



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Inmovilización de la enzima Glucosa Oxidasa en nanotubos de
carbono**

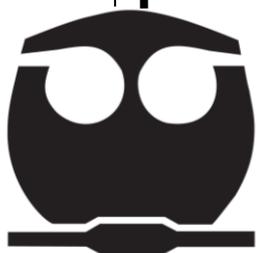
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

OSCAR SANDOVAL VENTURA



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: SALDIVAR Y OSORIO LILIANA VIRGINIA RAQUEL

VOCAL: Profesor: AGUILAR CABALLERO RAÚL GENARO

SECRETARIO: Profesor: CAÑIZARES MACÍAS MARÍA DEL PILAR

1er. SUPLENTE: Profesor: GONZÁLEZ CHÁVEZ JOSÉ LUZ

2° SUPLENTE: Profesor: FLORES ÁVILA CAROLINA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 105-106, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS

SUSTENTANTE:

OSCAR SANDOVAL VENTURA

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por inspirar y crear en mí una visión de esfuerzo, constancia, gratitud, reciprocidad y profesionalismo.

A la Facultad de Química por haberme instruido en esta maravillosa y apasionada ciencia que es la química.

A la Dra. María del Pilar Cañizares Macías por su paciencia, tiempo, amistad y sobre todo por guiarme, alentarme y apoyarme en la realización de este trabajo.

A todos los profesores que conocí y que de alguna u otra manera contribuyeron a mi formación académica.

A los profesores Raúl Aguilar Caballero y Liliana Saldivar por su tiempo en la revisión y corrección de este trabajo.

A todos los amigos que he conocido a lo largo de mi vida, con los que he compartido risas, tristezas, experiencias, juegos, preocupaciones, conocimientos. Sé que seguirá siendo así. Gracias Yolik, Gabriela, Christihan, Andrea, Mireya, Colin, Angeles, Paulina, Javier Silva, Sister, Boyo, Elsi, Jazmín, Fernanda, Erick, Fabián, Kikey, Laura P, Karen Silva, Javier Salinas, Edgar, Irma, Mimiz, Alejandro D. Los quiero mucho.

Al subprograma 127 por haber contribuido a la culminación de este proyecto.

Dedicatorias

A los dos seres humanos que más admiro y amo, mis padres, la Sra. Concepción Guadalupe Ventura Medina y el Sr. Pascual Sandoval Trinidad, por todo lo que han hecho por mi.

A mis abuelos la Sra. Lazara Medina Reyes, el Sr. Erasto Ventura y la Sra. Rufina Trinidad, por la gran tenacidad que tienen para hacer las cosas. Los admiro y quiero mucho.

A mis hermanos Víctor Rubén Sandoval Ventura y Yasbeth Maricela Sandoval Ventura, los quiero.

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

Issac Newton

“La ciencia es un gran juego. Es inspiradora y refrescante, y el campo de juego es el universo entero”

Isidor Isaac Rabi

“Los grandes espíritus siempre han tenido que luchar contra la oposición feroz de mentes mediocres”

Albert Einstein

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

“No hay que olvidar que cuando se descubrió el radio, nadie sabía que resultaría útil en los hospitales. El trabajo era ciencia pura. Y esto es una prueba de que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de la utilidad directa de la misma”

Marie Curie

Índice	Página
Resumen	1
Objetivos	2
Antecedentes	2
1.1 Enzimas	2
1.1.1 Generalidades	2
1.1.2 Clasificación de las enzimas	6
1.1.3 Propiedades de la enzima Glucosa oxidasa	7
1.2 Inmovilización de enzimas	8
1.2.1 Generalidades	8
1.2.2. Clasificación de los métodos de inmovilización	9
1.3 Biosensores y sistemas enzimáticos	11
1.3.1 Generalidades	11
1.3.2 Sensores electroquímicos	12
1.3.3 Transductores amperométricos	12
1.4 Reactores	13
1.4.1 Tipos de reactores	14
1.5 Nanotubos de carbono	15
1.6 Polímeros conductores	17
1.6.1 Polianilina	19
1.7 Análisis por inyección secuencial	22
1.7.1 Generalidades	22
1.7.2 Conceptos básicos	22
1.7.3 Siagrama	24
Capítulo 2 Desarrollo experimental	27
2.1 Equipo	27
2.2 Reactivos	27
2.3 Disoluciones	27
2.4 Normalización de disoluciones	30
2.5 Inmovilización de la enzima GOx en nanotubos de carbono	30
2.5.1 Acondicionamiento de nanotubos de carbono	30
2.5.2 Síntesis de polímero PANI en nanotubos de carbono	31
2.5.3 Acoplamiento con glutaraldehído	32
2.5.4 Inmovilización de la enzima	32
2.6 Inmovilización de la enzima GOx en vidrio de poro controlado	32
2.6.1 Limpieza de vidrio	32
2.6.2 Activación de vidrio	32
2.6.3 Inmovilización de la enzima	33
2.7 Evaluación de la actividad enzimática en línea	33
2.7.1 Preparación del reactor enzimático	33
2.7.2 Configuración del sistema en línea para evaluar la actividad enzimática	34
2.7.3 Fundamento de la reacción	35

Capítulo 3. Resultados y discusión	36
3.1 Síntesis de polímero de anilina en nanotubos de carbono	36
3.2 Caracterización de los nanotubos de carbono	38
3.2.1 Espectroscopia IR	38
3.2.2 Microscopia Electrónica de Transmisión	39
3.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido	40
3.3 Normalización de disoluciones	40
3.4 Optimización de los parámetros SIA	41
3.4.1 pH	41
3.4.2 Disolución buffer	41
3.4.3 Caudal	43
3.4.4 Volumen de inyección	43
3.5 Inmovilización de la enzima	45
3.6 Optimización de la reacción enzimática por SIA	46
3.6.1 Temperatura	47
3.6.2 Caudal	47
3.6.3 Volumen de inyección	48
3.6.4 Potencial de trabajo	48
3.6.5 Unidades inmovilizadas de GOx y diámetro del electrodo de trabajo	48
3.7 Corrección de curva de calibración de peróxido	49
3.8 Evaluación de la reacción enzimática por SIA a diferentes concentraciones de glucosa	50
3.9 Determinación de parámetros cinéticos de la enzima GOx	51
3.10 Repetibilidad y reproducibilidad	61
Conclusiones	68
Perspectivas	69
Bibliografía	70

RESUMEN

Muchos métodos de análisis se han desarrollado en las últimas décadas para la determinación de glucosa de interés industrial, comercial y clínico. Estos incluyen el uso de métodos químicos, métodos cromatográficos y espectroscópicos, sin embargo estos métodos presentan desventajas, como consumo de tiempo, procesos de separación previa (destilación, evaporación) e instrumentación costosa las cuales se pueden superar mediante el uso de métodos enzimáticos. Las enzimas son uno de los componentes esenciales de los sistemas vivos, catalizando casi todas las transformaciones químicas que se producen durante el metabolismo celular. La naturaleza y la especificidad de su actividad catalítica las hace una excelente herramienta para el análisis químico. Además, su inmovilización sobre soportes ofrece a los investigadores en las diferentes áreas de estudio las ventajas de su reutilización y mayor estabilidad.

Los Nanotubos de Carbono (NTC) han demostrado una gran cantidad de excepcionales propiedades eléctricas, mecánicas y térmicas, que han hecho que sean útiles para las aplicaciones potenciales que van desde la nanoelectrónica hasta dispositivos biomédicos. Más recientemente, las películas de nanocompuestos de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNT) /polianilina (PANI), han sido reportados para su posible uso en dispositivos fotovoltaicos. PANI es uno de los polímeros conductivos más importantes debido a su relativamente fácil procesabilidad, conductividad eléctrica y la estabilidad ambiental.

El acoplamiento de reactores enzimáticos a sistemas de flujo continuo ha permitido la automatización y miniaturización de las determinaciones analíticas. El Análisis por Inyección Secuencial (SIA) es un método de flujo que además permite disminuir el gasto de reactivos y acoplar reacciones enzimáticas en línea.

En este trabajo se desarrolló un método para la inmovilización de la enzima Glucosa oxidasa en nanotubos de carbono utilizando un polímero de anilina. Para verificar el proceso de inmovilización se hizo uso de microscopía electrónica y de infrarrojo. La actividad de la enzima inmovilizada se verificó utilizando un sistema SIA con detección amperométrica. El método de inmovilización de la enzima se comparó con otro método ya establecido en el laboratorio utilizando vidrio de poro controlado.

Objetivos

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Inmovilizar la enzima Glucosa Oxidasa (GOx) en nanotubos de carbono

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acondicionar los nanotubos de carbono para que sean un buen soporte de inmovilización
- Evaluar la actividad enzimática de la enzima GOx inmovilizada en nanotubos de carbono
- Caracterizar los nanotubos antes y después de la inmovilización de la enzima
- Optimizar un sistema en línea para la evaluación de la reacción enzimática
- Comparar este procedimiento de inmovilización con otro en el que se utilizó vidrio de poro controlado.

1. ANTECEDENTES

1.1 Enzimas

1.1.1 Generalidades

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores, es decir, aceleran la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. Una de sus principales características es que son muy específicas, lo que es de gran importancia en la industria. La especificidad de las enzimas tiene la capacidad de discriminar entre diferentes sustratos, incluso si éstos son isómeros ópticos, y sólo los sustratos que tiene el grupo idéntico al de la enzima, serán reconocidos por ésta. Desde el punto de vista fisicoquímico y como consecuencia de su estructura protéica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción. (García, 1993)

Como todas las proteínas, la estructura tridimensional de las enzimas incluye un grupo amino terminal y un grupo carboxilo terminal, los cuales al polimerizarse con otra molécula eliminan una molécula de agua, para formar un enlace CO-NH, que se conoce como enlace peptídico. (Angeles, 2003)

En la estructura molecular de las enzimas se consideran diferentes niveles de organización:

- Estructura primaria: Secuencia de aminoácidos que constituye la cadena peptídica; es decir, el orden en que están colocados los aminoácidos a lo largo de dicha cadena
- Estructura secundaria: Grado de torsión que existe en la cadena peptídica, depende también del tipo y secuencia de aminoácidos que la constituyen, describiéndose dos tipos de estructuras secundarias en las proteínas: la α hélice y la β configuración de hoja plegada. La primera es la más abundante y consiste en la formación de una hélice torcida hacia la derecha de la cadena que contiene de 3 a 6 residuos de aminoácidos por cada vuelta estabilizándose por la unión de puentes de hidrógeno entre los residuos de cada tercer NH y CO de los aminoácidos; al igual que la primera estructura, la segunda es estabilizada por puentes de hidrógeno entre los residuos de NH y CO pero de secciones distintas de la cadena que se acomodan de lado a lado, por lo que esta estructura puede ser paralela o antiparalela.

Antecedentes

- Estructura terciaria: Estructura en tercera dimensión que adopta la cadena peptídica como consecuencia del doblamiento varias veces sobre sí misma. Esta estructura es de fundamental importancia para la acción catalítica de las enzimas, ya que es la que determina la configuración de la molécula y, por tanto, la posibilidad de unión de la enzima con el sustrato a través de diversos puntos de contacto entre ambas moléculas. Existen ciertos agentes como la temperatura, la fuerza iónica, el pH y algunos compuestos que pueden causar la destrucción de estas estructuras provocando la desnaturalización de las proteínas
- Estructura cuaternaria: Unión entre dos o más cadenas peptídicas para integrar una molécula de enzima polimérica. Este término denota la existencia de subunidades en la molécula y establece un nivel superior de organización. Se considera que las moléculas con pesos superiores a los 100000 daltones pertenecen a esta categoría de proteínas. (López, 1987)

El centro activo de una enzima es la región que se une al sustrato y contiene los residuos que participan directamente en la producción y ruptura de enlaces. A menudo el sitio activo es una hendidura de la enzima, en la que encajan las moléculas del sustrato, el cual tiene una alta especificidad en el enlace, ya que depende de la disposición definida por los átomos del centro activo. El modelo que se ha propuesto para esta unión es la relación de una llave y una cerradura, formando un cambio en la superficie de la enzima (figura 1). Causando por ello un cambio conformacional en la molécula de la enzima. El modelo de ajuste inducido sugiere que el centro activo es flexible y por tanto capaz de acomodarse al sustrato según se aproxima, manteniéndose exactamente en la posición espacial correcta para reaccionar de modo que se aumenta la concentración efectiva de sustrato en un espacio muy delimitado. (Stryer, 1990)



Figura 1. Modelo de la llave-cerradura, ejemplificando la unión del sustrato a la enzima

Antecedentes

Las enzimas siendo consideradas como catalizadores biológicos, siguen las reglas generales de la catálisis. Sin embargo, presentan una característica que no se observa en los catalizadores no enzimáticos, este fenómeno se conoce como “saturación del sustrato”. Cuando se tienen concentraciones pequeñas de sustrato se observa una variación lineal con la velocidad inicial de reacción, lo que implica una reacción de primer orden; sin embargo, a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial también crece hasta alcanzar un valor constante para cualquier valor de concentración de sustrato, bajo estas condiciones la reacción es de orden cero, es decir, depende solamente de la concentración de la enzima presente. El modelo de cinética enzimática más simple y mejor conocido es el de Michaelis-Menten desarrollado en 1913 que toma en cuenta el fenómeno de saturación del sustrato. La teoría de Michaelis-Menten se ha desarrollado para las reacciones en que existe un solo sustrato y supone la formación de un complejo enzima-sustrato que posteriormente da lugar al producto. (López, 1987)

La cinética enzimática está descrita por la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 1. Ecuación que describe a la mayoría de las reacciones enzimáticas

donde $V_{m\acute{a}x}$ es la máxima velocidad de reacción y K_m es la constante de Michaelis-Menten que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es la mitad de la velocidad máxima y también indica la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, mientras menor sea su valor, menor será la concentración de sustrato para la cual la enzima alcanza su valor máximo de velocidad. Desde el punto de vista analítico, a medida que se tiene una constante de Michaelis-Menten más elevada la sensibilidad del método disminuye, pero aumenta el intervalo de linealidad. (Cano, 2008)

En la figura 2 se muestra la dependencia típica de la velocidad de reacción enzimática de la concentración de sustrato, donde se señalan los valores de los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$, y las zonas donde la señal obtenida es útil para la determinación del sustrato y para la determinación de la actividad enzimática.

Antecedentes

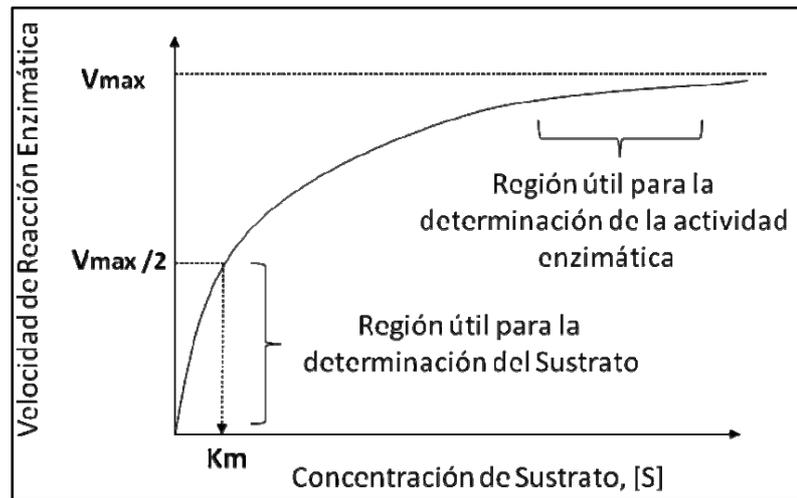


Figura 2. Dependencia de la velocidad de la reacción enzimática frente a la concentración de sustrato

1.1.2 Clasificación de las enzimas

En 1964, la Comisión sobre Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) ideó un esquema de clasificación que trajo un considerable orden en la caótica situación que existía entonces. Las enzimas se clasifican en seis grandes grupos atendiendo al tipo de reacción que catalizan (tabla 1). La Comisión estableció un número de 4 dígitos y un nombre sistemático para cada enzima: Todas las enzimas pertenecen a uno u otro grupo de entre los seis principales. El primer número indica a cuál de los seis grupos pertenece la enzima, el segundo se refiere a distintas subclases dentro de cada grupo, el tercero y el cuarto se refieren a grupos químicos específicos que intervienen en la reacción. (Lee, 2000)

Antecedentes

Clasificación	Ejemplos
1. Oxidorreductasas (Reacciones de oxidación-reducción)	1.1 –CH-OH 1.1.2.27 Lactato deshidrogenasa 1.2 –C=O 1.6 NADH; NADPH
2. Transferasas (transferencia de grupos funcionales)	2.1 Grupos de 1 carbono 2.1.1.1 Trancetolasa 2.3 Grupos acilo 2.8 Grupos que contienen azufre
3. Hidrolasas	3.1 Ésteres 3.1.1.3 Lipasas 3.1.1.7 Acetilcolinesterasa 3.6 Anhídridos ácidos
4. Liasas (adición de dobles enlaces)	4.1 –C=C- 4.1.1.32 Fosfoenolpiruvato carboxilasa 4.2 –C=C- 4.3 –C=N=
5. Isomerasas	5.1 Racemasas
6. Ligasas (formación de enlaces con hidrólisis de ATP)	6.1 C-O 6.2 C-S 6.3 C-N 6.4 C-C

Tabla 1. Clasificación sistemática de las enzimas, ilustrando el sistema de numeración y algunos ejemplos.

1.1.3 Propiedades de la enzima glucosa oxidasa (EC. 1.1.3.4)

Nombres sistemáticos: β -D-glucosa, oxígeno 1-oxireductasa, dextrosa

Es específica para β -D-glucosa

Su origen es de *Aspergillus niger*

Peso molecular 149000 g/mol

Es estable en un intervalo de pH de 3.5-8 y pH óptimo de 5.6

Pierde actividad en pH>8 y pH<2

Pierde actividad a temperaturas mayores de 39 °C

Es inhibida por exceso de H₂O₂

Antecedentes

Km de 0.0096 M (determinada con glucosa a 20 °C en presencia de catalasa y buffer de fosfatos 0.2M a pH 5.6)

Cataliza la oxidación de β-D-glucosa por el oxígeno molecular a δ-gluconolactona que subsecuentemente se hidroliza a ácido glúconico y peróxido de hidrógeno.



Es un homodímero compuesto por dos idénticas subunidades; el peso molecular de la enzima es de 149000 Daltones. Cada subunidad tiene una molécula de coenzima (FAD) fuertemente unida, que actúa como agente redox en la catálisis.

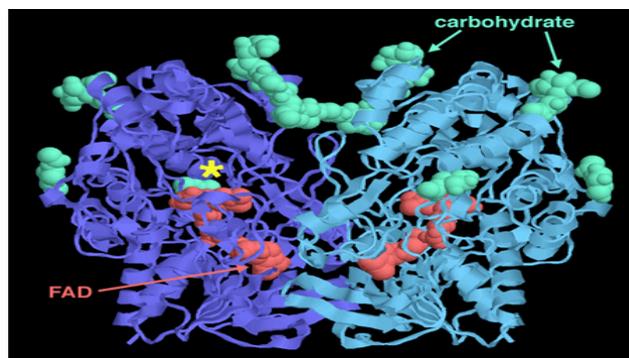


Figura 3. Estructura de la enzima GOx. Se observan los homodímeros con su respectiva coenzima (FAD)

1.2. Inmovilización de enzimas

1.2.1 Generalidades

El empleo de enzimas inmovilizadas ofrece a los investigadores en las diferentes áreas de estudio las ventajas de su reutilización y mayor estabilidad. La inmovilización de las enzimas es una técnica que alcanzó su máximo desarrollo durante los setentas. El objetivo de la técnica de inmovilizar enzimas, consiste en retener una enzima por medio de diversos mecanismos como son: atrapamiento en la matriz de un polímero, de un gel o de una microcápsula; adherirla a un soporte sólido ya sea por mecanismos de absorción, por intercambio iónico o bien por enlace covalente entre un soporte activado y algún grupo funcional de la enzima. En todos estos casos se pretende recuperar la enzima al final de la reacción para ser reutilizada posteriormente y, de ser posible, emplearla en un reactor de funcionamiento continuo. El costo de la enzima se ve, considerablemente reducido, por lo que en ausencia de actividades contaminantes, representa una verdadera alternativa para la aplicación industrial de las enzimas. (Angeles, 2003)

Antecedentes

1.2.2 Clasificación de los métodos de inmovilización

Existen 4 principales métodos para inmovilizar enzimas (figura 4). Adsorción, enlace covalente, atrapamiento y confinamiento en una membrana.(Chaplin, 1990)

Adsorción. El método más simple de inmovilización es la adsorción de la enzima sobre la superficie del soporte. Los materiales adecuados son grafito, oro y polímeros sintéticos. El enlace es a través de fuerzas iónicas y/o de Van de Waals. El enlace se consigue por incubación del soporte con la solución enzimática durante un período de tiempo de dos horas. Superficies de oro así como electrodos de grafito usualmente se limpian cuidadosamente antes de la aplicación de la solución enzimática. Debido a lo sencillo del procedimiento los cambios conformacionales de las proteínas son insignificantes y la actividad se conserva. Además como existe un íntimo contacto entre la enzima y el electrodo puede ocurrir una comunicación eléctrica directa entre ellos.

Atrapamiento en membranas. La estabilidad de los sistemas basado en la adsorción de enzimas puede ser mejorada por membranas adicionales con poros suficientemente pequeños para prevenir la disolución de la enzima. El primer paso en el protocolo de la inmovilización es la incubación del soporte en la solución de la enzima, seguido por el cubrimiento con una membrana. De esta manera, la estructura tridimensional de la enzima no se afecta y además existe un íntimo contacto entre la enzima y los electrodos. Los parámetros cinéticos de la reacción de la enzima sólo se modifican si la tasa de velocidad del transporte del sustrato de la enzima se ven limitados, lo que está influido por el tamaño de poro de la membrana. (Pandey, 2000)

Atrapamiento en matrices. Debido a la capacidad fuerte de adsorción del grafito y de materiales de carbono se usan preferencialmente como matrices para la adsorción de enzimas. Así, a través del procedimiento de inmovilización de enzimas vía adsorción es simple, la opción preferencial del grafito junto con la limitada estabilidad de las soluciones de enzima limita la extensa aplicación de este método. La simplicidad del método junto con un amplio rango de posibles modificaciones se mantiene cuando las enzimas son inmovilizadas en matrices, las cuales son formadas como redes en presencia de la enzima. La enzima y los reactivos requeridos son mezclados con precursores que forman una red por polimerización o solidificación atrapando la proteína. De esta manera, la enzima se inmoviliza principalmente debido a la presencia de barreras de difusión creadas por la matriz. Sin embargo, dependiendo de los precursores y del principio de la polimerización la enzima puede ser dañada por lo que una reducción en su actividad se observa además de efectos estéricos. Las redes con enzimas atrapadas se forman por

Antecedentes

precursores orgánicos o inorgánicos y se adhieren sin más ayuda que soportes adecuados.

