



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A

U. N. A. M.

DISEÑO, CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION
DE UN ELECTRODO - ENZIMATICO SENSIBLE A GLUCOSA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUAN LEODEGARIO GARCIA ROJAS



LOS REYES IZTACALA

MEXICO 1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A la vida por ser.....
la más extraña, insignificante
y temporal enfermedad
de la materia.

A MIS PADRES:

JOSE L. GARCIA LUCIO

JUANA ROJAS

A quienes les debo
lo que antes fui
lo que ahora soy
y lo que algun dia sere..

CON CARINO A MIS HERMANOS

JUANA LILIA

JOSE ALONSO

MARTHA

EVA

SILVIA

CECILIA

Deseando que este humilde
paso sea un aliciente para
su desarrollo profesional.

EL MAS SINCERO AGRADECIMIENTO AL
M. en IBB. Enrique Galindo Fontanes
Por su valiosa asesoria y ayuda
para la realizaci3n de este trabajo.

Para todas aquellas personas que
de una u otra forma contribuyeron
en la realizaci3n de este trabajo.

INDICE GENERAL

Capítulo		Pag.
	Indice de figuras.....	iv
	Indice de tablas.....	viii
	 Presentación.....	 i
	Resumen.....	2
1	Introducción.....	5
2	Antecedentes.....	10
	2.1.- Electrodo s biológico s	10
	2.2.- Senso r es electroquímico s	12
	2.3.- Electrodo s enzimático s	18
	2.3.1.- Generalidade s	18
	2.3.2.- Ventaja s	21
	2.3.3.- Construcción.....	23
	2.3.4.- Técnica s de inmovilizaci o n.....	26
	2.3.5.- Selecci o n de soporte s	28
	2.3.6.- Nylon.....	29
	2.4 .- Medici o n de glucosa.....	30
	2.4.1.- M é todos convenciona l es.....	36
	2.4.2.- M é todos colorimétrico s	37
	2.4.3.- M é todos enzimático s	39
	2.5 .- M é todos con dispositivo s electroquímico s	40
	2.5.1.- Senso r es basados en cambio s de pH.....	40
	2.5.2.- Senso r es basados en la detecci o n de H ₂ O ₂	41
	2.5.3.- Senso r es basados en el electrodo de oxígeno.....	45
	2.5.4.- Senso r es directo s	48

3	Objetivos.....	50
4	Material es y métodos.....	51
	4.1.- Materiales.....	51
	4.1.1.- Reactivos.....	51
	4.1.2.- Equipos.....	51
	4.1.3.- Enzimas.....	53
	4.1.4.- Soportes.....	53
	4.2.- Métodos.....	53
	4.2.1.- Técnicas analíticas.....	53
	4.2.1.1.- Cuantificación de proteína.....	54
	4.2.1.2.- Medición de glucosa.....	55
	4.2.2.- Procedimientos experimentales.....	56
	4.2.2.1.- Inmovilización.....	56
	4.2.2.2.- Operación del sistema del electrodo enzimático.....	62
	4.2.2.3.- Curvas de respuesta a glucosa.....	65
5	Resultados y discusión.....	67
	5.1.- Experimentos preliminares de activación del soporte.....	67
	5.2.- Hidrólisis parcial del nylon.....	71
	5.3.- Inmovilización de glucosa oxidasa.....	74
	5.4.- Actividad de la enzima inmovilizada.....	83
	5.5.- Membrana de diálisis y rango lineal.....	90
	5.6.- Curvas de respuesta y curvas de calibración.....	94
	5.7.- Tiempos de recuperación.....	103
	5.8.- Selación de la membrana.....	111
	5.9.- Co-inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con catalasa.....	115

	5.10.- Comparación del método del electrodo enzimático con un método convencional.....	118
	5.11.- Estabilidad operacional.....	118
6	Conclusiones.....	123
7	Recomendaciones.....	125
	Anexo 1	
	Preparación de amortiguadores y soluciones.....	127
	Bibliografía.....	131

Indice de figuras

Fig. No	Pág.
1.1.- Cuadro esquemático de la estrategia para la realización de este trabajo.....	5
2.1.- Diseño básico de un electrodo biológico.....	11
2.2 a.- Diseño usado por Clark y Lyons (1962).....	20
2.2 b.- Diseño usado por Urdike y Hicks (1967).....	20
2.4.- Formas básicas de construcción de electrodos enzimáticos.....	25
2.5.- Resumen de las principales formas de Inmovilización.....	27
2.6.- Molécula principal utilizada en la preparación del nylon.....	30
2.7.- Enlace covalente de enzimas al nylon.....	34
3.1.- Curva típica de proteína.....	56
4.2.- Dispositivo usado para el enfrentamiento enzima/soporte.....	60
4.3.- Sistema de medición del electrodo enzimático.....	63
4.4.- Sistema de montaje de las membranas de diálisis y de la malla de nylon al sensor de oxígeno disuelto para la construcción del electrodo enzimático.....	64

4.5.- Curvas de respuesta y curvas de calibración considerando la pendiente entre dos puntos después de un minuto de reacción (A) y el valor del equilibrio cuando la corriente de salida es constante (4 minutos).....	66
5.1.- Estrategia inicial seguida en la búsqueda de una técnica adecuada de inmovilización en mallas de nylon.....	69
5.2.- Inmovilización de albúmina en mallas nylon A y B con diferentes tratamientos.....	70
5.3.- Diseño seguido en la búsqueda de la concentración y tiempo óptimos del lavado previo de las mallas de nylon A y B.....	72
5.4.- Resultados observados de los distintos lavados de las mallas de nylon A.....	73
5.5.- Resultados observados en la optimización del tiempo de lavado de las mallas.....	75
5.6.- Proceso inicial probado para la inmovilización empleando etilendiamina e inmovilizando albúmina.....	76
5.7.- Proceso usado como el más adecuado para la inmovilización.....	79
5.8.- Comparación de la inmovilización de glucosa oxidasa en nylon A y nylon 150.....	82
5.9.- Esquemmatización del complejo nylon+GTA+PEI+GTA.....	84
5.10.- Curvas de respuesta del electrodo enzimático.....	86
5.11.- Curva de calibración para la medición de glucosa mediante el electrodo enzimático.....	87

5.12.- Principio funcional por el cual se probaron distintas membranas de diálisis en el electrodo enzimático.....	88
5.13.- Curvas de calibración para la medición de glucosa en función de la temperatura.....	91
5.14 a .- Niveles basales de oxígeno en el electrodo enzimático en función de la membrana usada como resistencia difusional.....	93
5.14 b .- Niveles basales de oxígeno en el sistema sin malla de nylon enzimática.....	95
5.14 c .- Relación entre el espesor de la membrana usada como resistencia difusional y la corriente basal disponible para la reacción.....	96
5.15.- Curvas de respuesta del electrodo enzimático empleando TDB.....	98
5.16.- Curvas de calibración para la medición de glucosa mediante el electrodo enzimático usando TDB.....	99
5.17.- Curvas de respuesta del electrodo enzimático empleando membranas de diálisis MD18.....	100
5.18.- Curvas de calibración para la medición de glucosa mediante el electrodo enzimático para MD18.....	101
5.19.- Curvas de respuesta del electrodo enzimático empleando membranas de diálisis MD89.....	102
5.20.- Curvas de calibración para la medición de glucosa, mediante el electrodo enzimático para MD89.....	103

5.21.-	Curvas de respuesta del electrodo enzimático empleando membranas de diálisis MD88.....	104
5.22 a .-	Curvas de calibración para la medición de glucosa, mediante el electrodo enzimático para MD88.....	105
5.22 b .-	Curvas de calibración para la medición de glucosa, mediante el electrodo enzimático en función de la barrera difusional usada.....	106
5.23.-	Curvas de recuperación de corriente basal en función de la barrera difusional usada.....	109
5.24.-	Curvas de respuesta observadas usando glucosa oxidasa (a) y glucosa oxidasa catalasa (b).....	115
5.25.-	Curvas de calibración del sistema glucosa oxidasa y glucosa oxidasa-catalasa.....	116
5.26.-	Correlación obtenida del enfrentamiento del método de enzima soluble (Sigma 510-A) con el electrodo enzimático desarrollado en este trabajo; a 37° C.....	119
5.27.-	Estabilidad operacional observada durante 15 días de operación del electrodo enzimático.....	121
Fóto 1 .-	Soportes usados para la inmovilización.....	78

Indice de tablas.

Tabla No.	Pag.
2.1.- Algunos compuestos que han sido reportados como posibles de ser determinados mediante electrodos biológicos.....	13
2.2.- Algunos transductores recientemente usados en la construcción de electrodos biológicos.....	16
2.3.- Ejemplos de electrodos enzimáticos potenciométricos y amperométricos.....	17
2.4.- Compuestos que han sido reportados como posibles de ser determinados usando electrodos enzimáticos.....	22
2.5.- Principales ventajas del uso del nylon como soporte para la inmovilización de enzimas.....	32
2.6.- Características de los instrumentos comerciales para medición de glucosa.....	49
5.1.- Inmovilización en nylon A y 150.....	80
5.2.- Tabla resumen en la que se consignan las principales características de cada una de las membranas probadas como resistencia difusional.....	111
5.3.- Resultados de la coinmovilización glucosa oxidasa-catalasa.....	111

Presentación.

El trabajo experimental realizado en la presente tesis fue llevado a cabo en el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología (CEINGEBI) y en el Centro de Instrumentos (CI), ambos de la UNAN.

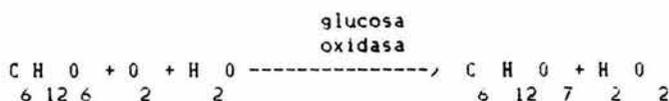
Forma parte de un proyecto global de colaboración CEINGEBI-CI denominado "Desarrollo de un prototipo de medidor electroenzimático para la cuantificación rápida y sencilla de compuestos de interés industrial y clínico". El cual es Patrocinado por el CONACYT mediante el donativo PVQ/QF/NAL/85/2744.

La responsabilidad académica estuvo a cargo del M.en C. Enrique Galindo, investigador del Departamento de Biotecnología del CEINGEBI. Participaron también como asesores los M.en C. Manuel Álvarez y Jaime Pimentel miembros del personal académico del CI.

Resumen.

Este trabajo presenta el desarrollo de un sensor electroenzimático para la determinación de glucosa empleando la enzima glucosa-oxidasa (E.C. 1.1.3.4.) de Aspergillus niger.

Esta enzima lleva a cabo la reacción que convierte a la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. En la reacción, la enzima consume oxígeno:



Con la enzima inmovilizada covalentemente en una diminuta malla de nylon y un electrodo galvánico de O₂, se diseñó un sistema de medición de glucosa (electrodo enzimático). Este sistema fue caracterizado en términos de sus principales parámetros de funcionamiento para su probable uso en casos específicos. Se realizaron experimentos de optimización para la activación del soporte usado en la inmovilización de la enzima. El soporte consistió en mallas de nylon, para el cual se logró desarrollar un proceso de activación acorde a sus características físicas y químicas.

En las pruebas de uso del sistema se requirió, además de la malla de nylon con la enzima inmovilizada, de una membrana de acetato de celulosa con el fin de incrementar el rango lineal. Para el caso fueron probadas diferentes membranas de acetato de celulosa y la más conveniente resultó ser la de tubos de diálisis benzollados. Lográndose ampliar el rango lineal de 0-50 mg/l a uno de 0-300 mg/l. La temperatura de operación a la que se logra la mejor respuesta del

sistema fué de 37°C. En los aspectos de la selección de la membrana y de la temperatura de operación, se observó que el rango lineal es inversamente proporcional a la sensibilidad del electrodo enzimático. Finalmente se logró un compromiso entre ambos parámetros.

Las curvas estandar alcanzaron una correlación lineal de hasta 0.9998, usando mallas de nylon en las que se logró inmovilizar, con el proceso descrito en el trabajo, un promedio de 350 mg de proteína por gramo de nylon. Estos valores son sensiblemente más altos en comparación con aquellos reportados cuando se inmoviliza la enzima en otras formas de nylon (especialmente tubos). Se debe mencionar que la presentación física del nylon en malla permite la medición directa con el sistema electrodo-malla-membrana.

Con el fin de aumentar el rango lineal del electrodo enzimático se realizaron experimentos co-inmovilizando glucosa oxidasa y catalasa, tratando de mantener un nivel alto de oxígeno disuelto disponible en el sistema, ya que este último es uno de los sustratos de la glucosa oxidasa. Sin embargo, aun cuando se logra aumentar la cantidad de enzima inmovilizada y el rango lineal, se observaron disminuciones considerables en la sensibilidad.

Del análisis comparativo con un método convencional para la medición de muestras de glucosa, se encontró que el uso del electrodo enzimático es tan apropiado como el método convencional.

Finalmente se determinó que la estabilidad del electrodo enzimático se conserva sin cambio durante más de 15 días habiendo realizado más de 200 determinaciones. Este hecho permite concluir que

los electrodos enzimáticos como el que se desarrolló en este trabajo, constituyen una alternativa de medición altamente específica, rápida, de fácil aplicación y posiblemente con costos menores que los de los métodos convencionales para la determinación de glucosa. Por otra parte el dispositivo desarrollado posee características que lo hacen competitivo con los instrumentos existentes comercialmente.

CAPITULO 1

Introducción.

La detección y cuantificación de determinadas sustancias es una de las claves para la adecuada interpretación del comportamiento íntegro de un sistema. Por esta razón, de la precisión y rapidez logradas en una determinación, pueden depender por ejemplo, la producción óptima de un antibiótico en una fermentación, o el diagnóstico adecuado de la enfermedad de un organismo. En este sentido, todos los laboratorios requieren de métodos adecuados de cuantificación y detección de sustancias, ya sea que se trate de la determinación, monitoreo o diagnóstico en laboratorios de investigación básica, industrial o clínicos, respectivamente.

Las técnicas más empleadas tienen sus principios en los métodos tritrimétricos, colorimétricos y bioensayos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se requiere que las metodologías usadas sean de alta especificidad, de respuesta rápida y de gran precisión. Para el caso de ciertas sustancias estas características difícilmente pueden cumplirse con los métodos mencionados ya que algunos no son suficientemente específicos, presentan baja precisión y altas interferencias.

Recientemente se han implementado los métodos electroquímicos, los cuales han marcado la pauta para que, en combinación con materiales biológicos se desarrollen técnicas mucho más simples. Los materiales biológicos que se han utilizado incluyen entre otros a organelos, anticuerpos y a las enzimas, lo cual garantiza una gran

especificidad. Estas técnicas casi siempre presentan tiempos de respuesta cortos. Este hecho ha dado un gran impulso al desarrollo de toda una línea tecnológica importante para estimar y monitorear algunas sustancias de interés biológico, con el objetivo final de conocer y controlar los procesos biológicos mismos.

Resultado de este avance ha sido la reciente aplicación de los sensores enzimáticos o electrodos enzimáticos, los cuales tienen como distintivo el hecho de combinar la alta especificidad de una enzima con la simplicidad de uso de los sensores electroquímicos convencionales. Tales dispositivos son sensibles a los cambios fisicoquímicos que ocurren al reaccionar la enzima situada en la vecindad del sensor electroquímico. La respuesta es proporcional al consumo de un sustrato o la generación de un producto presente en un medio determinado.

Cabe mencionar que este avance ha sido posible gracias al desarrollo paralelo de técnicas con las que es posible limitar a las enzimas en una región de un espacio determinado. Es decir, a las técnicas de inmovilización. De esta forma se evitaron en gran medida las principales limitaciones al uso de enzimas como reactivos analíticos, permitiendo su reutilización y por lo tanto abatiendo los costos involucrados en el análisis.

En la última década se han reportado una gran cantidad de dispositivos electroenzimáticos para la determinación de un elevado número de moléculas biológicas importantes. Entre ellas, por su importancia biológica, clínica e industrial, destaca la glucosa. Esta molécula es una de las que ha presentado mayor interés en el diseño de dispositivos para su medición.

En este trabajo se presenta el desarrollo de un dispositivo para medición de glucosa basado en la reacción de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en mallas de nylon colocadas en la superficie sensible de un electrodo galvánico para oxígeno disuelto.

La primera etapa del trabajo fue la selección del soporte para la enzima glucosa oxidasa y posteriormente el desarrollo de una metodología para su inmovilización. En esta misma etapa se realizaron experimentos con una proteína de prueba (albúmina) con el fin de seleccionar el soporte con mejores características para el proceso de inmovilización. La enzima utilizada en el trabajo fue de origen comercial (Sigma) y las condiciones finales del método de inmovilización se establecieron en base a los trabajos reportados para inmovilización de glucosa oxidasa en tubos de nylon.

Una vez seleccionado el soporte y la metodología de inmovilización, en una segunda etapa se construyó el dispositivo electroenzimático sensible a glucosa. Esto se logró colocando las mallas de nylon con la enzima inmovilizada en la vecindad de un electrodo para O_2 disuelto. Con este electrodo enzimático se realizaron los experimentos necesarios para determinar los valores de los parámetros que más importan en cuanto a su probable uso en casos específicos.

Una vez establecida la temperatura de operación, los primeros resultados mostraron la necesidad de mejorar dos de sus principales parámetros y que son inversamente proporcionales entre ellos: el rango lineal y la sensibilidad. Para ello se probaron diferentes membranas de diálisis como resistencia difusional y se logró un sistema con un compromiso adecuado entre ambos parámetros. Con ese

mismo objetivo se realizó una coinmovilización de glucosa oxidasa y catalasa. Se logró aumentar el rango lineal, pero se observó pérdida considerable en la sensibilidad de medición.

Una vez establecido el uso de la resistencia difusional, que consistió de una membrana de diálisis benzoinada, se estudió la estabilidad operacional del sistema. Se encontró que durante 15 días el sistema opera sin cambios notables en la sensibilidad del electrodo enzimático.

Finalmente, este dispositivo fue comparado con un método convencional de medición de glucosa el cual utiliza la misma enzima pero en forma soluble. Un plano general de la estrategia seguida en el trabajo experimental se observa en la figura 1.1.

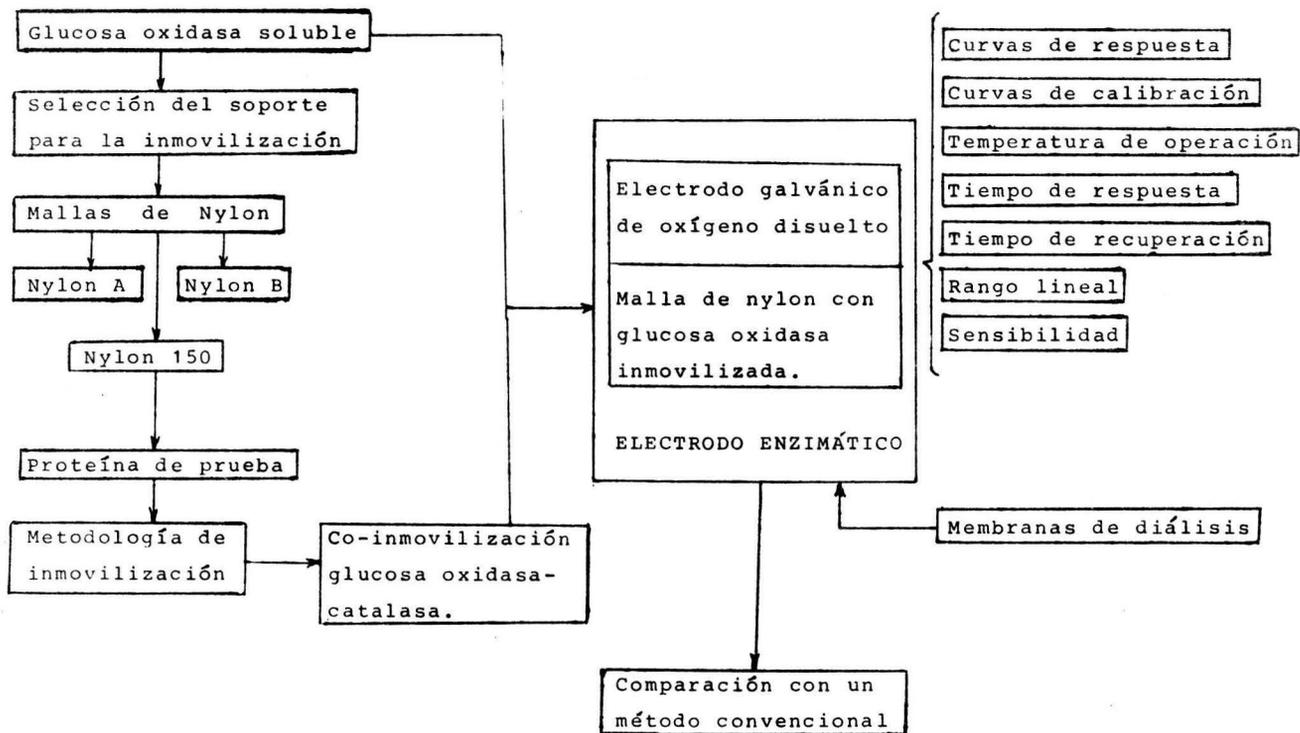


Figura 1.1.- Cuadro esquemático de la estrategia seguida para la realización de este trabajo.

CAPITULO 2

Antecedentes.

2.1.-Electrodos biológicos.

En la actualidad los químicos analíticos y clínicos han incrementado su interés por los electrodos biológicos. Ello se debe, entre otras cosas, a su gran versatilidad y relativa facilidad de uso en comparación con otras técnicas analíticas (Corcoran y Kechnitz, 1985).

En la literatura, para nombrar estos dispositivos se han usado, entre otros términos, las palabras biosensores, electrodos biológicos y bioelectrodos. El término original los define como "electrodos con membranas biocatalíticas" o "sensores bioelectroquímicos" (Gronow, 1984).

Un electrodo biológico es un dispositivo por medio del cual es posible la detección de compuestos específicos a través de una señal eléctrica. Este tipo de instrumentos son el resultado de la interacción entre alguno o algunos de los diversos catalizadores biológicos y los diferentes transductores existentes. En el diseño de un electrodo biológico el transductor es un dispositivo eléctrico que responde a cambios en los parámetros fisicoquímicos, asociados con la interacción del biocatalizador y su sustrato (figura 2.1). Esto ha permitido la combinación de la simplicidad y seguridad de las reacciones electroquímicas, con la alta especificidad de las reacciones enzimáticas e inmunológicas, que pueden ser usadas para la determinación de un número elevado de sustancias. De esta forma es posible la determinación de sustratos, productos, inhibidores

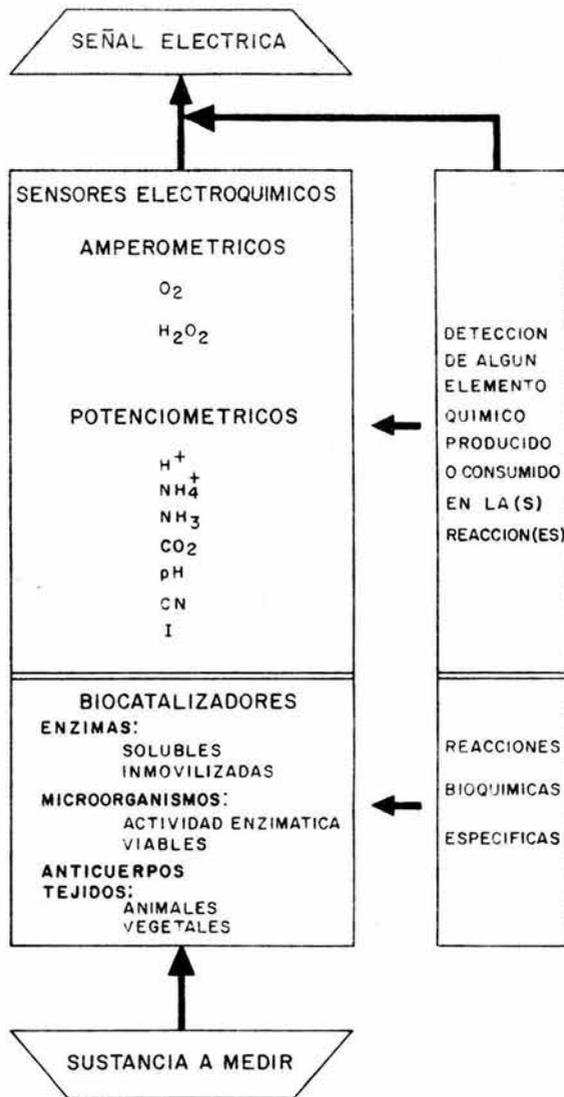


Fig 2.1 Diseño básico de un electrodo biológico

catalíticos y aun la actividad de las mismas enzimas. (Galindo, 1986; Sheller, et al, 1983).

