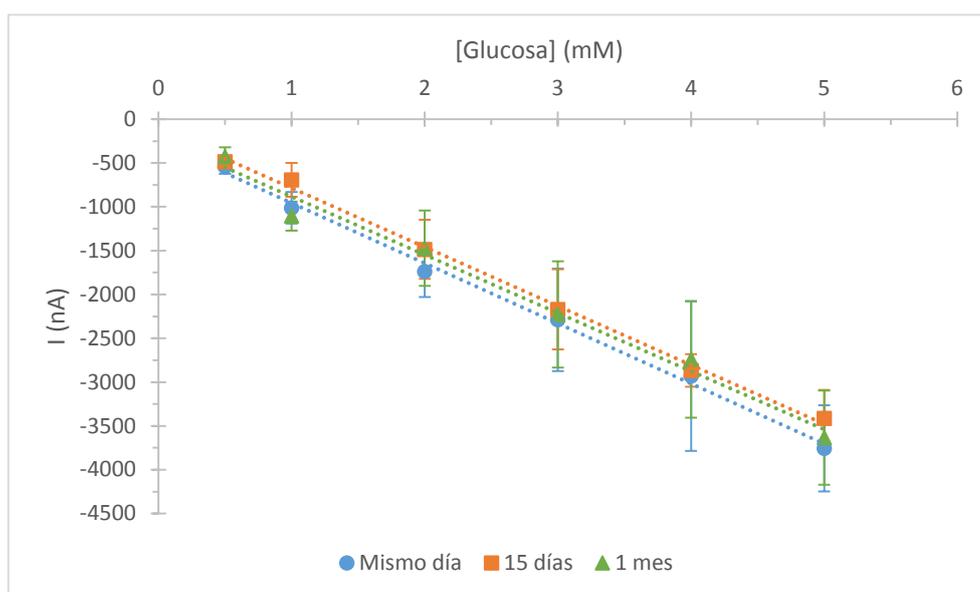
**Figura 3.21.** Estudio de estabilidad para biosensor con SPCE con GOx 1,6 U/ $\mu$ L, 2,5 U/ $\mu$ L y ferrocianuro 0,05 M: rectas de calibrado de glucosa realizadas el mismo día de la preparación y tras 15 días y 1 mes almacenados

En la **Tabla 3.3** se pueden ver los parámetros de los calibrados obtenidos, comprobando que este biosensor es estable al menos durante un mes si se almacena a 4 °C y protegido de la luz.

**Tabla 3.3.** Estudio de estabilidad para biosensor con SPCE con GOx 1,6 U/μL, 2,5 U/μL y ferrocianuro 0,05 M: parámetros de los calibrados de glucosa realizadas el mismo día de la preparación y tras 15 días y 1 mes almacenados

Recta	Pendiente (nA/mM)	Ordenada en el origen (nA)	R <sup>2</sup>	Intervalo lineal (mM)
●	- 1983	- 321	0,996	0,05 – 0,7
■	- 1898	- 226	0,991	0,05 – 0,7
▲	- 2023	- 157	0,992	0,05 – 0,7
<b>Promedio</b>	- 1968			
<b>Desviación estándar</b>	64			
<b>% DER</b>	3,2			

En la siguiente figura (**Figura 3.22**) se encuentran las rectas de calibrado correspondientes al estudio de estabilidad en el biosensor con electrodo de trabajo de papel.



**Figura 3.22.** Estudio de estabilidad para biosensor con electrodo de trabajo de papel con GOx 1,6 U/μL, 2,5 U/μL y ferrocianuro 0,1 M: rectas de calibrado de glucosa realizadas el mismo día de la preparación y tras 15 días y un mes almacenado

En la **Tabla 3.4** se pueden ver los parámetros obtenidos del calibrado, observando que este biosensor también es estable al menos durante un mes guardado a 4 °C y protegido de la luz.