Enlace covalente. La inmovilización de enzimas por enlace covalente es de particular atractivo dada la menor tendencia a que la enzima se pierda con el tiempo. Se trata de efectuar una reacción química entre grupos funcionales de la enzima y del soporte. Estos grupos funcionales no suelen ser suficientemente reactivos por lo que requieren de una activación. Teóricamente podrían activarse tanto los grupos funcionales del soporte como los de la enzima; sin embargo, activar estas últimas podría acarrear su desnaturalización. Por lo tanto los esfuerzos se han centrado en la activación de soportes. (Pandey, 2000)

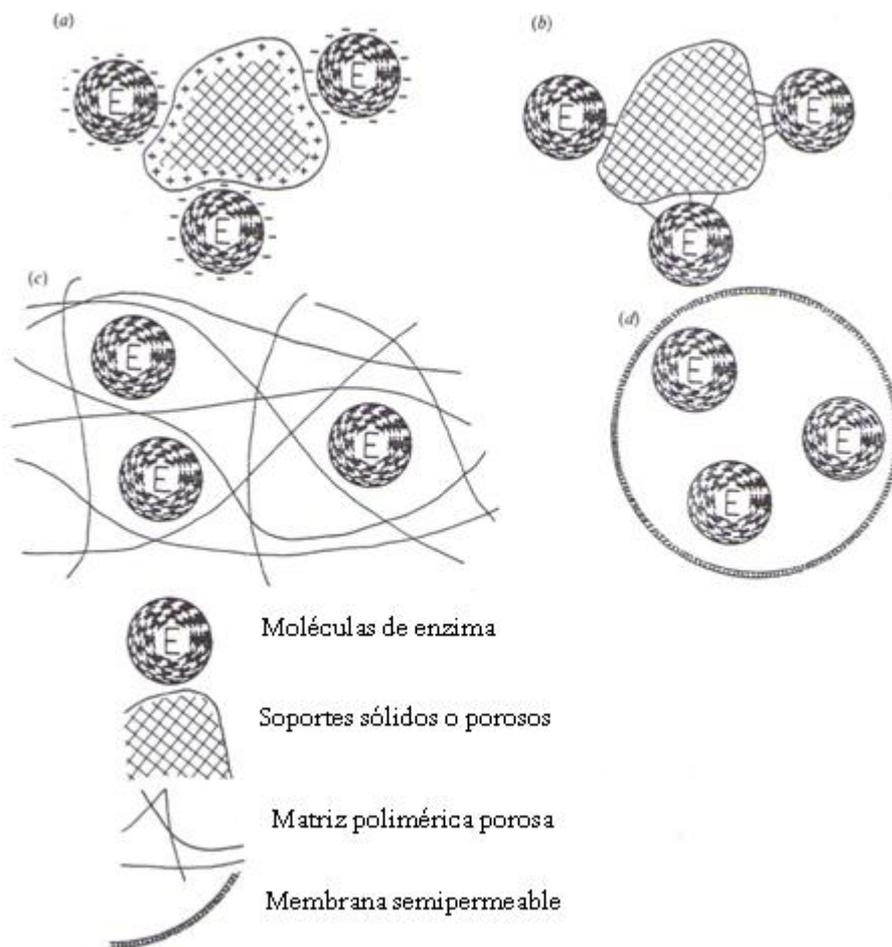


Figura 4. Esquematación de las diferentes maneras de inmovilización de enzimas. (a) Adsorción, (b) Enlace covalente, (c) Atrapamiento en matrices, (d) Atrapamiento en membrana

1.3. Biosensores y sistemas enzimáticos (Cano-Luna, 2008)

1.3.1 Generalidades

En el campo de la Química Analítica, la tendencia es simplificar el protocolo de análisis de una muestra determinada, reduciendo así los tiempos de análisis y su coste. Tradicionalmente se ha utilizado instrumentación analítica muy sofisticada, tal como cromatógrafos, espectrofotómetros, ICP-masas, etc., de coste elevado y que requiere especialización por parte del operario. Además, este tipo de equipos son incompatibles con análisis en continuo o pruebas de campo. Los sensores químicos se presentan como una clara alternativa, ya que permiten realizar análisis on-line, en cambio, su sensibilidad y fiabilidad es mucho menor que la ofrecida por la instrumentación analítica convencional. Los campos donde los sensores químicos han tenido una mayor implantación son principalmente, la biomedicina, el medioambiente y, en los últimos años, en la industria alimentaria, y en otros sectores, como la bioseguridad, se están desarrollando de forma exponencial.

Entre este tipo de sensores caben destacar los biosensores, ya que son los dispositivos con más selectividad y por tanto, con más aplicaciones potenciales en Química Analítica. Desde hace varios años, algunos de ellos ya han sido comercializados, como por ejemplo, los utilizados para los análisis de glucosa en sangre, de vital importancia en pacientes diabéticos.

Un sensor químico es un dispositivo capaz de traducir la información química de una muestra en una señal analítica útil. Los sensores químicos constan de dos componentes básicos: un sistema de reconocimiento o receptor y un transductor, sobre el que se encuentra conectado el primero. El receptor reconoce selectivamente la información química presente en la muestra, y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor. Éste la transforma, a su vez, de una señal primaria a una señal secundaria procesable fácilmente, generalmente eléctrica u óptica. Existen tres tipos de receptores:

- Físicos, cuando no hay reacciones químicas involucradas en la detección, algunos ejemplos son los materiales piezoeléctricos utilizados para detectar cambios de masa.
- Químicos, la señal proviene de una reacción química, por ejemplo agentes quelatantes, ionóforos, etc.
- Biológicos, cuando el material receptor tiene una procedencia biológica. Por ejemplo, enzimas, anticuerpos, ADN, células, etc. En este caso, los sensores químicos son denominados biosensores.

Antecedentes

La clasificación de los sensores y biosensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor utilizado, siendo ésta la más aceptada.

A continuación se describe, con más detalle, el grupo de sensores electroquímicos, ya que son los utilizados a lo largo del presente trabajo.

1.3.2 Sensores Electroquímicos

Durante la pasada década, los sensores basados en transductores electroquímicos fueron los que más publicaciones científicas generaron. Hecho que estaba claramente ligado a que estos dispositivos son más robustos, su fabricación es más simple y económica que la del resto de transductores y además poseen un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos. Así mismo, los equipos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potenciostatos y conductímetros, son económicos, de fácil mantenimiento, manejo y miniaturización, y son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis.

Existen tres grandes grupos de transductores electroquímicos clasificados según la técnica electroquímica utilizada para obtener la información de la muestra; conductimétricos, potenciométricos y amperométricos.

1.3.3 Transductores amperométricos

Este tipo de dispositivos se basa en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica. También es posible realizar análisis basados en técnicas voltamperométricas, variando el potencial de trabajo de forma controlada.

Los transductores amperométricos se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado. Esta relación intensidad-concentración se comporta según el siguiente modelo que proviene de la Ley de Fick,

Antecedentes

$$I = nFAD_0 \frac{\delta(C_0(o,t))}{\delta x}$$

Ecuación 2. Ley de Fick

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D_0 y C_0 son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente, x representa la distancia de la doble capa, F es la constante de Faraday (96485.309 C/mol), n es el número de carga y δ es el espesor de la capa de difusión (Noked et al., 2011). En el caso de que la solución esté agitada constantemente, se puede considerar que x se mantiene constante y corresponde con el tamaño de la capa de difusión. Así, la ecuación anterior puede simplificarse obteniéndose una relación lineal entre la intensidad medida y la concentración del analito,

$$I = \frac{nFAD_0}{\delta} C_0$$

Ecuación 3. Relación lineal entre intensidad de corriente y concentración del analito

Los biosensores amperométricos son los que han mostrado un mayor avance debido a su extensa aplicación dentro del campo del análisis médico. Ejemplos significativos de estos avances son los biosensores para medidas en sangre y suero.

1.4. Reactores (López, 1987)

Para la utilización de las enzimas inmovilizadas es necesario ubicarlas en un ambiente apropiado para que se lleve a cabo la reacción química deseada, este espacio se definirá en adelante como reactor. El reactor es un espacio que contiene a la enzima inmovilizada al que se alimentan uno o más sustratos para generar el o los productos y que opera en condiciones determinadas de presión, temperatura, mezclado y flujo de materiales. En última instancia, lo que se persigue con el análisis de los reactores de enzimas inmovilizadas es la correcta predicción del comportamiento de la reacción enzimática es su relación con:

- a) la configuración del reactor
- b) los efectos de transferencia de masa externos e internos al soporte de la enzima inmovilizada
- c) la distribución de los tiempos de residencia dentro del reactor

- d) el nivel de mezclado de los sustratos y productos

1.4.1 Tipos de reactores

Los reactores pueden clasificarse de acuerdo a su modo de operación y por el nivel de mezclado que existe en el interior del recipiente. En cuanto al modo de operación los reactores de enzimas inmovilizadas pueden clasificarse en: intermitentes o por lotes y continuos, o en híbridos de los anteriores que son los denominados semicontinuos. En los intermitentes se carga el sustrato, se lleva a las condiciones requeridas de operación (temperatura y nivel de mezclado), se agrega la enzima inmovilizada y se permite que la reacción se lleve a cabo hasta que la conversión a productos sea la deseada. El semicontinuo consiste en agregar el sustrato o bien eliminar el producto mientras transcurre la reacción; lo anterior podría ser útil cuando se desea superar inhibiciones por sustrato y/o producto. El reactor continuo, por otro lado, opera con la adición continua del sustrato que entra en contacto con la enzima inmovilizada dentro del reactor obteniéndose, a la salida, una mezcla de producto y de sustrato no consumido.

Con base en el nivel de mezclado del interior del reactor, existen dos configuraciones principales: el reactor de tanque agitado y el reactor de lecho empacado de flujo pistón. Estos dos tipos representan los extremos del rango del mezclado; por un lado el reactor de tanque agitado ideal supone mezclado perfecto del líquido en el reactor y por el otro, el reactor de lecho empacado ideal que supone el mezclado nulo en la dirección del flujo.

A continuación se revisan los principales tipos de reactores que han sido usados en sistemas con enzimas inmovilizadas.

- Reactores por lotes de tanque agitado. Este tipo de reactores es el más sencillo y el que se usa con más frecuencia en reacciones con enzimas no inmovilizadas. La utilidad de estos sistemas se encuentra cuando las cantidades requeridas de producto son pequeñas.
- Reactores de lecho empacado. Este tipo de reactores ha sido de los más estudiados por ser los de mayor uso en los procesos comerciales. En estos reactores el sustrato fluye a través de un lecho empacado con el soporte que contiene la enzima inmovilizada, en una dirección específica, con lo que se procede a la reacción. Aquí existe el mezclado entre los diferentes elementos de fluido debido a los gradientes de concentración (de sustratos y productos) y por las diferencias de velocidad a lo largo del reactor, que se acentúan por causas del empaque. El arreglo más convencional de estos reactores consiste en un tubo

Antecedentes

relleno del soporte a través del cual fluirá el sustrato por los espacios vacíos o intersticios que existe entre las partículas del soporte con la enzima inmovilizada. El soporte puede ser en forma de esferas, hojuelas, cilindros, hojas, etc.

- Reactores continuos de tanque agitado. En estos equipos, el mezclado es perfecto, lo que determina que las condiciones dentro del reactor sean uniformes e iguales a las de la salida. Lo anterior implica que el reactor se encuentra en condiciones de mínima concentración de sustrato y máxima de producto.
- Reactores de lecho fluidizado. En este tipo de reactores el líquido es alimentado en flujo ascendente para suspender las partículas de soporte con la enzima inmovilizada. Existe menor resistencia a la transferencia de masa externa e interna al soporte debido a que se pueden usar partículas más pequeñas sin problemas de taponamiento y con menores caídas de presión. Son muy recomendables cuando la corriente de alimentación es muy viscosa, pero por otro lado, la carga de enzima inmovilizada por unidad de volumen es menor que en los reactores de lecho empacado y el desgaste del soporte es mayor.

1.5. Nanotubos de carbono

A medida que la investigación avanza hacia dispositivos más pequeños y más eficientes, la necesidad de desarrollar alternativas de materiales electrónicos a escala molecular se hace evidente. Fabricación de componentes electrónicos integrados a partir de moléculas orgánicas ha sido reconocido teóricamente como el objetivo final. Esta propuesta representa un esfuerzo mundial para hacer frente a los problemas más importantes que intervienen en el progreso hacia su explotación, y para producir los dispositivos que utilizan nuevos materiales o combinaciones de ellos. (Feng et al., 2003b)

Materiales basados en carbón como los polímeros y los nanotubos tienen el potencial de hacer impacto en una variedad de aplicaciones que van desde los circuitos en general de bajo costo, pantallas para dispositivos de energía, sistemas microelectromecánicos, hasta supercondensadores, y sensores a las celdas solares. (Feng et al., 2003b)

Los nanomateriales han recibido gran atención en los últimos años en distintos campos, debido a su enorme potencial. Entre ellos, los nanotubos de carbono (NTC), descubiertas en 1991 por Iijima, representan un grupo importante de materiales a nanoescala. Los nanotubos poseen una de la composición química más simple y configuración de unión atómica, y muestran la diversidad y riqueza más extrema entre los

Antecedentes

nanomateriales en cuanto a la estructura y las propiedades asociadas. Desde su descubrimiento, NTC han sido el objetivo de numerosas investigaciones debido a sus propiedades únicas estructurales, electrónicas y mecánicas que los hacen un material muy atractivo para una amplia gama de aplicaciones.

Los nanotubos de carbono están contruidos a partir de unidades de carbono con configuración sp^2 y presentan una estructura con rejillas de panal hexagonal, presentando varios nanómetros de diámetro y varios micrómetros de longitud. NTC son estructuras cerradas que presentan dos regiones bien definidas con características claramente diferentes, el tubo y la tapa, que es como es la mitad de la molécula de fullereno con defectos topológicos que en este caso son principalmente pentágonos. (figura 5)

Básicamente, hay dos grupos de nanotubos de carbono, los de paredes múltiples (MWNT) y los de pared única (SWNT). MWNT, se pueden visualizar como túbulos de grafito concéntricos y cerrados con múltiples capas de hojas de grafito que definen un orificio normalmente 2 a 25 nm, separadas por una distancia de aproximadamente 0.34 nm.

Existen tres métodos básicos para la síntesis de SWNT y MWNT: la descarga del arco eléctrico, ablación por láser (vaporización con láser) y la deposición química de vapor (o de la descomposición catalítica de hidrocarburos). (Rivas et al., 2007)

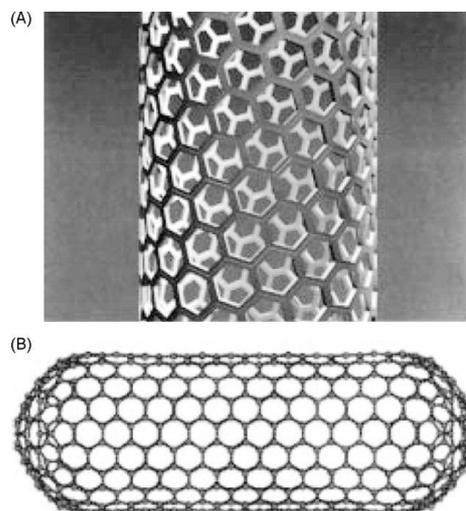


Figura 5. (A) Representación de la unidad básica de un nanotubo de carbono. (B) representación de un nanotubo de carbono mostrando las dos regiones, el tubo y la tapa.

NTC han demostrado una gran cantidad de excepcionales propiedades eléctricas, mecánicas y térmicas, que los han hecho útiles para aplicaciones potenciales que van desde la nanoelectrónica hasta dispositivos biomédicos. Estas moléculas y nanopartículas

Antecedentes

son los componentes básicos de los cuales las nanotecnologías emergentes y futuras serán construidas. (Dresselhaus y Endo, 2001; Joshi et al., 2005; Sreeja et al., 2011)

La mejora de la transferencia de electrones es debida a la curvatura de los tubos que originan cambios en las bandas de energía para cerrar el nivel de Fermi. La presencia de defectos pentagonales produce regiones con densidad de carga más altas que los observados en la región de grafito hexagonal, ya sea en estructuras planas o tubulares que demuestra la conexión entre los defectos topológicos y electroactividad de NTC.

En general, la reducción de las sobretensiones y picos de corriente más altas se observan en la respuesta voltamétrica de varias moléculas de electrodos modificados con nanotubos de carbono. Debido a estas propiedades únicas, los NTC han recibido una gran atención para la preparación de sensores electroquímicos. (Rivas et al., 2007)

1.6. Polímeros conductores

Cuando en 1729 Stephen Gray, junto con G. Wheeler y J. Godfrey, efectuaron la clasificación de los materiales en eléctricamente conductores y aislantes, nada hacía suponer que, dos siglos más tarde, la idea de que los metales eran los conductores por excelencia y que los compuestos orgánicos estaban situados dentro del grupo de los aislantes iba a ser profundamente transformada.

Los compuestos orgánicos han sido considerados, durante mucho tiempo, como representantes de los materiales aislantes. Esta concepción comenzó a cambiar de forma significativa con la descripción, en 1954, de un complejo de bromo-perileno que presentaba una conductividad de 1 S cm^{-1} . Este tipo de compuesto, en el que las unidades orgánicas de perileno, al ser combinadas con moléculas de halógeno, presentan una conductividad comparable a la de los semiconductores inorgánicos dopados, dio lugar a la aparición de un nuevo término: "metal orgánico". Sin embargo, la búsqueda de conductores orgánicos no se intensificó hasta el descubrimiento, en 1973, del complejo de transferencia de carga (CTQ) que forman el potente aceptor de electrones tetraciano-p-quinodimetano (TCNQ), sintetizado en 1960, y el potente dador electrónico tetratiofulvaleno (TTF), sintetizado en 1970. El complejo TTFTCNQ presenta una conductividad de tipo metálico con un máximo de 104 S cm^{-1} a 59 K.

Durante este mismo periodo, William A. Little, basándose en observaciones de sistemas biológicos, propuso un modelo de superconductor que implicaba conducción eléctrica a lo largo de cadenas de hidrocarburos lineales. El interés sobre los hidrocarburos poliméricos con una extensa deslocalización de los electrones de tipo π

Antecedentes

fomentó el estudio de sistemas como el poliacetileno, $(CH)_x$. Sintetizado a finales de los años 50 se había observado que la baja conductividad que presentaba a temperatura ambiente (el poliacetileno en estado puro es un aislante) podía incrementarse por exposición a aceptores de electrones. Años más tarde, en 1967, un error fortuito en la síntesis de Natta condujo a Shirakawa y col. a la obtención de láminas de poliacetileno que presentaban brillo metálico. Pero hubo que esperar hasta 1977 para observar cómo la conductividad de las láminas de poliacetileno aumentaba de 9-10 a 500 S cm^{-1} a temperatura ambiente al exponerlo a fuertes aceptores de electrones como el yodo. H. Shirakawa, A.G. MacDiarmid y A.J. Heeger habían descubierto los polímeros conductores, hecho por el cual les fue otorgado el Premio Nobel de Química en el año 2000.

El estudio del poliacetileno dopado contribuyó en gran medida a la comprensión del proceso de conducción, introduciendo nuevos conceptos que más tarde reaparecerían en los modelos utilizados para explicar el fenómeno de la superconductividad. Esta propiedad fue encontrada por primera vez en un compuesto orgánico en 1980. Jérôme y col. descubrieron que las sales de tetrametiltetraselenofulvaleno o TMTSF, $[(\text{TMTSF})_2\text{PF}_6]$, son superconductoras con una temperatura de transición de 0.9 K a 12 kbar de presión. En la actualidad se ha sintetizado un gran número de superconductores orgánicos con temperaturas de transición más elevadas a presión atmosférica. Más reciente es el descubrimiento de superconductividad en sales de fullereno C_{60} , con temperaturas de transición en el intervalo de 10 a 45 K.

De este modo, las tablas de conductividad de los distintos materiales tuvieron que recoger un nuevo tipo de materiales orgánicos en la zona de los semiconductores y los conductores, hasta entonces ocupada únicamente por metales.

Desde el desarrollo del primer biosensor de glucosa, la mejora de respuesta de los electrodos con enzimas ha seguido siendo el principal foco de investigación de biosensores. En particular, la investigación de nuevos materiales y métodos de inmovilización de enzimas es todavía un tema muy importante para obtener biosensores más activos y estables.

Desde el primer informe de la conductividad eléctrica en un polímero conjugado, en 1977, los polímeros conductores han atraído mucho interés debido a sus propiedades combinadas de polímeros orgánicos y las propiedades electrónicas de los semiconductores. Especialmente, la inmovilización de enzimas dentro/sobre diversos polímeros conductores ha sido ampliamente estudiado debido a sus características únicas. (Xian et al, 2006)

1.6.1 Polianilina

La polianilina (PANI) es un polímero conductor de la familia de polímeros semi-flexibles, fue descubierto hace unos 150 años. Recientemente, PANI ha captado la atención de la comunidad científica por el descubrimiento de su alta conductividad y bajo costo. Por lo tanto, los investigadores están explorando continuamente sus aplicaciones, incluyendo aquellos en los biosensores a causa de una serie de características útiles, tales como 1) la deposición directa y fácil en el electrodo sensor, 2) control de espesor, 3) conductividad redox y características de polielectrolitos, 4) alta área superficial, 5) las particularidades químicas, 6) a largo plazo la estabilidad ambiental y 7) propiedades sintonizables.

La estructura de la PANI se ilustra en la figura 6. Se compone de unidades repetidas oxidadas "m" (diamina quinona) y reducidas "n" (diamina benzenoide) donde el estado de oxidación puede ser definido por el valor de m.

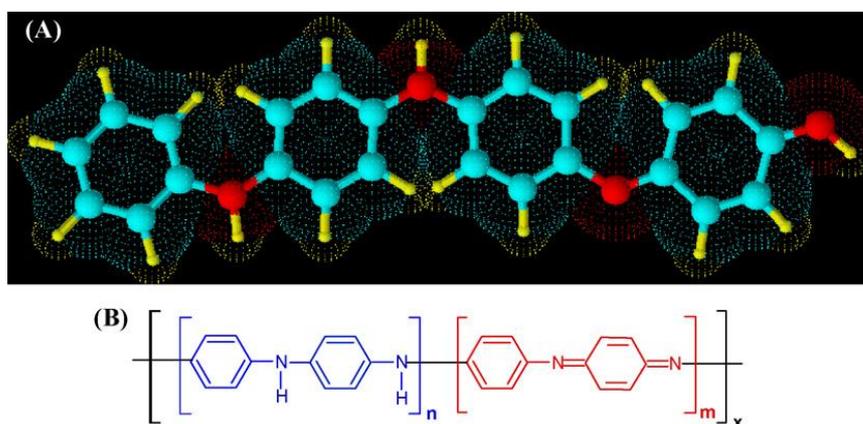


Figura 6. Diferentes estructuras de PANI

La tabla 2 muestra las diferentes formas redox de PANI. Leucoemeraldina (LE) es el estado totalmente reducido. Pernigranilina (PG) es el estado totalmente oxidado con enlaces imina en lugar de enlaces amina. La forma esmeraldina de PANI, a menudo referido como base esmeraldina (EB), es neutral o dopado, con nitrógenos de imina protonados por un ácido. EB es considerada como la forma más útil de PANI debido a su alta estabilidad a la temperatura ambiente y además, su forma neutra (sal esmeraldina; ES) es conductora de la electricidad. LE y PG son malos conductores, incluso si son dopados con un ácido. Estas formas pueden ser interconvertidas por oxidación o reducción química y/o electroquímica.