En la construcción de los electrodos biológicos se han empleado, enzimas ya sea solubles o bien en forma inmovilizada, microorganismos con una determinada actividad metabólica o enzimática, anticuerpos, tejidos animales o vegetales, organelos o bien combinaciones con dos o más de estos elementos biológicos (Galindo, 1986; Guilbault, 1980; Susuki, y Karube, 1981; Gronow, 1984). Un resumen se presenta en la tabla 2.1.

2.2.- Sensores electroquímicos.

Este tipo de sensores se divide en dos grandes categorías : potenciométricos y amperométricos. En el primero de ellos, una membrana o superficie sensible a un ión determinado, se comporta como una batería generando una diferencia de potencial. Este último es una función logarítmica de la concentración del compuesto analizado y se mide en relación al potencial de un electrodo de referencia inerte, tal como lo son el de calomel o el de plata-cloruro de plata.

En estos sensores las mediciones se realizan en el equilibrio, es decir, cuando no existe flujo de corriente. Esta característica se atribuye principalmente al hecho de que las membranas sensibles que utilizan son muy poco conductoras de corriente.

Los ejemplos más conocidos de los sensores potenciométricos lo constituyen los denominados electrodos ión-selectivos como lo son aquellos para medir pH, pCO_2 , NH_3 y diversos cationes.

En el otro grupo de sensores electroquímicos se ubican los

B I O C A T A L I Z A D O R									
E N Z I M A S					M I C R O O R G A N I S M O S				
Alcohol	a	Cefalosporinas	d	L-Metionina	a	Acido acético	c,d	L-Histidina	c
Acetil-colina	a	L-Cisteína	a	Monosaminas	d	Acido fórmico	b	Metano	b,c
Acido acético	a	Colesterol	a	NaOH	a	Acido nicotínico	d	NAD	c
Acido ascórbico	b	Colina	a	Nitrato	a	Acido nitroacético	b	Nistatina	d
Acido fórmico	a	Creatinina	a	Nitrato	a	Acido nitriloacético	c	Piruvato	c
Acido glutámico	a	Fosfato	a	Oxalato	a	Amonio	b,c	Nitrato	b,c
Acido láctico	a	Fosfolípidos	d	Penicilina	a	L-Arginina	b,c	Población microbiana	d
Amígdalina	a	Glucosa	a	Proteínas	b	L-Aspartato	b,c	Azúcares totales	c
L-Aminoácidos	a	Glutamina	a	Sacarosa	a	DBO	c	Acido úrico	c
D-Aminoácidos	a	Glutamato	a	Sulfato	a	Cisteína	b,c	Vitamina B ₁	d
AMP	a	L-Histidina	a	Tiosulfato	a	Colesterol	b,c	L-Tirosina	c
L-Asparagina	a	H ₂ O ₂	a	L-Tirosina	a	Etanol	c	L-Serina	b,c
L-Arginina	a	Lípidos neutros	d	Urea	a	Glucosa	c		
Acido succínico	a	L-Lisina	a			L-Glutamato	c		
Butiril tiocolina	a	Maltosa	a			Glutamina	b,c		

B I O C A T A L I Z A D O R									
ANTICUERPOS		TEJIDOS		ORGANELOS		HIBRIDOS (enzimas + microorganismos)			
Antígeno lipídico de Wassermann (Sifilia)	d	Animal:		Adenosina	b	NAD	b		
IGG	d	Glucosa	e	Sulfito	b	Fenilalanina	b		
G	d	Vegetal:							
Gonadotropina	g	Dopamina	f						

a)Gullbault, 1980

b)Aston y Turner, 1984

c)Corcoran y Rechnitz, 1985

d)Suzuki y Karube, 1981

e)Ho y Wu, 1984

f)Sidwell y Rechnitz, 1985

g)Aizawa *et al.*, 1979

Tabla 2.1.- Algunos compuestos que han sido reportados como posibles de ser determinados mediante electrodos biológicos

sensores amperométricos. En estos se aplica un voltaje entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia provocando reacciones de transferencia de electrones (redox). Las reacciones de oxidación-reducción producen un flujo neto de corriente, cuya magnitud es proporcional a la concentración del material electroactivo presente en la solución problema.

El ejemplo mejor conocido de un sensor amperométrico lo constituye el electrodo de Clark para detección de pO_2 (Higgins, et al 1985). Los electrodos disponibles comercialmente en la actualidad son principalmente de cuatro tipos, aquellos que detectan cationes, aniones, gases y los electrodos de platino que miden la generación de corriente. Los electrodos selectivos para iones así como los de CO_2 y NH_4 utilizan el principio potenciométrico; mientras que los de platino, O_2 y H_2O_2 destacan entre los que usan el principio amperométrico.

Existen otros tipos de sensores que no son propiamente electrodos, entre ellos se encuentran los ópticos y termométricos. En el primer caso la interacción entre el biocatalizador y el sustrato o producto desconocido produce cambios en las propiedades ópticas del sistema. Dependiendo del dispositivo usado y de la reacción producida el cambio de las propiedades ópticas se mide por absorbancia, refracción o luminiscencia.

Los sensores ópticos presentan algunas ventajas, como lo es el hecho de que no son susceptibles a interferencias eléctricas y no requieren el uso de electrodos de referencia. Sin embargo, su principal desventaja es que pueden ser susceptibles a interferencia por la luz ambiental.

Recientemente se han reportado los sensores ópticos que usan anticuerpos inmovilizados con su respectivo antígeno. Los cambios ópticos producidos por esta interacción son medidos por la absorbancia de luz en el sistema. (Sutherland, et al 1984).

Los sensores térmicos se basan en la teoría que afirma que todas las reacciones químicas pueden ser registradas indirectamente midiendo el calor generado por estas. Estos biosensores utilizan un termistor y pueden aplicarse eficientemente con enzimas, células o tejidos (Gronow, 1984).

Entre otras alternativas de medición se ha utilizado la detección de sustancias sin emplear ninguna conductancia iónica específica sino midiendo el incremento total en la conductancia de la solución problema.

Ciertos cristales piezo eléctricos para análisis de elementos traza se han usado para la medición de gases volátiles, sin embargo, no presentan ninguna relevancia importante para que sean considerados como biosensores (Ho, et al 1980)

Otra importante área en la cual se ha puesto gran interés es en la explotación de la tecnología de los semiconductores (ver tabla 2.2). Los semiconductores que se han empleado son los transistores de efecto de campo (FET) y su principal atractivo es su potencialidad para ser miniaturizados e integrados a microcircuitos electrónicos (Caras, et al, 1980).

Otra de las más recientes novedades ha sido el uso de los sensores amperométricos basados en ferrocenos. Estos compuestos actúan como mediadores en la transferencia de electrones de las

Material biológico en una matriz o soporte.	Transductor
E, A	Dispositivos de absorbancia o transmitancia de luz.
E	Conductimetría
E, EA	Transductor o transistores de efecto de campo.
E, A	Fibras ópticas
E, O, PK	Electrodos sensibles a gases
E	Electrodos ion-selectivos
E,PK,EK	NMR
E,EIA,PK,O	Electrodo de oxígeno
E, PK, O	Electrodo de pH
E,EIA,A	Fotodiodos, películas sensibles a luz
PK	Cristales piezoeléctricos
E,PK,EK	Conductores/semiconductores
E,A,PK	Termistores
E=enzimas; A=anticuerpos; EIA=inmunoensayo enzimático PK=células procariotas; EK=celulas eucariotas; O=organelos.	

Tabla 2.2.- Algunos transductores recientemente usados en la construcción de electrodos biológicos.

enzimas reducidas . El diseño permite la generación electroquímica de iones ferricianuro ($\text{Fe}(\text{CN})_2^+$) que actúan como oxidantes para las enzimas inmovilizadas. El ion ferricianuro que ha sido reducido puede volver a un estado oxidado con la ayuda de la polaridad del electrodo, permitiendo así el flujo de corriente.

Por otra parte, se han realizado experimentos exitosos en el desarrollo de inmunosensores que emplean enzimas y que se basan en los principios de las técnicas de ELISA (Gronow, 1984; Mattiason, et al 1977).

Un último caso de aquellos sensores que no son propiamente electrodos, son los que usan una clase especial de enzimas, la glutamato dehidrogenasa y lactato deshidrogenasa. Al igual que las flavin dehidrogenasas son completamente insensibles a oxígeno y pueden ser usadas en aquellos casos en los cuales la tensión del oxígeno es una limitante (Higgins, et al, 1985).

2.3.-Electrodos enzimáticos.

2.3.1.- Generalidades.

Los electrodos enzimáticos constituyen el mejor ejemplo de la aplicación de los electrodos biológicos. En ellos se utilizan transductores tanto amperométricos como potenciométricos. Estos sensores aprovechan las características de las enzimas, permitiendo diseños con una gran actividad catalítica y altamente específicos para un sustrato en particular. En la tabla 2.3 se presentan algunos de los ejemplos más conocidos de electrodos enzimáticos tanto amperométricos como potenciométricos.

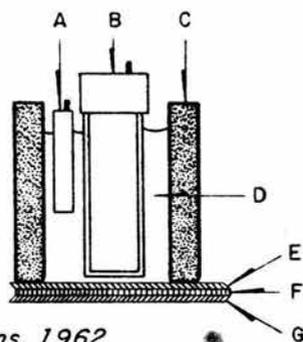
El primer reporte en relación con los electrodos enzimáticos se remonta al año de 1962 en donde Clark y Lyons describen un sistema electrodo-membrana para el monitoreo continuo de glucosa (ver figura 2.2). Con este sistema los autores median amperométricamente la concentración de glucosa usando la enzima glucosa oxidasa en forma soluble.

En 1967 Updike y Hicks introducen el término de "Electrodo enzimático", desarrollando un sensor para glucosa empleando un electrodo de Oxígeno cuya membrana recubren con glucosa oxidasa atrapada físicamente en un gel de poliacrilamida (Figura 2.3).

A raíz de la publicación de estos trabajos han aparecido toda una serie de artículos que tratan sobre el uso de enzimas inmovilizadas en cualesquiera de sus formas, trabajando en conjunto con los distintos transductores, principalmente electroquímicos. Se puede tener una idea de la cantidad de trabajos reportados con

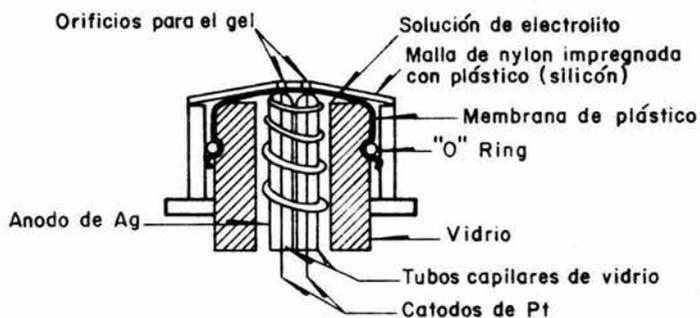
Sensor potenciométrico	Sustancia detectada	Sustratos típicos
pH	H^+	Penicilinas, glucosa, urea
Catión univalente	NH_4^+	Urea, L-aminoácidos, D-aminoácidos, Asparagina, Glutamina Glutamato, Lactato.
Membrana de silicón no activa	NH_4^+	Urea, Fenilalanina.
Sensor de amonio gaseoso	NH_3^+	L-asparagina, creatinina, urea 5'AMP, arginina
Yoduro en estado sólido	I^-	L-fenilalanina, glucosa
Cianuro en estado sólido	CN^-	Amigdalina
Sensor amperométrico (Especie electroactiva)	Electrodo sensor	Sustratos típicos
O_2	Pt, Electrodo de Clark	L-aminoácidos, glucosa, ácido urico, alcoholes, ácidos (COO) fosfatos, lactato, diaminas, peróxido, sacarosa
H_2O_2	Pt	Glucosa, L-aminoácidos, alcohol
NADH	Pt, Carbón vidrioso	Lactato, etanol
I_2	Pt	Glucosa

Tabla 2.3.- Ejemplos de electrodos-enzimáticos potenciométricos y amperométricos.



a) Clark y Lyons, 1962

A = Electrodo de referencia, B = Electrodo sensor
 C = Tubo contenedor, D = Electrolito, E = Agua
 G = Membrana permeable, F = Enzima



b) Updike y Hicks, 1967

Fig 2.2 (a) Diseño usado por Clark y Lyons 1962

Fig 2.3 (b) Diseño usado por Updike y Hicks, 1967

enzimas inmovilizadas en el diseño y construcción de electrodos enzimáticos observando la tabla 2.4.

2.3.2.- Ventajas.

El uso de los electrodos enzimáticos y en general de los electrodos biológicos representa una serie de ventajas sobre los métodos rutinarios convencionales de análisis , algunas de ellas son:

a) Alta especificidad , consecuencia de que los elementos biológicos utilizados son muy específicos. Este es el caso de la mayor parte de las enzimas que unicamente reconocen un solo sustrato o los anticuerpos que sólo se ligan selectivamente a un antígeno.

b) Simplicidad en su uso, esto es debido a que la preparación de la muestra y su manipulación es reducida al mínimo.

c) Medición rápida, por el hecho de ser una medición directa basada en una señal eléctrica.

d) Uso mínimo de reactivos , ya que sólo se requieren para la calibración y mantenimiento de condiciones óptimas y en su caso para dilución de la muestra

e) La medición no depende del color de la muestra, lo que normalmente ocurre en los métodos colorimétricos.

f) Pueden realizarse mediciones en línea, principalmente cuando se requiere el registro continuo o la automatización de cierto proceso .

g) La parte biológica o catalítica inmovilizada en un soporte sólido puede ser usada repetidas veces.

Compuesto	Referencia	Compuesto	Referencia
Alcohol	A	Glucosa	A
Acetil colina	A	L-glutamina	A
Acido acético	A	Glutamato	A
Acido ascórbico	B	L-histidina	A
Acido fórmico	A	H ₂ O ₂	A
Acido láctico	A	Lípidos neutros	C
Acido succinico	A	L-lisina	A
Amigdalina	A	Maltosa	A
L-aminoácidos	A	L-metionina	A
D-aminoácidos	A	Monoaminas	C
AMP	A	NaOH	A
L-asparagina	A	Nitratos	A
L-arginina	A	Nitritos	A
Butiril tiocolina	A	Oxalatos	A
Cefalosporinas	C	Penicilinas	A
L-cisteina	A	Proteínas	B
Colesterol	A	Sacarosa	A
Colina	A	Sulfato	A
Creatinina	A	Tiosulfato	A
Fosfato	A	L-tirosina	A
Fosfolípidos	C	Urea	A

A). Guilbault, 1980; B). -Aston y Turner, 1984; C). -Susuki y Karube, 1981.

Tabla 2.4.- Compuestos que han sido reportados como posibles de ser determinados usando electrodos enzimáticos

h) Reducción de costos por muestra analizada , esto como consecuencia de los puntos d , f y g antes mencionados.

Esta serie de ventajas se atribuyen a los electrodos enzimáticos principalmente porque combinan la sensibilidad y selectividad de un método enzimático con la alta velocidad de respuesta de los transductores. (Galindo, 1986; Bautista, 1983).

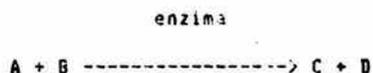
2.3.3.- Construcción.

Para construir un electrodo enzimático es necesario tomar en cuenta cuatro aspectos importantes:

- a) Selección de la enzima.
- b) Obtención de la enzima.
- c) Inmovilización de la enzima.
- e) Montaje de la enzima en el transductor apropiado.

De los puntos antes mencionados se ha considerado de mayor importancia el que se refiere a la inmovilización de la enzima. Esta consideración se basa en que de la estabilidad de la enzima en la matriz o soporte para su inmovilización, depende en gran parte su reutilización. Al mismo tiempo, de los valores de inmovilización logrados, puede depender la selección del transductor adecuado, según los productos generados o los sustratos consumidos por la enzima. Por otra parte la enzima elegida preferentemente debe tener suficiente actividad catalítica y un alto grado de pureza para no permitir la interferencia de sustancias extrañas a la que se requiere analizar (Guilbault, 1976; Bautista, 1983).

De forma general la enzima cataliza una reacción que sigue una secuencia como la siguiente:



El electrodo enzimático requiere de un sensor que responda a cualquiera de los reactantes A o B o a los productos C o D. Otros aspectos que se incluyen en la construcción de electrodos enzimáticos son, el tipo y características de los componentes electrónicos y el diseño mecánico para que estos resulten fáciles de mantener y operar.

Los sensores que se requieren para la construcción de electrodos enzimáticos algunas veces son el único factor limitante, por su reducida capacidad para medir la reacción.

Asumiendo que se cuenta con todos los componentes básicos para la construcción de un electrodo enzimático, existen algunas formas básicas de construcción de estos electrodos, las cuales se esquematizan en la figura 2.4. Si se dispone de membranas planas, el electrodo sensor debe tener preferentemente el extremo plano, además de requerir de dispositivos mecánicos para fijarlos. En el caso de no ser plano, la membrana debe ser lo suficientemente flexible para ser adaptada con anillos de hule ("O" rings).

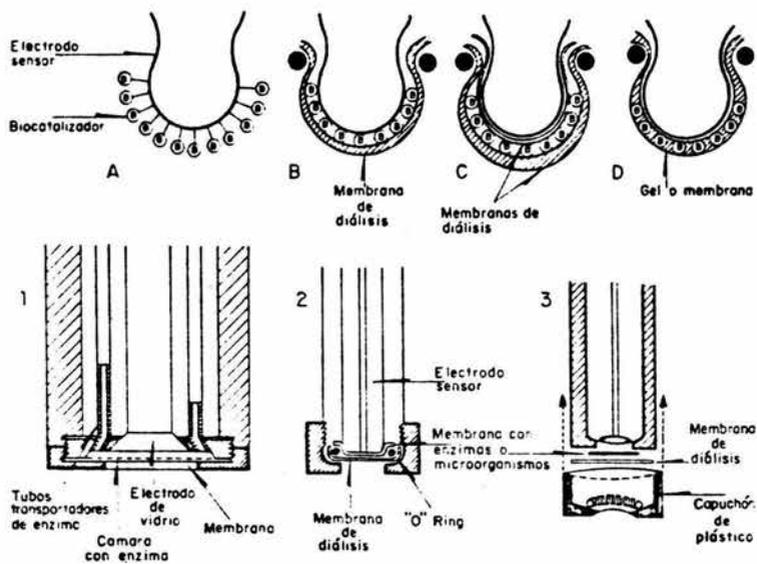


Fig 2.4 Formas básicas de construcción de electrodos enzimáticos

2.3.4.- Técnicas de inmovilización.

Un proceso de inmovilización es aquel por medio del cual se limita a las enzimas en una región de un espacio determinado. Las distintas formas en las cuales se ha inmovilizado, tanto enzimas como anticuerpos, incluyen métodos físicos y químicos. (Un resumen se presenta en la figura 2.5). El método usado depende de las características del soporte y de lo que se va a inmovilizar en él. Para células u organelos el atrapamiento físico en matrices poliméricas es el método más comúnmente usado. Las enzimas y anticuerpos regularmente se enlazan o entrecruzan covalentemente con reactivos bifuncionales o multifuncionales (Susuki y Karube, 1979; Guilbault, 1976, 1982; Hartemeir, 1985; Tramper, 1985).

En el caso de la inmovilización de enzimas, se puede realizar por muchos métodos, entre ellos : copolimerización, atrapamiento en geles y enlace covalente de la enzima a un soporte o matriz sólida. La difusividad de sustratos y productos así como las dimensiones de la membrana son de primordial importancia puesto que influyen en las características de respuesta del electrodo.

Las enzimas pueden ser inmovilizadas de varias formas y en distintos soportes que incluyen la adsorción a soportes inertes o resinas de intercambio iónico, atrapamiento en geles, fibras o encapsulación en microcápsulas, entrecruzamiento con reactivos multifuncionales o bifuncionales en estructuras con una geometría definida y enlaces covalentes con soportes poliméricos vía grupos funcionales no esenciales para la actividad biológica de las enzimas.

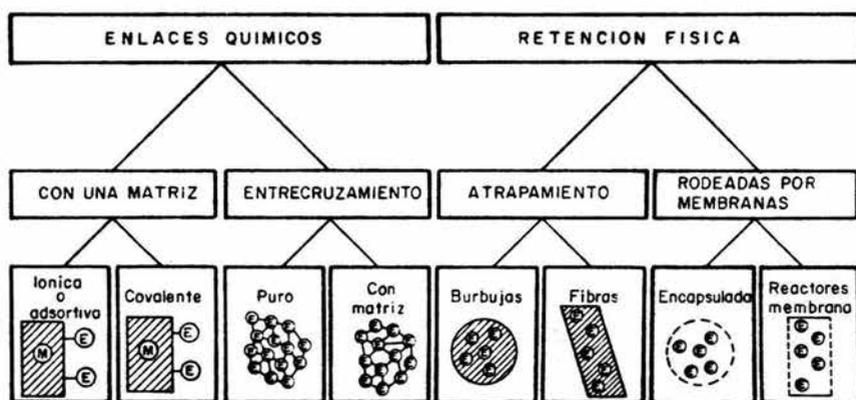


Fig 2.5 Principales formas de inmovilización, M=Matriz o soporte
E=Enzima

Es necesario que el método de inmovilización de las enzimas no altere negativamente el funcionamiento de estas, ya que siempre existe la posibilidad de que se produzcan cambios que conduzcan a un comportamiento diferente al observado cuando se encuentran en forma soluble.

Los métodos de enlace covalente y copolimerización de enzimas a soportes sólidos, algunas veces implican que el soporte mismo sea un componente del detector electroquímico. Este es el caso de la membrana de teflón de los electrodos de oxígeno o el bulbo de vidrio del electrodo de pH. Los métodos de atrapamiento en geles o filtros son menos costosos y más simples que los de enlace covalente. En este último caso, la enzima puede sufrir pérdida de actividad en mucho mayor proporción que en el caso de los métodos de atrapamiento. La principal desventaja de los métodos de atrapamiento es que requieren mayores volúmenes de enzima lo que implica membranas más gruesas y que pueden originar problemas difusionales.

Para el método por enlazamiento covalente existe una clasificación que ubica los soportes usados en soportes sintéticos y soportes naturales: en los soportes sintéticos se encuentran gran cantidad de polímeros que se basan en acrilamidas, ácidos metacrílicos, estireno y polipéptidos. Por su parte los soportes naturales incluyen métodos en los que se usa agarosa, celulosa, dextrana, vidrio, almidón etc. (Zaborsky, 1977).

2.3.5.- Selección de soportes.

Una de las consideraciones básicas en la inmovilización de una

enzima es la selección del soporte adecuado. En este proceso se deben tomar en cuenta los siguientes factores: (Jerker y Rolf, 1976):

a) Propiedades mecánicas, como lo son su rigidez y durabilidad para soportar agitación mecánica y compresión en caso de que el sistema lo requiera.

b) Forma física, es decir su presentación pudiendo ser granulos, esferas, tubos, mallas, membranas etc..

c) Resistencia al ataque químico y microbiano.

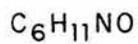
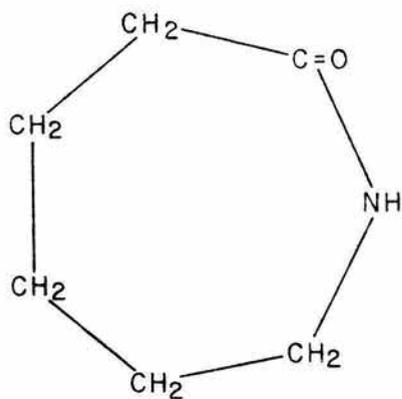
d) Capacidad de interacción con agua, es decir su grado de hidrofobicidad..

e) Permeabilidad, es decir la capacidad del soporte para permitir la difusión de sustratos y productos a través del mismo.

f) Precio y disponibilidad.

2.3.6.- Nylon

Los nylons son una familia de polímeros lineales que consisten de un ensamblaje repetitivo de grupos metileno unidos por enlaces amida secundarios clasificados de acuerdo al número de átomos de carbono presentes en sus unidades monoméricas. Por ejemplo, el nylon 6 es llamado así debido a que en su preparación se usa el compuesto caprolactama que tiene 6 átomos de carbono, como lo muestra la figura 2.6.



Peso molecular 113.6 g/g Mol

CAPROLACTAMA

Fig 2.6 Molécula principal usada en la preparación del Nylon 6

Las principales ventajas que presenta el nylon como soporte para la inmovilización de enzimas se encuentran listadas en la tabla 2.5. Algunos sistemas de enzimas inmovilizadas se han reportado usando nylon como soporte. Chang, en 1964 y 1971 reporta la inmovilización de enzimas por microencapsulación usando membranas permeables de nylon 610. Otros trabajos (Edelman et al, 1971) reportan la inmovilización de varios antígenos por adsorción, usando monofilamentos de nylon por medio del entrecruzamiento con carbodiimida.