**Tabla 3.4.** Estudio de estabilidad para biosensor con electrodo de trabajo de papel con GOx 1,6 U/ $\mu$ L, 2,5 U/ $\mu$ L y ferrocianuro 0,1 M: parámetros del calibrado de glucosa realizadas el mismo día de la preparación y tras 15 días y un mes almacenado

Recta	Pendiente (nA/mM)	Ordenada en el origen (nA)	R <sup>2</sup>	Intervalo lineal (mM)
	- 687	- 270	0,995	0,5 – 5
	- 773	- 112	0,997	0,5 – 5
	- 664	- 220	0,98	0,5 – 5
<b>Promedio</b>	- 708			
<b>Desviación estándar</b>	- 58			
<b>% DER</b>	8,1			

### 3.3.6. Estudio de interferencias

La selectividad es otra característica importante que ha de tener un sensor. Una vez realizados los estudios de reproducibilidad y estabilidad, se estudian posibles interferentes que puedan afectar a estos biosensores, como por ejemplo la fructosa o el ácido ascórbico. Para estudiar la selectividad de los biosensores frente a estas especies, con cada uno de ellos se realizan medidas de blanco de disolución reguladora, de glucosa (G), fructosa (F) y ácido ascórbico (AA), y de mezclas de glucosa con ácido ascórbico y de glucosa con fructosa. Las señales recogidas para cada caso se encuentran en la **Tabla 3.5**.

**Tabla 3.5.** Estudio de interferencias para biosensor con SPCE (1,6 U/μL de GOx, 2,5 U/μL de HRP y 0,05 M de ferrocianuro, n=3) y con electrodo de trabajo de papel (con 1,6 U/μL de GOx, 2,5 U/μL de HRP y 0,1 M de ferrocianuro, n=5): intensidad de corriente para distintas disoluciones

Biosensor con SPCE			Biosensor con electrodo de papel		
	I (nA)	% DER		I (nA)	% DER
<b>Blanco</b>	- 386,0	2,7	<b>Blanco</b>	- 156,3	6,4
<b>Glucosa 0,3 mM</b>	- 790,7	2,6	<b>Glucosa 2,5 mM</b>	- 1986,7	9,0
<b>Fructosa 0,3 mM</b>	- 348,5	3,4	<b>Fructosa 2,5 mM</b>	- 148,3	13,8
<b>AA 0,15 mM</b>	- 893,0	0,3	<b>AA 1,25 mM</b>	- 261,5	5,7
<b>AA 0,3 mM</b>	- 987,7	0,1	<b>AA 2,5 mM</b>	- 272,7	2,4
<b>G 0,3 mM/F 0,3 mM</b>	- 851,7	3,5	<b>G 2,5 mM/F 2,5 mM</b>	- 2086,7	18,2
<b>G 0,3 mM/AA 0,15 mM</b>	- 382,0	1,8	<b>G 2,5 mM/AA 1,25 mM</b>	- 854,4	10,4
<b>G 0,3 mM/AA 0,3 mM</b>	- 538,0	4,7	<b>G 2,5 mM/AA 2,5 mM</b>	- 423,1	6,1
<b>G 0,3 mM/AA 6 μM</b>	- 829,0	3,5	<b>G 2,5 mM/AA 0,05 mM</b>	- 1926,7	8,4

A la vista de los resultados, en el caso del biosensor de SPCE, la fructosa no constituye un interferente, ya que por sí sola da una señal similar a la del blanco, y al mezclarla con la glucosa a iguales concentraciones de glucosa y fructosa da un ligero aumento de señal (en valor absoluto) pero no muy significativo. La presencia de ácido ascórbico, en este biosensor, si afecta más a la señal, tanto en la mezcla de glucosa y ácido ascórbico como por sí solo.

En el biosensor con el electrodo de trabajo de papel, se puede observar que la fructosa tampoco es un interferente serio. En cambio, la presencia de ácido ascórbico en este biosensor también afecta, haciendo disminuir la señal, en valor absoluto.

A pesar de que el ácido ascórbico a concentraciones próximas a la glucosa sí es un interferente en los dos biosensores, hay que tener en cuenta que, como se ha encontrado en la bibliografía<sup>49</sup>, la concentración de ácido ascórbico en muestras reales de zumos resulta ser unas 50 veces menos que la de glucosa, por lo que se prepara y se mide una mezcla de glucosa y ácido ascórbico en esa proporción, comprobando que el ácido ascórbico no produce una interferencia significativa (última fila de la **Tabla 3.5**).

Por lo tanto, se puede decir que ni la fructosa ni el ácido ascórbico (en la proporción en la que se encuentra en muestras reales como por ejemplo zumos) son interferentes serios para ninguno de los dos biosensores.

### 3.3.7. Muestras reales

Por último, los biosensores desarrollados se utilizan para el análisis de glucosa en muestras reales. Las muestras utilizadas para la determinación de la glucosa son miel y un zumo de naranja no concentrado. El único pretratamiento de muestra necesario es diluir la misma en disolución reguladora hasta que llegue a tener una concentración que esté comprendida dentro del rango lineal que abarca el calibrado de cada biosensor. Todas estas diluciones se hacen en la disolución reguladora *tris*-HNO<sub>3</sub> 0,1 M y de pH = 7,00.