Antecedentes

Forma de PANI	Estado redox	Grupos Oxidados	Grupos Reducidos	Color
Leucoemeraldina	Totalmente reducido	0	1	Blanco/Claro
Emeraldina	Parcialmente oxidado	0.5	0.5	Verde/Azul
Pernigranilina	Totalmente oxidado	1	0	Azul/Violeta

Tabla 2. Propiedades de las diferentes estructuras de PANI

PANI es un semiconductor donde los portadores de la carga son estructuras en forma de canales. Los enlaces π deslocalizados disponibles en este sistema son los responsables de sus propiedades semi-conductoras. PANI tiene un sistema heterogéneo, semicristalino con una región cristalina dispersa en una región amorfa. Es similar a una isla cuasi-metálica rodeada por una zona no metálica amorfa. Cuando PANI es dopada con un ácido, un polarón se forma mediante la formación sucesiva de especies bipoisitivas y estructuras bipolarón; como se muestra en la figura 7. Esta estructura polarón es responsable de la conducción eléctrica a través del mecanismo de salto en su región cristalina y este salto puede ser intra-cadena o inter-cadena. (Dhand et al, 2011)

En la estructura polarón, radicales de átomos de nitrógeno son portadores de carga. Los electrones de los nitrógenos adyacentes (neutros) saltan hasta el canal provocando un sistema eléctricamente neutro. Por consiguiente, se observa movimiento de electrones dentro del canal (figura 7). Sin embargo, en la estructura bipolarón, este tipo de movimiento no es posible ya que dos canales se encuentran adyacentes (figura 7).

En las estructuras de LE o PG, los entornos electrónicos de todos los átomos de nitrógeno a lo largo de la cadena de polímero son similares. Los protones de un dopante pueden ser atraídos por cualquier átomo de nitrógeno y puede haber unos pocos (más de dos) átomos de nitrógeno protonados o átomos libres de nitrógeno situados lado a lado a través de la cadena. Por lo tanto, hay menos probabilidad de regularidad de la cadena, creando menos oportunidad para la formación de un polarón. Como resultado, LE o PG son aislantes en la naturaleza.

PANI es interesante como material para interfaces de sensores y biosensores ya que puede actuar como un mediador eficaz para la transferencia de electrones en las reacciones redox o enzimáticas. La función del PANI como mediador es posiblemente debido a las cargas redox deslocalizadas presentes sobre una serie de realización de

Antecedentes

granos (polarones) en su fase cristalina ES. PANI es considerado a ser un polímero atractivo, ya que presenta dos pares redox en el rango de potencial adecuado para facilitar la transferencia de carga de un polímero-enzima y por lo tanto actuar como autónomo mediador de transferencia electrónica. (Dhand et al, 2011)

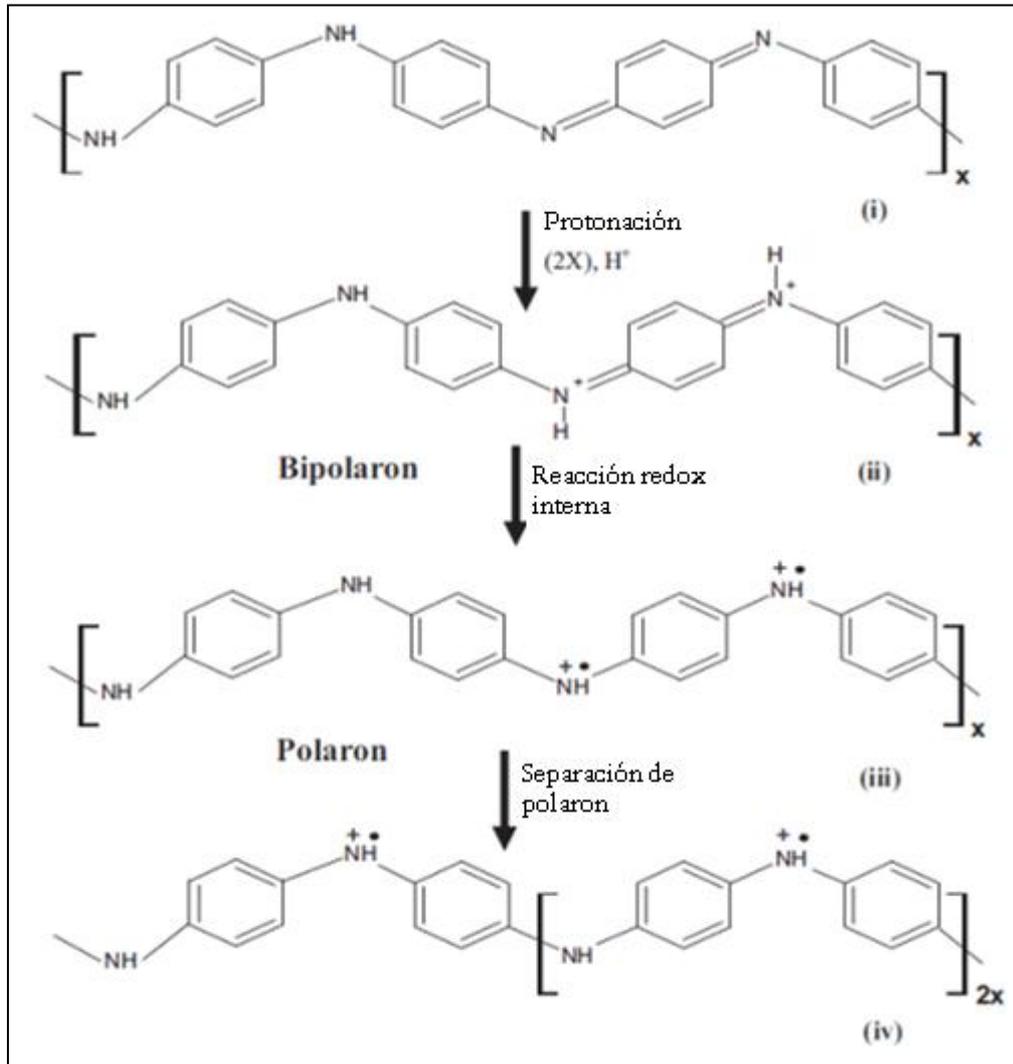


Figura 7. Formación y estructura de polarón.

1.7. Análisis por inyección secuencial

1.7.1 Generalidades

La introducción del análisis por inyección secuencial (SIA) en 1990 fue un intento de hacer que las técnicas de inyección fueran más empleadas para aplicaciones de control de procesos. Es un sistema de una sola línea, completamente controlado por un ordenador, que puede ser configurado para realizar la mayoría de las operaciones convencionales de análisis de inyección de flujo, con ninguna o una mínima reconfiguración física del sistema. (Christian, 1994)

1.7.2 Conceptos básicos

Un diseño del sistema operativo para SIA se ilustra en la figura 8. El corazón del sistema es una válvula de selección de varios puertos, empleada en lugar de una válvula de inyección convencional usada en análisis por inyección en flujo (FIA). El puerto común está conectado a la bomba reversible, con un reactor de espera colocada en medio para evitar aspirar solución (inyectada) dentro de la bomba. El puerto común puede acceder a cualquiera de los otros puertos por rotación eléctrica de la válvula. Los puertos están conectados al lavado, a la muestra, al reactivo, a las disoluciones estándar, a los depósitos de residuos y a la celda de flujo del detector (con un reactor de reacción en medio). En funcionamiento, la solución de lavado o portador se aspira primero dentro del reactor de espera por flujo inverso de la bomba. La válvula entonces se mueve a la posición del reactivo, y algunos microlitros de reactivo son aspirados, en un tiempo preciso; la bomba se detiene durante la rotación de la válvula para evitar sobrepresiones en el sistema. Después, la muestra se aspira, al lado del reactivo. Un segundo reactivo puede ser aspirado al otro lado de la muestra. Así, la muestra y los reactivos son secuencialmente inyectados dentro del reactor de espera, uno detrás del otro, de ahí el nombre de análisis por inyección secuencial. Finalmente, la válvula se conecta al puerto de detector, el caudal de la bomba es cambiado al flujo hacia adelante, y las soluciones aspiradas son propulsadas a través del reactor de reacción a la celda de flujo del detector. (Lenehan, 2002)

Antecedentes

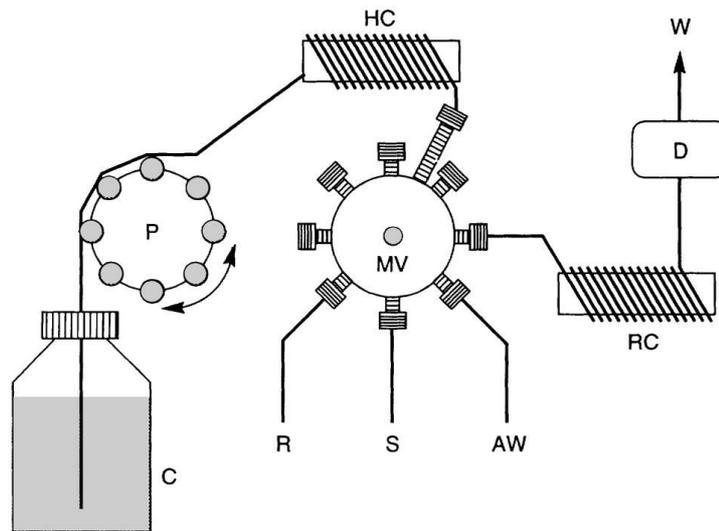


Figura 8. Diseño del sistema operativo de un sistema SIA. P: bomba peristáltica, C: acarreador, HC: reactor de espera, MV: válvula multicanal, RC: reactor de reacción, D: detector, W: desecho, R, S, AW: reactivos.

Las disoluciones se combinan a través de la difusión y fuerzas secundarias y reaccionan para producir un producto que se detecta (figura 9), resultando en una señal transitoria como en FIA convencional. (Christian, 1990)

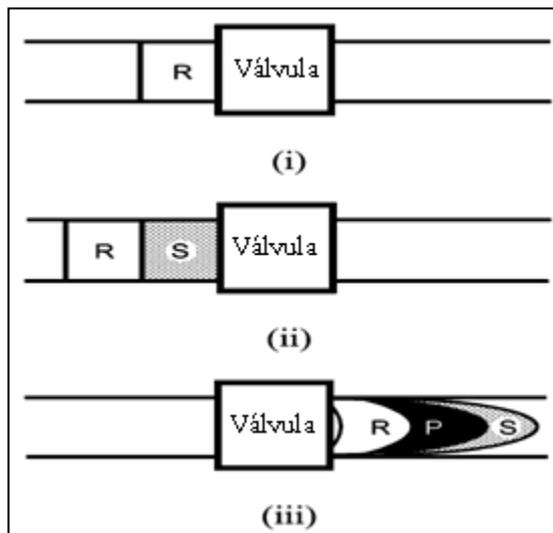


Figura 9. Formación del producto de reacción. (i) A través de la válvula multicanal un reactivo R es aspirado. (ii) De la misma forma, se aspira un reactivo S. (iii) Se inyectan al sistema los reactivos cambiando el sentido del flujo, reaccionan para dar el producto.

Esta técnica ofrece varias ventajas frente a otras técnicas automáticas, siendo la más común el análisis por inyección en flujo, técnica que ha tenido gran auge debido a sus múltiples aplicaciones.

El FIA tiene como base angular el uso de un flujo de proporciones constante y de un acarreador adecuado, en el cual se introduce una zona de muestra. Algunas desventajas que presenta este método es el uso de complejos flujos múltiples que

Antecedentes

requieren el uso de bombas peristálticas multicanal, lo que lleva a esquemas de tubería difíciles de manejar. Todo esto sin recordar que los acarreadores que se encuentran en flujo continuo deben contener los reactivos necesarios para realizar la detección del compuesto de interés; esto implica un gasto relativamente grande de reactivos. (Christian, 1994)

En análisis por inyección secuencial se sustituye el manejo del flujo continuo por el de un flujo programado, en el que se puede incorporar la inyección secuencial de zonas de reactivos y muestra en un orden específico que favorece la formación de un producto detectable por el sistema de detección adecuado. En general el tamaño de las zonas inyectadas es del orden de μL por lo que se reduce ampliamente el gasto de reactivos. El acarreador cumple con la función de empujar las zonas de dirección programada y favorecer la dispersión de éstas.

En análisis por inyección en flujo se evita tener dispersiones grandes para impedir la dilución de la muestra. Como contraste, en el análisis por inyección secuencial se promueve esta dispersión para favorece el traslape de las zonas de reactivos y muestra así tener una mayor formación del producto.

1.7.3 Siagrama

La respuesta de la unidad de detección de un sistema SIA es una señal transitoria. Se trata de una representación de la señal analítica (absorbancia, fluorescencia, potencial, etc.) en función del tiempo (figura 10)

La característica más importante es que la altura del pico obtenido se relaciona con la concentración del componente que se determina en la muestra inyectada.

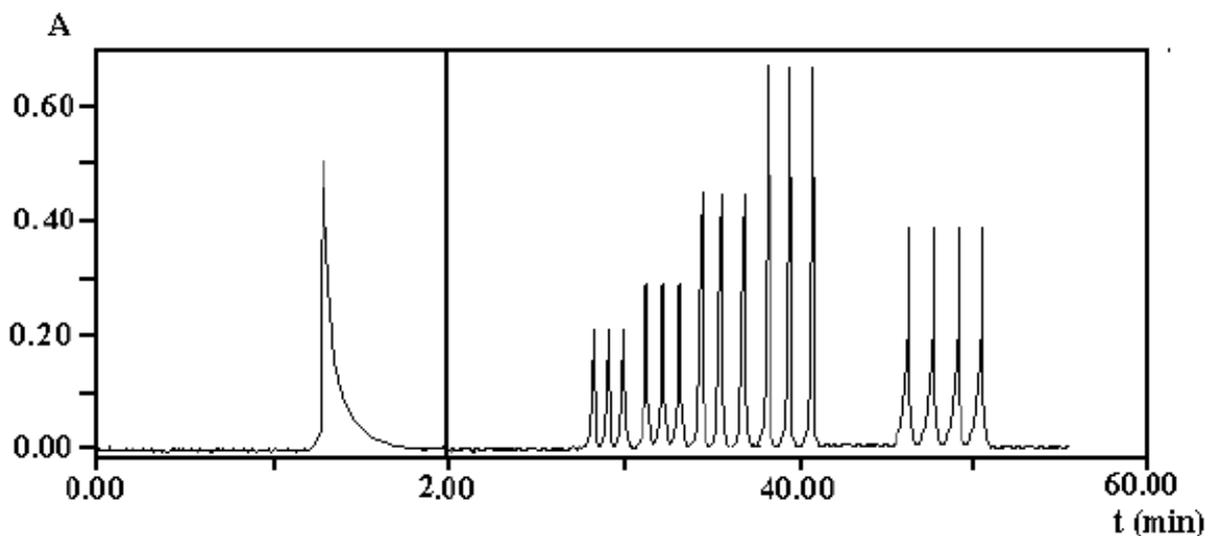


Figura 10. Ejemplo de siagrama

Antecedentes

Se postula que un mezclado eficiente en un sistema de flujo podría lograrse moviendo una pila de reactivos de un lado a otro, sin tener que viajar cualquier distancia neta (Ruzicka and Marshall). Como consecuencia, la dispersión parcial controlada y secuenciación de reactivo son los parámetros clave en el SIA. De esta manera, al ir circulando por el interior del tubo, tiene lugar una dispersión. El perfil resultante depende de varios fenómenos. Uno es la convección asociada al flujo laminar en el que el centro del fluido avanza más rápido que el líquido adyacente a las paredes, lo que da lugar a una zona con perfil parabólico mientras se desplaza (figura 11). También se produce ensanchamiento en las zonas por difusión.

Pueden producirse dos tipos de difusión: radial o perpendicular a la dirección del flujo y longitudinal o paralela la flujo (figura 11). Se ha demostrado que la difusión longitudinal, en un tubo estrecho, no es significativa, sin embargo, la difusión radial siempre es importante. (Ramírez, 2007)

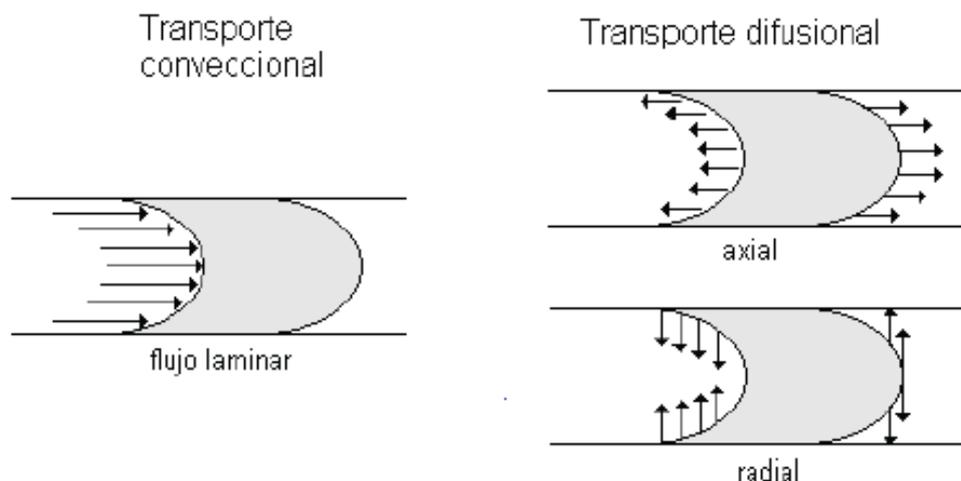


Figura 11. Tipos de difusión producidos dentro del sistema SIA

Este grado de penetración se ha medido y los términos se definen para ayudar a la comprensión de la dispersión zona. Estos incluyen: D (dispersión); $S_{1/2}$ (el volumen requerido para alcanzar una dispersión de 2 en el máximo del pico), P (grado de penetración de zona). (Lehenan, 2002)

El parámetro de gran importancia en SIA es el grado de penetración o el solapamiento de las zonas adyacentes. Esto depende de los volúmenes relativos, del tamaño y longitud de los tubos, de la geometría de la bobina de reacción. El grado de penetración y la dispersión determina la señal relativa a grabar. Se puede definir la zona de penetración por:

Antecedentes

$$p = \frac{2w_o}{w_s + w_r}$$

Ecuación 4. Grado de penetración

donde W_o es el ancho de línea de base de la zona de superposición y W_s y W_r son los anchos de línea de base de la muestra y del reactivo, respectivamente. Cuando $W_s + W_r = 2W_o$, hay una superposición completa, con una penetración de la zona del valor unitario. Normalmente, p está entre cero y la unidad, es decir, no hay solapamiento parcial. Un volumen de la zona pequeña resulta en superposición aumentada, pero la dispersión es relativamente grande. El aumento de uno o ambos volúmenes disminuye la superposición relativa, pero la dispersión en el punto isodispersión es inferior (el punto en el máximo solapamiento). Los valores más altos requieren mayor tiempo de análisis. Normalmente, el volumen inyectado de muestra deberá ser menor que el volumen a la mitad del máximo de la señal, $S_{1/2}$, y el volumen de reactivo debe ser al menos dos veces el volumen de la muestra. (Christian, 1994)

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Equipo

- Balanza analítica Ohaus modelo E12140
- Bomba peristáltica Gilson Miniplus 3 y bomba peristáltica ISMATEC
- Parrilla Cimarec modelo sp46925
- Horno de secado Rios Rocha modelo E41
- Potenciómetro Oakton Ph 500 series modelo 00702-75
- Potenciostato Petit Ampere LC-3D
- Celda electroquímica BAS unijet. Electrodo de trabajo: carbón vítreo. Electrodo de referencia: Ag-AgCl. Electrodo auxiliar de acero inoxidable.
- Registrador gráfico Delux Laboratory modelo 157
- Espectrofotómetro FT-IR/FT-FIR 400. Perkin Elmer. Accesorio de reflectancia ATR
- Microscopio electrónico de transmisión JEOL 2010

2.2. Reactivos

- Enzima Glucosa Oxidasa de *Aspergillus Niger*. 55 mg de sólido. 181300 Unidades/g sólido. Sigma Aldrich
- Nanotubos de carbono de multipared. Diámetro: 110-170 nm, Longitud 5-9 micrómetros. 90 +% . Sigma Aldrich
- Anilina, 99.5 % (GC). Sigma Aldrich
- Glutaraldehído. Grado II. Solución acuosa 25 %. Sigma Aldrich.
- 3-aminopropiltriethoxi silano 99 %. Sigma Aldrich
- Vidrio de poro controlado. Tamaño de malla 120-200. Diámetro de poro 239 Å. Volumen de poro 0.82 cc/g. Área superficial 81.6 m²/g. Sigma Aldrich

2.3. Disoluciones

- Disolución de ácido clorhídrico 6 M

Se tomó un volumen de 122 mL de ácido clorhídrico al 37.9 % de pureza (J.T. Baker) y se deslizó por las paredes del cuello de un matraz volumétrico de 250 mL que contenía aproximadamente 150 mL de agua destilada. Se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

- Disolución de ácido sulfúrico 0.5 M

Se tomó una alícuota de 1.5 mL de ácido sulfúrico al 98 % (J.T. Baker) y se deslizó por las paredes del cuello de un matraz volumétrico de 50 mL que contenía

Desarrollo Experimental

aproximadamente 25 mL de agua destilada. Se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

- Disolución de persulfato de potasio 0.15 M

Se pesó 2.0279 g de persulfato de potasio (PSK) (Baker Analysed) y se disolvió en aproximadamente 40 mL de agua destilada. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

- Disolución de ácido nítrico 5 %

Se tomó una alícuota de 5 mL de ácido nítrico (J.T. Baker) y se deslizó por las paredes del cuello de un matraz volumétrico de 100 mL que contenía aproximadamente 50 mL de agua destilada. Se llevó a la marca con agua destilada.

- Disolución madre de peróxido

Se tomó 1 mL de peróxido al 30 % (Sigma Aldrich) y se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Se obtuvo una disolución de 0.1 M

- Estándares para la curva de calibración de peróxido

En un matraz volumétrico de 50 mL se colocó una alícuota de 5 mL de la disolución madre de peróxido y se llevó a la marca de aforo con agua destilada para obtener una disolución de 10 mM. De ésta disolución, en matraces volumétricos de 10 mL, se colocaron volúmenes de 5 mL, 4 mL, 2 mL y 1 mL; y se llevaron a la marca de aforo con agua destilada. De la disolución de 1mM, en matraces de 10 mL, se colocaron volúmenes de 5 y 1 mL y se llevaron a la marca de aforo con agua destilada. Por último de la disolución de 0.1 mM se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en un matraz de 10 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Se obtuvieron disoluciones de 5000, 4000, 2000, 1000, 0.500, 100 y 10 μ M.

- Disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.5

Se pesaron 1.7851 g de fosfato ácido de sodio heptahidratado (Mallinckrodt) y 0.4593 g de fosfato diácido de potasio (Mallinckrodt) y se disolvieron en aproximadamente 50 mL de agua destilada. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Se ajustó el pH, añadiendo gota a gota, una solución de ácido nítrico que se preparó diluyendo 1 mL del ácido concentrado en 9 mL de agua destilada.

Desarrollo Experimental

- Disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6

Se pesaron 4.4712 g de fosfato ácido de sodio heptahidratado (Mallinckrodt) y 1.1419 g de fosfato diácido de potasio (Mallinckrodt) y se disolvieron en aproximadamente 100 mL de agua destilada. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 250 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Se ajustó el pH, añadiendo gota a gota, una solución de ácido nítrico que se preparó diluyendo 1 mL del ácido concentrado en 9 mL de agua destilada.