La mayoría de los sistemas de enzimas inmovilizadas usando nylon como soporte se han realizado por el método de enlazamiento covalente. El nylon es un polímero de alto peso molecular y por su naturaleza, con pocos grupos terminales libres. Por esta razón, la mayoría de las veces tiene que ser previamente tratado para generar centros reactivos que potencialmente sean capaces de interactuar covalentemente con las enzimas. Estos pretratamientos tienen sus bases en tres puntos esenciales; el primero de ellos es el hecho de que los componentes de los enlaces amida secundarios del nylon (esencialmente grupos amino alifáticos y carboxílicos) son los principalmente reactivos. Consecuentemente el nylon puede ser sometido a un tratamiento para romper algunos de los enlaces amida secundarios generando la liberación de sus componentes amínicos y carboxílicos.

Por otra parte se sabe que los grupos reactivos pueden ser introducidos en el nylon y para ello se usan métodos que involucran la *o*-alquilación de los enlaces amida secundarios con grupos potencialmente reactivos. Este método produce una sal amidada del

- a) Muy fácil de conseguir
- b) Amplia gama de formas físicas
 - b.1.- Películas
 - b.2.- Membranas
 - b.3.- Mallas
 - b.4.- Fibras
 - b.5.- Tubos
- c) Relativamente hidrofílicos
- d) Mecánicamente fuertes
- e) No biodegradables.

Tabla 2.5.- Principales ventajas del uso del nylon como soporte para la inmovilización de enzimas.

nylon y no produce la depolimerización del mismo.

En un tercer caso, los centros reactivos son generados usando procesos que implican inicialmente la hidrólisis parcial del nylon. Los enlaces peptídicos rotos en este proceso son reconstituidos por condensación, con reacciones que involucran la participación de los grupos amino y carboxílicos liberados, con aldehídos e isocianuros. La mayoría de estos métodos producen un nylon intacto que contiene grupos reactivos derivados de la n-sustitución de algunos de los enlaces amida secundarios.

Ejemplos de estos tratamientos han sido descritos por Goldtein, et al en 1974, en base al reporte de Ugi (1962), los autores describen cuatro formas de condensación entre aminos, carboxílicos, isocianuros y aldehídos para la formación de amidas n-sustituidas. En este caso utilizan polvos de nylon para inmovilizar tripsina y pepsina. El mismo año Inman y Hornby reportan la preparación de algunos sistemas para inmovilizar covalentemente la glucosa oxidasa, amiloglucosidasa, invertasa y B-galactosidasa en tubos de nylon para la determinación de disacáridos.

La inmovilización de enzimas en nylon por enlace covalente, incluye tres etapas separadas; (1) la depolimerización parcial del nylon por rompimientos de enlaces amida secundarios, (2) activación de cada uno de los grupos amino y carboxílicos liberados en la primera etapa. (3) la mezcla con la enzima para que reaccione con el derivado de nylon activado en la segunda etapa (figura 2.7). Estos procesos han sido usados por Hornby y Filippuson en 1970, activando los grupos reactivos en tubos de nylon por hidrólisis ácida. Horvat y Solomon en 1972, reportan la inmovilización de tripsina y uricasa en tubos de

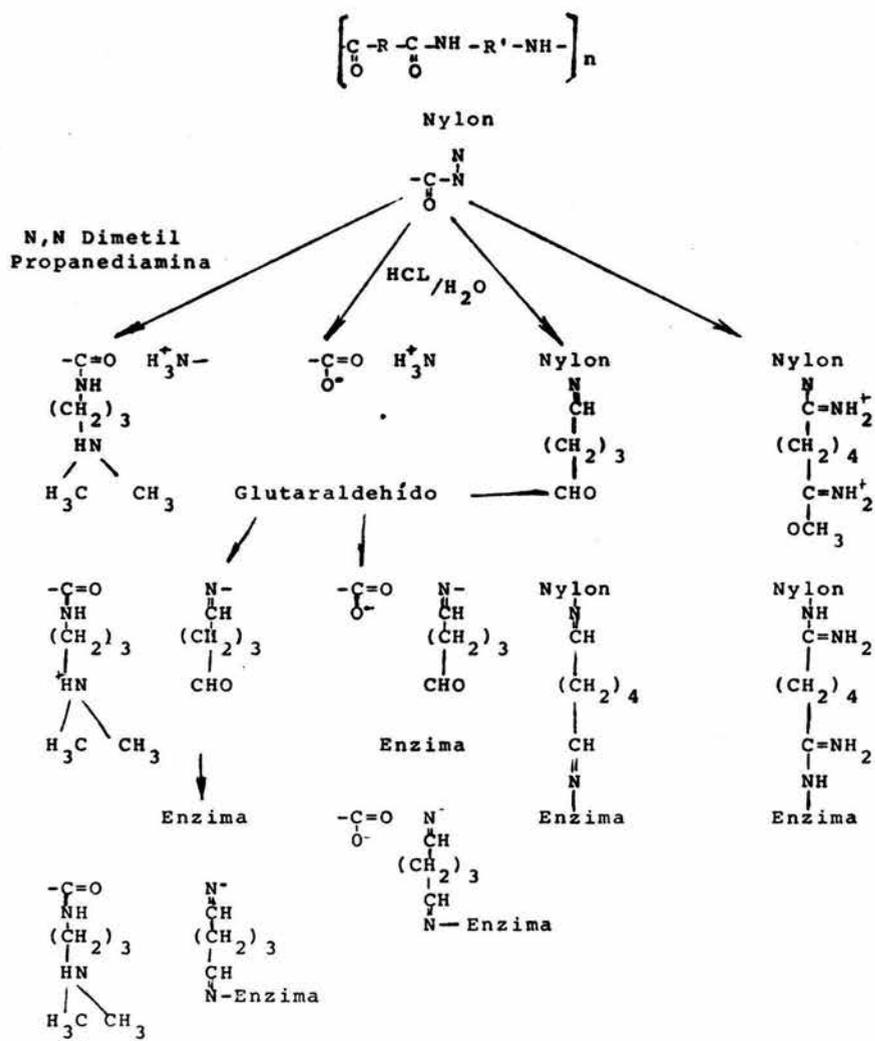


Figura 2.7.- Enlace covalente de enzimas al nylon, por métodos que implican el rompimiento y acoplamiento del enlace péptido, por liberación de grupos amino.

nylon activando los grupos amino.

Sundaran y Hornby (1970) inmovilizan ureasa utilizando los grupos amino del hidrólizado previo de tubos de nylon. En este caso los grupos fueron expuestos y hechos reaccionar con un exceso del agente bifuncional glutaraldehído (GTA) y la ureasa se enlazo con los grupos aldehído libres del nylon. Un proceso semejante al de Sundaran y Hornby fue utilizado por Bunting, (1974) para la inmovilización de asparaginasa a tubos de nylon.

El entrecruzamiento con glutaraldehído fue usado por Inman y Hornby en 1972 para activar tubos, polvo y membranas de nylon. En estas formas las enzimas glucosa oxidasa y ureasa fueron adsorbidas en los poros y luego entrecruzadas con glutaraldehído.

Aunque estos procesos no son los únicos que existen para la activación de nylon, al menos si son generalmente los mas usados en los reportes de la literatura. En general se ha reportado que existen métodos para inmovilizar enzimas en tubos, en membranas, y en pulverizados de nylon. En esta tesis se utiliza una de las formas de nylon que en la literatura solo se ha usado para la detección de insulina por medio de un inmunoelectrodo. Mattiasson, et al 1977. Este inmunoelectrodo utiliza una área de 3 x 7 cm. Todavía no se ha reportado en la literatura el uso de mallas de nylon como soporte enzimático para su uso en electrodos enzimáticos específicamente.

2.4.- Medición de glucosa.

2.4.1.- Métodos convencionales.

Generalidades.

La glucosa es un carbohidrato que pertenece a los monosacáridos llamados también azúcares simples. Químicamente los monosacáridos tienen la fórmula general $(CH_2O)_n$ y se trata de aldehídos y cetonas polihidroxilados y sus derivados. Su determinación con los métodos clásicos de química orgánica ha presentado problemas debido a que no se pueden detectar pequeñas cantidades de glucosa a partir de muestras complejas de materiales biológicos. Esto llevó al desarrollo de técnicas colorimétricas más sensibles y específicas que pueden detectar microgramos de un azúcar determinado.

Algunas de estas técnicas se basan en el calentamiento de las soluciones acuosas del azúcar con un ácido fuerte para convertirlo en furfural o en cualquiera de sus derivados. Posteriormente, adicionando un elemento orgánico tal como el indol, orcinol, difenilamina o carbazol se produce un color que puede ser correlacionado con la concentración del azúcar.

Existen también técnicas basadas en métodos reductivos, los cuales casi se han descartado, debido a su muy poca especificidad. De estos métodos el que en la actualidad se mantiene, es la modificación de Hoffman al método de Hagedorn-Jensen y que se aplica en autoanalizadores (Gerbig, 1986).

Recientemente se han logrado avances en la determinación de azúcares, con el empleo de los métodos que utilizan enzimas solubles.

Estos métodos presentan algunas ventajas sobre los métodos químicos, entre las que se encuentran: 1) Son mucho más específicas, 2) pueden usarse para monitorear reacciones en las cuales el azúcar es liberado por algún proceso biológico y 3) la determinación del azúcar se puede realizar en presencia de proteínas.

Actualmente se están usando los sensores biológicos aprovechando las técnicas de inmovilización en los cuales la detección de glucosa tiene un gran interés.

2.4.2.- Métodos colorimétricos (cromogénicos).

La mayoría de estos métodos utilizan el color formado en una reacción posterior al tratamiento ácido de los azúcares. Los métodos usados presentan valores razonablemente válidos para tener una idea de la concentración de un determinado azúcar. Estos métodos, en base al color, pueden ser cualitativos o cuantitativos, los cualitativos se usan cuando se requiere conocer la presencia de un azúcar específico en una mezcla de reacción. Los métodos cualitativos también son de gran utilidad en la identificación sistemática de un compuesto desconocido.

Los métodos cuantitativos se usan cuando los azúcares son conocidos y se requiere una rigurosa determinación en muestras que no existan sustancias extrañas que interfieran en la lectura del azúcar medido. Bajo estas condiciones, usando los blancos apropiados, se logran lecturas que son seguras y representativas del azúcar presente en una muestra.

Debido a la existencia de una gran cantidad de azúcares los métodos colorimétricos se han diseñado para el análisis de hexosas, tetrosas, ácidos urónicos, hexosaminas y desoxiazúcares. En este caso, por ser la glucosa una hexosa únicamente se hará mención de los métodos colorimétricos para estas moléculas. El análisis de hexosas se ha dividido en aldohexosas y cetohehexosas, debido a que no existen procedimientos colorimétricos simples que determinen aldohexosa en presencia de cetohehexosas.

Los métodos cualitativos para medir coloriméricamente aldazúcares emplean las reacciones con naftol, triptófano y aminoguanidina (Dische, 1929; Shetler, et al, 1948; Tauber, 1953). Los métodos cuantitativos para determinar aldohexosas en presencia de cetohehexosas, se basan principalmente en el método de Dische que utiliza ácido sulfúrico-cisteína.

Para el análisis colorimétrico de cetohehexosas existen varios métodos entre ellos el de Roe (1934) (resorcinol), reacciones de cisteína-carbazol reportado por Dische y Borenfreund en 1951, reacciones con difenilalanina usados por Rothenfusser en 1909 y modificado por Dische en 1929, reacciones con indol empleados por Wechuizen (1970) y Fleig en 1980. Existen los métodos que determinan hexosas totales entre ellos los que usan reacciones con carbazol (Garin y Hood, 1939), con antrona (Scott y Melvin, 1953), método de arsenol-molibdato (Nelson, 1944) y el método de Park y Johnson que emplea ferricianuro (1949) (Ashwell, 1976).

Un método que aun se utiliza con mucha frecuencia es el método

de la o-toluidina, debido principalmente a que su realización es muy simple. Los valores obtenidos son muy reproducibles y el color formado es estable por un buen tiempo. Además presenta una linealidad adecuada que permite la medición de valores muy altos de glucosa. La principal desventaja representa el hecho de tener que calentar las muestras que en presencia de polidextrinas se produce cierta turbidez que conduce a la obtención de valores falsamente aumentados (Gerbig, 1966).

2.4.3.- Métodos enzimáticos

Ultimamente en algunos laboratorios se han estado implementando los métodos enzimáticos para la determinación de glucosa, los cuales usan generalmente la enzima glucosa oxidasa en forma soluble. Este es el caso de los métodos llamados GOD-PERID, GOD-PAP comercializados por las casas Merck y Sigma.

Estos métodos por utilizar la enzima soluble presentan la desventaja de su alto costo y en algunos casos son interferidas por sustancias ajenas a la glucosa que pueden inhibir o activar a la enzima.

Una clasificación muy general de las determinaciones de glucosa con la enzima glucosa oxidasa podría darse en cuatro grupos: método del electrodo de oxígeno, colorimétrico, fluorométrico y electroquímicos. A continuación se describen los sensores comúnmente usados para determinación de glucosa en donde algunos de los más recientes utilizan la enzima en forma inmovilizada.

2.5.- Métodos con dispositivos electroquímicos.

2.5.1.- Sensores basados en cambios de pH.

El artículo original de Clark y Lyons (1962) reporta el diseño de un electrodo enzimático para determinación de glucosa. En este diseño, la glucosa oxidasa es retenida entre membranas de cuprofan en contacto con un electrodo de pH. El incremento de iones hidrógeno es resultado de la reacción de la enzima y es relacionado con la concentración de glucosa, bajo ciertas condiciones de temperatura, pH inicial y capacidad amortiguadora de la muestra.

Nilsson, et al, (1973) demostró que la glucosa podía ser medida de esta forma en concentraciones por abajo de 1 mM, sin embargo la respuesta no fue lineal. El hecho de que los electrodos potenciométricos tengan alta impedancia los hace particularmente susceptibles al ruido eléctrico, por otra parte dependen fuertemente de un potencial de referencia confiable. Esto explica en parte, el que los electrodos de pH no sean muy adecuados para la determinación de glucosa.

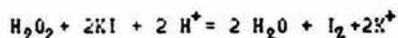
Electrodos de pH alternos pueden incorporarse a los electrodos biológicos para determinación de glucosa, Caras y Janata (1980) demostraron la posibilidad del uso de un transistor enzimático, esto es, usando un transistor de efecto de campo (FET) para detectar cambios de pH relacionados con la acción de la β -lactamasa sobre penicilinas. Una configuración similar podría usarse para medir glucosa empleando las enzimas apropiadas. Un problema serio de los FETs es que no ha sido posible la construcción de un electrodo de referencia conveniente para su caso (Kuisl y Klein, 1982).

Dobson et al., en 1976 sugieren mezclas de óxidos conductores con sensores de pH. Estos óxidos generalmente son estables en medios acuosos y pueden constituir transductores adecuados para construir biosensores. Los métodos tradicionales para determinación del pH usando indicadores coloridos pueden ser usados con el empleo de las fibras ópticas o semiconductores basados en sistemas ópticos. Las fibras ópticas en sensores solo han sido diseñadas para usos fisiológicos (Peterson et al., 1980). Están constituidos por dos fibras ópticas, una fuente de luz y un detector al final de una de ellas y un colorante sensible al pH, como el rojo fenol al final de la otra. La luz de la lámpara de tungsteno se transmite por una fibra hasta el colorante y regresa por la segunda hasta un tubo fotomultiplicador. La inmovilización de una enzima como la glucosa oxidasa en la vecindad del colorante puede convertir el diseño en un biosensor. En 1983, Lowe et al., describieron un sensor optoelectrónico empleando glucosa oxidasa co-inmovilizada con el verde de bromocresol. La membrana estuvo en contacto con el líquido de la celda y el dispositivo completo ensandwichado entre un diodo emisor de luz (LED) y un fotodiodo con un amplificador integral. La salida del fotodiodo es directamente proporcional a la concentración de glucosa por arriba de 70 mM.

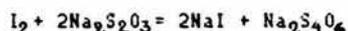
2.5.2.-Sensores basados en la detección de H_2O_2 .

Estos sensores tienen su principio en la reacción de la glucosa oxidasa con su sustrato, lo cual produce H_2O_2 . Este compuesto, a su vez puede ser reactivado para liberar una sal de sodio (Iodina). La

reacción es catalizada por molibdeno utilizando ioduro de potasio:



Cuando la reacción se efectúa con altas concentraciones de tiosulfato de sodio se produce una reacción hasta producir iodina:



En este caso el descenso en la concentración de tiosulfato se determina electroquímicamente y es proporcional a la concentración de glucosa (Mell y Malloy, 1975).

Malmstad y Pardue reportaron (1961) el análisis de glucosa con una reacción medida potenciométricamente. El H_2O_2 formado en la reacción de oxidación, se hace reaccionar con iodo en presencia de molibdeno para dar la sal iodina. Los cambios en la concentración de esta sal provocan cambios en el voltaje, que son detectados con un par de electrodos de platino. Los resultados se obtienen en uno o dos minutos y las concentraciones que puede medir en un volumen de 2 ml. son de 10 a 1000 $\mu\text{g}/\text{l}$. con un error de 1%.

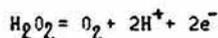
Pardue, (1963) reporta una determinación amperométrica de glucosa en 20 μl . de suero, plasma y sangre completa con tiempos de respuesta de 10 a 100 seg. Este método utiliza la misma secuencia de reacciones que Malmstad y Pardue, pero la velocidad de formación de la sal es medida amperométricamente con un electrodo de platino. Este mismo autor en 1964 desarrolla un método potenciométrico automatizado usando el mismo principio pero realizando las determinaciones en base a las pendientes observadas en las curvas de respuesta. El rango que

puede detectar es de 5 a 500 $\mu\text{g}/\text{l}$. con un error de 1.5%.

Guilbault et al., (1963) describen un método electroquímico basado en la oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa. Usando dos electrodos de platino con una corriente fija de 40 μA , miden el cambio del potencial en el ánodo provocado por el H_2O_2 formado en la reacción. Por este método se detectan de 4.15 a 45 mg. de glucosa en 25 ml. en un tiempo de 3 a 5 min. con una desviación del 1.5%.

Blaedel y Olson en 1964 miden glucosa en un sistema similar en el cual el H_2O_2 producido en la reacción, es oxidado por ferrocianuro y medido con un electrodo tubular de platino, en este método se tiene una respuesta lineal hasta 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. de glucosa, con un error menor al 1% pudiendose analizar 20 muestras por hora.

El método usado con mayor frecuencia para la detección de peróxido de hidrógeno en la medición de glucosa es el que se ha implementado para medición directa de la oxidación química ocurrida en la siguiente reacción:



En general estos métodos presentan ciertas ventajas sobre todo en los tiempos de respuesta, amplitud en los rangos de concentración sin necesidad de dilución. Sin embargo tienen algunas desventajas por el hecho de emplear la enzima en forma soluble, con la ayuda de las técnicas de inmovilización pueden lograrse ventajas adicionales en el diseño de dispositivos para la medición de glucosa y otros compuestos.

Clark en 1970 patentó un dispositivo basado en este principio el cual posteriormente fue comercializado por la compañía Yellow Springs Instruments de USA. La glucosa oxidasa es inmovilizada entre dos membranas y el peróxido de hidrógeno se mide amperométricamente a través de la oxidación de un electrodo de platino polarizado a + 700 mV. Una membrana externa de policarbonato se usa para eliminar el paso de moléculas grandes y para generar un sistema limitado por difusión, con las subsecuentes ventajas en la estabilidad y respuesta lineal (Nell y Malloy, 1975). Otra membrana de acetato de celulosa separa la capa enzimática del electrodo evitando al mismo tiempo el paso de moléculas más grandes que el peróxido de hidrógeno, como el ácido ascórbico el cual contribuye a la oxidación del ánodo. Una dilución 14:1 permite que la concentración de alguna sustancia de interferencia se reduzca hasta límites no detectables y se asegura que la concentración de oxígeno no sea una limitante para la reacción.

En 1972 Guilbault y Lubrano describen un electrodo enzimático similar en el que la glucosa oxidasa se inmoviliza entre membranas de celofán sobre un electrodo de platino. En este caso la respuesta cinética del electrodo permite reducir el tiempo de respuesta a doce segundos.

Fogt, et al., (1978) reportan un analizador en línea de glucosa midiendo el peróxido de hidrógeno electroquímicamente. Algunos trabajos tienen el objeto de desarrollar electrodos de glucosa implantables in vivo detectando peróxido de hidrógeno entre estos se encuentran los de Clark y Duggan (1982), Shichiri et al., 1982.

2.5.3.- Sensores basados en electrodo de oxígeno.

El consumo de oxígeno por la enzima glucosa-oxidasa en presencia de glucosa se puede medir fácilmente si se usa ya sea un electrodo polarográfico o galvánico de oxígeno. Clark y Lyons en 1962, sin conocer el término de electrodo enzimático, proponen el primer diseño de un sensor de glucosa. Ellos sugieren que una capa delgada de enzima soluble podía ser adherida a la superficie de un electrodo de oxígeno, usando membranas de diálisis para atrapar la enzima. La glucosa y el oxígeno pueden difundir al interior de la enzima soluble y provocar el consumo de oxígeno en la vecindad de la superficie del electrodo, lo cual proporciona una medición de la concentración de glucosa. Updike y Hicks en 1967 inmovilizan glucosa oxidasa en un gel de poliacrilamida (ellos proponen el término electrodo enzimático), montando el gel en un electrodo amperométrico de oxígeno, en su trabajo utilizan un electrodo "blanco" con enzima completamente desnaturalizada con el objeto de compensar las fluctuaciones no debidas a la glucosa.

Debido a que el electrodo de oxígeno del tipo de Clark es relativamente insensible a interferencias electroquímicas, este método es altamente sensible a los cambios en la tensión de oxígeno debidos a la reacción de la enzima. Con el electrodo de oxígeno se presenta una relación directa entre la cantidad de oxígeno consumido y la concentración de glucosa durante la oxidación. Keilin y Hartree (1948) reportan el análisis de glucosa sanguínea basados en este principio.

El electrodo polarográfico tipo Clark presenta facilidad de manejo y las muestras no requieren de ningún tratamiento antes de su

uso, tales como la desproteínización. Este método además presenta la ventaja de ser insensible a factores tales como sustancias reductoras, materiales coloridos, turbidez, etc. y es relativamente rápido.

Kadish y Hall (1965) reportan la determinación polarográfica de glucosa con un electrodo tipo Clark y la enzima glucosa oxidasa (Beckman Instruments, Fullerton, California, U.S.A.). En este método la concentración de glucosa se determinó en relación con la cantidad de oxígeno consumido de una muestra saturada continuamente con oxígeno.

Kajigihara y Hagihara (1965) describen la determinación polarográfica de glucosa en suero. Utilizan un electrodo de platino rotatorio equipado con un celda de vidrio diseñada para reducir la entrada de oxígeno atmosférico a niveles despreciables. La glucosa se determina con un error de 0.5% en 5 min. midiendo la cantidad de oxígeno consumido por la enzima, en presencia de catalasa.

Un electrodo de oxígeno del tipo Clark fue usado por Makino y Konno (1967) para determinar glucosa en sangre (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, Ohio U.S.A.). En este caso la hemoglobina se transforma en cianometahemoglobina por incubación de la sangre en una solución de ferricianuro y cianuro de potasio para eliminar la influencia de la hemoglobina sobre la medición del oxígeno consumido.

Makim y Warren en 1970 usando un electrodo modificado de oxígeno disuelto tipo Clark (Rank Bros., Bottisham, Cambridge, U.S.A.) analizaron glucosa en sangre tratada con nitrito de sodio para convertir a la hemoglobina activa en metahemoglobina sin necesidad de

usar catalasa para romper el H_2O_2 formado. En este caso la determinación de glucosa con 50 μ l. se lleva a cabo en 2 min.

Todos los métodos anteriormente descritos tienen la desventaja de usar la enzima soluble y por tanto son más susceptibles a interferencia por sustancias que presentan oxidación espontánea.

En 1972 Notin et al., reportan un biosensor para glucosa con la enzima inmovilizada en un gel de poliacrilamida montado sobre una membrana de acetato de celulosa y en la punta de un electrodo de oxígeno. Este sensor presenta un rango de respuesta de 0.2-11 mM de glucosa y tiene buena correlación comparado con un método colorimétrico.

Romette et al., 1979 usando una membrana enzimática especial con una solubilidad al oxígeno más alta que la de la solución acuosa, logra buena correlación con un método convencional de medición de glucosa detectando concentraciones por arriba de 14mM.

Se han descrito ejemplos de sensores de glucosa con electrodos de oxígeno no sólo usando enzimas sino también microorganismos. Sin embargo, en estos casos se han tenido problemas en la especificidad y tiempo de recuperación del estado de equilibrio del electrodo. Además, se logran rangos lineales muy cortos, de 0.01 a 0.1 mM (Karube et al., 1979).