Una vez medidas las muestras con cada uno de los biosensores y utilizando el calibrado para cada biosensor desarrollado en el **Apartado 3.3.2.4**, se calcula la concentración de glucosa. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 3.6** (los valores de intensidades de corriente para cada muestra en cada biosensor se recogen en la **Tabla I** y **Tabla II** del **Anexo**).

**Tabla 3.6.** Determinación de glucosa en muestras reales para el biosensor con SPCE (1,6 U/μL de GOx, 2,5 U/μL de HRP y 0,05 M de ferrocianuro, n=3) y con electrodo de trabajo de papel (con 1,6 U/μL de GOx, 2,5 U/μL de HRP y 0,1 M de ferrocianuro, n=3)

Muestra	Biosensor SPCE	Biosensor papel
Miel (g/100 g)	25 ± 2	26 ± 5
Zumo de naranja (g/L)	28,2 ± 0,4	29 ± 6

Como se puede observar, los valores de concentración de glucosa que proporcionan ambos biosensores son muy próximos entre sí, y se encuentran dentro del rango de concentraciones esperado para este tipo de muestras<sup>50, 51, 52</sup>.

## 4. CONCLUSIONES

---

Las principales conclusiones que se pueden extraer una vez concluido este trabajo son las siguientes:

- Se han desarrollado dos sensores enzimáticos para la determinación de glucosa utilizando procedimientos muy similares para ambos y dos transductores diferentes. Se ha comprobado que ambos sensores permiten determinar la concentración de glucosa, además de poseer buenas capacidades en cuanto a reproducibilidad, estabilidad e interferencias.
- La metodología de inmovilización de las enzimas que constituyen la fase sensora es muy simple y proporciona buena reproducibilidad y estabilidad.
- Ni la fructosa ni el ácido ascórbico en las concentraciones las que se encuentran en posibles muestras reales son interferentes serios de estos biosensores.
- Ambos biosensores permiten la determinación de glucosa en muestras reales con un mínimo tratamiento de muestra.
- Ambos biosensores son estables al menos durante un mes si se almacenan a 4 °C y protegidos de la luz.
- Se ha comprobado que usar un transductor u otro para el desarrollo del biosensor, siendo la fase sensora muy similar para ambos, hace que se obtengan biosensores con características analíticas diferentes. Se observa que el uso del electrodo de trabajo de papel sobre SPCE como transductor produce un biosensor capaz de determinar glucosa a concentraciones mayores (de 0,5 a 5 mM) que el biosensor desarrollado con un SPCE (de 0,05 a 0,7 mM).
- El uso del electrodo de trabajo de papel combinado con el SPCE como transductor para este biosensor permite la reutilización del SPCE al menos 10 veces.
- El papel es una alternativa de bajo coste muy adecuada para desarrollar superficies electrónicas.

## 5. PERSPECTIVAS DE FUTURO

---

Tras la construcción de estos dos sensores enzimáticos, reproducibles, con una estabilidad de al menos un mes y capaces de determinar la concentración de glucosa en muestras reales, los próximos objetivos a cumplir podrían ser:

- Estudiar si los biosensores son estables para tiempos de almacenamiento mayores. Por el momento no se ha podido llevar a cabo en este trabajo por falta de tiempo.
- En el caso del transductor con el electrodo de trabajo de papel, intentar mejorar la reproducibilidad. Por ejemplo, mediante la modificación del electrodo de papel con nanomateriales u optimizando el proceso de deposición de la tinta de carbono se podrían mejorar las características analíticas del transductor.
- Para el biosensor con electrodo de trabajo de papel, estudiar cómo mejorar el modo de incorporación del ferrocianuro, de manera que se pueda obtener un dispositivo de análisis aún más rápido y fácil de usar.
- Aplicar los biosensores para la cuantificación de glucosa en otro tipo de muestras, como suero sanguíneo.
- Utilizar el transductor con el electrodo de trabajo de papel para el desarrollo de biosensores que puedan determinar otro tipo de analitos.