- Disolución amortiguadora de fosfatos 0.001 M pH 6

Se pesó 0.0052 g de fosfato ácido de sodio heptahidratado (Mallinckrodt) y 0.0154 g de fosfato diácido de potasio (Mallinckrodt) y se disolvieron en aproximadamente 30 mL de agua destilada. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Se ajustó el pH, añadiendo gota a gota, una solución de hidróxido de sodio que se preparó disolviendo 4 granos en aproximadamente 10 mL de agua destilada.

- Disolución amortiguadora de TRIS-EDTA 0.1 M pH 6

Se tomó un volumen de 25 mL de disolución amortiguadora TRIS-EDTA 0.41 M (Fluka) y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL. Se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Se ajustó el pH, añadiendo gota a gota, una solución de ácido nítrico que se preparó diluyendo 1 mL del ácido concentrado en 9 mL de agua destilada.

- Disolución de madre de glucosa 0.1 M

Se pesaron 0.9045 g de dextrosa anhidra (J.T. Baker) y se disolvieron en aproximadamente 50 mL de agua destilada. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

- Estándares para la curva de calibración de glucosa

De la disolución madre de glucosa, en matraces volumétricos de 10 mL, se colocaron volúmenes de 5 mL y 2 mL; se llevaron a la marca de aforo con agua destilada resultando concentraciones de 50,000 μM y 20,000 μM respectivamente. Así mismo, de esa disolución, en un matraz volumétrico de 50 mL se colocó una alícuota de 5 mL obteniendo una disolución de 10,000 μM . De ésta, en matraces volumétricos de 10 mL, se colocaron volúmenes de 8 mL, 5 mL y 2 mL; se llevaron a la marca de aforo con agua destilada resultando concentraciones de 8000 μM , 5000 μM y 2000 μM respectivamente.

Desarrollo Experimental

De la misma manera, en un matraz volumétrico de 50 mL, se colocó una alícuota de 5 mL de la disolución de 10,000 μM y se llevó a la marca de aforo con agua destilada resultando una concentración de 1000 μM . De la última disolución, en matraces volumétricos de 10 mL, se colocaron volúmenes de 5 mL, 2 mL y 1 mL; se llevaron a la marca de aforo con agua destilada resultando concentraciones de 500 μM , 200 μM y 100 μM .

2.4. Normalización de disoluciones

- Normalización de la disolución de permanganato de potasio

Se pesaron 0.0340 g de ácido oxálico dihidratado y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 85 mL de agua destilada y 25 mL de ácido sulfúrico 9 N. Esta mezcla se calentó aproximadamente a 65 °C y se efectuó la titulación agregando el permanganato hasta el momento que ocurrió el vire de la disolución de incoloro a rosa pálido. La titulación se realizó por triplicado.

- Normalización de la disolución madre de peróxido de hidrógeno

En un matraz erlenmeyer se colocaron 2 mL de la disolución madre de peróxido de hidrógeno, 25 mL de ácido sulfúrico 9 N y 75 mL de agua destilada. La mezcla se tituló con la disolución normalizada de permanganato de potasio hasta el vire de la disolución de incoloro a rosa pálido. La titulación se realizó por triplicado.

2.5. Inmovilización de la enzima GOx en nanotubos de carbono

2.5.1. Acondicionamiento de nanotubos de carbono

- Limpieza de nanotubos de carbono (Zhong et al., 2011)

Se pesaron 0.1011 g de nanotubos de carbono y fueron sometidos a una temperatura de 300 °C durante 7 horas. Posteriormente, se sumergieron en 25 mL de ácido clorhídrico 6 M bajo agitación ultrasónica durante 2 horas. Se filtró y se realizaron lavados con agua destilada hasta un pH cercano a la neutralidad. Se dejó secar durante 12 horas a una temperatura de 80 °C.

Desarrollo Experimental

2.5.2 Síntesis de polímero PANI en nanotubos de carbono

Se adicionaron gota a gota 300 μL de anilina a un volumen de 20 mL de ácido sulfúrico 0.5 M con agitación vigorosa. En esta disolución se sumergieron 0.0894 g de nanotubos de carbono secos. Se agitó vigorosamente para que la mayor cantidad de nanotubos estuvieran sumergidos en la mezcla de anilina/ácido. Se dejó reposar.

Posteriormente, se agregaron, gota a gota y bajo agitación vigorosa 25 mL de persulfato de potasio 0.15 M. La disolución se almacenó a 4 $^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 24 horas. Se filtró, se lavó con agua destilada y con etanol. Se dejó secar.

Se realizó una muestra blanco en la que se realizó el mismo procedimiento sin nanotubos.

En las figuras 12 y 13 se esquematizan los pasos anteriores.

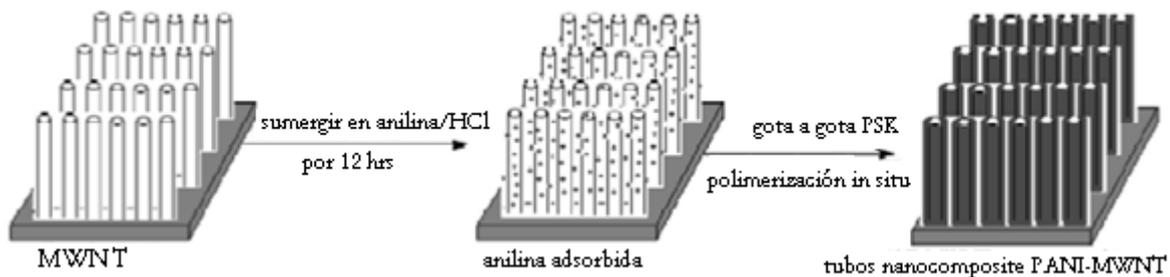


Figura 12. Acondicionamiento de los NTC y síntesis de PANI

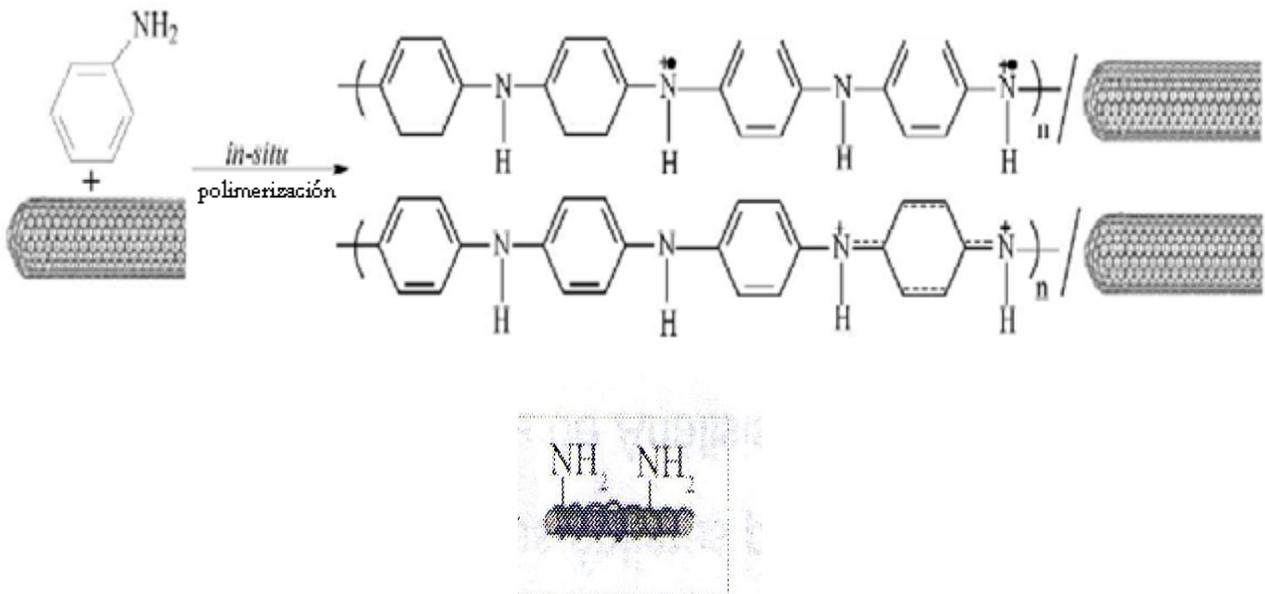


Figura 13. Reacción de polimerización de anilina para formar PANI y recubrir los NTC

Desarrollo Experimental

2.5.3 Acoplamiento con glutaraldehído

Se tomaron 25 mL de glutaraldehído grado II 25 % y se le añadieron 50 mL de la disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 8.5. De esta disolución se tomaron 15 mL y se agregaron a los nanotubos y se mantuvieron en agitación por 2 hora a temperatura ambiente. Se lavó con agua destilada y se filtró. Se dejó secar.

2.5.4 Inmovilización de la enzima

Se pesaron 0.1035 g de nanotubos tratados y se les añadieron 5 mL de disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7, en los que previamente se disolvieron 0.0045 g de sólido de enzima Glucosa Oxidasa. Esta mezcla se mantuvo a temperatura de refrigeración con agitación eventual por dos días. Se filtró y se lavó con agua destilada. Se almacenó a 4 °C en disolución amortiguadora de fosfatos 0.001 M pH 6 hasta su uso (Figura 14).

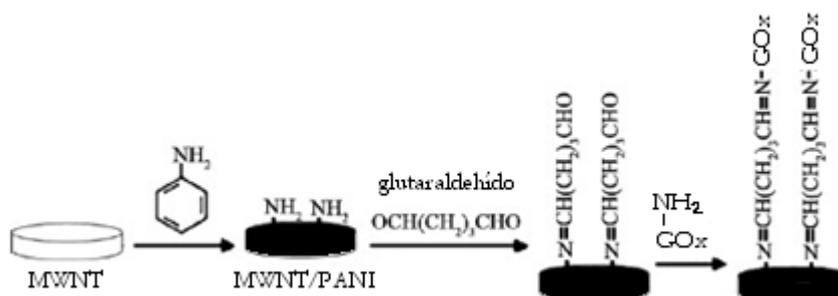


Figura 14. Esquemización de la inmovilización de GOx en NTC

2.6. Inmovilización de la enzima GOx en vidrio de poro controlado (VPC)

2.6.1 Limpieza de vidrio (Angeles, 2003)

Se pesaron 1.5331 g de vidrio de poro controlado, se adicionaron 50 mL de HNO₃ al 5 % y se calentó a ebullición en parrilla eléctrica por 30 min. Transcurrido este tiempo se filtró sobre placa porosa, se lavó con agua destilada y se secó a 95 °C.

2.6.2 Activación de vidrio

- Silanización

Se tomaron 5 mL de 3-aminopropiltriethoxi-silano al 99 % y se añadieron a 45 mL de la disolución amortiguadora de acetatos 0.005 M y pH 5. Esta disolución se añadió al vidrio seco y se calentó en parrilla eléctrica con agitación a 90 °C por 2 horas. Después el

Desarrollo Experimental

vidrio se filtró sobre placa porosa, se lavó con agua destilada y se secó a 95 °C. El vidrio silanizado seco se guardó protegido de la luz, hasta su utilización.

- Acoplamiento con glutaraldehído

Se tomaron 25 mL de glutaraldehído grado II 25 % y se le añadieron 50 mL de la disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 8.5. De esta disolución se tomaron 15 mL y se agregaron al vidrio silanizado y se mantuvo en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó con agua destilada y se filtró.

2.6.3 Inmovilización de la enzima

Se pesaron 0.1069 g de vidrio preparado y se les añadieron 6 mL de disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7, en los que previamente se disolvieron 0.0045 g de sólido de enzima Glucosa Oxidasa. Esta mezcla se mantuvo a temperatura de refrigeración con agitación eventual por dos días. Se filtró y se lavó con agua destilada. Se almacenó a 4 °C en disolución amortiguadora de fosfatos 0.001 M pH 6 hasta su uso (figura 15).

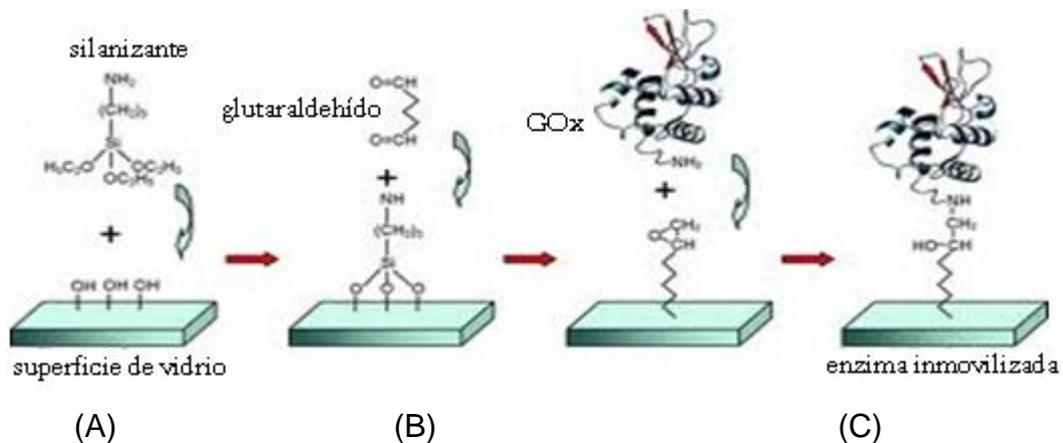


Figura 15. Inmovilización de la enzima GOx en VPC. (A) Silanización del vidrio de poro controlado. (B) Acoplamiento con glutaraldehído. (C) Inmovilización de la enzima

2.7. Evaluación de la actividad enzimática en línea

2.7.1 Preparación del reactor enzimático

A un tubo de teflón de aproximadamente 2 mm de diámetro interno y 3 cm de longitud, se le colocó un pedazo de algodón en uno de los extremos para evitar la pérdida de la enzima. Con una pipeta pasteur se tomó una alícuota de la enzima inmovilizada en

Desarrollo Experimental

nanotubos de carbono y por medio de un tubo conectado a una bomba peristáltica en el extremo del tubo donde está el algodón, se aspiró la alícuota de la enzima y se hizo pasar a lo largo del tubo de teflón. Este reactor se colocó en la configuración SIA que se muestra en la figura 16 (reactor empacado). El mismo procedimiento se realizó para evaluar la actividad de la enzima inmovilizada en VPC.

2.7.2 Configuración del sistema en línea para evaluar la actividad enzimática

La figura 16 muestra la configuración SIA para evaluar la actividad del reactor enzimático en línea. Se inyectan 10 μL del estándar de glucosa dentro de la disolución portadora que tiene un caudal de 0.16 mL/min . La mezcla pasa por el reactor enzimático a temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$), donde la glucosa se oxida a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, este último se oxida por el potencial impuesto (0.8 V) produciendo intensidad de corriente. Las señales analíticas obtenidas forman una señal transiente con un máximo que es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y por lo tanto a la concentración de glucosa.

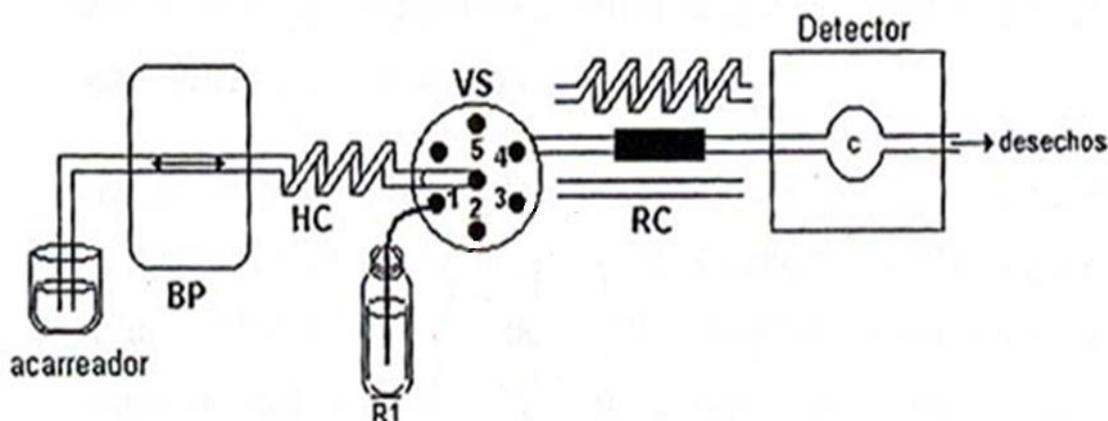


Figura 16. Configuración del sistema en línea para evaluarla actividad enzimática con un reactor empacado acoplado. Bomba peristáltica (BP), Reactor de espera (HC), Válvula de selección (VS), Reactor empacado (RC), Reactivo (R1).

Esta misma configuración se utilizó para cuantificar peróxido de hidrógeno pero sin el reactor enzimático.

Desarrollo Experimental

La tabla 3 muestra la secuencia del funcionamiento del sistema SIA.

Pasos	Acción	Posición de VS	Caudal ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Volumen
1	Llenado del sistema con el acarreador	2	160	Todo el posible para llenarlo
2	Aspirar muestra	6	160	10 μL
3	Dispensar muestra hacia el detector	2	160	Todo el posible para observar la formación de la señal analítica

Tabla 3. Secuencia de funcionamiento de la configuración del sistema en línea para la evaluación de la actividad de la enzima inmovilizada en ambos soportes.

2.7.3 Fundamento de la reacción

En el sistema SIA, el peróxido de hidrógeno se forma de la oxidación de glucosa por medio de la enzima inmovilizada glucosa oxidasa y es detectado electroquímicamente en la celda electroquímica (figura 17), midiendo la respuesta anódica debido a la oxidación en la superficie del electrodo de trabajo lo cual ocurre a potenciales más altos que 600 mV /Ag-AgCl (Azevedo et al., 2005)

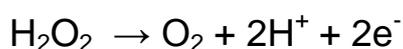


Figura 17. Reacciones que se llevan a cabo dentro del sistema SIA

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis del polímero de anilina en nanotubos de carbono

La limpieza de los nanotubos consistió en calentarlos a 300 °C para remover partículas de carbón amorfas y que toda la muestra de nanotubos fuera lo más homogénea posible, sin embargo, al compararla con una muestra que no fue sometida a calentamiento a simple vista no se observó diferencia alguna. Aún así se utilizaron los nanotubos tratados térmicamente para los siguientes ensayos para evitar cualquier contaminación posible.

Se sometieron a la acción de ácido clorhídrico 6 M y ultrasonido para eliminar cualquier catalizador de óxido de metales que pudiera interferir con la inmovilización de anilina en la superficie de los nanotubos. Para la inmovilización de la anilina se dejó reposar la mezcla de nanotubos y anilina en ácido sulfúrico para permitir que la anilina se adsorbiera y así lograr una mejor inmovilización en los nanotubos.

Se observó, al momento de la adición de la disolución de persulfato de potasio a la mezcla de anilina-nanotubos, un cambio de color de incoloro a azul marino que, luego cambió a verde oscuro. Posteriormente, se obtuvo una mezcla de nanotubos, de color grisáceo y polianilina (PANI) de un color verde fuerte. La muestra blanco (anilina sola) también fue un sólido color verde fuerte. Finalmente cuando se acopló glutaraldehído a PANI y, después de secar, se observó un sólido color azul marino/morado.

Para determinar si la superficie de los nanotubos había sido modificada por la polimerización de anilina, se realizaron estudios de Espectroscopia de Infrarrojo y Microscopía Electrónica de transmisión y de barrido (figuras 18, 19, 20).

Se muestra que los espectros de infrarrojo, tanto de PANI solo y PANI con nanotubos (NTC-PANI), son muy similares. En un principio se puede deber a que el PANI se unió a los nanotubos, pero debido a que el polímero de PANI es un conglomerado muy grande posiblemente el espectro de NTC-PANI puede deberse a un exceso de PANI más que al PANI unido a los NTC. Sin embargo, se observa que existe una pequeña disminución en la intensidad de los picos del espectro de NTC-PANI comparado con el de PANI solo. Esta disminución sugiere que una interacción entre el anillo quinoide de la polianilina dopada y los nanotubos puede ocurrir como consecuencia de la polimerización in situ . Esta interacción puede entonces facilitar los procesos de transferencia de carga entre los componentes del sistema y por lo tanto influir en las propiedades de transporte. (Feng et al., 2003; Choi et al., 2011)

Resultados y Discusión

El espectro de PANI muestra las bandas características de amina secundaria (N-H) en 3228.41 cm^{-1} , la deformación de estiramiento del enlace C=C de los anillos quinoide (N=Q=N) a 1557.45 cm^{-1} , anillos bencenoides (N-B-N) a 1477.10 cm^{-1} , y el estiramiento del enlace de la amina aromática secundaria en 1288.75 cm^{-1} (figura 18a). El espectro de NTC-PANI muestra bandas características casi idénticas en 3228, 1562.98, 1482.11 y 1293.46 cm^{-1} (figura 18b). En comparación con el número de unidades de repetición de PANI en el compuesto NTC-PANI, la población relativa de grupos C=O era demasiado bajo para ser detectado claramente, porque se encuentra sólo en la unión covalente entre NTC y PANI. Esto afirma el recubrimiento de los nanotubos por la síntesis de PANI al igual que se indica en literatura consultada. (Jeon, I.Y. J.Polym. Sci. 2010)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión muestran un claro aumento en el grosor de los nanotubos por efecto de la inmovilización de PANI sobre ellos; confirmando la inmovilización del polímero por un aumento de 10 nm en el diámetro de los nanotubos. Se observa que los nanotubos de las figuras 19a y 19c son más anchos con un diámetro de aproximadamente 80 nm mientras que los nanotubos de las imágenes 19b y 19d presentan un diámetro de aproximadamente 70 nm. El aumento de grosor se debe al recubrimiento de los nanotubos por la síntesis de PANI en concordancia con lo que ha sido publicado por otros investigadores (Zhong et al., 2011).

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido concuerdan con los resultados anteriores ya que muestran cómo la superficie de los nanotubos se modifica cuando fueron cubiertos por PANI y se modifica una vez más cuando se inmovilizó la enzima sobre ellos (figuras 20a, 20b y 20c). Todas estas pruebas nos indican que la inmovilización de la enzima sí se lleva a cabo.