En otros trabajos se ha intentado el análisis "in vivo" usando electrodos enzimáticos, en estos sensores se cuantifica glucosa midiendo la diferencia entre la tensión de oxígeno del electrodo enzimático y el electrodo de oxígeno de referencia. Se han reportado respuestas lineales hasta por arriba de 8.3 mM de glucosa (Layne et

al., 1976; Kondo et al. , 1982).

En algunos otros trabajos recientemente se ha reportado la miniaturización del electrodo de oxígeno por medio de técnicas de fotolitografía (Kondo, et al., 1982).

Los dispositivos electroenzimáticos que se encuentran disponibles comercialmente existen bajo diferentes principios de medición. Consecuentemente presentan distintas características de uso, que son observadas en los principales parámetros que se consideran para su empleo. Una comparación de los dispositivos enzimáticos disponibles a nivel comercial para la medición de glucosa puede observarse en la tabla 2.6.

2.5.4.-Sensores directos.

La detección de los sustratos o productos de la reacción de la glucosa oxidasa también puede hacerse por métodos directos, potenciométricos o amperométricos. Estos sensores usan la interacción directa de la enzima con el sistema electrónico con lo cual se puede lograr que el método mida directamente la corriente generada en el consumo de glucosa (Turner, 1983; Aston y Turner, 1984).

Se ha descrito un sensor que consiste de glucosa oxidasa y catalasa inmovilizadas sobre un electrodo de platino. Así se mide el potencial generado por la enzima y se compara con el de un electrodo "blanco". Existe una relación lineal entre la corriente y la concentración de glucosa que puede ser de hasta 8.3 mM. El mecanismo no se ha elucidado del todo pero al parecer se debe a la interacción entre el peróxido de hidrógeno y la superficie del platino (Wingar et al., 1979; 1983; 1983a).

Marca	Leeds	Yellow Springs	Technicon	Owen-Illinois
Característica	Northrup	Instrument		(Kimble)
Método	Equilibrio	Cinético	Cinético	Equilibrio
Enzima	Glucosa oxidasa	Glucosa oxidasa catalasa(soluble)	Hexokinasa	Glucosa oxidasa
Detector	Amperométrico (H ₂ O ₂)	Amperométrico (H ₂ O ₂)	Espectrofotométrico 340 nm	Amperométrico (H ₂ O ₂)
Muestras analizadas/h	-----	20-30	150	60
Precisión	1% 0-50ppm	1.3 mg/dl	2%	1%

Tabla 2.6.- Características de los instrumentos comerciales para medición de glucosa.

CAPITULO 3

Objetivos.

General.

- 1.- Desarrollo de un dispositivo electroenzimático sensible a glucosa.

Particulares.

1. Desarrollar una metodología eficaz para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4.) de Aspergillus niger, en un soporte adecuado y versátil.
2. Demostrar el principio funcional del electrodo enzimático empleando un electrodo de oxígeno o bien uno de peróxido de hidrógeno.
3. Establecer las condiciones de operación y las características de respuesta del sistema.
4. Evaluar el electrodo enzimático como técnica de medición de glucosa, en relación a un método convencional.

CAPITULO 4

Materiales y Métodos.

4.1.-Materiales.

4.1.1.- Reactivos.

Durante el desarrollo de la parte experimental se emplearon los siguientes reactivos:

Nombre comercial	Procedencia
Acido bórico	J.T. Baker
Acido clorhídrico	J.T. Baker
Albúmina	Sigma Chemical, (A-7906)
Carbonato de sodio	J.T. Baker
Etilendiamina	J.T. Baker
Fosfato de potasio dibásico	J.T. Baker
Fosfato de potasio monobásico	J.T. Baker
Glucosa	Sigma. Chemical (G-5250)
Glutaraldehido (GTA)	E. Merck
Hidróxido de sodio	J.T. Baker
Kit para glucosa	Sigma Chemical (S10-A)
Membranas de diálisis benzoiladas (corte de 2000)	Sigma Chemical (D-7984)
Membranas de diálisis:	
(corte 8000 y espesor de 9 um,	Spectrapor
corte 1000 y espesor de 8 um,	Spectrapor
corte 8000 y espesor de 8 um)	Spectrapor

Poli-etilenimina (PEI)	Sigma Chemical (P-3143)
Reactivo de Fenol Folin Ciocalteu	Sigma Chemical, México (F-9252)
Sulfato de cobre	J.T. Baker
Tartrato de sodio y potasio	J.T. Baker

4.1.3.- Equipo.

El equipo que se utilizó para el desarrollo experimental se encuentra en la lista siguiente:

Equipo	Especificación
Agitador magnético (parrilla)	Corning Stirrer PC-353
Agitador mecánico de rotación vertical	U.N.A.M. (CEINGEBI)
Balanza analítica	Bosh, S-2000
Baño de incubación con agitación	New Brunswick Sci.Co.Inc. modelo G-85
Colorímetro	Spectronic 20, Bausch & Lomb, Co.
Controlador de temperatura	Colona Messtechnik GMBH.
Cronómetro	Hanhart 1012 0101
Electrodo de oxígeno disuelto (Clark)	New Brunswick Sci.Co.Inc. M-1016-5050
Medidor de oxígeno disuelto	Centro de Instrumentos U.N.A.M.
Medidor de pH (potenciómetro)	Corning, Co. Modelo 125

4.1.3.- Enzimas.

Se usaron las siguientes enzimas:

Enzima.	Procedencia.
Catalasa de <u>Aspergillus niger</u>	Sigma Chemical C-3515
Catalasa de hígado bovino.	Sigma Chemical C-10
Glucosa-oxidasa (GOX) Tipo V de <u>Aspergillus niger</u> .	Sigma Chemical G-6500
Glucosa-oxidasa-Peróxidasa	Sigma Chemical kit-510-A

4.1.4.-Soportes.

Los soportes usados en este trabajo fueron los siguientes:

Soporte procedencia

Nylon (6) tipo A Celanese Mexicana, S.A.

Nylon (6) tipo B Celanese Mexicana, S.A.

Nylon 150 (serigrafía) PROBST de Mexico, S.A.

4.2.-Métodos.

4.2.1.-Técnicas analíticas.

4.2.1.1.- Cuantificación de proteína.

Se usó el método de Lowry et al (1951), para cuantificar la cantidad de enzima inmovilizada como proteína total. Este es uno de los métodos más sensibles para medir proteína. Se basa en el color desarrollado por el reactivo de Folin en una mezcla a la que se ha dado un tratamiento alcalino. La coloración final es el resultado de una reacción de Biuret, de la proteína (en este caso la enzima) con el ion Cu^{2+} en alcali y una reducción final del reactivo fosfotungstico fosfomolibdico por el triptofano y la tirosina de la proteína.

Procedimiento . (De acuerdo a Bautista, 1983).

Previamente se deben preparar las siguientes soluciones:

Solución A= 2 % de Na_2CO_3 con Na OH al 0.1 N.

Solución B= $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 1%

Solución C= $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ al 1%

Reactivo D= Solución C + Solución B , 1:1

Reactivo E= 1 ml. del reactivo D con 50 ml. de la solución A,
si se prepara al momento no necesita decantarse.

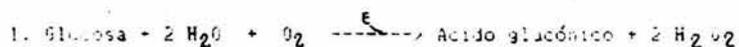
Reactivo de Folin: Se diluye con agua destilada en una
relación 1:1.

En tubos de ensayo de 10 x 15 mm. se toman de las muestras problema 0.5 ml. y se diluyen 1:10 con agua destilada, de ahí se toman alícuotas de 1 ml por duplicado y se colocan en nuevos tubos de ensayo. Posteriormente se añaden 5 ml del reactivo E y se dejan reposar 10 minutos, enseguida se añaden 0.5 ml del reactivo de Folin y se mantienen en reposo durante 30 minutos. Después las muestras son leídas a 590 nm contra un blanco de reactivos. La curva de calibración se hace partiendo de una solución de 1 mg/ml de albúmina para tener concentraciones de 20,40,60,80 y 100 µg/ml aforando con agua destilada.

Una curva típica se presenta en la figura 3.1. El coeficiente de correlación lineal no es menor de 0.99.

4.2.1.2.-Medición de glucosa.

El método convencional usado para medir glucosa y comparar sus resultados con el electrodo enzimático, fue el método de la enzima glucosa oxidasa soluble de Sigma (Kit Sigma 510-A). Este proceso se basa en las reacciones siguientes:



La coloración café es medida a 450 nm. y es proporcional a la concentración de glucosa.

Procedimiento: (En base al instructivo del kit de Sigma)

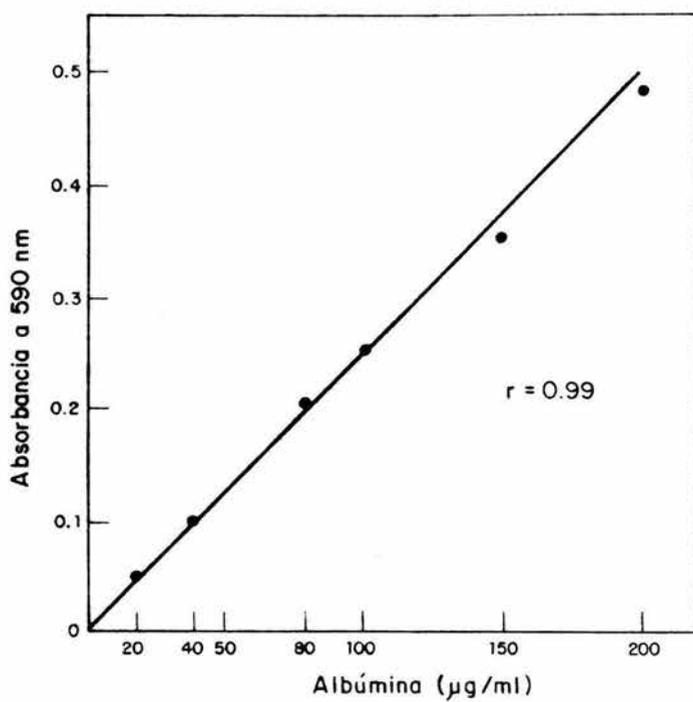


Fig 3.1 Curva típica de proteína (método de Lowry)

I. Preparar solución A.

1.- Adicionar el contenido de una cápsula a 100 ml. de agua destilada y colocar en frasco ambar.

2.- Agitar homogéneamente y almacenar, ya sea entre 0° C y 4° C, con lo cual la preparación es estable por un mes, en el congelador a - 20° C es estable por lo menos 6 meses.

II. Preparar solución B .

Preparación de O-dianisina dihidroclorada Sigma stock S10-50.

En un vial conteniendo 50 mg. de O-dianisidina agregar 20 ml. de agua destilada. Esta solución es estable por tres meses en refrigeración.

III. Preparación de solución C.

A 100 ml. de la solución A, agregar 1.6 ml. del reactivo colorido (Solución C).

En tubos de ensaye de 10 ml. usando pipetas serológicas, colocar para el blanco 0.5 ml. de agua. Para el estandar usar 0.5 ml. de la solución estandar previamente diluida 1:19 con agua destilada (El estandar contiene 100 mg./dl). Para cada una de las muestras problemas tomar 0.5 ml. y llevarlos a tubos de ensaye agregar 2 ml. de la solución enzimática C. Mezclar e incubar durante 35 min. a 37° C, finalmente leer a 450 nm.

El cálculo de la concentración de glucosa en mg/dl. se efectúa con la ecuación siguiente:

$$\text{mg/dl de glucosa} = \frac{\text{lectura de la prueba}}{\text{lectura del estandar}} \times 100$$

4.2.2.- Procedimientos experimentales.

4.2.2.1.-Inmovilización.

Una vez establecido el soporte y la forma física en que se utilizaría (malla de nylon), se procedió a la adecuación de la técnica de inmovilización. El procedimiento final usado para la activación e inmovilización es original de este trabajo pero tiene sus bases en el proceso que se emplea para la activación de tubos de nylon reportado por Salleh (1982).

La técnica de inmovilización adaptada a las condiciones fisicoquímicas del soporte usado en este trabajo consistió en los pasos experimentales que se describen a continuación. En primer lugar, las mallas de nylon fueron cortadas en forma circular con un radio de aproximadamente 0.6 cm. Cada una de las mallas así cortadas se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. En cada matraz se adicionaron 5 ml. de HCl 1 M y se mantuvieron en agitación por 5 min. y a temperatura ambiente, cuidando que las mallas no se adhirieran a la paredes del matraz puesto que se evita su contacto con el ácido. Transcurrido el tiempo de tratamiento, cada malla se lavo con agua destilada usando una piceta. Posteriormente se adicionaron en cada matraz 8 ml de glutaraldehído al 18.5 % en amortiguador de boratos

0.74 M, pH 9. En seguida se colocan en un baño de incubación, en el cual se mantuvieron durante 15 min, en agitación a 200 rpm y a 90°C. A su término las mallas son lavadas con agua destilada hasta eliminar el exceso de glutaraldehído. A cada matraz con su respectiva malla, se adicionan 10 ml de una solución de polietilenimina al 10 % en agua destilada y se mantienen durante 2 horas en agitación a 37°C. Las mallas se lavan con agua y son tratadas nuevamente con glutaraldehído al 5 % en amortiguador de boratos 0.2 M a pH de 8.5 durante 15 minutos y a 90°C. Transcurrido este lapso, las mallas son lavadas con amortiguador de boratos 0.25 M a pH de 8.5 y son enfrentadas con la enzima glucosa oxidasa.

El enfrentamiento se realiza colocando las mallas en un tubo de ensaye conteniendo 2.4 ml de amortiguador de boratos 0.2 M, pH de 8.5 y agregando 0.6 ml de la enzima solubilizada previamente en amortiguador de boratos 0.2 M pH de 8.5 de tal forma que la concentración final de la enzima sea de 1 mg/ml. Esta última mezcla determina la relación de 1:1.3 de enzima/soporte (p/p). El enfrentamiento se lleva a cabo durante 18 horas a 4°C, montando cada uno de los tubos en un agitador de rotación vertical como se observa en la figura 4.2. Durante el enfrentamiento fue necesario agregar el sustrato en el amortiguador para proteger a la enzima, esta protección se debe a que la enzima mantiene su sitio catalítico con el sustrato y evita la inmovilización en este sitio. La concentración usada fue de 1.056 mM de glucosa, tomando en cuenta el tiempo de enfrentamiento (18 horas) y la actividad de la enzima. De tal forma que esta mantenga su sitio activo ocupado durante todo el tiempo de enfrentamiento. Con esta concentración tan baja, las condiciones del enfrentamiento no sufren alteración. Transcurrido el tiempo de

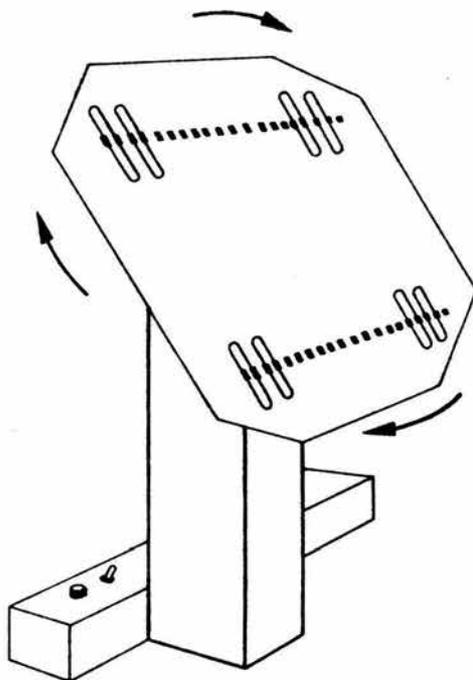


Fig 4.2 Dispositivo usado para el enfrentamiento enzima/soporte

enfrentamiento para eliminar el exceso de enzima no enlazada, las mallas son lavadas con amortiguador de boratos 0.2 M, pH 8.5 . Posteriormente se almacenan en tubos de ensaye con 3 ml de amortiguador de boratos pH 8.5 y se mantienen en refrigeración hasta su utilización.

4.2.2.2.- Operación del sistema del electrodo enzimático.

El sistema de medición del electrodo enzimático para glucosa se observa en las figuras 4.3 y 4.4. La parte fundamental, que es el biocatalizador, lo constituye una malla de nylon con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada covalentemente. El transductor electroquímico usado en este caso fue un electrodo de O_2 tipo Clark. Este electrodo enzimático es conectado a un sistema de registro o medidor de O_2 disuelto, el cual proporciona una lectura en corriente (μA). Puesto que la enzima requiere de una temperatura adecuada para su funcionamiento, se empleo un sistema de control de temperatura (thermomix) el cual se calibró a $37^\circ C$.

Como se observa en la figura 4.4, la malla de nylon es colocada en contacto con la superficie sensible del electrodo de oxígeno junto con la membrana de tubos de diálisis benzoilados, la cual se coloca en la parte más externa, ambas son aseguradas con un anillo de hule y un adaptador de teflon construido especialmente para el sistema.

En vasos de precipitados de 100 ml se colocaron 29 ml de un amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH de 7. El sistema requiere de un agitador magnético graduable en r.p.m., para asegurar una agitación adecuada. En cada medición se fijo la velocidad en aproximadamente 300 r.p.m. equivalente al número 3 en la perilla. Para mantener siempre las mismas condiciones, el electrodo enzimático se mantenía siempre a una distancia constante del magneto, cuyo diámetro fue de 0.7 cm. Ver detalles en la figura 4.4.

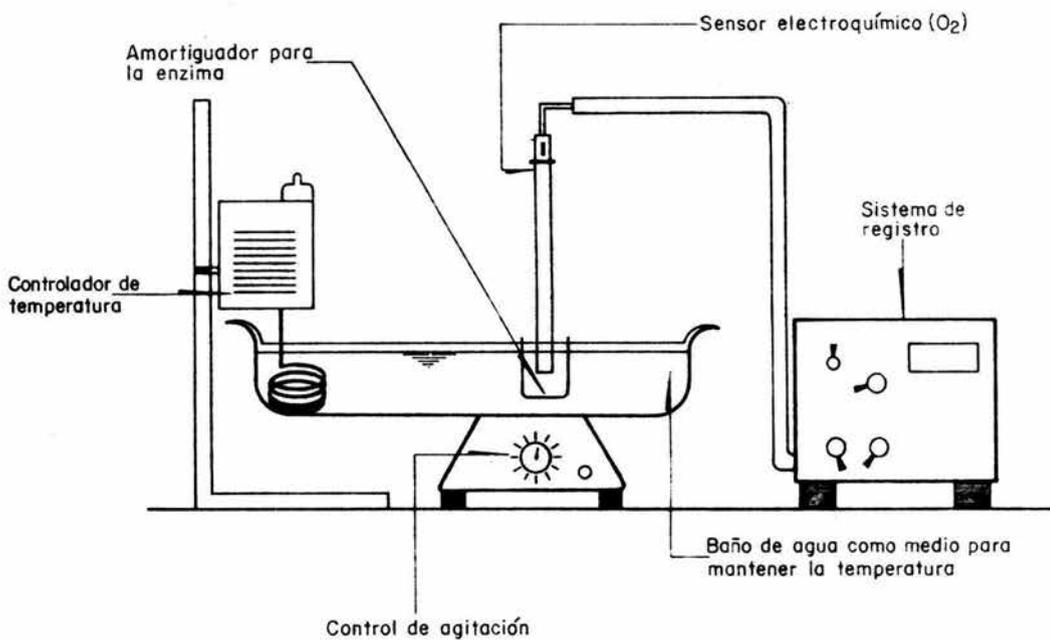


Fig 4.3 Sistema de medición del electrodo enzimático

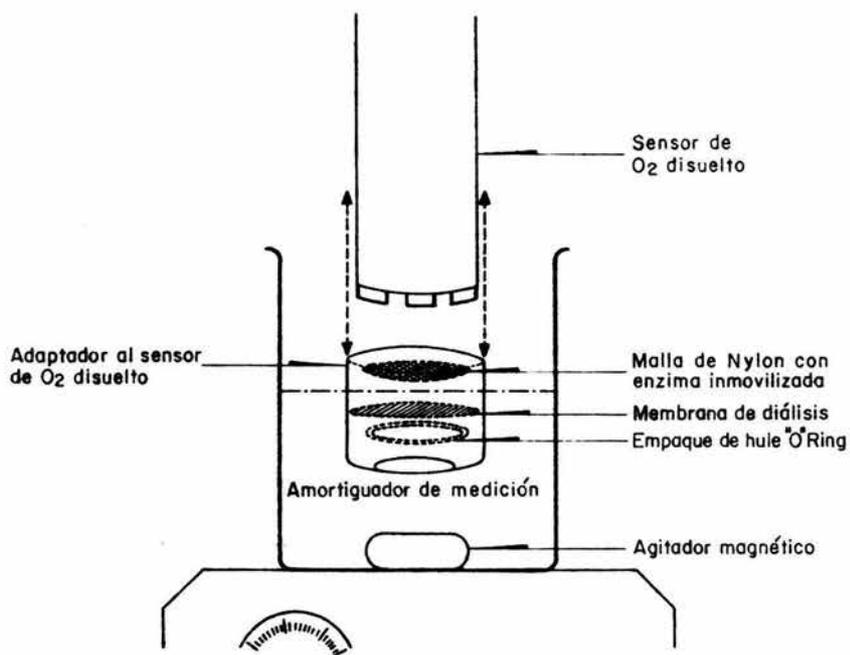


Fig 4.4 Sistema de montaje de las membranas de diálisis y de la malla de Nylon al sensor de O_2 para la construcción del electrodo enzimático

4.2.2.3.- Curvas de respuesta a glucosa.

Estas curvas fueron determinadas probando diferentes concentraciones de glucosa en el electrodo enzimático. Las muestras conocidas se prepararon pesando la glucosa en la balanza analítica y diluyendo cada concentración en 10 ml. de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH de 7.0. De esta manera, al tomar 1 ml. y colocarlo en los 29 ml. del mismo amortiguador dispuestos para la medición, correspondieria a 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 mg/l. Las curvas de respuesta se construyeron midiendo la corriente de salida del electrodo contra el tiempo (Entre 1 y 4 minutos, medidos con un cronómetro). A partir de estas curvas se construyeron las curvas estandar de calibración, considerando ya sea el valor de la pendiente entre dos puntos preestablecidos en el tiempo ó bien el valor del equilibrio cuando la corriente de salida es constante respecto al tiempo, ver figura 4.5 (a) y 4.5 (b).

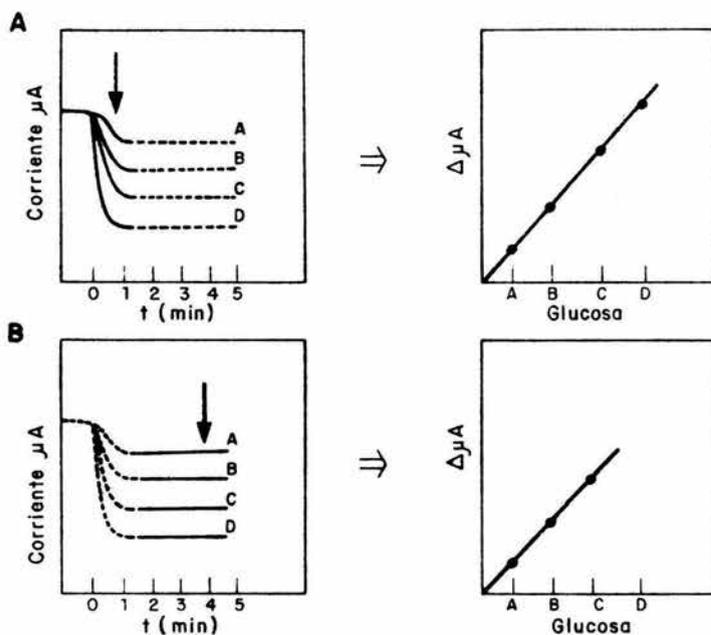


Fig 4.5 Curvas de respuesta y curvas de calibración considerando la pendiente entre dos puntos después de un minuto de reacción (A) y el valor del equilibrio de reacción cuando la corriente de salida es constante (B)

CAPITULO 5.

Resultados y discusión.

5.1.-Experimentos preliminares de activación del soporte.

El primer objetivo del trabajo fue el desarrollo de un método de inmovilización eficaz para la enzima glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4.) de Aspergillus niger sobre mallas de nylon.

Tomando en cuenta que los trabajos de inmovilización de esta enzima se han realizado en su mayoría en tubos de nylon y en este caso se trata de mallas, se hicieron experimentos con el objetivo de contar con un proceso adecuado de inmovilización para este soporte.

Salleh (1982), describe un método de inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre la superficie interna de tubos de nylon. Este tratamiento requiere del agente bifuncional glutaraldehído y de polietilenimina. Las condiciones usadas para el tratamiento de los tubos de nylon mediante el método de Salleh incluye las siguientes:

Un tratamiento con glutaraldehído al 18.5% en amortiguador de boratos a pH 8.0, durante 15 minutos a 60°C. Posteriormente, un tratamiento con polietilenimina al 10 % en agua durante 2 horas. Después de ello un tratamiento con glutaraldehído al 5 % en amortiguador de boratos 0.25 M durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente el enfrentamiento con la enzima, llevado a cabo durante 3 horas a 4°C.