## 6. ANEXO

---

**Tabla I.** Determinación de glucosa en muestras reales para el biosensor con SPCE (n=3), con GOx 1,6 U/ $\mu$ L, 2,5 U/ $\mu$ L y ferrocianuro 0,05 M

MIEL				ZUMO			
I (nA)	- 841	- 852	- 901	I (nA)	- 1370	- 1350	- 1350
Concentración (mM)	0,26	0,27	0,29	Concentración (mM)	0,53	0,52	0,52
Conc. muestra real (g/100g)	23,62	24,12	26,35	Conc. muestra real (g/L)	28,59	28,05	28,05
Media	25			Media	28,2		
Desviación estándar	2			Desviación estándar	0,4		

**Tabla II.** Determinación de glucosa en muestras reales para el biosensor con electrodo de trabajo de papel (n=3), con GOx 1,6 U/ $\mu$ L, 2,5 U/ $\mu$ L y ferrocianuro 0,1 M

MIEL				ZUMO			
I (nA)	- 1890	- 2270	- 2560	I (nA)	- 2930	- 2470	- 3570
Concentración (mM)	2,36	2,91	3,34	Concentración (mM)	3,87	3,20	4,81
Conc. muestra real (g/100g)	21,26	26,24	30,04	Conc. muestra real (g/L)	27,92	23,09	34,63
Media	26			Media	29		
Desviación estándar	5			Desviación estándar	6		

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] M. Varcárcel, M. S. Cárdenas; "Automatización y Miniaturización en Química Analítica"; *Springer*. Barcelona, **2000**.
- [2] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego; "Sample screening systems in analytical chemistry"; *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 685-694.
- [3] R. P. Feynmann; "There is plenty of room at the bottom"; *Engineering and Science.* **1960**, 22-36.
- [4] O. Domínguez Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, M. J. Arcos Martínez; "Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications"; *Talanta.* **2007**, *73*, 202-219.
- [5] S. Kröger, A. P. F. Turner; "Solvent-resistant carbon electrodes screen printed onto plastic for use in biosensors"; *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *347*, 9-18.
- [6] T. M. Adams, R.A. Layton; "Introductory MEMS: Fabrication and Applications"; *Springer*. Nueva York, **2010**.
- [7] J. Wang, B. Tian, V. B. Nascimento, L. Angnes; "Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks"; *Electrochim. Acta.* **1997**, *43*, 3459-3465.
- [8] A. Hayat, J. L. Marty; "Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring"; *Sensors.* **2014**, *14*, 10432-10453.
- [9] D. Martín Yerga, M. C. Blanco López, M. T. Fernández Abedul, A. Costa García; "Dispositivos Point-of-Use para análisis"; *Boletín GRASEQA.* **2014**, *8*, 29-43.
- [10] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P. J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García; "Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes"; *Electrochim. Acta.* **2008**, *53*, 3635-3642.
- [11] C. S. K. Lawrence, S. N. Tan, C. Z. Floresca; "A "green" cellulose paper based glucose amperometric biosensor"; *Sens. Actuators, B.* **2014**, *193*, 536-541.
- [12] W. Jung, J. Han, J. Choi, C. H. Ahn; "Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies"; *Microelectron. Eng.* **2015**, *132*, 46-57.
- [13] R. W. Peeling, D. Mabey; "Point-of-care test for diagnosing infections in the developing world"; *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1062-1069.
- [14] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides; "Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices"; *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3-10.

- [15] J. Yu, L. Ge, J. Huang, S. Wang, S. Ge; "Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid"; *Lab Chip*. **2011**, *11*, 1286-1291.
- [16] E. Carrilho, A. W. Martinez, G. M. Whitesides; "Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics"; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7091-7095.
- [17] W. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry; "Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics"; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5821-5826.
- [18] Diccionario de la Real Academia Española (RAE), [www.rae.es](http://www.rae.es) (Última consulta: Junio 2015).
- [19] O. S. Wolfbeis; "Probes, Sensors, and Labels: Why is Real Progress Slow?"; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9864-9865.
- [20] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson; "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification"; *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121-131.
- [21] J. Janata; "Principles of Chemical Sensors"; *Springer*. Nueva York, **2009**.
- [22] S. Zhang, G. Wright, Y. Yang; "Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction"; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 273-282.
- [23] "IUPAC. Compendium of Chemical Terminology", 2ª edición (el "Gold Book"). Recopilado por A. D. McNaught, A. Wilkinson. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford, **1997**.
- [24] R. Renneberg, D. Pfeiffer, F. Lisdat, G. Wilson, U. Wollenberger, F. Ligler, A. P. F. Turner; "Frieder Scheller and the Short History of Biosensors"; *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **2007**, *109*, 1-18.
- [25] F. W. Scheller, U. Wollenberger, A. Warsinke, F. Lisdat; "Research and development in biosensors"; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 35-40.
- [26] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson; "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification"; *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 2333-2348.
- [27] A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón, "Biosensores electroquímicos: Una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico"; *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. Segunda Época. Abril-Junio, **2000**.
- [28] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult; "Electrochemical Biosensors – Sensor Principles and Architectures"; *Sensors*. **2008**, *8*, 1400-1458.