Resultados y Discusión

3.2. Caracterización de los nanotubos de carbono

3.2.1 Espectroscopia IR

- Espectro de IR de PANI

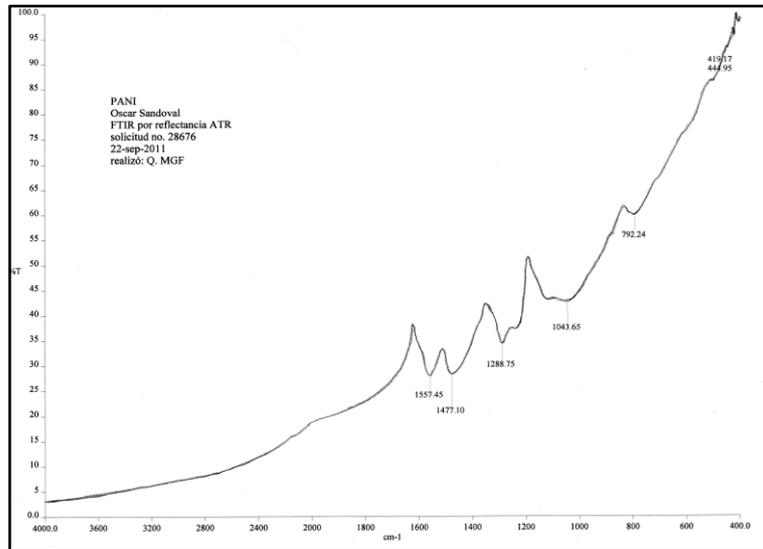


Figura 18a. Espectro de IR de PANI

- Espectro de IR de nanotubos con PANI

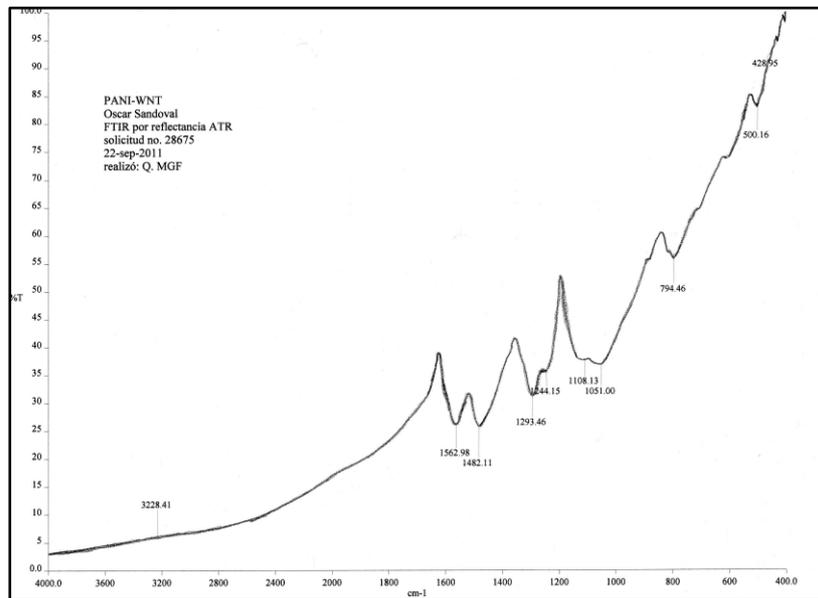


Figura 18b. Espectro de IR de nanotubos con PANI

3.2.2 Microscopia Electrónica de Transmisión

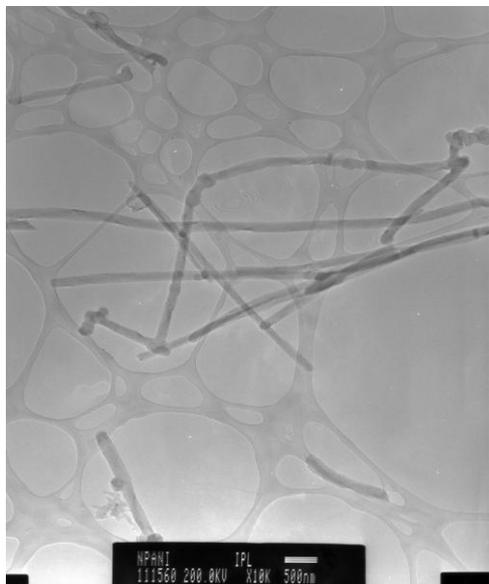


Figura 19a

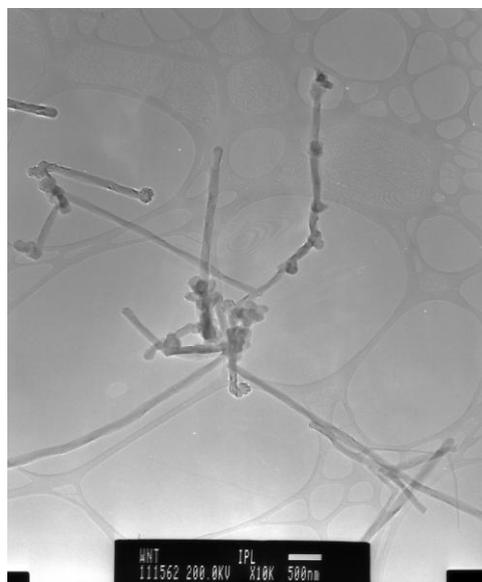


Figura 19b

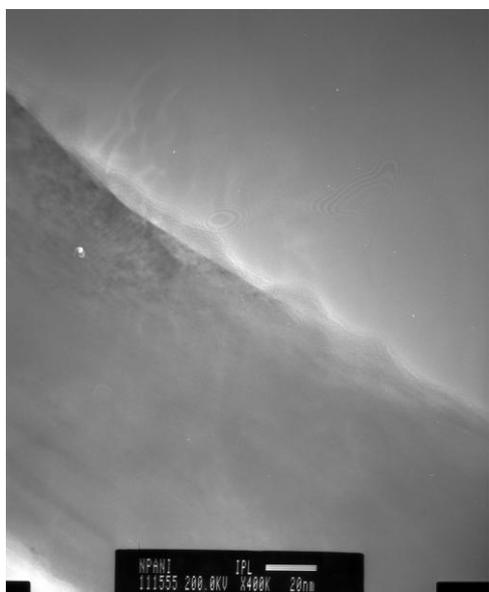


Figura 19c

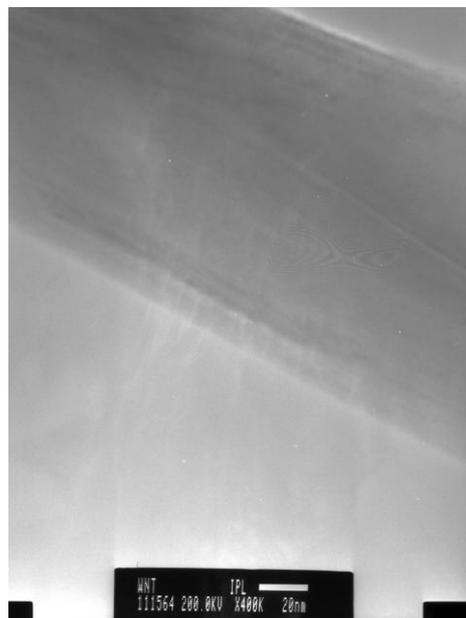


Figura 19d

Figura 19. Las imágenes a y c corresponden a los nanotubos con el polímero de anilina (PANI-NTC) y las imágenes b y d corresponden a los nanotubos solos.

3.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido

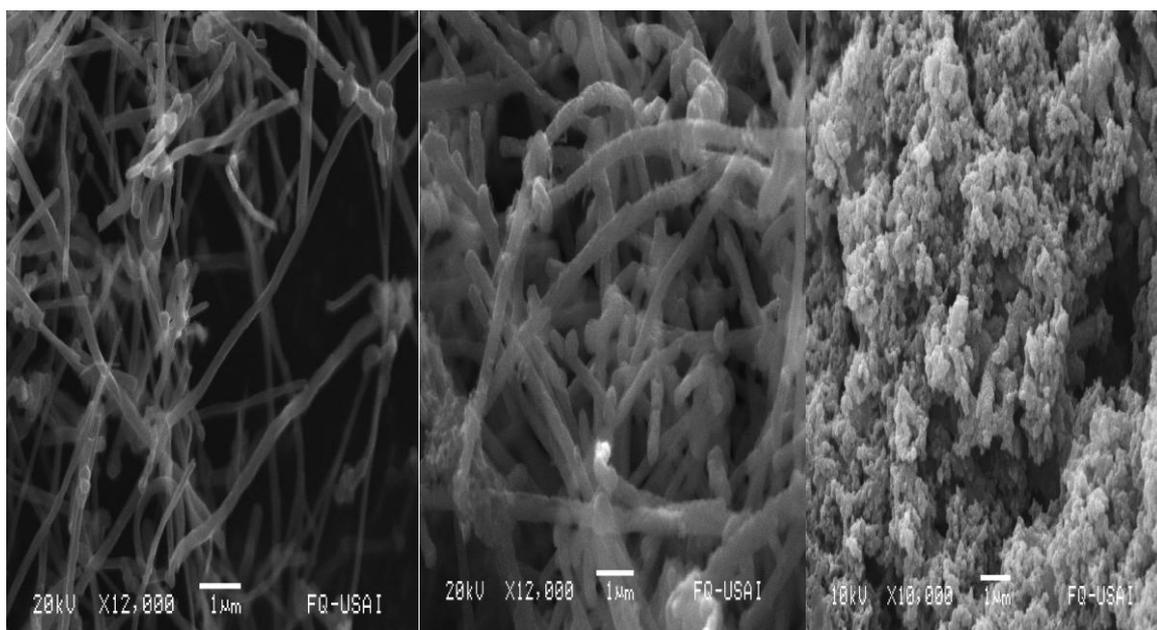


Figura 20a

Figura 20b

Figura 20c

Figura 20. Imágenes correspondientes al proceso de modificación de la superficie de los nanotubos de carbono. Figura 20a. Nanotubos de carbono solos. Figura 20b. Nanotubos recubiertos por PANI. Figura 20c. Enzima inmovilizada en Nanotubos de carbono.

3.3. Normalización de disoluciones

Para conocer la concentración real de la disolución de peróxido de hidrógeno se realizó una valoración por patrón secundario utilizando una disolución de permanganato de potasio previamente normalizado por patrón primario con ácido oxálico. Los resultados de la valoración se muestran en las tablas 4 y 5.

Masa de ácido oxálico (g)	Volumen de KMnO_4 gastado (mL)	Concentración de KMnO_4 (M)
0.0344	7.2	0.01517
0.0354	7.4	0.01519
0.0338	7	0.01533

Tabla 4. Normalización de la disolución de permanganato de potasio

Promedio = 0.0152 M

Resultados y Discusión

Normalizada la disolución de KMnO_4 se prosiguió a realizar la valoración de 2.0 mL de la disolución madre de peróxido de hidrógeno.

Volumen de KMnO_4 gastados (mL)	Concentración de H_2O_2 (M)
5.3	0.1007
5.4	0.1026
5.4	0.1026

Tabla 5. Valoración de la disolución madre de peróxido de hidrógeno.

Promedio = 0.102 M

Desviación estándar = 0.0011

3.4. Optimización de los parámetros SIA

Lo primero que se realizó fue un análisis de la detección de peróxido, es decir, sin involucrar el reactor enzimático. Se midió la intensidad de corriente de los estándares de peróxido preparados, realizándose por triplicado y se obtuvo la curva de calibración en el rango de detección del método. El potencial de trabajo fue de 0.6 V /Ag-AgCl (Azevedo et al., 2005)

3.4.1 pH

De acuerdo a trabajos previos hechos por el equipo de trabajo, el pH óptimo para la enzima GOx es 6. Por lo tanto, se decidió trabajar a este valor de pH (Angeles, 2003)

3.4.2 Disolución buffer

Basándose en que la enzima bajo estudio necesita de un valor de pH amortiguado de 6 se escogió como solución portadora una disolución buffer. Se realizaron estudios con diferentes soluciones buffer para comparar la intensidad de la señal que se presentaba por los estándares de peróxido inyectados. Se trabajó con buffers de TRIS-EDTA 0.1 M con diferente concentración de iones cloruro: 1, 10 y 100 mM; se trabajó también con buffer de fosfatos 0.1 M. Los resultados se observan en la figura 21 y en la tabla 6.

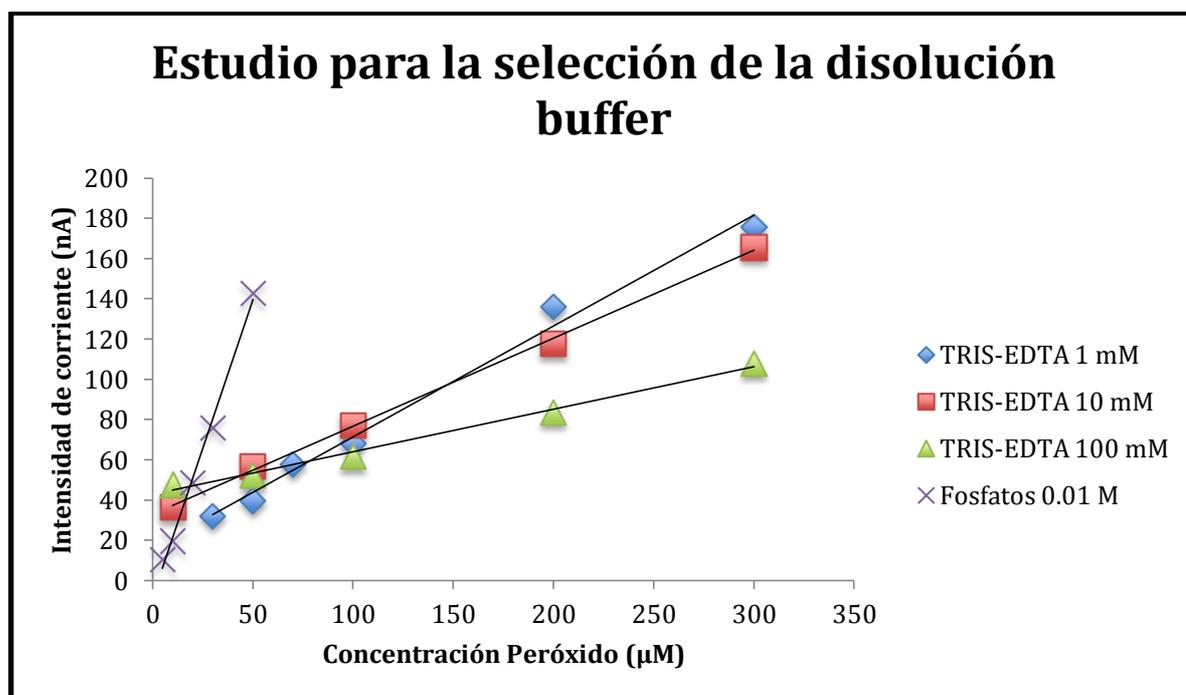


Figura 21. Estudio de la respuesta de la disolución buffer para la detección de peróxido de hidrógeno.

Disolución Buffer	TRIS-EDTA 1mM	TRIS-EDTA 10 mM	TRIS-EDTA 100 mM	Fosfatos 0.01M
Pendiente	0.5516	0.4378	0.2117	2.9633
Ordenada al origen	16.107	32.961	42.692	- 8.6544
Coefficiente de Correlación cuadrado	0.99014	0.99872	0.99219	0.99555

Tabla 6. Relación de valores de las líneas de tendencia para cada disolución buffer estudiada.

La mayor sensibilidad con los diferentes buffer TRIS-EDTA se presentó con el que tenía una concentración de cloruros de 1 mM. Sin embargo, presentó mucha variación en las lecturas de amperaje obtenidas en los diferentes días de evaluación. Al contrario con lo que pasó con el buffer de fosfatos 0.01 M ya que los resultados fueron más consistentes en las réplicas realizadas. Por ello se decidió trabajar con ese buffer además que presentó mayor sensibilidad entre los buffers evaluados. Posteriormente, se cambió a un buffer de fosfatos 0.001M porque se observó que era menor el tiempo en que tardaba en estabilizarse la lectura del detector.

3.4.3 Caudal

Para este estudio se utilizó una disolución 400 μM de peróxido y se evaluaron diferentes caudales (40-200 $\mu\text{L}/\text{min}$), se inyectó un volumen de 20 μL . Se eligieron 160 $\mu\text{L}/\text{min}$ porque las señales que se obtenían eran más reproducibles entre sí. Cada vez que se aspira muestra el flujo hacia el detector se detiene y la señal disminuye, en cuanto el flujo es nuevamente accionado la señal regresa al valor que tenía antes de detenerlo y con este caudal es posible que la lectura se establezca antes que comience a aparecer la señal analítica ocasionada por la muestra. En la figura 22 se observa que a caudales mayores (200 $\mu\text{L}/\text{min}$) no se llega a la estabilización y a caudales menores la señal tarda mucho en aparecer.

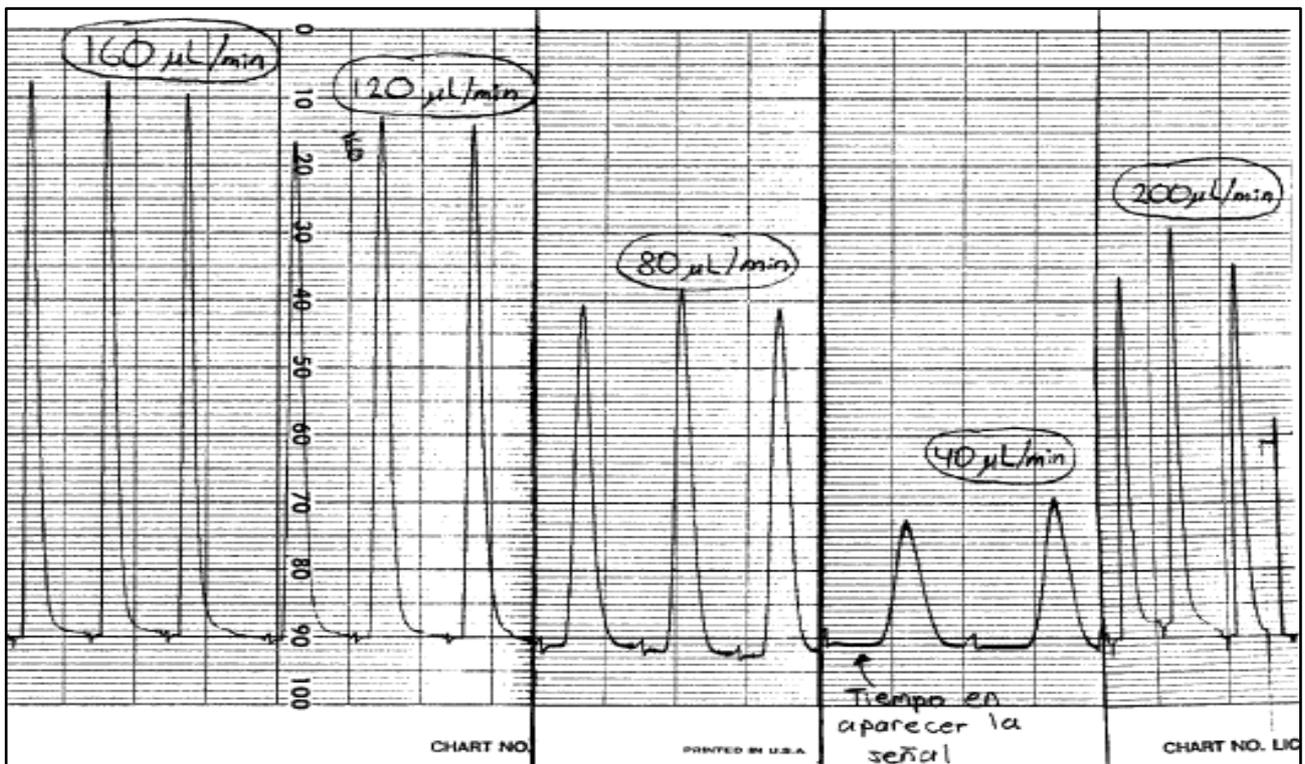


Figura 22. Siagrama del efecto del caudal en la respuesta analítica.

3.4.4 Volumen de inyección

Se inyectaron disoluciones de peróxido de hidrógeno de concentración de 400 y 1 μM variando el volumen de inyección. Se observó que mientras el volumen de inyección es mayor la altura de la señal analítica que se obtiene también lo es (figura 23). Cuando se inyectó la disolución de concentración 1 μM , se observó que con 40 μL era suficiente para poder observar un incremento en la lectura del detector y poder medir esa concentración de peróxido (figura 24) Se realizó una curva de calibración de peróxido de

Resultados y Discusión

hidrógeno con esas condiciones: Caudal 160 $\mu\text{L}/\text{min}$, y 40 μL de volumen de muestra (figura 25).

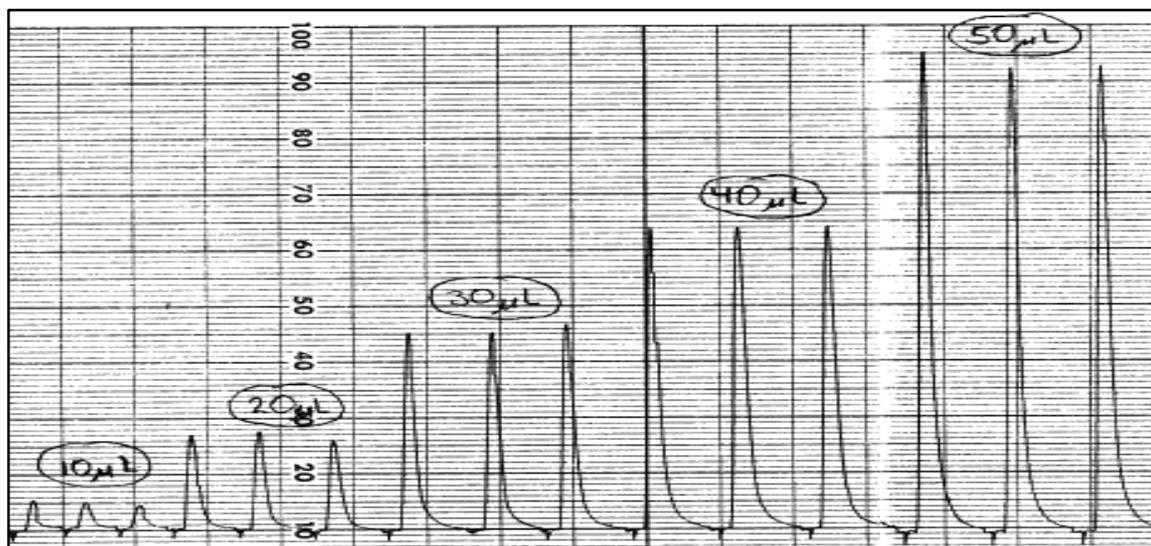


Figura 23. Siagrama del efecto del volumen inyectado en la respuesta analítica. Disolución inyectada: estándar de peróxido 400 μM .



Figura 24. Siagrama del efecto de la concentración de peróxido en la respuesta analítica. Volumen inyectado: 40 μL de cada disolución de peróxido de diferente concentración.