Estas condiciones fueron inicialmente probadas y optimizadas en dos mallas de nylon comercial (Nylon A y B). En estas mallas se

hicieron variaciones de uno o más parámetros involucrados en el proceso de activación. La figura 5.1 muestra la estrategia inicial seguida para su activación.

Antes de llevar a cabo inmobilizaciones con la enzima se probó una proteína de menor costo, la albúmina, con el fin de no desperdiciar enzima en estos primeros ensayos. Debido al hecho de no contar aun con la polietilenimina, esta fue sustituida temporalmente por etilendiamina.

Los resultados de estos experimentos iniciales se presentan en la figura 5.2 Como se puede observar, el nylon A con los tratamientos de glutaraldehído y glutaraldehído más etilendiamina a 90 °C, presentó mejores características como soporte, que el nylon B. El tratamiento en que se utilizó únicamente un tratamiento con glutaraldehído, fue realizado con el fin de observar las características de inmobilización obtenidas y tratar de eficientar el proceso, para evitar el empleo de la etilendiamina o en su caso de la polietilenimine. Resultados posteriores indicaron la necesidad de estos compuestos para lograr una mayor cantidad de enzima inmobilizada en las mallas de nylon.

Con el nylon tipo A se logró inmobilizar 64.6 mg de proteína por gramo de nylon, mientras que en el caso del nylon B, el valor más alto fue de 34.4 mg de proteína por gramo de nylon. Lo anterior se puede deber principalmente a las diferencias en el tamaño de la malla de cada una de las mallas probadas. La malla de nylon A presenta un arreglo de hilos más cerrado que el nylon B, es decir que, bajo la misma unidad de peso en el tipo A se puede disponer de mayor área de enlace comparado con el nylon B. Esta puede ser la causa principal de

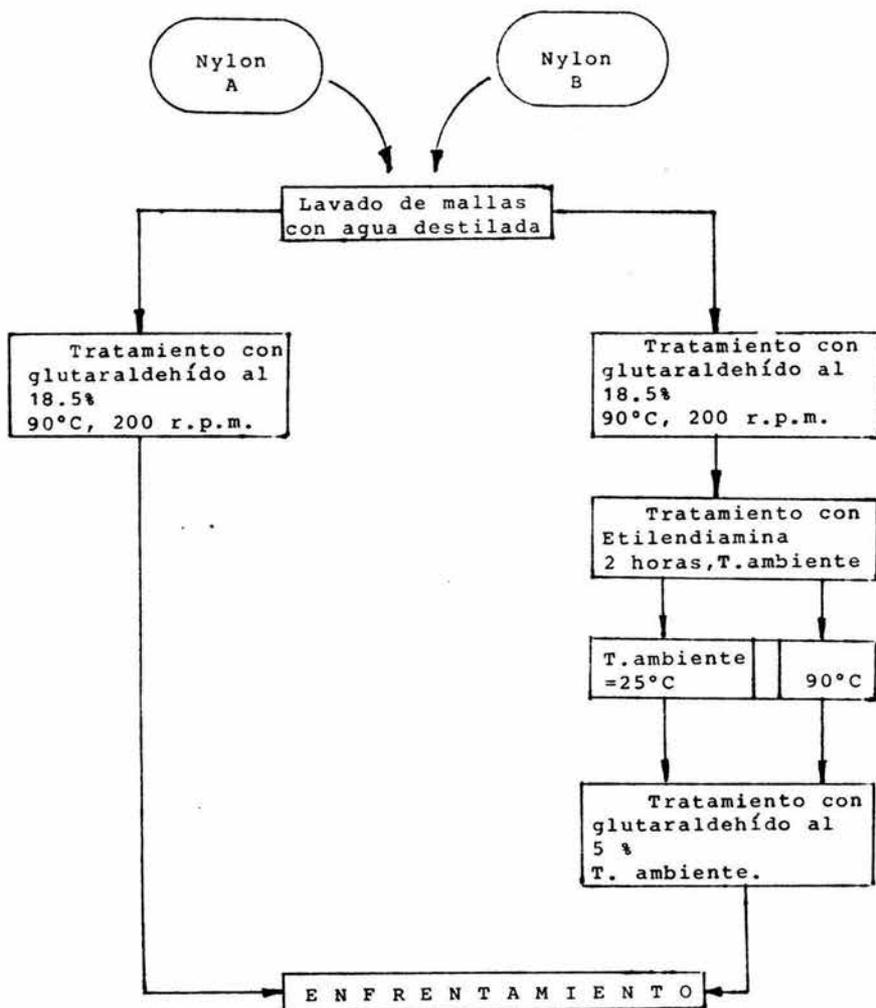


Figura 5.1.- Estrategia inicial seguida en la búsqueda de una técnica adecuada de inmovilización en mallas de nylon.

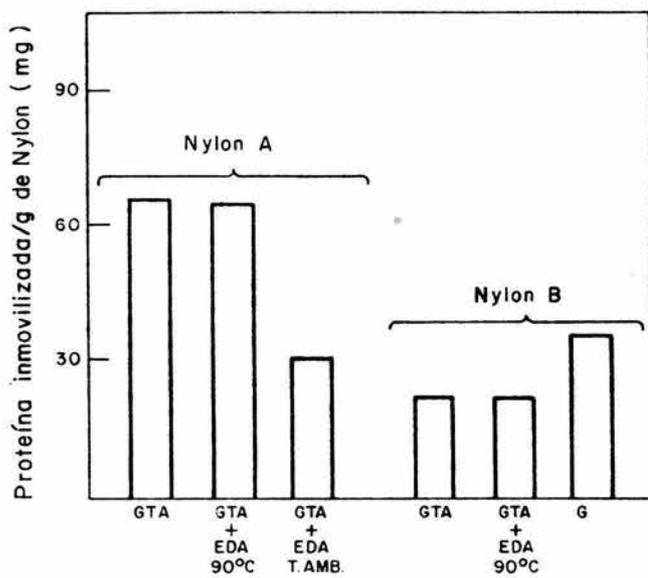


Fig 5.2 Inmovilización de albúmina en mallas de Nylon A y B con diferentes tratamientos

que en el nylon tipo A se logra un 50 % más de proteína inmovilizada. A partir de estos resultados se desechó el nylon E para los experimentos posteriores.

5.2.-Hidrólisis parcial del nylon.

Con el objeto de exponer mayor cantidad de grupos funcionales reactivos disponibles del nylon para la inmovilización de enzimas, se intentó una hidrólisis con HCl de acuerdo a lo reportado (Inman y Hornby, 1974; Hornby y Goldstein, 1976). Con esta base se establecieron las condiciones más adecuadas para un lavado con HCl de las mallas de nylon.

Las concentraciones reportadas están en un rango de 3.5 a 4.6 M de HCl. Los primeros experimentos se realizaron con estas concentraciones y como resultado se obtuvo una completa hidrólisis de las mallas. Estos resultados obligaron a realizar experimentos variando las concentraciones de HCl, así como los tiempos de exposición para el tratamiento del nylon A, de acuerdo al diseño mostrado en la figura 5.3

En la inmovilización inicial, el nylon A mostró que puede acoplar hasta 64.6 mg de proteína por gramo de nylon en aquellos tratamientos en que se usó glutaraldehído (GTA) y GTA + EDA a 90°C. En los experimentos siguientes, con el nylon A, se probaron concentraciones de 1, 2 y 3 M de HCl a diferentes tiempos de exposición. Se obtuvieron los resultados que se presentan en la figura 5.4. En este caso el lavado con el HCl 1 M durante 15 minutos alcanzó un valor máximo de inmovilización de 94.8 mg de proteína por gramo de nylon lo que significó un 57 % más de proteína acoplada

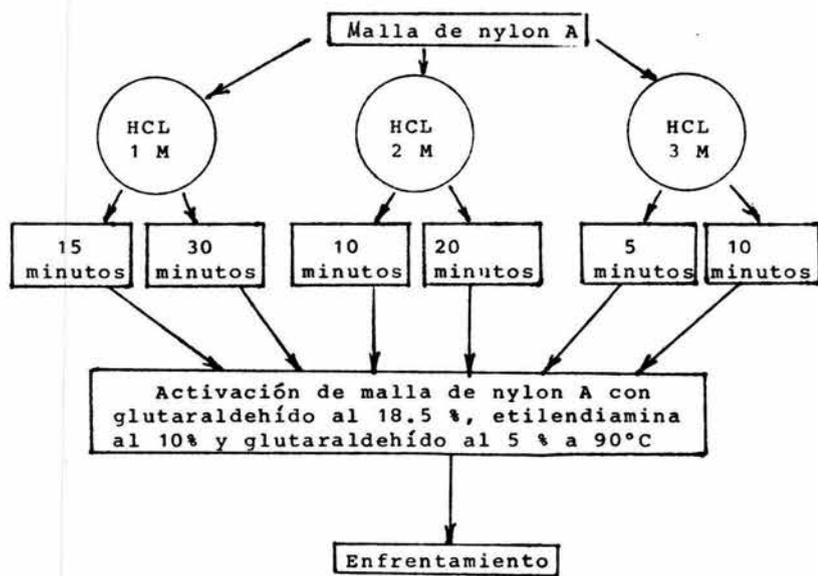


Figura 5.3 .- Diseño seguido en la búsqueda de la concentración y tiempo óptimos del lavado previo de las mallas de nylon tipo A.

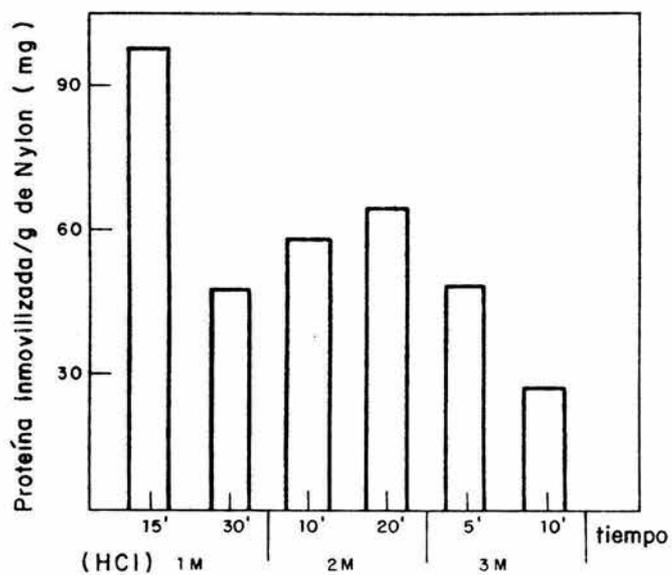


Fig 5.4 Resultados observados de los distintos lavados de las mallas de Nylon tipo A

respecto a las condiciones iniciales. A partir de estos resultados, se decidió mantener la concentración de HCl fija (1 M) y se efectuaron experimentos para eficientar el tiempo de exposición. En la figura 5.5 se observa que a los 5 min. de exposición al ácido, se obtiene el máximo de proteína inmovilizada y el nylon no sufre depolimerización apreciable. Los valores más bajos se presentan a los 10 minutos, aunque a los 15 minutos se logra una inmovilización similar a la obtenida a los 5 minutos, las características físicas de las mallas se ven alteradas puesto que comienza a ser visible la depolimerización del nylon. Por esta razón se tomó el tiempo de 5 minutos de lavado con HCl, como el mejor para su tratamiento.

Con estos resultados se llegó a establecer el primer diseño del proceso de inmovilización: lavado previo de las mallas con HCl 1 M durante 5 minutos, tratamiento de glutaraldehído al 18.5 % en amortiguador de boratos 0.74 M, pH 9.0, durante 15 minutos a 90° C, tratamiento con etilendiamina al 10 % en agua durante 2 horas a 37° C y finalmente un tratamiento con glutaraldehído al 5 % en amortiguador de boratos 0.25 M, pH 8.5, durante 15 minutos a 90° C. (figura 5.6). En este proceso inicial se usa etilendiamina en sustitución de la polietilendiamina cuya ventaja en el proceso es la de proporcionar un aumento en el área de enlace de la enzima por ramificación del complejo glutaraldehído-etilendiamina enlazado al soporte.

5.3.- Inmovilización de glucosa oxidasa.

Siquiendo en el establecimiento de un método adecuado para la inmovilización en mallas de nylon tipo A, una vez disponible la polietilendiamina, se substituyó a la etilendiamina y se iniciaron los experimentos en que ya se usó la enzima glucosa oxidasa en lugar de

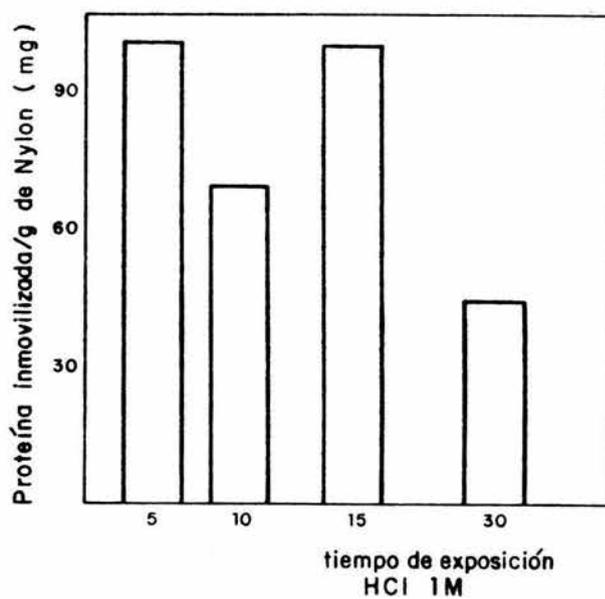


Fig 5.5 Resultados observados en la optimización del tiempo de lavado de las mallas de Nylon

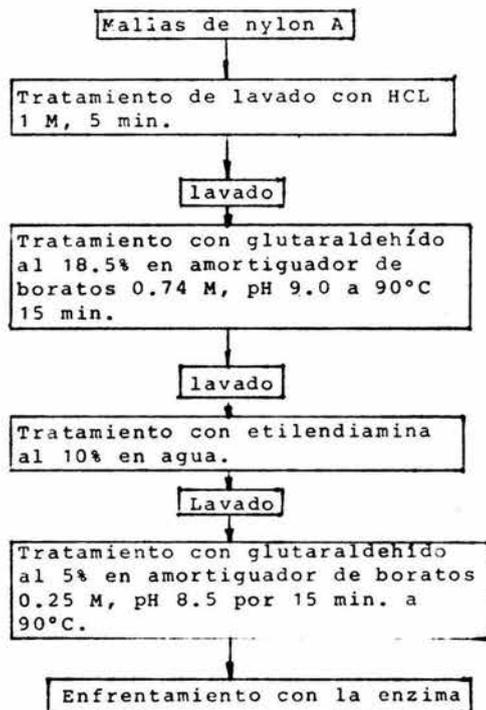


Figura 5.6 Proceso inicialmente probado para la inmovilización empleando etilendiamina e inmovilizando albúmina.

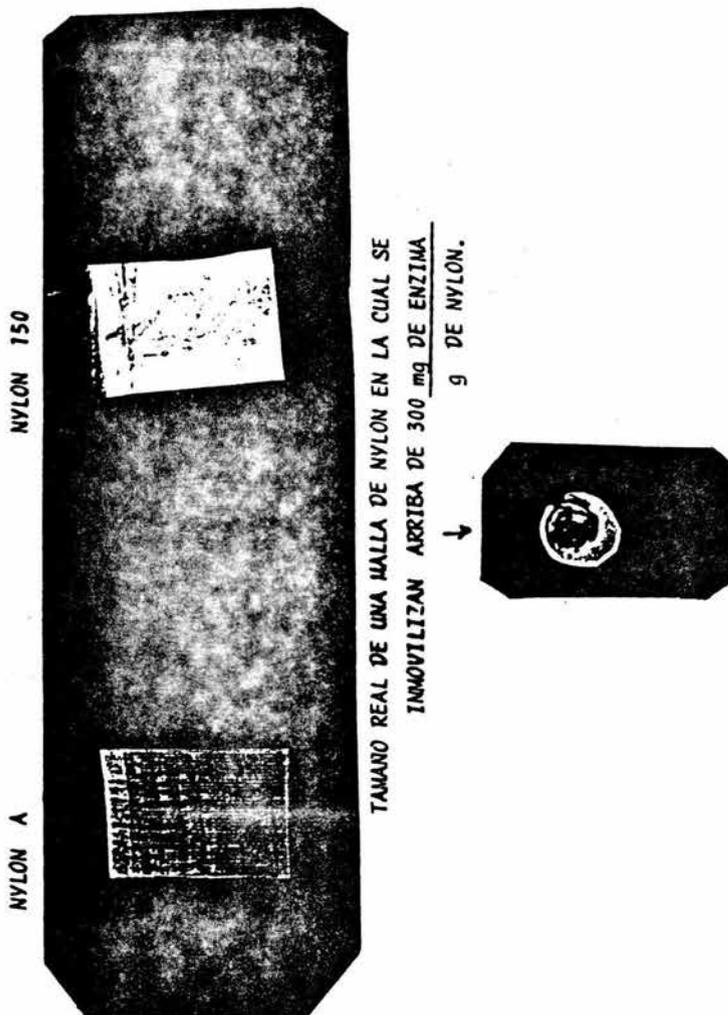
la albúmina. Como resultado se logró desarrollar una técnica de inmovilización para mallas de nylon tipo A mostrada en la figura 5.7. Esta técnica, como puede verse, sólo difiere de la inicialmente usada en este trabajo por el uso de la polietilenimina como elemento de entrecruzamiento con el glutaraldehído para lograr mayor superficie de enlace disponible a la glucosa oxidasa.

Con el método de inmovilización establecido para mallas de nylon tipo A se inmovilizó la glucosa oxidasa obteniéndose los resultados que ilustra la tabla 5.1. En promedio se lograron 80 mg de enzima por gramo de nylon tipo A. 16 mg menos que en el caso de inmovilizar albúmina. Este fenómeno se debe muy probablemente a que son moléculas diferentes.

En una última etapa del desarrollo de la metodología de inmovilización se hicieron pruebas en un tipo de nylon utilizado en trabajos de serigrafía (Nylon 150). Este otro tipo de nylon se decidió usar por las ventajas que representa en cuanto a la superficie de enlace disponible para la enzima debido fundamentalmente al número de hilos por centímetro cuadrado que en el caso del nylon 150 es sensiblemente mayor al del nylon A, ver foto 1.

Con el nylon 150 se lograron entre otras ventajas; el poder usar un menor tamaño de malla sin alterar el sistema debido a que la superficie sensible del electrodo de oxígeno es cubierta totalmente por la malla enzimática. Las mallas fueron de 12 mm de diámetro y un peso de 4.6 mg. En este caso aun cuando es menor tamaño de malla

FOTO 1.- SOPORTE USADO PARA LA INMOVILIZACION.



TAMANO REAL DE UNA MALLA DE NYLON EN LA CUAL SE
INMOVILIZAN ARRIBA DE 300 mg DE ENZIMA
g DE NYLON.

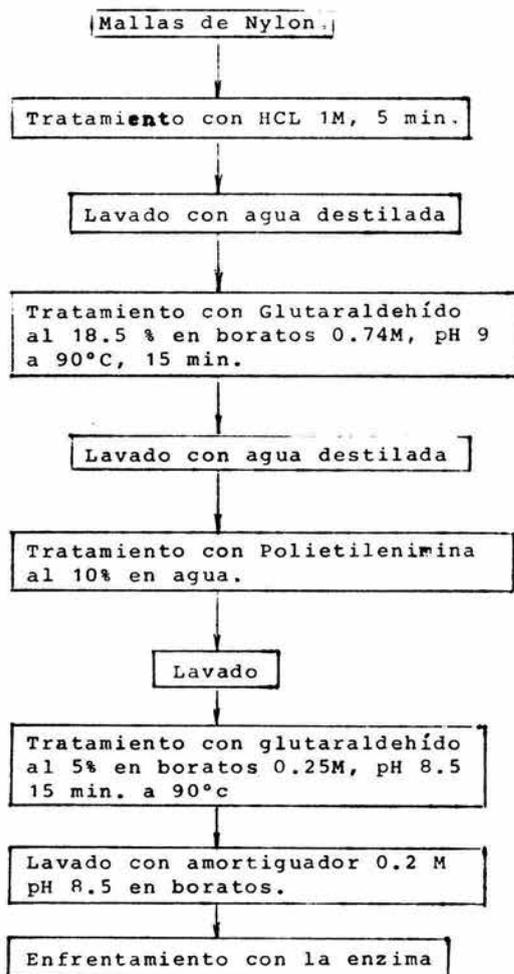


Figura 5.7.- Proceso usado como el más adecuado para la inmovilización empleando polietilenimina y glutaraldehído.

Nylon	Proteína inmovilizada (mg)	$\frac{\text{Proteína inmovilizada (mg)}}{\text{g de nylon}}$	% de Proteína inmovilizada.
A	0.96 ± 0.1	83.4 ± 8.0	45.4
150	1.75 ± 0.05	384.7 ± 10.8	40.6
Condiciones	Nylon A	Nylon 150	
Tratamiento	HCL-GTA-PEI-GTA	HCL-GTA-PEI-GTA	
Volumen de enfrentamiento	5 ml.	3 ml.	
Relación enzima/soporte	1:4	1:1.3	
Enzima total	3.0 mg.	3.0 mg.	
Tiempo de enfrentamiento	18 hrs.	18 hrs.	
Temperatura	4°C	4°C	

Tabla 5.1.- Inmovilización en nylon A y nylon 150.

comparada con las mallas iniciales usadas en este trabajo de 2 x 2 cm se logra mayor área de enlace y por tanto más enzima inmovilizada. Evitándose el uso de enzima no útil en una malla de mayor tamaño, es decir aquella que no puede estar en contacto con toda la superficie sensible del electrodo de oxígeno. Cuando se usaron mallas de nylon más grandes 2 x 2 cm la superficie sensible del electrodo, presenta una zona no útil, "área de desperdicio", constituida por aquella malla que no está en contacto directo con el área sensible del sensor de oxígeno disuelto. En relación con otros soportes, esta área es significativamente menor, puesto que en el único reporte que emplea mallas de nylon para el desarrollo de un inmunosensor para insulina (Mattiason et al, 1977), el área que requieren es de 3 x 7 cm. Cuando se han usado tubos de nylon la mínima longitud usada ha sido de 3 m.

En una serie de experimentos en el enfrentamiento en los cuales se probaron concentraciones de enzima que nos proporcionan las relaciones 1:4, 1:3 y 1:1.3 de enzima/suporte, se observó que con la relación 1:1.3 g/g se lograron resultados con los cuales se evitó al máximo el desecho de enzima soluble no inmovilizada, sin alterar los valores alcanzados como adecuados en el proceso de inmovilización.

En resumen, el nylon 150 pudo ser usado en menor tamaño y en forma circular con un diámetro de 12 mm. y un peso de 4.6 mg. En relación al tamaño, peso y concentración de enzima usada en el enfrentamiento, se observó que la relación enzima-suporte que ofreció mejores resultados fue la de 1:1.3. g/g.

Como se puede observar en la tabla 5.1 y en la figura 5.8 con el nylon 150 se logró aumentar los niveles de glucosa oxidasa inmovilizada hasta tres veces respecto al nylon tipo A. Mientras que

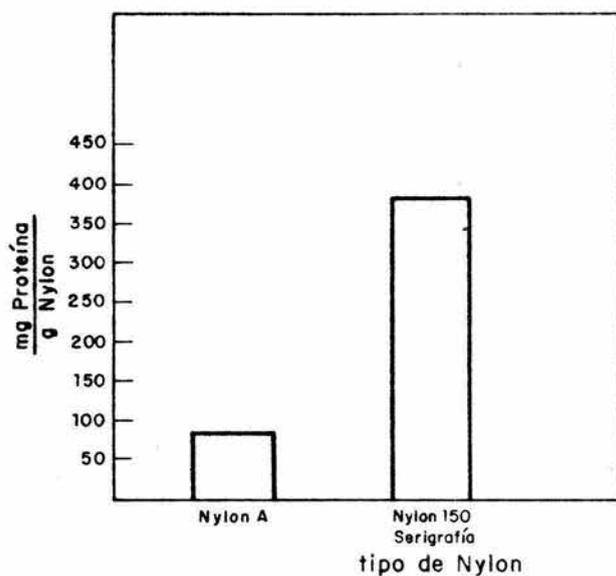


Fig 5.8 Comparación de la inmovilización de glucosa-oxidasa en Nylon A y Nylon 150

en el nylon tipo A se lograron inmovilizar 83 ± 8.8 mg de enzima por gramo de nylon, en el nylon 150 se alcanzó a inmovilizar 385 ± 10.8 mg de enzima por gramo de nylon. Con estos resultados se logró cubrir el primer objetivo particular de esta tesis, teniendo finalmente la metodología para la activación e inmovilización en mallas de nylon que se describe en la figura 5.8. Las mallas construidas en estas condiciones se probaron en el sistema de medición.