- [29] M. Pohanka, P. Skládal; "Electrochemical biosensors – principles and applications"; *J. Appl. Biomed.* **2008**, *6*, 57-64.
- [30] J. M. Pingarrón Carrazón, P. Sánchez Batanero; "Química electroanalítica: Fundamentos y aplicaciones"; *Editorial Síntesis*. Madrid, **2003**.
- [31] L. Murphy; "Biosensors and bioelectrochemistry"; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 177-184.
- [32] J. Wang; "Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review"; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 47-53.
- [33] I. E. Tothill; "Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector"; *Comput. Electron. Agric.* **2001**, *30*, 205-218.
- [34] L. D. Mello, L. T. Kubota; "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries"; *Food Chem.* **2001**, *77*, 237-256.
- [35] V. Leskovac, S. Trivić, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, D. Peričin; "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors"; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 731-750.
- [36] S. P. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, L. Ananthanarayan; "Glucose oxidase – an overview"; *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 489-501.
- [37] F. Passardi, G. Theiler, M. Zamocky, C. Cosio, N. Rouhier, F. Teixeira, M. Margis-Pinheiro, V. Ioannidis, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand; "Peroxibase: The peroxidase database"; *Phytochemistry.* **2007**, *68*, 1605-1611.
- [38] M. Hamid, Khalil-ur-Rehman; "Potential applications of peroxidases"; *Food Chem.* **2009**, *115*, 1177-1186.
- [39] N. C. Veitch; "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme"; *Phytochemistry.* **2004**, *65*, 249-259.
- [40] G. A. Carriedo; "La Química Inorgánica en reacciones"; *Editorial Síntesis*. Madrid, **2011**.
- [41] A. L. Galant, R. C. Kaufman, J. D. Wilson; "Glucose: Detection and analysis"; *Food Chem.* **2015**, *188*, 149-160.
- [42] L. G. Wade, Jr; "Química Orgánica"; *Editorial Pearson Prentice Hall*. Madrid, **2010**.
- [43] A. Heller, B. Feldman; "Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management"; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2482-2505.

- [44] American Diabetes Association; “Standard of Medical Care in Diabetes – 2014”; *Diabetes Care*. **2014**, *37*, S14-S80.
- [45] MedlinePlus, Enciclopedia médica, [www.nlm.nih.gov/medlineplus/](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/) (Última consulta: Junio 2015).
- [46] J. Biscay, E. Costa Rama, M. B. González García, J. M. Pingarrón Carrazón, A. Costa García; “Enzymatic Sensor Using Mediator-Screen-Printed Carbon Electrodes”; *Electroanalysis*. **2011**, *23*, 209-214.
- [47] Dropsens, [www.dropsens.com](http://www.dropsens.com) (Última consulta: Junio 2015)
- [48] Sigma-Aldrich, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Última consulta: Junio 2015)
- [49] A. Barberis, Y. Spissu, A. Fadda, E. Azara, G. Bazzu, S. Marceddu, A. Angioni, D. Sanna, M. Schirra; “Simultaneous amperometric detection of ascorbic acid and antioxidant capacity in orange, blueberry and kiwi juice, by a telemetric system coupled with a fullerene- or nanotubes-modified ascorbate subtractive biosensor”; *Biosens. Bioelectron*. **2015**, *67*, 214-223.
- [50] A. Úbeda Gallego, M. C. Díaz García, M. R. Castellar Rodríguez, J. M. Obón de Castro; “Análisis del perfil de azúcares en zumos de fruta comerciales”; *VI Jornadas de Introducción a la Investigación de la UPCT. Investigación ETSIA*, 58-60.
- [51] Apicultura: Todo sobre la miel, [www.apiservices.com](http://www.apiservices.com) (Última consulta: Julio 2015)
- [52] J. Biscay, E. Costa Rama, M. B. González García, A. Julio Reviejo, J. M. Pingarrón Carrazón, A. Costa Gracia; “Amperometric fructose sensor base don ferrocyanide modified screen-printed carbon electrode”; *Talanta*. **2012**, *88*, 432-438.