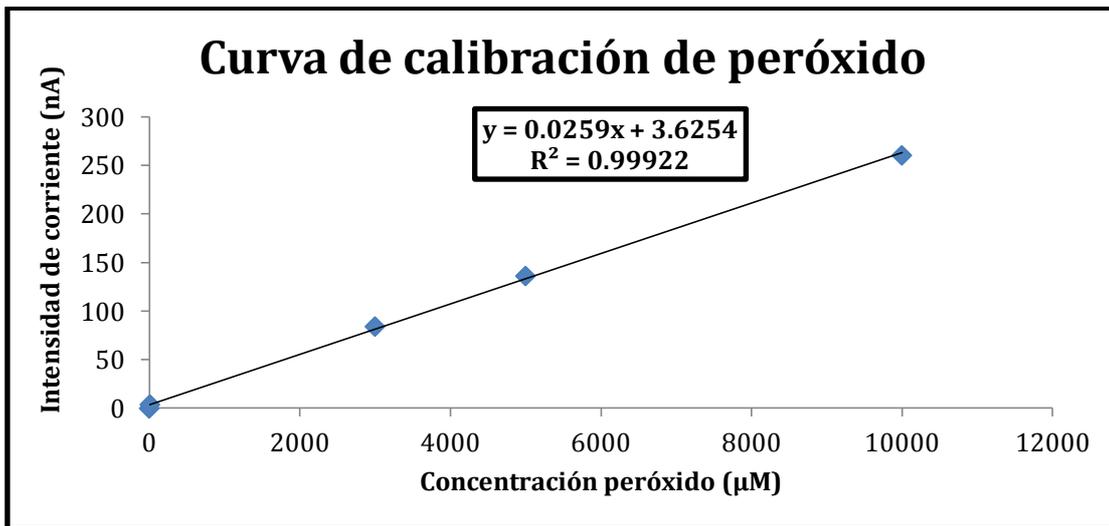


Figura 25. Curva de calibración de peróxido. Intervalo lineal 10-10000 μM

3.5. Inmovilización de la enzima

-NTC

masa de reactor enzimático con enzima inmovilizada en NTC = 0.1815 g

masa de reactor enzimático vacío = 0.177 g

por lo tanto, la masa de sólido de enzima inmovilizada más NTC = 0.0045 g

0.0045 g de sólido de enzima (181300 Unidades de enzima/g de sólido de enzima)
= 815.85 Unidades

de esta manera en los gramos de NTC que se pesaron se tienen = 7882.6 Unidades/g de
NTC

Para determinar las unidades que se tienen en el reactor enzimático:

0.0045 g de sólido de enzima inmovilizada en NTC (7882.6 Unidades/g de NTC) = 35.47
Unidades en el reactor

-VPC

masa de reactor enzimático con enzima inmovilizada en el VPC = 0.1947 g

masa de reactor enzimático vacío = 0.1904 g

por lo tanto, la masa de sólido de enzima inmovilizada más VPC = 0.0043 g

0.0045 g de sólido de enzima (181300 Unidades de enzima/g de sólido de enzima)
= 815.85 Unidades

Resultados y Discusión

de esta manera en los gramos de VPC que se pesaron se tienen = 7631.89 Unidades/g de VPC

Para determinar las unidades que se tienen en el reactor enzimático:

0.0043 g de sólido de enzima inmovilizada en VPC (7631.89 Unidades/g de VPC) = 32.82 Unidades en el reactor

3.6. Optimización de la reacción enzimática por SIA

Se optimizó el sistema SIA acoplado el reactor enzimático de nanotubos. Se trabajó con una disolución de glucosa 1000 μM para realizar pruebas preliminares.

Lo primero que se hizo fue observar si la enzima seguía activa a pesar del proceso de inmovilización y aunque en las pruebas de microscopía se observó que la enzima sí se inmovilizó sobre los nanotubos eso no garantizaba que la enzima retuviera su poder catalítico. De esta manera, se inyectó un volumen determinado de disolución de glucosa 250 μM con el reactor acoplado al sistema SIA y, para poder comparar y verificar que la enzima seguía activa, se inyectó el mismo volumen de glucosa pero sin el reactor enzimático acoplado al sistema. Como se observa en la figura 26 cuando la glucosa entra en contacto con la enzima se observa la señal analítica en forma de pico por efecto del peróxido producido, sin embargo cuando el reactor enzimático no está presente, la glucosa no produce la señal analítica esperada porque no es oxidada en la celda electroquímica. Estos resultados demuestran que la enzima GOx inmovilizada en los NTC sigue activa.

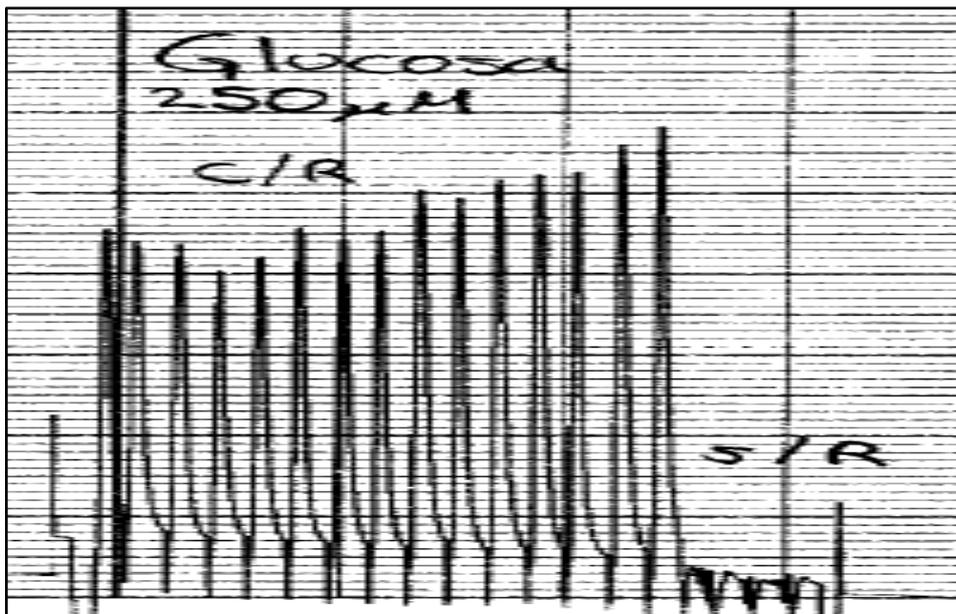


Figura 26. Efecto en la respuesta analítica debido a la presencia del reactor enzimático en el sistema SIA. C/R (reactor acoplado al sistema). S/R (sistema sin reactor enzimático)

Resultados y Discusión

El desempeño del biosensor esta fuertemente basado en la estabilización de la enzima vía inmovilización. Además, la estabilidad de las enzimas multiméricas está basada en la disociación de las subunidades.

La inmovilización multienlace de enzimas multiméricas puede evitar la disociación de las subunidades por enlace de entrecruzamiento intersubunitario que también reduce cambios no deseados de conformación. La técnica de glutaraldehído es muy versátil para lograr enlaces multienlace. En términos de la estabilización, el tratamiento de enzimas que, previamente adsorbidos sobre soportes llevan grupos amino primarios con glutaraldehído, en muchos casos ofrece muy buenos resultados (como los que se muestran), ya que esta técnica permite el enlace entre las moléculas de glutaraldehído unidos a las moléculas de enzima y el glutaraldehído enlazados al soporte. (Yuksel, 2011)

Por lo tanto, un intenso enlace entre el soporte y la enzima parece llevarse acabo y estos múltiples enlaces covalentes entre la enzima y el soporte estabilizan la estructura cuaternaria de la proteína y se incrementa la rigidez de las estructuras de las subunidades.

Los grupos amino en la superficie del soporte hacen que las estructuras de las subunidades de GOx se involucren en la inmovilización. Esto conduce a una estabilización alta de la enzima. (Yuksel, 2011)

3.6.1 Temperatura

Con base en el trabajo previo realizado en el laboratorio, la temperatura óptima de trabajo de la enzima GOx inmovilizada es de 36 °C. Sin embargo, se observó que cuando el reactor era sumergido en un baño térmico a esta temperatura la línea base de la lectura presentaba muchas variaciones en el amperaje medido, evitando tener señales analíticas bien definidas. Por esa razón, se decidió trabajar sin ocupar el baño térmico, es decir, a temperatura ambiente (aprox. 23 °C).

3.6.2 Caudal

Con base en los resultados obtenido en la optimización de los parámetros SIA para la detección de peróxido, se realizó un estudio variando el caudal a valores menores de 160 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se estudiaron 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 120 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se observó que sucedía lo mismo que con la disolución peróxido. A valores de caudal menores a 160 $\mu\text{L}/\text{min}$ la señal analítica tardaba más tiempo en aparecer siendo 160 $\mu\text{L}/\text{min}$ también el óptimo para la disolución de glucosa.

3.6.3 Volumen de inyección

Se realizó el estudio de volumen inyectado de disolución de glucosa inyectado al sistema SIA. Se realizaron pruebas con 50 y 25 μL de volumen inyectado y se observó que mientras mayor es el volumen inyectado la intensidad de corriente también lo es. Para este caso, la intensidad de corriente fue el doble para el volumen de 50 μL respecto al que se obtuvo cuando se inyectaron 25 μL . Ello se debe a que en volúmenes mayores existe una cantidad más grande de muestra que entra en contacto con la enzima transformándose en peróxido y obteniendo amperajes más grandes. Se realizó una prueba más, inyectando 10 μL y se observó que esta cantidad de disolución de dextrosa era capaz de ser detectada y de presentar la señal analítica correspondiente. De esta manera, se eligió trabajar con un volumen de 10 μL porque en el presente trabajo se busca trabajar con el menor tamaño de muestra al igual que se busca reducir la generación de residuos posibles.

3.6.4 Potencial de trabajo

Con las condiciones óptimas obtenidas (pH 6, temperatura ambiente, caudal 160 $\mu\text{L}/\text{min}$, 10 μL de analito) se volvieron a inyectar disoluciones de peróxido para realizar la curva de calibración y así poder comparar acoplando el reactor enzimático e inyectando disoluciones de glucosa a diferentes concentraciones. Al compararlas, se observó que el valor de intensidad de corriente de las señales analíticas de las disoluciones de glucosa era mayor que las que se obtenían al inyectar las disoluciones de peróxido de la misma concentración. Esa situación tenía un error porque es como si la enzima estuviera produciendo más peróxido del que podría producir a partir de las moles de glucosa presentes. Por ello, se decidió a cambiarlo a 0.8 V. Con este cambio, los valores de intensidad de corriente producidas por las disoluciones de peróxido de hidrógeno fueron mayores que las que se registraron para las disoluciones de glucosa a la misma concentración.

3.6.5 Unidades inmovilizadas de GOx y diámetro del electrodo de trabajo

Al realizar el estudio de la evaluación de la reacción enzimática con diferentes concentraciones de glucosa, se observó que el detector era muy sensible, por la respuesta de intensidad de corriente producida, por lo que no permitía observar la saturación de la enzima por el sustrato presentándose una relación proporcional entre concentración de sustrato e intensidad de corriente. Así, se decidió inmovilizar menos

unidades de enzima por cada gramo de soporte y además cambiar de electrodo de trabajo de 6 mm a 3 mm de diámetro.

3.7. Corrección de curva de calibración de peróxido

Por los parámetros modificados con la optimización de la reacción enzimática por SIA (volumen de analito, valor de potencial, diámetro de electrodo de trabajo) se realizó otra curva de peróxido a diferentes concentraciones. Se midió la intensidad de corriente de los estándares preparados, realizándose por triplicado y se obtuvo la curva de calibración en el rango de detección del método (figuras 27 y 28).

Se observó que los estándares de peróxido no presentaban la misma intensidad de corriente de un día para otro, por lo tanto se decidió realizar la curva de calibración de peróxido cada vez que se evaluó la actividad de la reacción enzimática.



Figura 27. Siagrama de la curva de calibración de peróxido para la evaluación de la reacción enzimática de GOx inmovilizada en NTC. Las concentraciones de las disoluciones son del orden de μM .

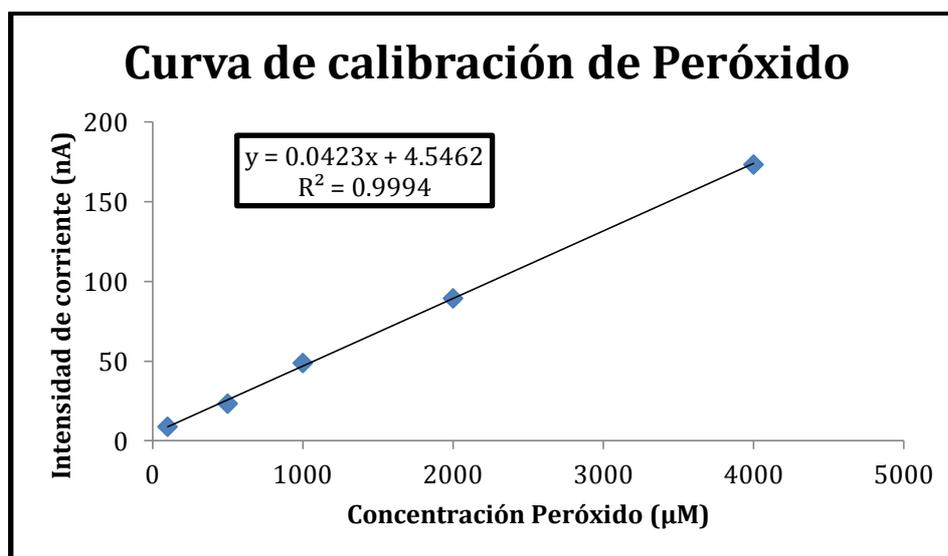


Figura 28. Curva de calibración para peróxido. Intervalo lineal 100 – 4000 μM

3.8. Evaluación de la reacción enzimática por SIA a diferentes concentraciones de glucosa

Con los parámetros optimizados para el sistema SIA, se inyectaron diferentes concentraciones de glucosa. Se prepararon estándares del sustrato de 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 8000, 10000, 20000 y 50000 μM . Las condiciones óptimas obtenidas fueron: temperatura ambiente (23 $^{\circ}\text{C}$), pH 6, volumen de muestra inyectado 10 microlitros y un caudal de 0.16 mL/min. Cada estándar se inyectó por triplicado (figura 29). Los resultados se muestran en la tabla 7 y la figuras 30 y 31. Se observa que la intensidad de corriente aumenta conforme se inyecta glucosa más concentrada, sin embargo, la relación lineal que existe entre esas variables se pierde a concentraciones de glucosa superiores a 5000 μM .

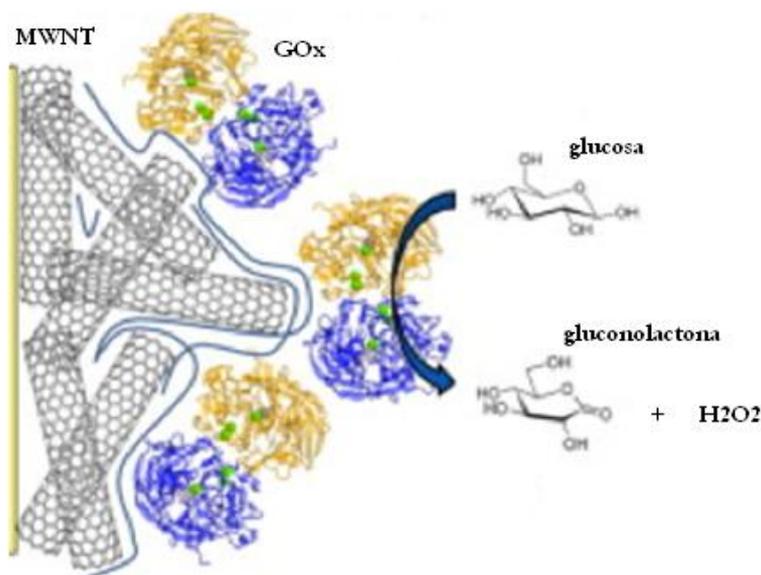


Figura 29. Reacción de la enzima GOx inmovilizada en NTC

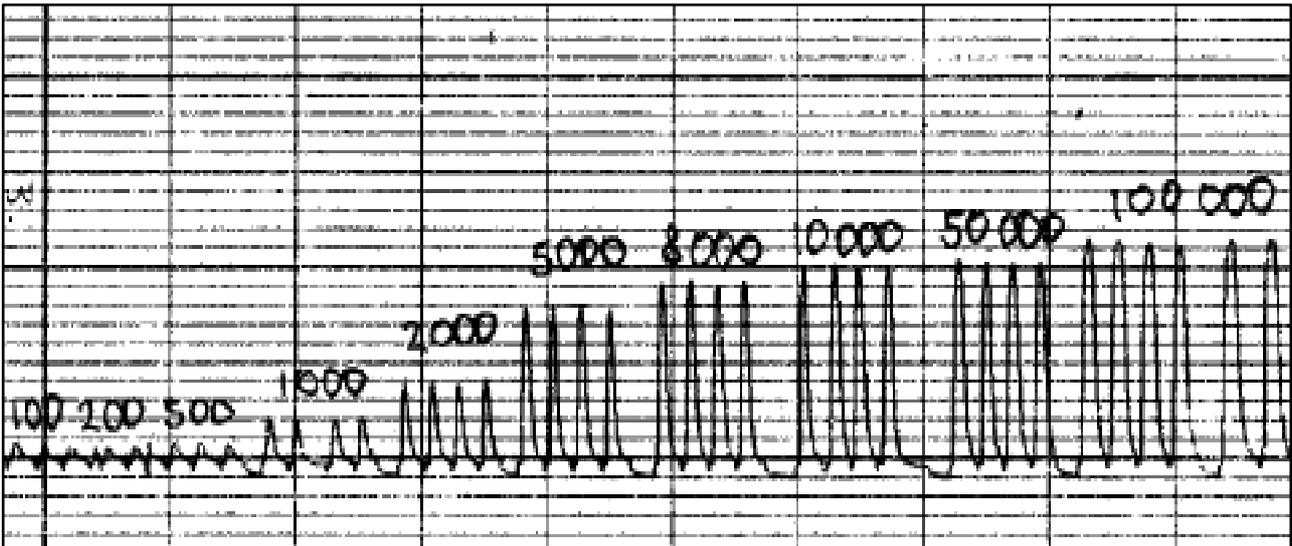


Figura 30. Siagrama de la evaluación de la reacción de la enzima inmovilizada en NTC por SIA a diferentes concentraciones de glucosa.

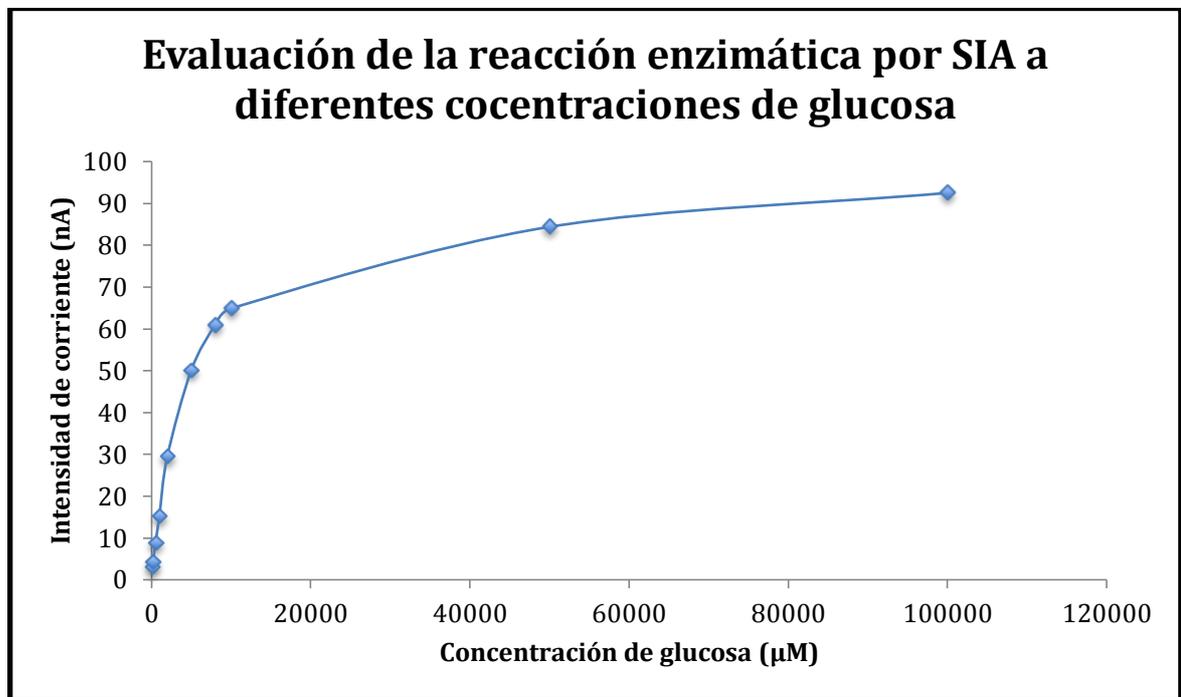


Figura 31. Curva obtenida para los estándares de glucosa, sustrato de la enzima GOx inmovilizada en NTC

3.9. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima GOx

A partir de los resultados de amperaje obtenidos de las diferentes concentraciones de glucosa por SIA y mediante la ecuación de la recta que se obtuvo de la curva de calibración de peróxido ($y = 0.0423x + 4.5462$) se obtuvo la concentración de éste para cada concentración de glucosa analizada (tabla 7). El tiempo del máximo del pico de la señal analítica de la reacción enzimática fue 0.916 min, es decir, es el tiempo que tarda en llegar a ese máximo desde que el volumen de muestra es inyectado dentro del sistema SIA. Se observa que a mayores concentraciones de glucosa la velocidad con la que es

Resultados y Discusión

transformado el sustrato es más grande, llegando a una saturación de la enzima con una concentración de 5000 μM de glucosa (figuras 31 y 32) ya que es cuando la relación entre la concentración de sustrato y la respuesta analítica ya no es proporcional, presentando un comportamiento cinético descrito por la ecuación de Michaelis-Menten para la mayoría de las cinéticas enzimáticas (Yildiz y Toppare, 2006). La figura 33 muestra la relación del inverso de la velocidad de la reacción enzimática y el inverso de la concentración de peróxido, y la figura 34 muestra la relación entre la velocidad de la reacción enzimática y el cociente de la velocidad entre la concentración y, con base a lo descrito por las ecuaciones de Lineweaver-Burk y Eadie-Hofstee (Yildiz y Toppare, 2006), se realizó el cálculo para determinar los parámetros cinéticos de la GOx (K_m y Velocidad máxima, tabla 8).