En la primera etapa del proceso de inmovilización se produce una depolimerización parcial del nylon, por rompimiento de los enlaces amida secundarios del nylon lograda por la acción de HCl. Este rompimiento produce grupos alifáticos amino y carboxílicos, estos grupos se activan al reaccionar con el agente bifuncional glutaraldehído en condiciones alcalinas. Con este complejo entre el nylon y el glutaraldehído se tiene un sistema que puede enlazar enzimas covalentemente, sin embargo para aumentar el área de enlace se emplea un tratamiento con polietilenimina. Este tratamiento produce un desequilibrio favorable a los grupos amino disponibles para el enlace de la enzima, por lo cual un nuevo tratamiento con una solución ligera de glutaraldehído, además de lograr una proporción equivalente entre los grupos amino y carboxilo, proporciona un complejo dado por soporte glutaraldehído + polietilenimina + glutaraldehído el cual forma una especie de "cadena" que a su vez aumenta el área de enlace de la enzima. Lo anterior se ilustra esquemáticamente en la figura 5.9

5.4.-Actividad de la enzima inmovilizada.

Una vez establecido el método de inmovilización, las mallas fueron adaptadas al sensor de oxígeno disuelto. Las concentraciones

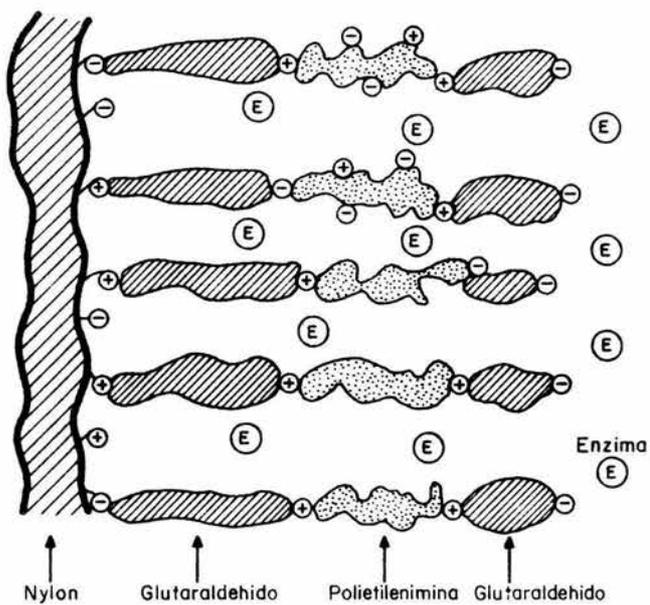


Fig 5.9 Esquematización del complejo Nylon+Glutaraldehído +PEI+ Glutaraldehído

de glucosa probadas se establecieron de acuerdo con los niveles normales de glucosa en sangre, es decir 70-110 mg./dl. o bien de 80-120 mgr/dl. (Wingard, et al, 1982).

Los primeros resultados se ilustran en la figura 5.10 y 5.11. se observa que, como se esperaba, el consumo de oxígeno es mayor a medida que la concentración de glucosa se incrementa. Este hecho se debe a que el oxígeno se consume estequiométricamente proporcional a la concentración del otro sustrato la glucosa.

En estas figuras también se puede ver que la respuesta puede ser determinada cinéticamente o bien en el equilibrio, siendo el tiempo menor de 1 min. aproximadamente para la respuesta cinética y de 2 minutos para realizarla en el equilibrio.

En la figura 5.10 puede observarse como se consume el oxígeno por la reacción, reflejado en las caídas de pendiente para cada concentración de sustrato probada. A partir de estas curvas de respuesta se construyen las curvas de calibración. En este caso al construir la curva de calibración se estableció que su rango lineal de sensibilidad es muy corto en función de que solo alcanza a detectar valores de 0 a 50 mg/l. (fig. 5.11). Este fenómeno se debe a que el rango lineal es un parámetro influenciado importantemente por la velocidad con la que la enzima reacciona con el sustrato. Algunos autores como Clark, (1970); Mell y Maloy (1975), han reportado este problema y logran reducirlo usando una membrana externa, para limitar la respuesta del sensor por la velocidad de difusión del sustrato. Una esquematización del problema observado y de su solución se esquematiza en la figura 5.12.

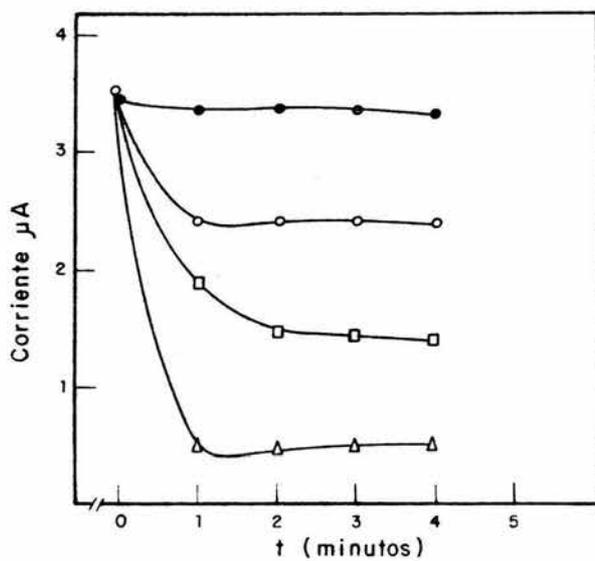


Fig 5.10 Curvas de respuesta del electrodo-enzimático (•) = 25 (◦) = 50, (◻) = 100, (◴) = 150 mg/l

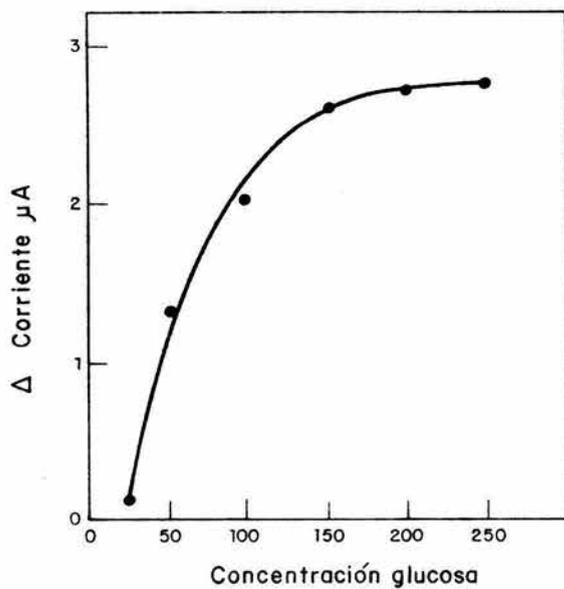


Fig 5.11 Curva de calibración para la medición de glucosa mediante el electrodo-enzimático

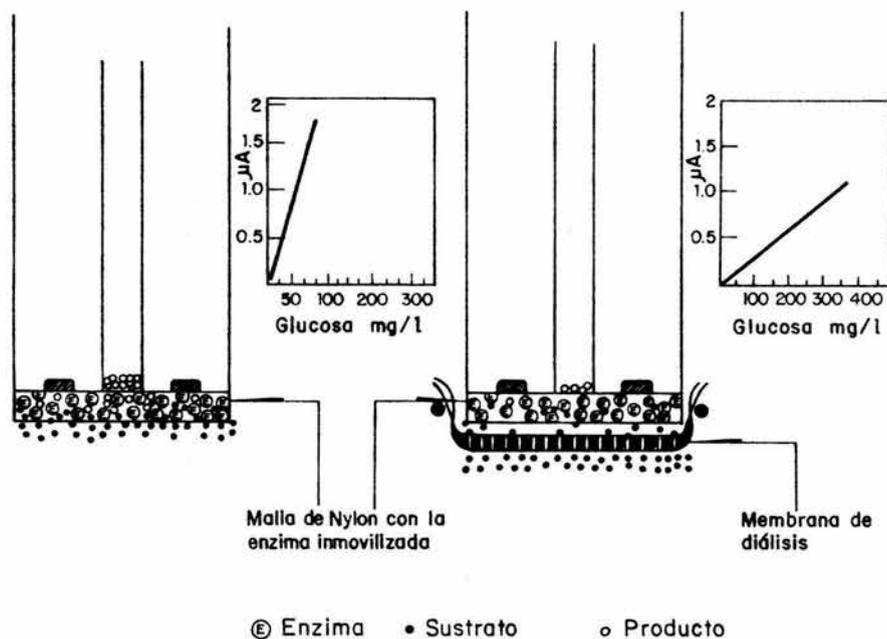


Fig 5.12 Principio funcional por el cual se probaron distintas membranas de diálisis en el electrodo enzimático

De esta forma se muestra que la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en las mallas de nylon presenta actividad catalítica y es sensible a la glucosa. Cabe mencionar que en estos experimentos se adicionó una muestra "blanco" que no contenía glucosa para observar la posible respuesta del electrodo. Se corroboró que no se presenta consumo de oxígeno.

5.5.- Membranas de diálisis y rango lineal.

Los primeros resultados indicaron que el rango lineal era muy corto, de 0- 50 mg/dl . Esto es una evidencia indirecta de que el fenómeno es controlado por la velocidad de reacción enzimática (Clark 1970; Mell y Maloy , 1975), en estas condiciones el electrodo enzimático no sería funcional. Como ya se ha mencionado en la literatura este fenómeno se ha resuelto con el uso de membranas de diferentes materiales como elementos de resistencia a la difusión (Mell y Maloy, 1975).

Clark en su patente para la construcción de un dispositivo de medición de glucosa (Yellow Springs Instruments U.S.A.) utiliza una membrana de policarbonato para así lograr evitar el paso de moléculas grandes y al mismo tiempo limitar la respuesta por difusión (Clark, 1970). De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se realizaron pruebas con membranas de diálisis de distintos espesores y tamaños de poro para resolver el problema del rango lineal. Fueron probadas cuatro membranas, las cuales se adaptaron al sistema de medición y se hicieron experimentos para determinar sus características.

Las membranas probadas en estos experimentos fueron las siguientes: tubos de diálisis benzilados (TDB) con un corte de 2000 y espesor no especificado; membranas de diálisis con un corte de 8000 y espesor de 9 μ m (MD89); membranas de diálisis con corte de 1000 y un espesor de 8 μ m (MD18); membranas de diálisis con un corte de 8000 y espesor de 8 μ m (MD88). La temperatura de medición fue seleccionada entre dos pruebas, una a 25°C (temperatura ambiente) y la otra a 37°C que se reporta como la óptima para el funcionamiento de la enzima (Gibson et al 1964; Sigma, 1985). Como se observa en la figura 5.13 a

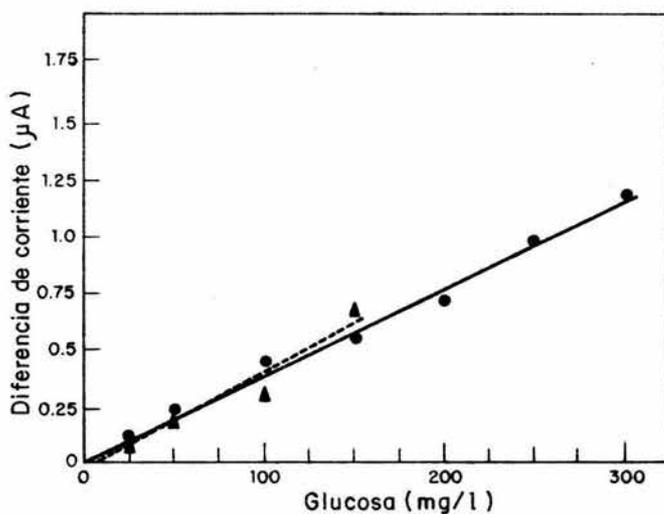


Fig 5.13 Curvas de calibración para la medición de glucosa mediante el electrodo enzimático en función de la temperatura. Los datos corresponden a las lecturas realizadas transcurriendo un minuto después de inyectar la muestra (\blacktriangle) 25°C, (\bullet) 37°C como resistencia difusional se emplearon tubos de diálisis benzoilados

25°C, las curvas de calibración dieron como resultado un rango lineal de detección muy corto, 0-150 mg/l, mientras que a 37°C el rango lineal de detección mínimo fue de 0-300 mg/l. Esto puede deberse al cambio (no cuantificado en este trabajo) de las condiciones de operación óptimas de pH y temperatura después de su inmovilización. En cuanto a la temperatura se esperaba que gracias a que la concentración de oxígeno disuelto es mayor a temperaturas bajas no hubiera problema al usar el sistema a 25°C. Sin embargo, puesto que la actividad se expresa en un rango muy corto, se puede establecer que la temperatura no es adecuada para la expresión óptima de la actividad enzimática. No hay evidencias de que la concentración de oxígeno inhiba la acción de la glucosa oxidasa, elemento que apoya el punto anterior puesto que, aun cuando a 25°C se tiene alta solubilidad de oxígeno en el amortiguador de medición, no hay expresión adecuada de la actividad de la enzima inmovilizada, por lo cual se establece que puede ser debido a que 25°C no sea una temperatura adecuada de operación de la enzima inmovilizada. En el caso de 37°C, se observa un rango lineal más amplio lo cual puede ser función directa de que la temperatura de operación sea más adecuada para la enzima inmovilizada.

Los niveles de oxígeno disuelto que mostraron cuando el electrodo enzimático se mantenía sin sustrato a una temperatura de 37°C se observan en la figura 5.14 a .Se puede ver como algunas membranas presentan niveles mayores de oxígeno disuelto que otras (MB18 vs MB89), esto es importante por la disponibilidad de oxígeno para la enzima que puede proporcionar cada una de ellas.

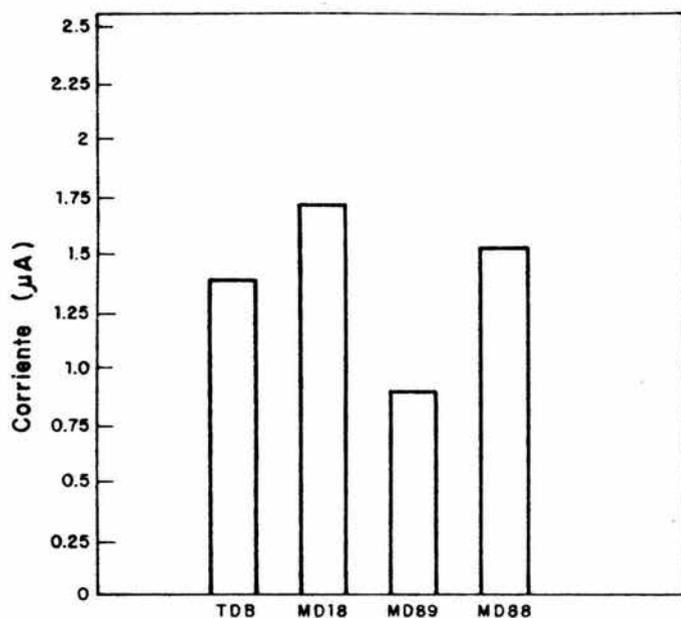


Fig 5.14. Niveles basales de oxígeno en el electrodo enzimático en función de la membrana usada como resistencia difusional. TDB: tubos de diálisis benzoilados, MD89: Membrana de diálisis (poro 8000 espesor $9\mu\text{m}$) MD18: Membrana de diálisis (poro 1000, espesor $8\mu\text{m}$) MD88: Membrana de diálisis (poro 8000, espesor $8\mu\text{m}$) en todos los casos la temperatura se controló en 37°C

En la figura 5.14 b se muestran los niveles basales de corriente en el electrodo de oxígeno que se pueden detectar cuando el electrodo de oxígeno únicamente tiene adaptada la membrana de diálisis, es decir, sin la malla de nylon con enzima inmovilizada. Un análisis de estos resultados tratando de establecer la posible relación entre el tamaño de poro y espesor con la concentración de oxígeno que puede dejar difundir libremente cada una de las membranas (medida como corriente en μA), evidenció que existe una relación entre el espesor y la concentración de oxígeno, de tal forma que a menor espesor mayor difusión de oxígeno en el sistema como se puede observar en la figura 5.14 c. En este caso TDB con espesor de 6μ presenta la mayor cantidad de oxígeno en el nivel basal (glucosa cero) disponible para la reacción de la glucosa oxidasa. MD18 y MD88 con un espesor de 8μ cuando se midieron sus difusividades de oxígeno sin malla de nylon presentan menor concentración de oxígeno difundido que TDB pero mayor que MD89 que tiene un espesor de 9μ . Cuando el sistema presentaba la malla de nylon enzimática más la membrana de diálisis, MD18 y MD88 presentaron difusividades de oxígeno un poco mayores que TDB, sin embargo en la caracterización TDB presentó mejores características en cuanto a rango lineal de detección y tiempo de recuperación.

5.6.- Curvas de respuesta y curvas de calibración.

De acuerdo al sistema de montaje y medición con el electrodo enzimático para cada una de las membranas de diálisis, se obtuvieron las curvas de respuesta determinándose a partir de estas sus curvas de calibración a 1 y a 4 minutos después de la reacción al adicionar el sustrato a diferentes concentraciones.

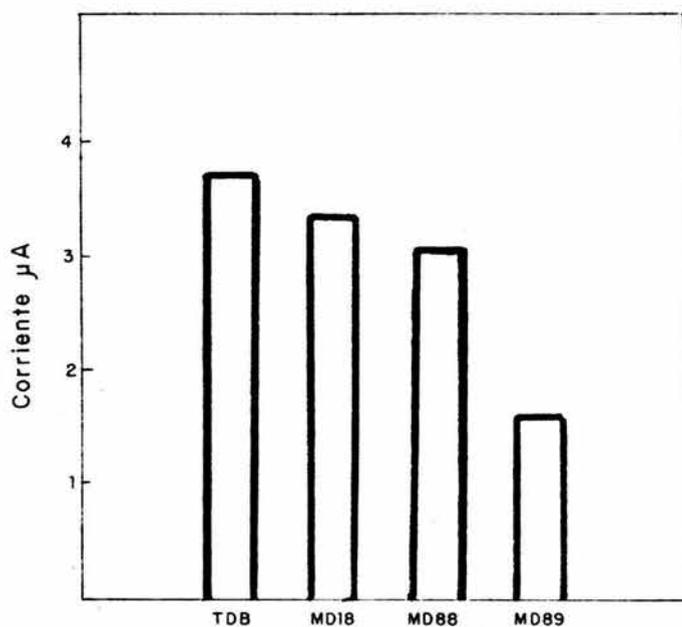


Fig 5.14b Niveles basales de oxígeno en el sistema sin malla de nylon enzimática

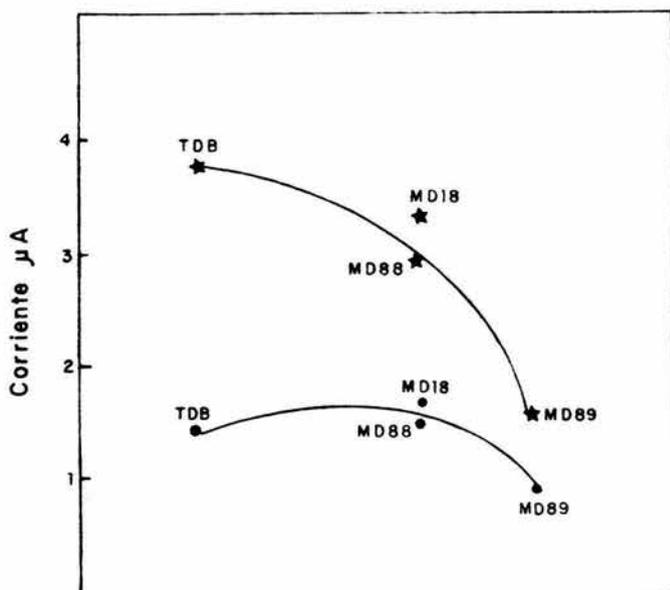


Fig 5.14c Relación entre el espesor de la membrana usada como resistencia difusional y la corriente basal (corriente de oxígeno), disponible para la reacción.
 ★ = Electrodo de oxígeno más membrana de diálisis
 • = Electrodo de oxígeno más la malla enzimática más membrana de diálisis

El análisis de las curvas de respuesta evidenció que las lecturas a 1 min. son representativas de las concentraciones probadas, por lo tanto, aunque se realizó la medición también a 4 min., los datos mostrados en las figuras posteriores se obtuvieron con la determinación a un minuto.

En las figuras 5.15 y 5.16, se observan las respuestas del electrodo enzimático medidas al minuto, usando TDB. En la figura 5.16 se puede ver que la respuesta medida cinéticamente al minuto es representativa de la concentración usada. Se observa también que el rango lineal es de 0 hasta 300 mg/l de glucosa. La curva de calibración para los tubos de diálisis benzoilados alcanzó un coeficiente de correlación lineal de 0,999 para el rango lineal hasta 250 mg/l y de 0.998 hasta 300 mg/l.

En las figuras 5.17, 5.18, 5.19, 5.20, 5.21, y 5.22 se muestran las curvas de respuesta y de calibración para las membranas MD18, MD89 y MD88.

Cuando se usaron las membranas MD18 se observó que el rango lineal de detección tomando la lectura a 1 minuto es de 0 a 250 mg/l; en el caso de que la medida se haga en el equilibrio, es decir a los 4 minutos, el rango resulta mucho menor, alcanzando sólo a medir hasta 150 mg/l, en este caso el valor de correlación lineal de la curva estándar fue de 0.997. Este fenómeno se explica por el hecho de que esta membrana aun cuando presenta un corte menor de P.M.(1000), es más gruesa que TDB. Por esta razón la difusión del sustrato (Oxígeno) puede ser más lenta provocando que a medida que la concentración de glucosa aumenta se vaya consumiendo en mayor proporción el oxígeno disponible en la reacción, de tal forma que no es posible tomar

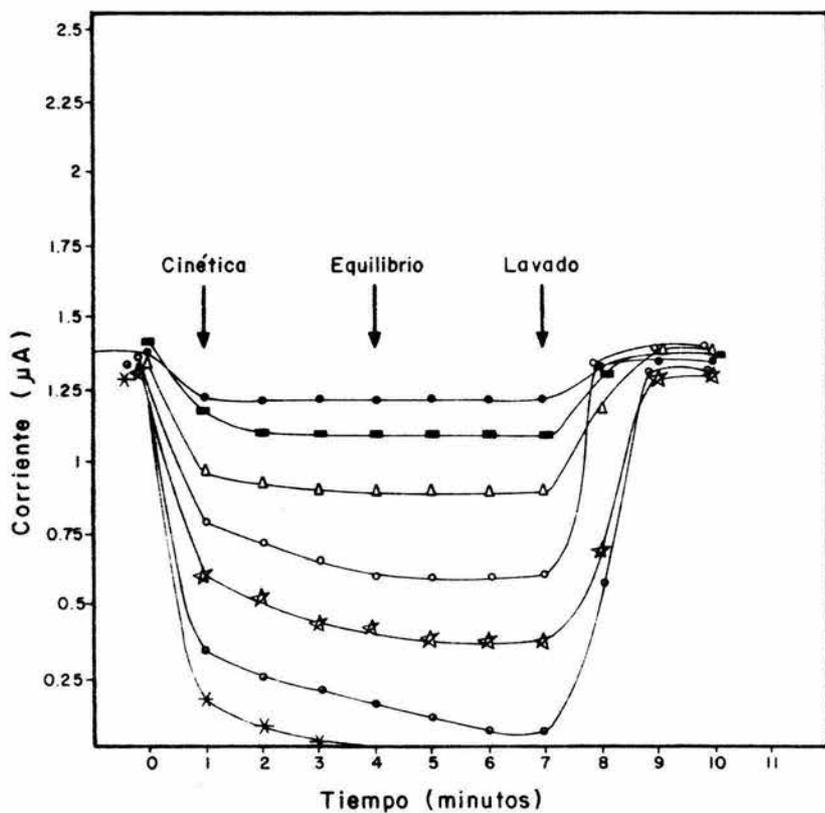


Fig 5.15 Curvas de respuesta del electrodo enzimático empleando tubos benzoilados como resistencia difusional. Las concentraciones de glucosa fueron en mg/l. (●) 25 (■) 50, (△) 100, (○) 150, (★) 200, (◊) 250. La temperatura se controló en 37°C

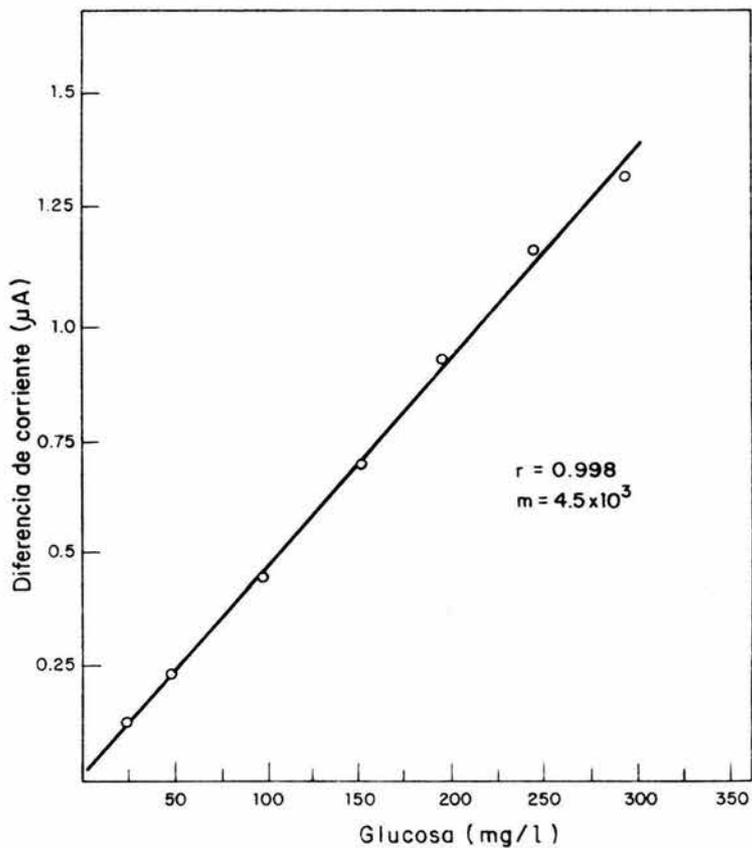


Fig 5.16 Curva de calibración para la medición de glucosa, mediante el electrodo enzimático empleando membranas TDB

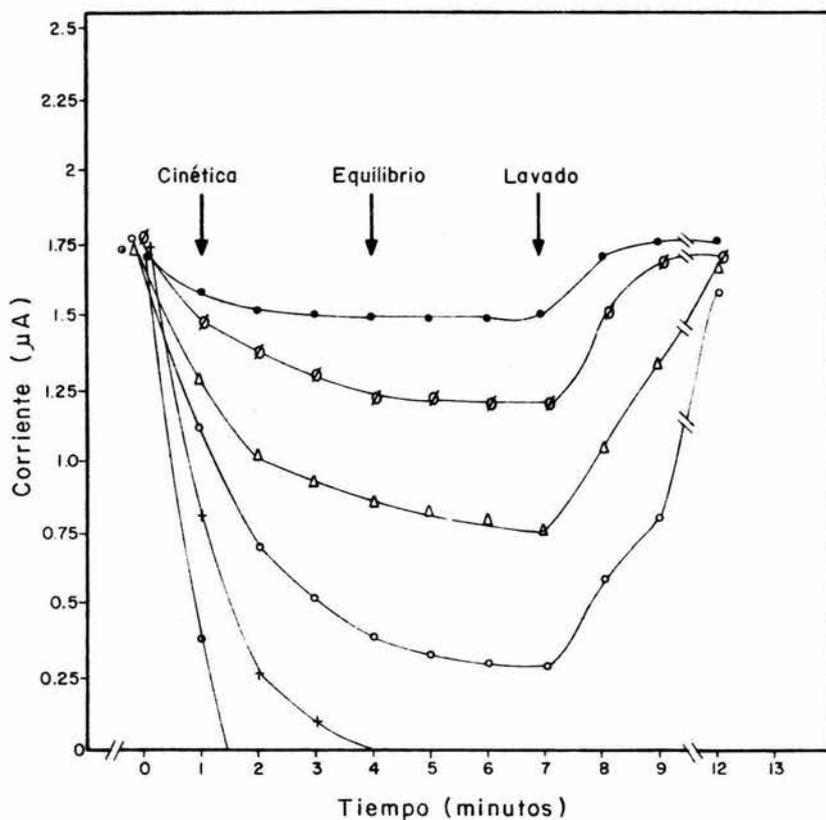


Fig 5.17 Curvas de respuesta del electrodo enzimático empleando membranas de diálisis (poro 1000 espesor $8\mu m$) Las concentraciones de glucosa fueron en mg/l (●) 25 (∅) 50, (Δ) 100, (○) 150, (+) 200, (◊) 250 Temperatura $37^{\circ}C$

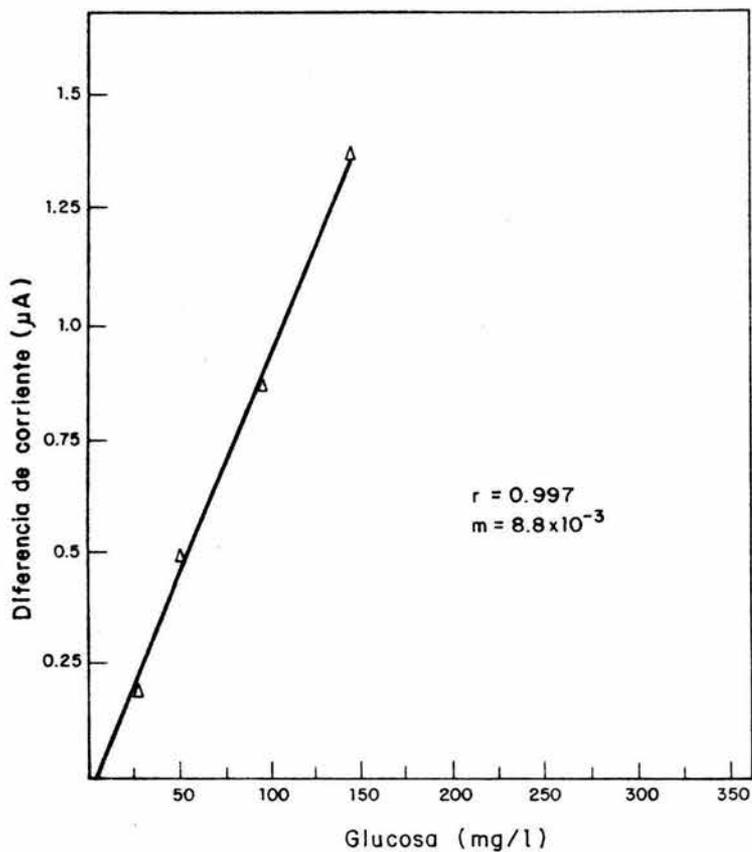


Fig 5.18 Curvas de calibración para la medición de glucosa, mediante el electrodo enzimático empleando membranas MD18

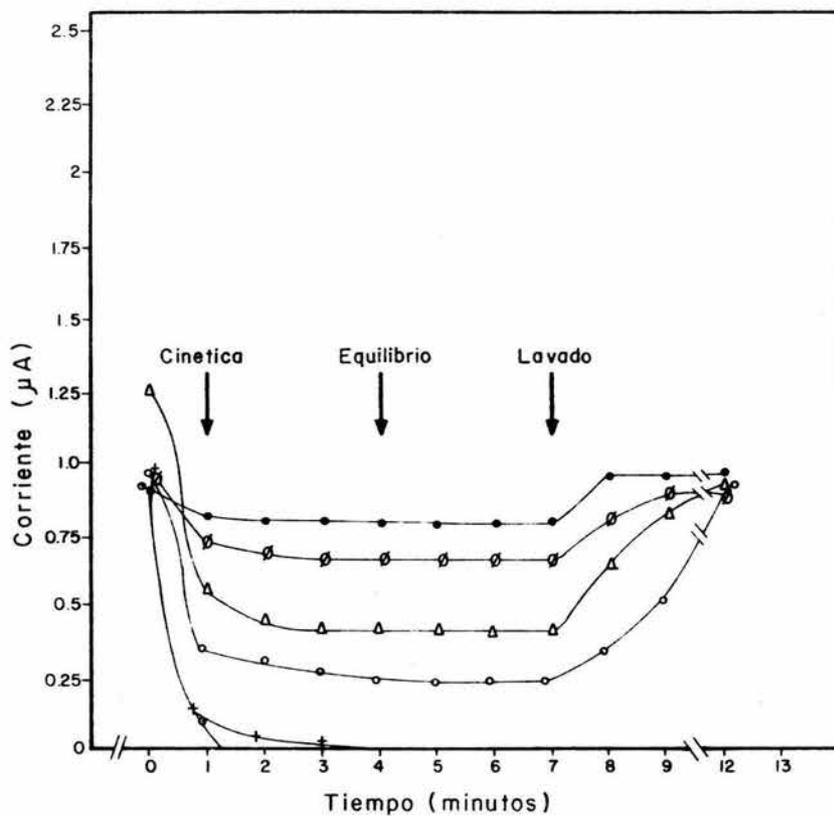


Fig 5.19 Curvas de respuestas del electrodo enzimático empleando membranas de diálisis (poro 8000, espesor 9µm). Las concentraciones de glucosa fueron en mg/l. (●) 25, (◊) 50, (△) 100, (○) 150, (+) 200, (◉) 250. Temperatura 37°C

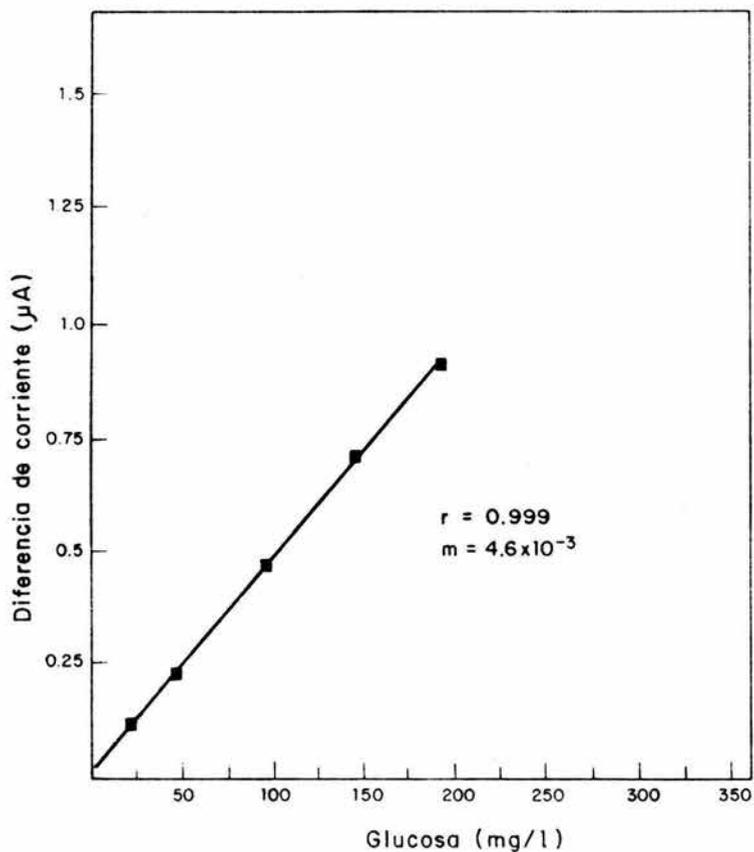


Fig 5.20 Curvas de calibración para la medición de glucosa, mediante el electrodo enzimático empleando membranas MD89

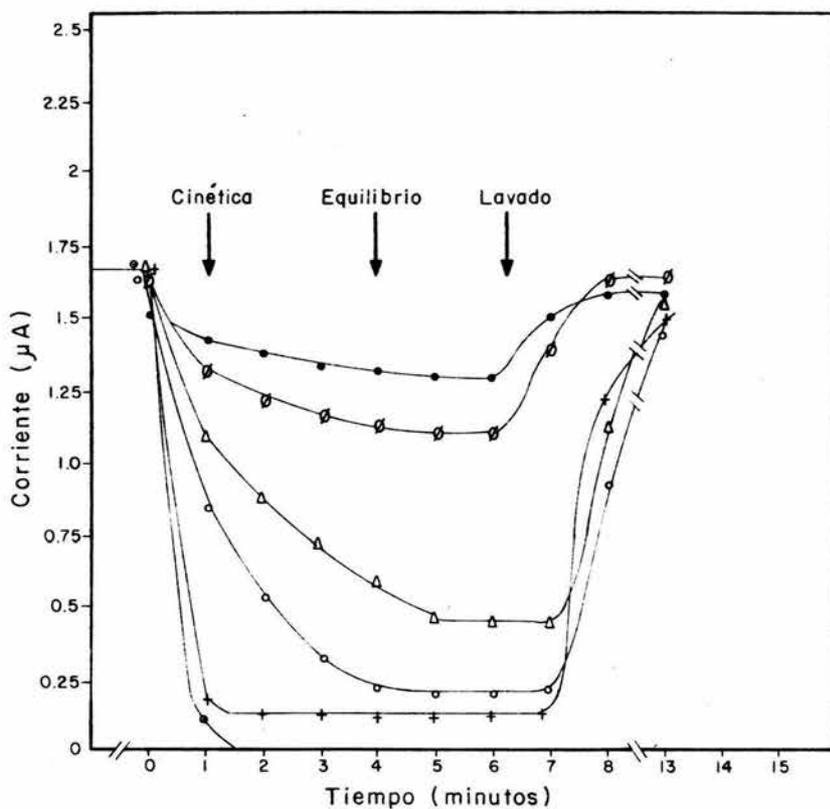


Fig 5.21 Curvas de respuesta del electrodo enzimático empleando membranas de diálisis (poro 8000, espesor $8\mu\text{m}$). Las concentraciones de glucosa fueron en mg/l. (●) 25, (○) 50, (△) 100, (◻) 150, (+) 200, (◊) 250. Temperatura 37°C

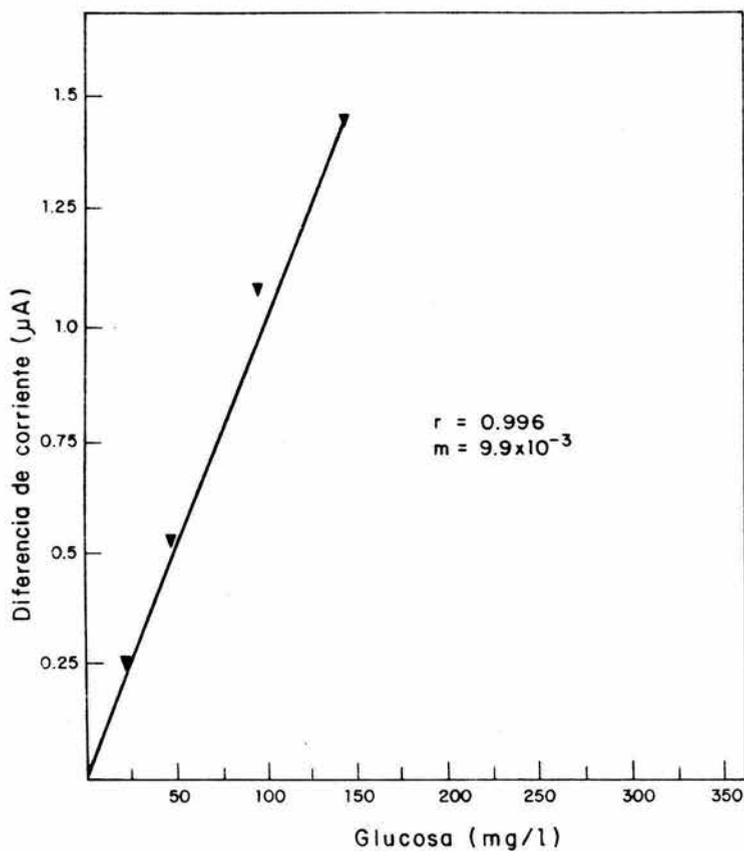


Fig 5.22a Curvas de calibración para la medición de glucosa, mediante el electrodo enzimático empleando membranas MD18

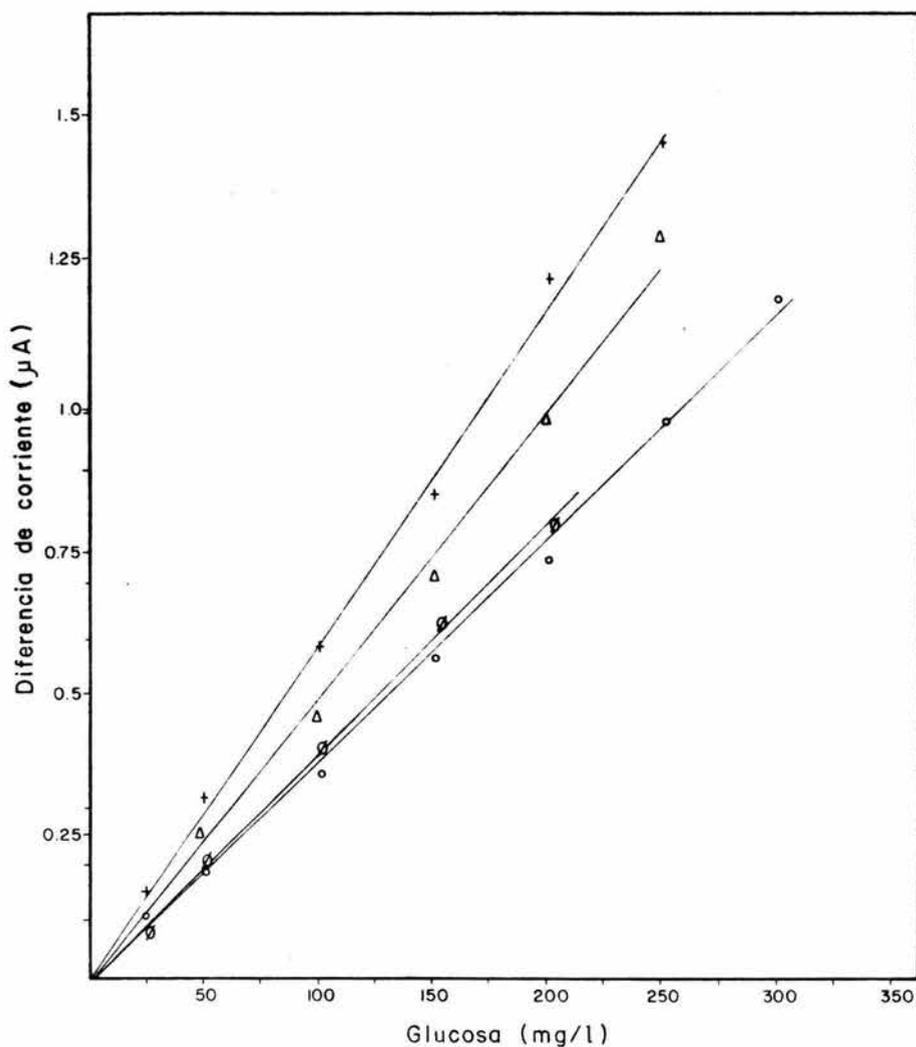


Fig 5.22b Curvas de calibración para la medición de glucosa, mediante el electrodo enzimático, en función de la barrera difusional utilizada. (◊) MD89, (Δ) MD18, (◊) TDB, (+) MD88. Los datos corresponden a las lecturas realizadas transcurriendo un minuto después de inyectar la muestra. Temperatura 37°C

lecturas en el equilibrio (4 min) por arriba de 150 mg/l por la limitación de oxígeno. En este caso debido a que el consumo de oxígeno no es total después de transcurrido un minuto de reacción, es posible establecer dos puntos de la pendiente máxima y lograr que el rango lineal pueda ampliarse hasta 250 mg/l que sigue siendo menor que el rango que presentan los TDB.

Con el uso de las membranas MD89, se observa en primera instancia que el rango lineal a 1 minuto es de 0 - 200 mg/l, su coeficiente de correlación alcanza 0.998, este hecho puede ser debido a que esta membrana aún cuando tiene un corte de 3000 su espesor es mayor y por tanto se aumenta su capacidad de limitar la difusión del sustrato (oxígeno). En el caso anterior MD18 se tenía un espesor menor y se ofrecía un poro de menor tamaño, la única explicación del porque MD18 muestra mayor rango lineal de detección que MD89 es debido a la diferencia de espesores que se observa en las figuras 5.14 b y 5.14 c.

Las membranas MD88 cuando se tiene el sistema de malla de nylon más membrana de diálisis, presentan un nivel basal de oxígeno alto, sin embargo al igual que las MD89 el rango lineal detectado es solo hasta 200 mg/l, con una curva de calibración que presenta un relativamente bajo coeficiente de correlación lineal (0.996). En este caso también se puede pensar en la influencia que tiene el espesor de la membrana en el rango lineal observado, en relación al tamaño de poro lo mismo que MD89 la membrana MD88 presenta un poro mayor que puede no ser adecuado para limitar la reacción del sustrato. Por otra parte puede establecerse al considerar la difusión del oxígeno se entienda que esta difundiendo al mismo tiempo la glucosa que en

este caso también es función del corte de cada membrana. a medida que el corte es menor se observan mejores características de sensibilidad en las membranas, existiendo una que logró satisfacer una característica importante (en este caso los TDB). Esta es que la membrana debe dejar difundir al oxígeno y la glucosa para que pueda llevarse a cabo la reacción pero en concentraciones tales que no permitan que la respuesta del electrodo enzimático sea controlada por la cinética de la enzima inmovilizada, sino que sea función del espesor y tamaño del poro usados como resistencia difusional.

5.7.-Tiempos de recuperación.

Habiendo efectuado una evaluación del comportamiento de las membranas de diálisis entre las cuales se elegiría una, no sólo tenía que tomarse en cuenta el rango lineal ofrecido por cada membrana, sino también debía considerarse el tiempo de recuperación de cada una de ellas. Es decir, el tiempo mínimo en el cual el electrodo enzimático, después de ser lavado para asegurar la eliminación de residuos de sustrato que pudieran haber quedado en la membrana, está en disposición de recibir una nueva muestra. Esto redundaría en la cantidad de muestras que el electrodo puede recibir por unidad de tiempo. Los tiempos de recuperación fueron calculados a partir de la segunda parte de las curvas de respuesta para cada membrana después de cada lavado.

Los resultados de esas pruebas se resumen en la figura 5.23. Como puede verse, los tiempos de recuperación están en un rango que va desde 2 hasta 4 o 5 minutos. Las membranas que mostraron menor

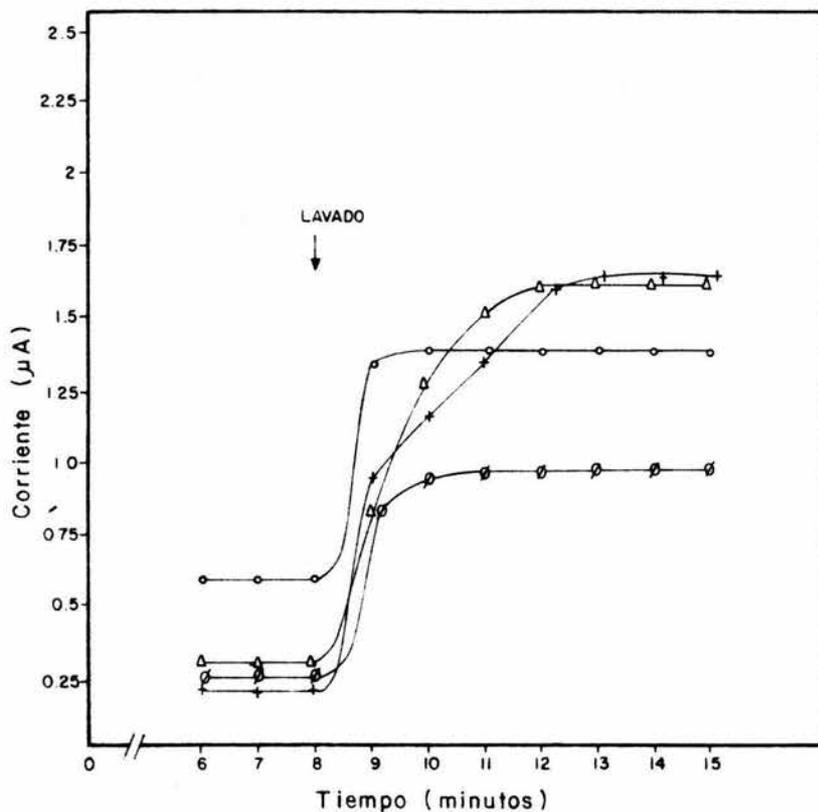


Fig 5.23 Curvas de recuperación de corriente basal en función de la barrera difusional utilizada. Concentración de glucosa hasta el momento de lavado: 150 mg/l (ϕ)MD89, (Δ)MD18, (+)MD88, (\circ) TDB. Temperatura 37°C

tiempo de recuperación fueron la MD89 y TDB ambas con dos minutos. las membranas MD89 y MD18 tienen tiempos de recuperación casi de 4 ó de 5 min.

5.8.- Selección de la membrana.

Una vez que se tenía caracterizado el electrodo enzimático en lo que respecta a rango lineal de detección, correlación, linealidad de la curva estándar, sensibilidad, niveles basales de oxígeno y tiempos de recuperación, para cada una de las membranas probadas como resistencia difusional, se construyó la tabla 5.2, donde se resumen las características que sirvieron para la selección definitiva de la membrana más apropiada.