[S] (μM)	I (nA)	Concentración de peróxido (μM)	μM de peróxido producidos/min	1/[S]	1/V	V/[S]
100	3.05	-	-	0.01	-	-
200	4.23	-	-	0.005	-	-
500	8.68	97.66	106.62	0.002	0.009379	0.21323
1000	15.18	251.4	274.45	0.001	0.003643	0.27445
2000	29.51	590.1	644.22	0.0005	0.001552	0.32211
5000	50.1	1076.68	1175.42	0.0002	0.0008507	0.23508
8000	60.91	1332.44	1454.63	0.000125	0.0006874	0.18183
10000	64.91	1427.09	1557.95	0.0001	0.0006418	0.15579
50000	84.43	1888.5	2061.68	0.00002	0.0004850	0.04123
100000	92.55	2080.45	2271.23	0.00001	0.0004403	0.02271

Tabla 7. Datos obtenidos para determinar los parámetros cinéticos de la enzima GOx inmovilizada en NTC

Resultados y Discusión

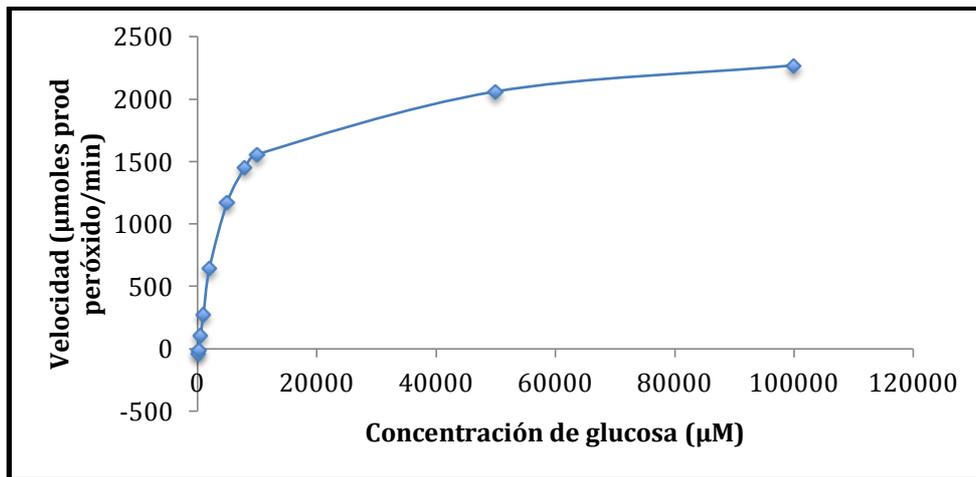


Figura 32. Curva de comportamiento cinético de la enzima GOx inmovilizada en NTC

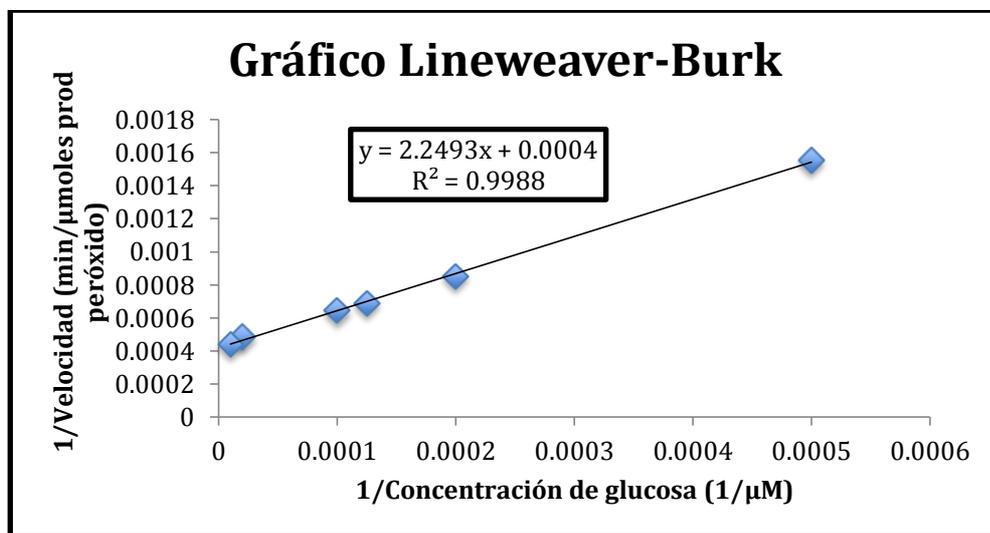


Figura 33. Gráfico Lineweaver-Burk. Donde $V_{m\acute{a}x}$ es igual al inverso de la ordenada al origen y k_m es igual al producto de $V_{m\acute{a}x}$ y la pendiente de la gráfica.

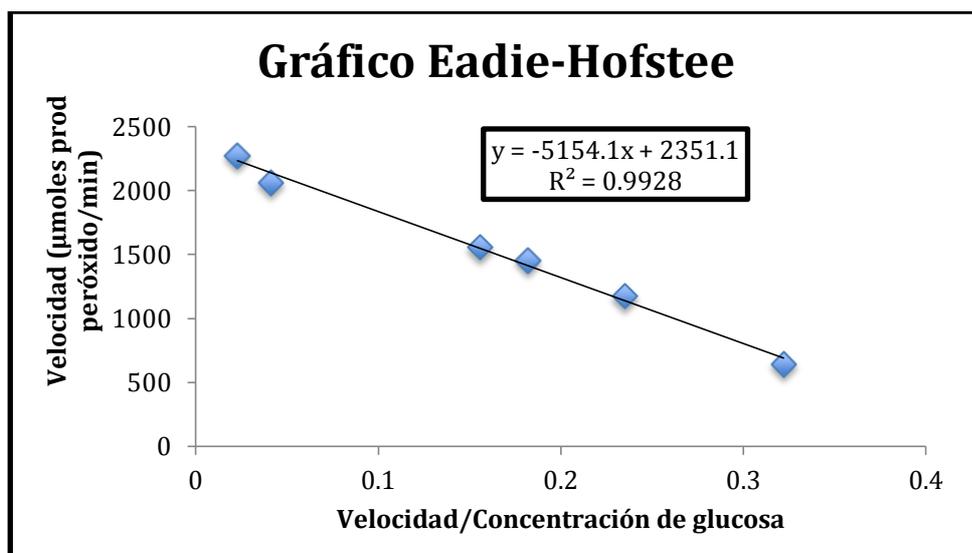


Figura 34. Gráfico Eadie-Hofstee. Donde $V_{m\acute{a}x}$ es igual a la ordenada al origen y k_m es igual a la pendiente de la gráfica multiplicada por -1.

Resultados y Discusión

Gráfico	Km (μM)	Km (mM)	V _{máx} (μM peróxido prod/min)
L-B	5623.25	5.62	2500
E-H	5154.1	5.15	2351.1

Tabla 8. Relación de valores para los parámetros cinéticos de la enzima GOx inmovilizada en NTC calculados por dos diferentes ecuaciones. L-B (Lineweaver-Burk). E-H (Eadie-Hofstee)

Los mismos procedimientos se llevaron a cabo para determinar los parámetros cinéticos de la enzima GOx inmovilizada en VPC. Los resultados se muestran en las tablas 9 y 10; y figuras 35, 36, 37, 38 y 39.

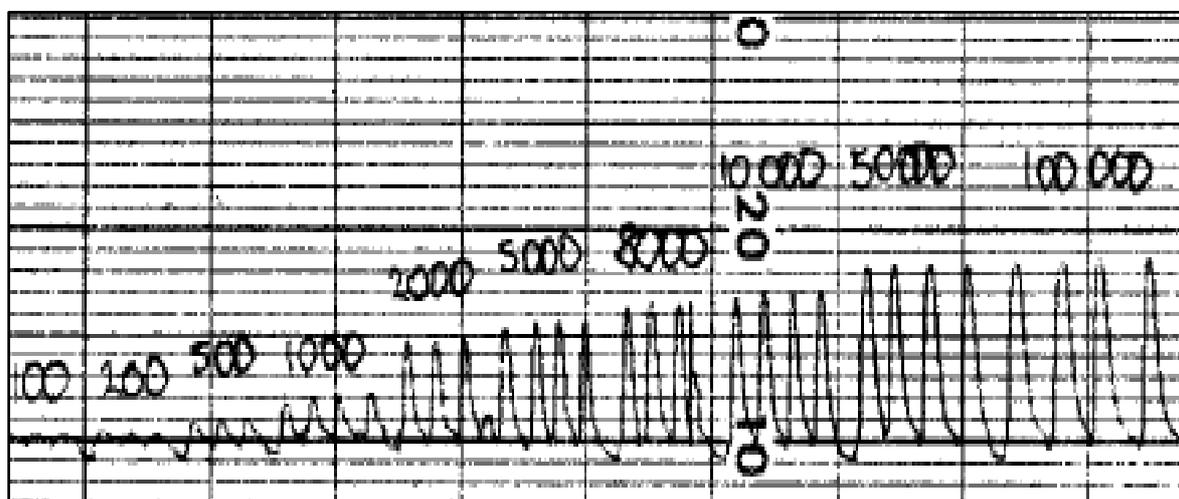


Figura 35. Siagrama de la evaluación de la reacción de la enzima inmovilizada en VPC por SIA a diferentes concentraciones de glucosa.

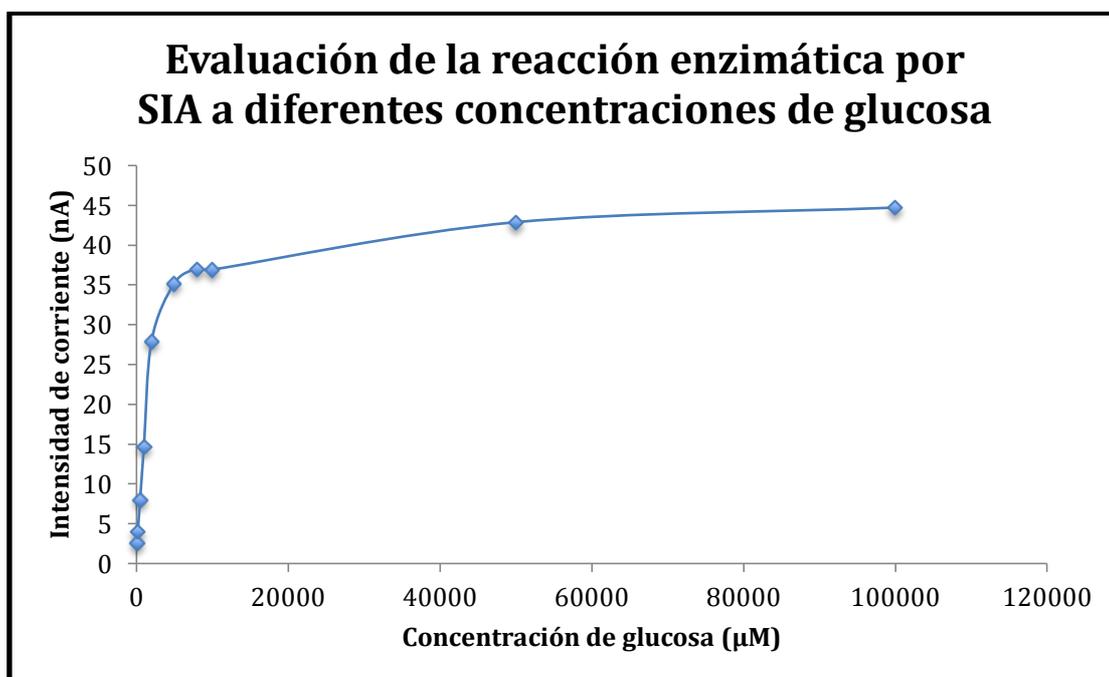


Figura 36. Curva obtenida para los estándares de glucosa, sustrato de la enzima GOx inmovilizada en VPC

[S] (µM)	I (nA)	Concentración de peróxido (µM)	µM de peróxido producidos/min	1/[S]	1/V	V/[S]
100	2.59	-	-	0.01	-	-
200	4.02	3.25	3.54	0.005	0.28227	0.017713
500	8	198.34	216.53	0.002	0.004618	0.433064
1000	14.66	524.69	572.81	0.001	0.001745	0.572807
2000	27.93	1175.3	1283.01	0.0005	0.0007793	0.641541
5000	35.21	1532.17	1672.67	0.0002	0.0005979	0.334534
8000	37.03	1621.55	1770.25	0.000125	0.0005649	0.221281
10000	36.94	1616.97	1765.25	0.0001	0.0005665	0.176525
50000	42.9	1909.01	2084.07	0.00002	0.0004798	0.041681
100000	44.73	1998.95	2182.27	0.00001	0.0004583	0.021823

Tabla 9. Datos obtenidos para determinar los parámetros cinéticos de la enzima GOx inmovilizada en VPC

Resultados y Discusión

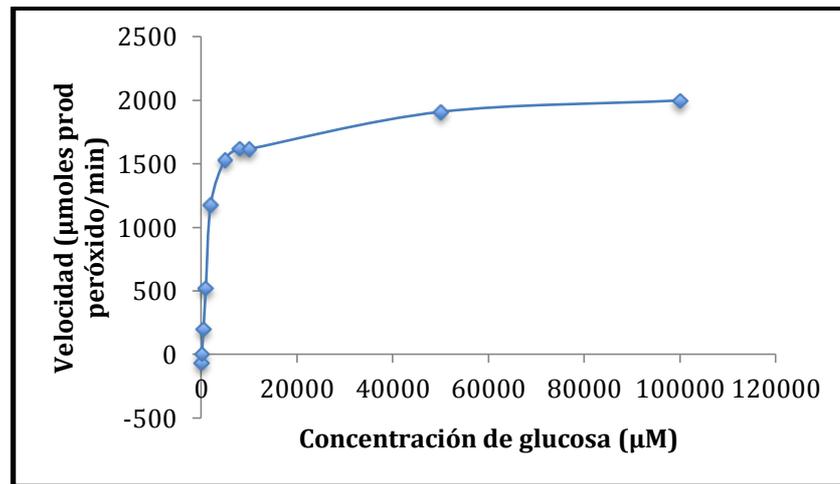


Figura 37. Curva de comportamiento cinético de la enzima GOx inmovilizada en VPC

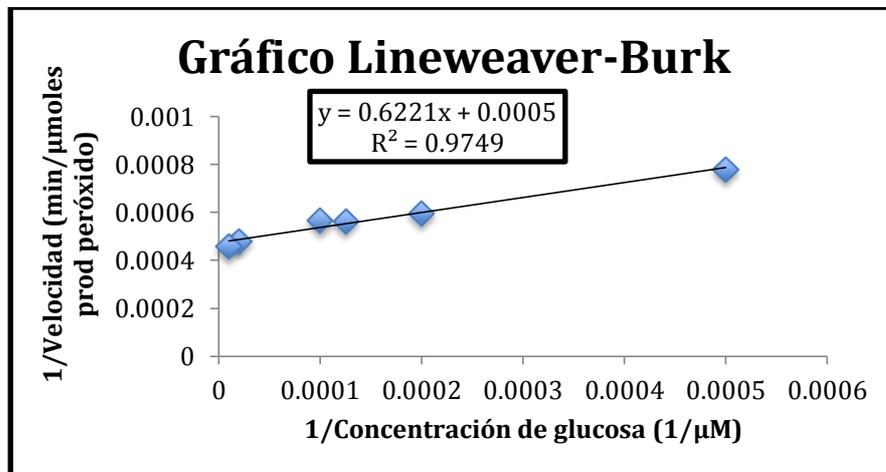


Figura 38. Gráfico Lineweaver-Burk. Donde $V_{m\acute{a}x}$ es igual al inverso de la ordenada al origen y k_m es igual al producto de $V_{m\acute{a}x}$ y la pendiente de la gráfica.

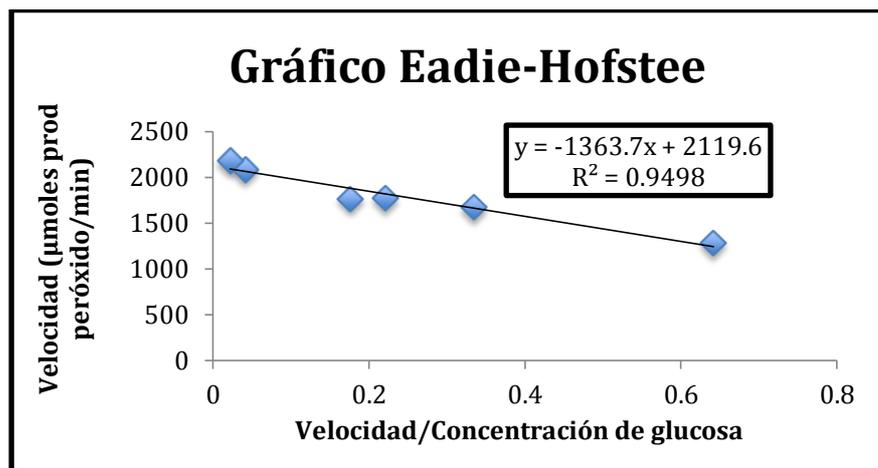


Figura 39. Gráfico Eadie-Hofstee. Donde $V_{m\acute{a}x}$ es igual a la ordenada al origen y k_m es igual a la pendiente de la gráfica multiplicada por -1.

Resultados y Discusión

Gráfico	Km (μM)	Km (mM)	V _m ^{máx} (μM peróxido prod/min)
L-B	1244.2	1.24	2000
E-H	1363.7	1.36	2119.6

Tabla 10. Relación de valores para los parámetros cinéticos de la enzima GOx inmovilizada en VPC calculados por dos diferentes ecuaciones. L-B (Lineweaver-Burk). E-H (Eadie-Hofstee)

De acuerdo a la literatura los valores de Km para la enzima GOx de *Aspergillus niger* sp. cambia en un rango de 1.59 a 130 mM para β -D-glucosa. (Yuksel, 2011)

Se sabe que la fuente de obtención de la enzima y el método usado son parámetros muy importantes que afectan las propiedades cinéticas de las enzimas. Es claro que no hay cambios significativos en la afinidad de las enzimas hacia los sustratos. Se puede afirmar que la inmovilización por enlace covalente a través de glutaraldehído como agente de enlace permite estabilizar enzimas en su forma nativa. Además, es muy importante proteger a las enzimas de cambios negativos cinéticos durante el proceso de inmovilización. Los resultados muestran que el procedimiento aplicado de inmovilización es compatible con la naturaleza de la enzima.

Como se observa en la figuras 40 y 42 los valores de intensidad de corriente son muy similares en la parte lineal de la evaluación de la reacción enzimática por SIA de la GOx inmovilizada en los dos soportes, sin embargo las respuestas analíticas de los estándares de glucosa de concentración mayores e igual a 5000 μM son muy distintos (figuras 40 y 41). A pesar de esas grandes diferencias, se observa que las velocidades en que son transformados los estándares de mayor concentración ($\geq 10000 \mu\text{M}$) son semejantes (figura 41).

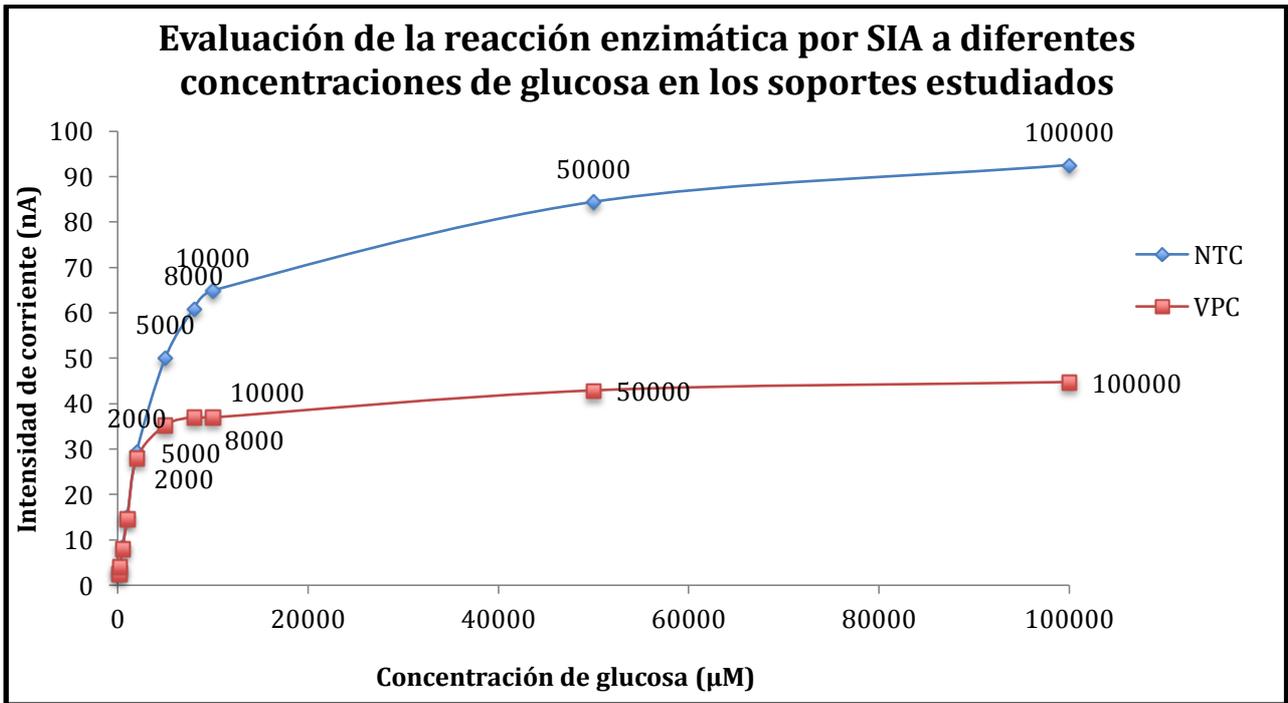


Figura 40. Comparación de los datos obtenidos de la evaluación de la reacción enzimática en los soportes evaluados

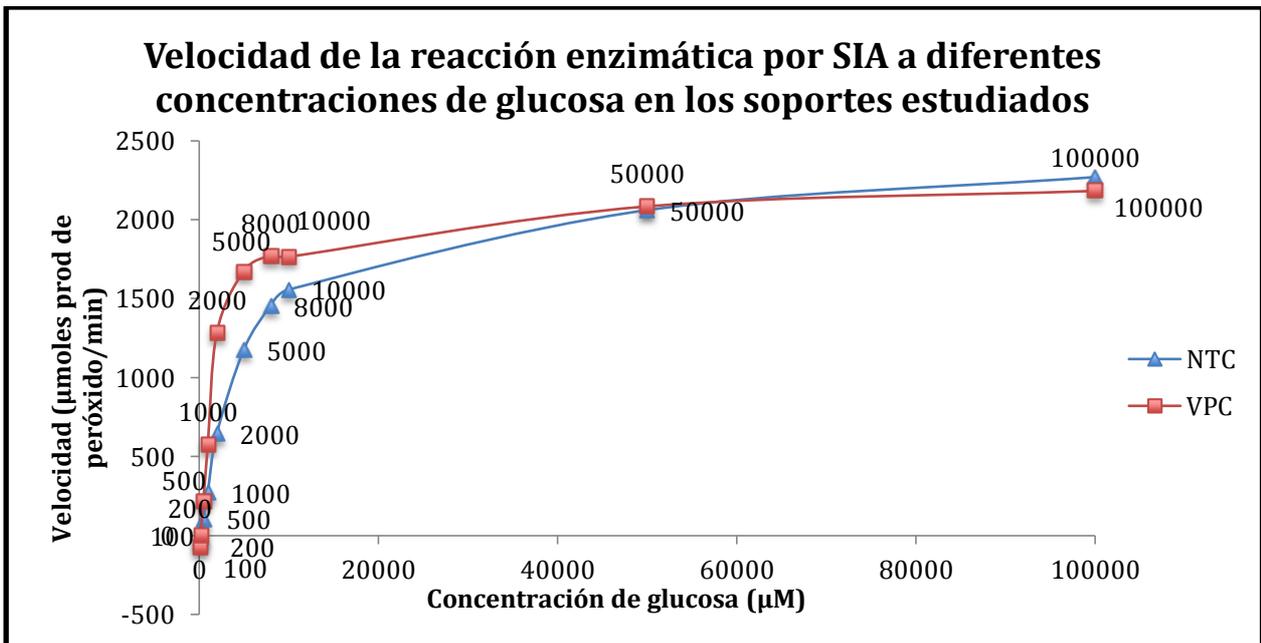


Figura 41. Comparación del comportamiento cinético de la enzima GOx inmovilizada en dos soportes diferentes.

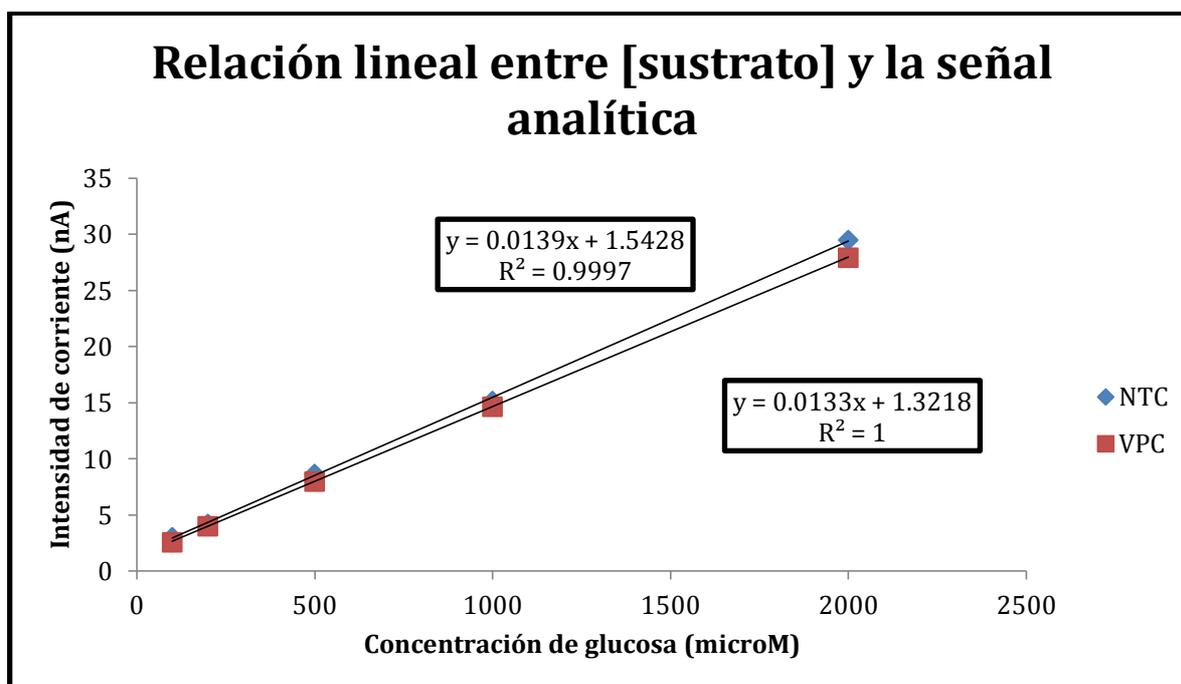


Figura 42. Relación lineal entre la concentración de sustrato y la respuesta analítica observada para la enzima GOx inmovilizada en NTC y VPC.

Soporte	NTC		VPC	
	Km (mM)	V _{máx} (μM prod peróxido/min)	Km (mM)	V _{máx} (μM prod peróxido/min)
L-B	5.62	2500	1.24	2000
E-H	5.15	2351.1	1.36	2119.6

Tabla 11. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima GOx calculados por las dos ecuaciones en los dos soportes. L-B (Lineweaver-Burk). E-H (Eadie-Hofstee)

Como se observa en la tabla 11 los valores de Km de la GOx inmovilizada en NTC y VPC son distintos. El cambio en la actividad enzimática puede resultar de alteraciones estructurales inducidas por la inmovilización. Las propiedades catalíticas de una enzima son crucialmente dependientes de la conformación tridimensional de la proteína y la alineación funcional precisa entre el sustrato y el sitio activo de la enzima. La unión de una enzima a una superficie, ya sea covalentemente o no, puede perturbar la configuración nativa de la proteína y por lo tanto influir en la actividad enzimática. Además, el microambiente de la matriz de soporte, que puede diferir significativamente

Resultados y Discusión

del medio ambiente al que está naturalmente la enzima, puede promover la formación de conformaciones de proteínas anormales. Estos efectos pueden ser las causas de la diferencia entre la afinidad que presenta la GOx inmovilizada en los soportes estudiados. (Douglas, 1994)

Las constantes cinéticas de la enzimas (K_m y Vel. máxima) pueden ser alteradas por todos los pasos que se llevaron a cabo para la inmovilización debido a cambios dentro de su estructura y acceso restringido al sitio activo. El valor aparente de los parámetros cinéticos, cuando son determinados experimentalmente, pueden ser diferentes de sus valores intrínsecos. Esto puede deberse a cambios en las propiedades de la solución en la vecindad inmediata de la enzima inmovilizada o a los efectos de difusión molecular dentro del ambiente local.

Efecto de la partición de solutos

La solución que se encuentra a unos cuantos diámetros moleculares de la superficie de una enzima inmovilizada será influida por cargas e hidrofobicidad que presente ésta. Las cargas siempre están presentes sobre la superficie de partículas de enzimas inmovilizadas debido a la naturaleza anfotérica de las enzimas. Donde esas cargas positivas y negativas no están igualmente equilibradas, la carga neta sobre la superficie ejerce un efecto considerable sobre las propiedades del microambiente. Esta carga de la superficie, fácilmente producida por el uso de matrices cargadas para la inmovilización, repela moléculas de carga similar mientras que atrae aquéllas que poseen carga opuesta. La fuerza de atracción o repulsión debido a esta carga es significativa en distancias moleculares pero decae rápidamente con el cuadrado de la distancia desde la superficie. Una partición o división de moléculas cargadas ocurre entre la mayoría de la solución y el microambiente; moléculas de carga positiva a la de la superficie de la enzima inmovilizada son divididas dentro del microambiente, mientras que las moléculas que poseen carga similar a la de la superficie de la enzima inmovilizada son repelidas, con efecto igual, dentro de la mayor parte de la solución.

Además de sus efectos sobre la partición de soluto, el gradiente electrostático localizado puede afectar tanto a la K_m y $V_{máx}$ por alentar o desalentar el enfoque intramolecular de grupos cargados dentro de la enzima, o el complejo enzima-sustrato, durante la unión y la catálisis.

La razón por la que la K_m de la GOx inmovilizada en NTC sea mayor que la de GOx inmovilizada en VPC puede deberse a que el polímero sintetizado de PANI presenta

Resultados y Discusión

un desbalance de cargas (por los electrones deslocalizados entre todos los enlaces del polímero) que causa una perturbación en la estructura de la enzima, lo que no ocurre en el VPC ya que el silanizante no presenta esta propiedad de tener regiones con diferente densidad de carga evitando tener alguna interacción principalmente de tipo electrostática con la enzima, lo que conlleva a que ésta presente una mejor conformación y por lo tanto que sea más afín a su sustrato.

Los sustratos se aproximan a la superficie de las partículas de enzima a través de la delgada capa estancada que rodea sin agitar la solución y luego se difunden en los poros donde pueden encontrarse con enzimas activas. Este también es uno de los factores que influyen para que existan diferencias en los parámetros cinéticos de GOx en los diferentes soportes, ya que los NTC presentan una mayor porosidad que VPC

El movimiento neto de los solutos se describe en términos de los siguientes pasos: difusión externa, donde el transporte de sustratos hacia la superficie, y los productos fuera de él, está en serie con la conversión catalítica de sustratos a productos ocurriendo en la superficie; y difusión interna, donde el transporte de los sustratos y productos, dentro de los poros de las partículas de enzima inmovilizada, está en paralelo con la reacción catalizada (los procesos son simultáneos). Además, por tener un menor tamaño los NTC que el VPC, cuando el sustrato entra en contacto con ellos, se crea un flujo turbulento más grande porque existe mayor área superficial provocando que haya mayor número de choques enzima-sustrato favoreciendo mayor producción de peróxido, resultando en valores de intensidad de corriente mayores.

3.10. Repetibilidad y Reproducibilidad

Para conocer la precisión del método se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. Esta evaluación requiere contar con un estándar certificado o bien realizar el análisis repetido de una muestra, por el mismo analista con el mismo instrumento en un lapso corto de tiempo. En este caso se hizo el análisis por 5 días consecutivos de dos estándares de glucosa que no sean puntos de la curva de calibración, uno de mayor concentración que el otro (400 y 150 μM). El estudio se realizó para cada uno de los soportes evaluados. Los resultados se muestran en la tabla 12

Resultados y Discusión

✓ Enzima inmovilizada en NTC

a) Estándar de 150 μ M

Día	Réplica 1	Réplica 2
1	176.44	190.33
2	185.65	166.42
3	161.71	175.22
4	196.68	175.95
5	212.35	215.1

Tabla 12. Resultados para la prueba de repetibilidad y reproducibilidad para la enzima GOx inmovilizada en NTC del estándar 150 μ M de glucosa.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA). En la tabla 13 se indican la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL) y los cuadrados medios (CM) de entre días como dentro de los días que serán de utilidad para el cálculo de repetibilidad y reproducibilidad.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	2363.0588	4	590.7647
Dentro de los grupos	591.27025	5	118.25405
Total	2954.32905	9	

Tabla 13. Análisis de varianza del estándar 150 μ M de glucosa para GOx inmovilizada en NTC

La variación entre días (repetibilidad, S_R^2) se determinó tomando en cuenta que S^2 es igual a la media de cuadrados dentro de días (Miller et al., 2002), ya que $S_R = \sqrt{CM_{dentro\ de\ días}}$

Por lo tanto:

$$S_R^2 = 118.25$$

Para calcular la reproducibilidad dentro del laboratorio (S_{WR}^2), se determinó de acuerdo a las siguientes ecuaciones, donde n_j es el número de réplicas por día.

$$S^2 = (CM_{entre\ días} - CM_{dentro\ de\ días} / n_j)$$

$$S_{WR}^2 = S_R^2 + S_{entre\ días}^2$$

Resultados y Discusión

$$S^2 = 590.76 - 118.25/2 = 236.26$$

$$S^2_{WR} = 118.25 + 236.26 = 354.51$$

$$\text{Repetibilidad} = \left(\sqrt{118.25} / 185.59 \right) 100 = 5.86 \%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\sqrt{354.51} / 185.59 \right) 100 = 10.15 \%$$

b) Estándar de 400 μM

Día	Réplica 1	Réplica 2
1	471.58	478.53
2	451.04	428.6
3	425.22	434
4	432.41	425.7
5	429.52	443.34

Tabla 14. Resultados para la prueba de repetibilidad y reproducibilidad para la enzima GOx inmovilizada en NTC del estándar 400 μM de glucosa.

Se realizó el mismo procedimiento para el cálculo de repetibilidad y reproducibilidad que el caso anterior.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	2898.99054	4	724.747635
Dentro de los grupos	432.4805	5	86.4961
Total	3331.47104	9	

Tabla 15. Análisis de varianza del estándar 400 μM de glucosa para GOx inmovilizada en NTC

$$S_R^2 = 86.49$$

$$S^2 = (724.748 - 86.49) / 2 = 319.13$$

$$S^2_{WR} = 86.49 + 319.13 = 405.62$$

Resultados y Discusión

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{\sqrt{86.49}}{441.99} \right) 100 = 2.1 \%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{\sqrt{405.62}}{441.99} \right) 100 = 4.56 \%$$

✓ Enzima inmovilizada en VPC

a) Estándar de 150 μM

Día	Réplica 1	Réplica 2
1	173.01	170.53
2	229.88	206.16
3	190.6	186.81
4	162.23	160
5	180.53	165.33

Tabla 16. Resultados para la prueba de repetibilidad y reproducibilidad para la enzima GOx inmovilizada en VPC del estándar 150 μM de glucosa.

Se realizó el mismo procedimiento para el cálculo de repetibilidad y reproducibilidad que en los casos anteriores.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	3928.41626	4	982.104065
Dentro de los grupos	409.5829	5	81.91658
Total	4337.99916	9	

Tabla 17. Análisis de varianza del estándar 150 μM de glucosa para GOx inmovilizada en VPC

$$S_R^2 = 81.92$$

$$S^2 = (982.1 - 81.92) / 2 = 450.1$$

$$S_{WR}^2 = 81.92 + 450.1 = 532.02$$

Resultados y Discusión

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{\sqrt{81.92}}{182.51} \right) 100 = 4.96 \%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{\sqrt{532.02}}{182.51} \right) 100 = 12.64 \%$$

b) Estándar de 400 μM

Día	Réplica 1	Réplica 2
1	477.36	477.36
2	471.54	490.78
3	489.84	486.05
4	412.23	418.93
5	414.18	406.34

Tabla 18. Resultados para la prueba de repetibilidad y reproducibilidad para la enzima GOx inmovilizada en VPC del estándar 400 μM de glucosa.

Se realizó el mismo procedimiento para el cálculo de repetibilidad y reproducibilidad que en los casos anteriores

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	11647.67924	4	2911.91981
Dentro de los grupos	245.44865	5	49.08973
Total	11893.12789	9	

Tabla 19. Análisis de varianza del estándar 400 μM de glucosa para GOx inmovilizada en VPC

$$S_R^2 = 49.01$$

$$S^2 = (2911.92 - 49.01) / 2 = 1431.46$$

$$S_{WR}^2 = 49.01 + 1431.46 = 1480.47$$

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{\sqrt{49.01}}{454.46} \right) 100 = 1.54 \%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{\sqrt{1480.47}}{454.46} \right) 100 = 8.47 \%$$

Resultados y Discusión

En la tabla 20 se resumen todos los datos de repetibilidad y reproducibilidad para todos los casos.

Datos	Estándar de Glucosa (μM)	GOx inmovilizada	
		NTC	VPC
Repetibilidad	150	5.86	4.96
	400	2.1	1.54
Reproducibilidad	150	10.15	12.64
	400	4.56	8.47

Tabla 20. Repetibilidad y reproducibilidad de estándares de glucosa 150 μM y 400 μM para GOx inmovilizada en NTC y VPC. Los datos están expresados como desviación estándar relativa (%)

Se compararon las desviaciones estándar de repetibilidad y reproducibilidad de la enzima inmovilizada en ambos soportes, es decir, los errores aleatorios de los conjuntos de datos. Por ello se utiliza el contraste F que considera la razón de dos varianzas muestrales, es decir, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar. Se realizó el cálculo para cada experimento (repetibilidad y reproducibilidad) de los soportes estudiados.

Se tomaron en cuenta las siguientes hipótesis para saber si existe diferencia significativa entre las varianzas de los métodos empleados.

Hipótesis nula

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

Hipótesis alternativa

$$H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Para la repetibilidad del estándar de glucosa 150 μM se tiene lo siguiente:

Calculando F de forma que sea mayor que 1, se tiene:

$$F = \frac{5.86^2}{4.96^2} = 1.4$$

Resultados y Discusión

Es adecuado usar un contraste de dos colas porque no hay, de antemano, ninguna razón para esperar que la varianza de un método deba ser mayor que la del otro. De los valores de tablas se obtiene que $F_{4,4} = 9.605$

El valor calculado es menor que el de tablas, por tanto no hay diferencia significativa entre las dos varianzas a un nivel del 5%.

Se realizó el mismo procedimiento matemático para cada par de datos, obteniendo la siguiente tabla 21.

Datos	Estándar de glucosa (μM)	GOx inmovilizada		F_{Tablas}	$F_{\text{Calculado}}$	Hipótesis aceptada
		NTC	VPC			
Repetibilidad	150	5.86	4.96	9.605	1.4	H_0
	400	2.1	1.54	9.605	1.85	H_0
Reproducibilidad	150	10.15	12.64	9.605	1.55	H_0
	400	4.56	8.47	9.605	3.45	H_0

Tabla 21. Contraste F de desviaciones estándar de la enzima GOx inmovilizada en ambos soportes a un nivel del 5%.

Se observa que los valores de repetibilidad son menores que los de reproducibilidad para todos los casos, esto quiere decir que existe una mayor variabilidad en la respuesta entre días que el mismo día de la determinación. Además, tanto los valores de repetibilidad y reproducibilidad del estándar de 400 μM son menores que los del estándar de 150 para todos los casos, es decir que existe mayor precisión a valores centrales que a valores extremos en la curva de calibración. Comparando los resultados de la enzima inmovilizada en ambos soportes, y con ayuda del contraste F, se observa que no existe diferencia significativa entre ellos de repetibilidad y reproducibilidad al aceptarse en todos los casos la hipótesis nula (H_0)

CONCLUSIONES

Se inmovilizó a la enzima GOx en nanotubos de carbono.

Se desarrolló la optimización de un sistema de inyección secuencial para la cuantificación de glucosa acoplado a un reactor enzimático.

Se evaluó la actividad enzimática de GOx inmovilizada en NTC por SIA, además de la determinación de los parámetros cinéticos k_m y $V_{máx}$.

La inmovilización multienlace de enzimas multiméricas puede evitar la disociación de las subunidades por enlace de entrecruzamiento intersubunitario que también reduce cambios no deseados de conformación.

La técnica de glutaraldehído es muy versátil y eficaz para lograr enlaces multienlace.

Para lograr máxima estabilización de las enzimas, las superficies de la enzima y el soporte deben ser complementarios, con la formación de muchos enlaces covalentes o no covalentes

La inmovilización de GOx en NTC se comparó con una técnica empleada previamente por el equipo de trabajo (VPC). Se encontraron diferencias en los parámetros cinéticos calculados de la enzima inmovilizada en los dos soportes. Estos cambios pueden deberse a alteraciones conformacionales en la enzima, resultante del procedimiento de inmovilización, o a la presencia y naturaleza del soporte de inmovilización. Concluyendo que la estructura de la enzima inmovilizada sobre el vidrio es más afín a su sustrato (glucosa) que la que adopta inmovilizada en NTC.

A pesar de que la enzima GOx es más afín a su sustrato inmovilizada en VPC que en NTC, ello se puede considerar como una desventaja, ya que depende desde el punto de vista que se tenga porque en ese caso la enzima se satura con menos cantidad de glucosa lo que, en el caso de NTC no ocurre, teniendo la capacidad de aceptar más cantidad de sustrato que, desde el punto de vista analítico es benéfico porque de esta manera se puede tener un mayor rango para la cuantificación del analito de interés.

El método muestra buenos resultados de precisión ya que los valores de repetibilidad y reproducibilidad son menores al 13 % de error.

No existe diferencia significativa entre los valores de repetibilidad y reproducibilidad para ambos métodos, es decir, no existe diferencia de precisión entre ellos.

PERSPECTIVAS

- ✓ Inmovilizar a la enzima GOx sobre la superficie del electrodo de trabajo con ayuda de los NTC para monitorear la reacción in-situ y aumentar la sensibilidad del método.
- ✓ Poder cuantificar glucosa en muestras reales, sobre todo diagnósticos de interés clínico como sangre y orina.

BIBLIOGRAFÍA

Angeles-Cañas, A. N. Desarrollo de un sistema sensor para determinar D-glucosa en jugos de fruta. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2003.

Azevedo, A.M., Prazeres, F., Cabral, J.M.S., Fonseca, L.P., 2005. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2), 235–247.

Cano-Luna, M. Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras. Tesis de doctorado. Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. Universidad de Córdoba. España, 2008.

Chaplin, M. *Enzyme Technology*. Cambridge, Gran Bretaña, 1990, pp. 82-136

Chen, B., Pernodet, N., Rafailovich, M.H., Bakhtina, A., Gross, R.A., 2008. Protein immobilization on epoxy-activated thin polymer films: effect of surface wettability and enzyme loading. *Langmuir*. 24, 13457-13464.

Choi, H.J., Jeon, I.Y., Kang, S.W., Baek, J.B., 2011. Electrochemical activity of a polyaniline/polyaniline-grafted multiwalled carbon nanotube mixture produced by a simple suspension polymerization. *Electrochimica Acta*. 56, 10023-10031.

Christian, G.D., 1994. Sequential injection analysis for electrochemical measurements and process analysis. *Analyst*. 19, 2309-2314

Dhand, C., Das, M., Datta, M., Malhotra, B.D., 2011. Recent advances in polyaniline based biosensor-review. *Biosensor and Bioelectronics*. 26, 2811-2821

Douglas, S.C., 1994. Can immobilization be exploited to modify enzyme activity?. *Trends in Biotechnology*. 12 (11), 439-443

Dresselhaus, M. y Endo, M. 2001. Relation of carbon nanotubes to other carbon materials. *Topics in Applied Physics*. 80, 11-28

Bibliografía

Feng, W., Bai, X.D., Lian, Y.Q., Liang, J., Wang, X.G., Yoshino, K., 2003b. Well-aligned polyaniline/carbon-nanotube composite films grown by in-situ aniline polymerization. *Carbon*. 41, 1551–1557

García, G. *Biología Alimentaria*. Limusa. Mexico, 1993, pp. 103-123

Jeon, I.Y., Kang, S.W., Tan, L.S., Baek, J.B., 2010. Grafting of polyaniline onto the surface of 4-aminobenzoyl-functionalized multiwalled carbon nanotube and its electrochemical properties. *Journal of polymer science part a: polymer chemistry*. 48, 3103-3112

Joshi, P., Merchant, S.A., Wang, Y., Schmidtke, D.W., 2005. Amperometric biosensors based on redox polymer-carbon nanotube-enzyme composite. *Analytical Chemistry*. 77, 3183-3188

Lee, B. *Fundamentos de biología de los alimentos*. Acribia, España, 2000, pp. 41-43

Lenahan, C.E., Barnett, N.W., Lewis, S.W., 2002. Sequential injection analysis. *Analyst*. 127, 997-1020

López, A. *Tecnología Enzimática*. UNAM, México, 1987, pp. 34-90

Miller, N., James y Miller, J.C. *Estadística y quimiometría para Química Analítica*. 4ª edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, 2002, pp. 21-30, 50-64

Mosbach, K., 1980. Immobilized enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*. 5 (1), 1-3

Noked, M., Soffer, A., Aurbach, D., 2011. The electrochemistry of activated carbonaceous materials: past, present and future – a review. *Journal of solid state electrochemistry*, 15, 1563-1578

Pandey, A. *Enzyme Technology*. Springer, Estados Unidos de América. 2000, pp. 345-410

Bibliografía

Rivas, G., Rubianes, M., Rodríguez, M., Ferreyra, N., Luque, G., Pedano, M., Miscoria, S., Parrado, C., 2007. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing –a review. *Talanta*. 74, 291-307

Ramírez Cordero, B.E. Desarrollo de metodologías de análisis por inyección secuencial para la determinación de fosfatos, arsenatos y arsenitos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2007.

Saleemuddin, M., Husain, Q., 1991. Concanavalin A: a useful ligand for glycoenzyme immobilization – a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 13, 290-295

Sreeja, V., Sasikumar, R., Alagarsamy, M., Manisankar, P., 2011. Multiwall carbon nanotube modified electrochemical sensor for reactive black 5. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2, 814-819

Stryer, L. Bioquímica. Tomo 1, Reverté, 3^o edición, España, 1990, pp. 185-210

Xian, Y., Hu, Y., Liu, F., Xian, Y., Wang, H., Jin, L., 2006. Glucose biosensor based on Au nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*. 21, 1996-2000

Yildiz, H.B., Toppare, L., 2006. Biosensing approach for alcohol determination using immobilized alcohol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*. 21, 2306-2310.

Yuksel, M., Akin, M., Geyik, C., Demirkol, D. O., Ozdemir, C., 2011. Offline glucose biomonitoring in yeast culture by Polyamidoamine/Cysteamine – modified gold electrodes. *American Institute of Chemical Engineers*. 530-538

Zhong, H., Yuan, R., Chai, Y., Li, W., Zhong, X., Zhang, Y., 2011. In situ chemosynthesized multi-wall carbon nanotube-conductive polyaniline nanocomposites: Characterization and application for a glucose amperometric biosensor. *Talanta*. 85 (1), 104-111

Bibliografia

Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J., Zhao, Xinqiang., Ma, L., Zhou, Q., 2012. Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide. *Biochemical Engineering Journal*. 69, 28-31