Evaluando las características enmarcadas en la tabla 5.2 se encontró que las dos mejores membranas que podían ser usadas fueron MD89 y TDB. Sin embargo, para continuar con los experimentos fueron seleccionados finalmente tubos de diálisis benzoilados como la membrana con mejores características para ser usada en el electrodo enzimático, en base al mejor rango lineal. Además los TDB presentan una correlación aceptable y tiempo de recuperación corto.

Observando la tabla 5.2, podemos decir que el electrodo enzimático tiene como principales características las siguientes: un rango lineal desde cero hasta 300 mg/l que comparado con los instrumentos que ya existen comercialmente se encuentra en valores similares, considerando que estos instrumentos requieren de una dilución para leer concentraciones muy altas presentando un rango normal de lectura de 0 - 500 mg/dl. (Guilbault, 1984; Sheller et al 1983). En relación a los tiempos de respuesta en los instrumentos

Variable	Tiempo de detección (minutos).	M E M B R A N A			
		MD89	MD88	MD18	TDB
Rango de detección (g/l).	1	0.200	0.250	0.250	0.300
	4	0.200	0.150	0.150	0.300
Linealidad (correlación)	1	0.999	0.998	0.997	0.998
	4	0.999	0.996	0.997	0.998
Sensibilidad (pendiente) x 10 μ A/mgl	1	4.6	5.8	5.0	3.8
	4	4.6	9.9	8.8	4.5
Ordenada al origen μ A x 10 ⁻⁵	1	5.8	5.8	-17.1	3.8
	4	4.9	9.9	8.8	6.8
Corriente basal μ A x 10 ⁻²		0.94	1.6	1.7	1.3
		\pm 3.4	\pm 4.5	\pm 2.2	\pm 1.3
Tiempo de recuperación (minutos).		2	4	4	1

Tabla 5.2.- Tabla resumen en la que se consignan las principales características de cada una de las membranas probadas como resistencia difusional.

comerciales como se presenta en la tabla 2.6 va desde 40 seg. hasta 9 minutos máximo. En este trabajo se logra un tiempo de respuesta menor de 1 min. con tiempos de recuperación máximos de 2 min. lo cual permite cerca de 20 análisis por hora. Este último valor está dentro de un rango aceptable si se compara con los datos de la tabla 2.6. Aunque todavía se podría buscar la membrana ideal.

5.9.- Coinmovilización de la enzima glucosa oxidasa con catalasa.

Como ya se ha dicho, la respuesta del electrodo enzimático fue muy rápida sin la presencia de una resistencia difusional al sustrato. Consecuentemente se observó que el oxígeno disuelto en el amortiguador de medición era consumido totalmente y es posible que el rango lineal estuviera limitado por oxígeno. Una forma de atacar este problema, es reciclando oxígeno con la enzima catalasa, la cual transforma el H_2O_2 en O_2 y agua.

Con esa idea se realizaron experimentos de coinmovilización con la glucosa oxidasa y catalasa. La reacción de la glucosa oxidasa sobre la glucosa produce H_2O_2 , el cual, en este sistema puede ser degradado por la catalasa y garantizar la presencia de suficiente cantidad de oxígeno en el medio. Además se eliminaría el efecto degradante del H_2O_2 . El resultado esperado es una ampliación del rango lineal. Debido principalmente a que la enzima no está limitada por la concentración de oxígeno y puede por tanto oxidar concentraciones mayores de glucosa.

Los resultados de la coinmovilización se observan en la tabla 5.3. El primer aspecto interesante de estos resultados es el aumento

Inmovilización	Proteína total (mg)	<u>Proteína inmovilizada</u> g. de nylon	Relación Proteína total/saporte.
Glucosa oxidasa	3	282.6 ± 40	1:1.3
Glucosa oxidasa-catalasa	4	437.3 ± 80	1:1

Tabla 5.3.- Resultados de la co-inmovilización glucosa oxidasa-catalasa

en la cantidad de proteína inmovilizada por gramo de nylon. Este fenómeno puede explicarse por el hecho del cambio del volumen en el enfrentamiento. Normalmente para la inmovilización de la glucosa oxidasa se disponen 3 mg totales de enzima en un volumen total de 3 ml. En los experimentos de co-inmovilización se usaron un total de 4 ml en el volumen de enfrentamiento que contenían 3 mg de glucosa oxidasa y 1 mg de catalasa. En ambos casos, el área disponible para el enlace fue similar. Aunque en los dos experimentos la concentración de proteína en el enfrentamiento fue la misma, en el caso del sistema glucosa oxidasa catalasa, la relación proteína enfrentada total/soporte, fue mayor. De esta manera, se esperaría que el perfil de concentración de proteína a lo largo del tiempo de inmovilización fuera en promedio mayor al caso en el que se inmovilizó exclusivamente la glucosa oxidasa.

Este fenómeno puede aprovecharse para desarrollar un método con el fin de inmovilizar mayor cantidad de enzima, aunque desde luego, con el precio de la utilización de mas enzima. Sin embargo podría pensarse en una concentración posterior por ultrafiltración, lo que eliminaría su posible desventaja.

En las figuras 5.24 y 5.25 se presentan las curvas de repuesta y de calibración utilizando el sistema glucosa oxidasa-catalasa y la membrana de diálisis. Se observa que tal como se había supuesto, el rango lineal de detección se logró aumentar hasta 400 mg/l de glucosa. Sin embargo, el aumento en el rango lineal lleva consigo un decremento en la sensibilidad del electrodo enzimático.

El aumento en el rango lineal de detección se debe principalmente a la presencia de la catalasa en la malla de nylon.

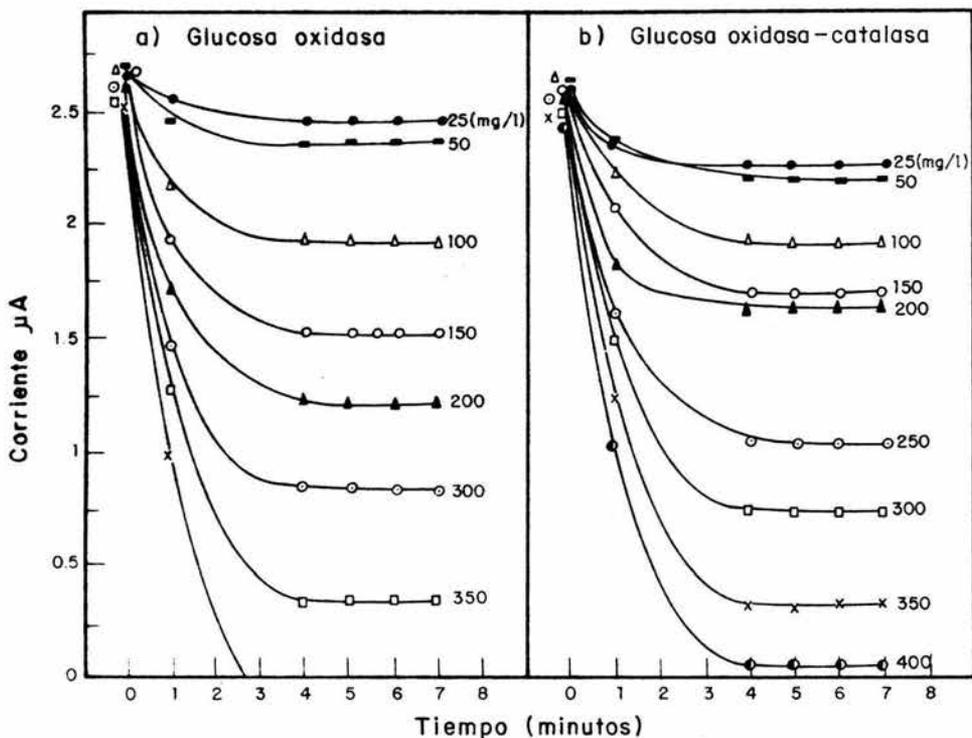


Fig 5.24 Curvas de respuesta observadas usando glucosa-oxidasa (a) y glucosa oxidasa-catalasa (b)

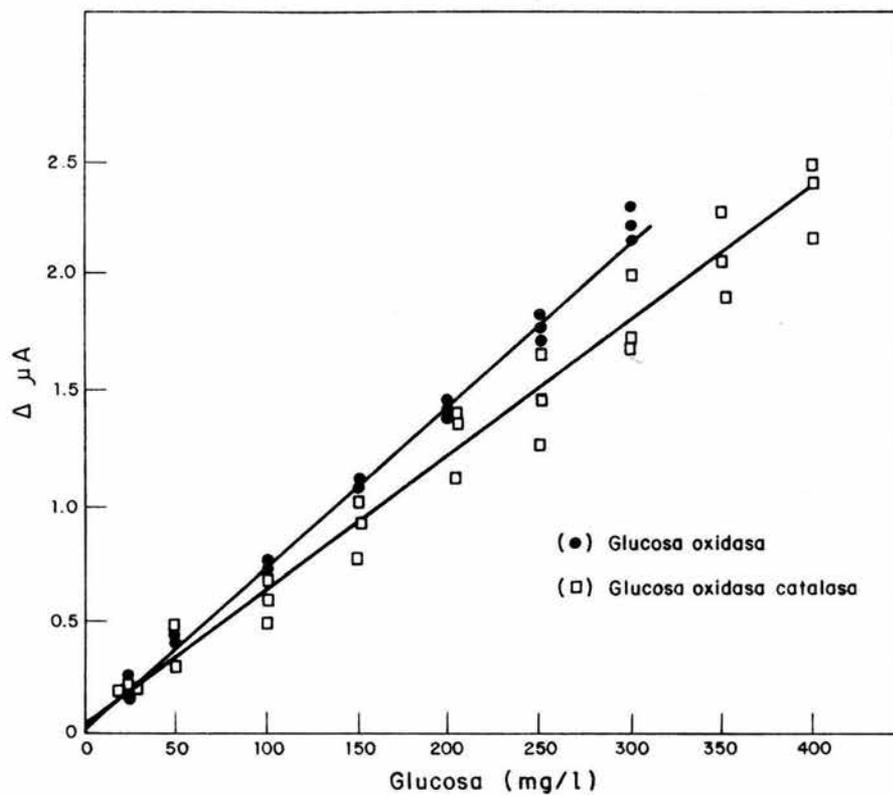


Fig 5.25 Curvas de calibración del sistema glucosa oxidasa catalasa y glucosa oxidasa

Esto es porque el H_2O_2 que se produce en la reacción es degradado y convertido en O_2 y agua. El oxígeno reciclado es aprovechado por la glucosa oxidasa para la reacción con la glucosa. El decremento en la sensibilidad puede deberse a dos cosas; por un lado a que la concentración de catalasa no alcance a eliminar todo el H_2O_2 producido y que por esta razón a mayores concentraciones de glucosa la dispersión de datos también es mayor. Por otro lado también puede deberse a que la velocidad de reciclaje de oxígeno sea tal, que las concentraciones de glucosa sean consumidas muy rápidamente pero que la mayor disponibilidad de oxígeno resultante elimine a la respuesta real observada del oxígeno que esta utilizando la enzima.

Las anteriores aseveraciones son solo hipótesis para explicar el fenómeno. sin embargo, para dar una conclusión definitiva a este respecto hubieran sido necesarios, al menos los siguientes experimentos:

- a) Optimización de las condiciones de inmovilización con las dos enzimas. Es decir, proporciones entre ambas, concentración de proteína, tiempo, pH y temperatura de la solución de enfrentamiento, entre otras.
- b) Evaluación de la estabilidad operacional del electrodo ; ya que se esperaria que con la presencia de la catalasa, la vida útil de la membrana enzimática se incrementaría, por la eliminación del peróxido, el cual es bien conocido como degradante de enzimas.

El uso de la catalasa se justificaría en ciertas aplicaciones donde fuera más importante un amplio rango lineal (y probablemente una vida útil mas larga), que una alta sensibilidad. En vista de que

los puntos anteriores se encontraban fuera del alcance de la presente tesis se decidió continuar los experimentos sin el uso de la catalasa.

5.10.-Comparación del método del electrodo enzimático con un método convencional.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue que el electrodo enzimático desarrollado pudiera ser utilizado como método de cuantificación de glucosa indistintamente de aquellos métodos de análisis usados normalmente para la determinación de glucosa.

Para este propósito se realizaron experimentos con el equipo de glucosa oxidasa - peroxidasa solubles de Sigma. Con este método se analizaron muestras en un rango que fue desde 10 hasta 100 mg/dl. Las mismas muestras fueron determinadas simultáneamente con el electrodo enzimático.

Los resultados de ambos métodos se presentan en la figura 5.2b. La correlación entre el electrodo enzimático y el kit de Sigma fue de 0.99, lo cual indica que ambos métodos son equivalentes para la determinación de glucosa y que el valor que se obtenga con cualquiera de ellos representa el mismo margen de error en la determinación.

En estas condiciones, la principal ventaja con el electrodo enzimático se refiere al tiempo de la determinación (3 minutos como máximo), además de que la enzima no se desecha sino que es reutilizable para la lectura de nuevas muestras.

5.11.-Estabilidad operacional.

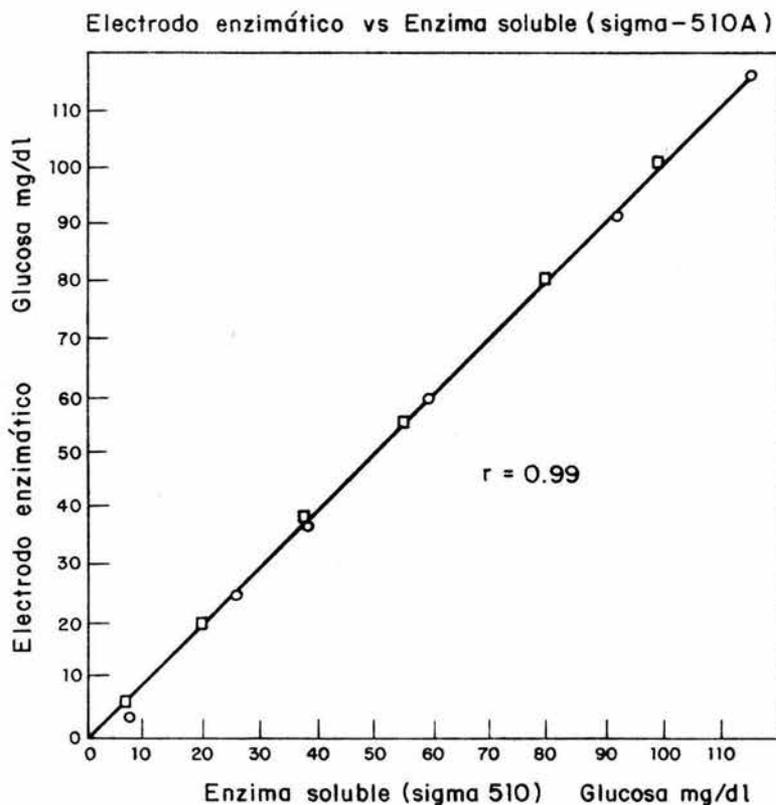


Fig 5.26 Correlación obtenida del enfrentamiento del método de enzima soluble (sigma 510), con el electrodo enzimático desarrollado en este trabajo. El análisis de ambos se llevó a cabo a 37°C

La estabilidad de un electrodo enzimático en general esta determinada por la actividad total de la enzima y por la velocidad de inactivación de la misma. Ello en parte, es una función de las condiciones de operación. La estabilidad del electrodo enzimático en realidad no es otra cosa que la estabilidad de la enzima en la malla de nylon montada en el electrodo.

Con el objeto de observar la variación existente en la sensibilidad del sistema de medición, se realizaron mediciones diariamente durante 15 días. Durante ese período, la malla de nylon con la glucosa oxidasa inmovilizada, se mantuvo acoplada al electrodo de oxígeno. Este estudio consistió en el análisis de al menos 10 muestras de glucosa por día que permitieran la construcción de curvas de calibración.

Los resultados, esquematizados en la figura 5.27 indicaron que no hubo variación en cuanto a los tiempos de respuesta, que continuaron siendo de un minuto o menos. Tampoco se observó una pérdida en la capacidad de recuperación del electrodo enzimático. Ella indica que la estabilidad de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en mallas de nylon es de al menos 15 días, con una respuesta satisfactoria.

Para el caso de la determinación de glucosa, los instrumentos comerciales que usan membranas enzimáticas reportan la estabilidad de las mismas en un rango de 1 semana hasta un mes en operación. El medidor de Yellow Springs Instruments reporta una estabilidad de 300 mediciones de glucosa por membrana que se realizan aproximadamente en una semana. GRM-01 reporta 3 o 4 semanas y la Roche hasta 8 semanas (ver tabla 2.27), en base a esto podemos establecer como

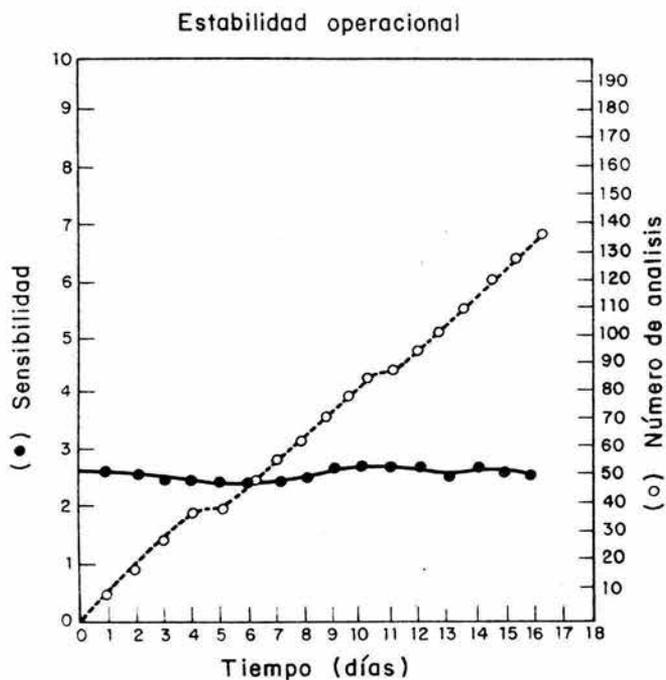


Fig 5.27 Estabilidad operacional del electrodo enzimático evaluada durante 15 días en operación

satisfactorios 150 ensayos en 15 días con la enzima glucosa oxidasa
inmovilizada en la malla de nylon.

CAPITULO 6.

Conclusiones.

En relación con la inmovilización se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- El tratamiento del nylon con HCl, así como el uso de polietilenimina presentan ventajas en el proceso de activación con glutaraldehído en condiciones alcalinas.
- Las mallas de nylon 150 proporcionan un soporte con ventajas en la inmovilización en comparación con los nylon comerciales, teniendo además características de flexibilidad adecuadas para su montaje en el electrodo enzimático.
- Con la metodología de inmovilización desarrollada se pudieron alcanzar valores de inmovilización hasta de 400 mg de enzima por gramo de nylon.

Electrodo enzimático.

- Este electrodo presenta un rango lineal similar al de los instrumentos comerciales ya existentes para la detección de glucosa.
- La temperatura en la cual opera resultó ser para este caso de 37° C.
- El rango lineal se incrementa sensiblemente con una determinada resistencia difusional.

- En este trabajo se pudo establecer que el espesor de las membranas es el parámetro de mayor influencia para lograr un sistema controlado por difusión.

- La resistencia difusional más adecuada para el electrodo enzimático fueron los tubos de diálisis benzoilados (TDB).

- La determinación de glucosa puede ser obtenida en menos de 1 min. aunque puede ser realizada después de 4 min.

- El tiempo de recuperación entre cada lectura es de 2 min.

- La co-inmovilización glucosa oxidasa- catalasa aumenta el rango lineal hasta 400 mg/l, sin embargo este aumento lleva consigo una pérdida en la sensibilidad.

- De la comparación con un método convencional se encontró que el electrodo enzimático puede ser usado indistintamente de aquel con las ventajas que este ofrece respecto a simplicidad, tiempo de análisis y posiblemente costos.

- Este electrodo presenta una estabilidad operacional que garantiza su uso continuo durante al menos 15 días (150 análisis).

CAPITULO 7

Recomendaciones.

a) Para la mejor caracterización de este tipo de sensores se recomienda realizar un estudio cinético del comportamiento de la enzima en forma soluble e inmovilizada, esto ayudaría a la mejor comprensión de los parámetros observados en la caracterización. En cuanto a la estabilidad se recomienda realizar el estudio hasta observar las pérdidas de sensibilidad en las mallas puesto que en este trabajo no fue posible realizarlo.

b) Es recomendable que se estudien a fondo los problemas relacionados a los fenómenos de difusión que están involucrados en el diseño, construcción y aplicación de este tipo de dispositivos.

c) Un estudio de las posibles interferencias que puedan afectar las mediciones.

d) En este trabajo se montó una técnica alternativa no incluida en el texto para la fabricación de membranas de acetato de celulosa por medio de la cual se tiene la perspectiva de realizar la búsqueda de una membrana más delgada y con mejores características para aumentar el número de análisis por hora.

e) Caracterización del funcionamiento de las mallas enzimáticas en un detector de peróxido de hidrógeno y evaluar las ventajas y desventajas con respecto al sensor de oxígeno.

f) Se recomienda una afinación en los aspectos del uso de la catalasa ya sea en co-inmovilización con glucosa oxidasa ó bien

disuelta en el amortiguador de medición.

g) Prueba del sensor en medios complejos (Sangre, Bebidas etc.).

h) Uso de una malla de nylon más cerrada, la cual posiblemente contribuya al proceso de control por difusión.

i) Integración de los aspectos mecánico electrónico para permitir automatización de la dilución, lavado, cálculo de la concentración etc.

j) Reducción del tamaño de muestra a usar sin decremento en la precisión.

k) Comparación estricta con los electrodos comerciales.

l) Aprobación del sensor para su uso en análisis clínicos e industriales.

m) Finalmente la prueba de la versatilidad del sistema con el uso de otras enzimas, otros sustratos etc.

ANEXO 1

Preparación de amortiguadores y soluciones.

Amortiguadores.

Todas las cantidades pesadas para cada amortiguador se calcularon en base a la molaridad y volumen deseados.

A) Amortiguador de boratos 0.74 M., pH=9.0

Para preparar un litro y medio aproximadamente se procede de la forma siguiente:

Acido.- Se pesaron 45.7 g. de H_3BO_3 (ácido bórico), se colocaron en un matraz aforado de 1000 ml. y se aforan con agua destilada.

Base.- Se pesaron 29.6 g. de NaOH (hidróxido de sodio), se colocaron en un matraz aforado de 1000 ml. se aforan con agua destilada.

Ajuste del pH.

Para llevar la solución amortiguadora al pH deseado, en un vaso de precipitado de 2 litros se coloca el ácido, en este vaso se agrega un agitador magnético para mantener agitada la solución durante el ajuste. Enseguida con el electrodo de pH en el ácido, se adiciona lentamente la base hasta alcanzar el valor deseado.

B) Amortiguador de boratos al 0.2 M, pH= 8.5.

Para preparar un litro y medio aproximadamente se procede de la forma siguiente.

Acido.- Se pesan 12.36 g de H_3BO_3 (ácido bórico), se colocan en matraz aforado de 1000 ml y se aforan con agua destilada.

Base.- Se pesan 8 g de NaOH (hidróxido de sodio), se colocan en matraz aforado de 1000 ml y se afora en agua destilada.

Ajuste del pH.

Para llevar la solución al pH deseado, en un vaso de precipitado de 2 lts. se coloca el ácido, en este vaso se agrega un agitador magnético para mantener agitada la solución durante el ajuste. Con el electrodo de pH inmerso en esta solución, se adiciona lentamente la base hasta alcanzar el valor deseado.

C) Amortiguador de boratos 0.25 M, pH=8.5

Para preparar un litro y medio aproximadamente. Acido. Se pesan 15.46 g de ácido bórico y se aforan en matraz aforado de 1000 ml con agua destilada. Base.- Se pesan 10 g. de hidróxido de sodio y se afora en matraz de 1000 ml. con agua destilada.

El ajuste se realiza de la misma forma que en A y B.

D) Amortiguador de fosfatos 0.1 M , pH=7.0

Para preparar un litro.

Fosfato de potasio monobásico.

Se pesan 6.8 g., se colocan en matraz aforado de 500 ml. y se aforan con agua destilada.

Fosfato de potasio dibásico.

Se pesan 8.7 g., se colocan en matraz aforado de 500 ml y se aforan con agua destilada.

Para ajustar el pH, se coloca el fosfato de potasio dibásico en un vaso de precipitado de un litro con un agitador magnético en el cual se adiciona lentamente el fosfato de potasio monobásico hasta llegar al pH de 7.0.

Soluciones.

I) Glutaraldehído al 16.5 % en amortiguador A.

Para preparar esta solución se construyó una tabla a partir de la cual según el volumen requerido, se mezclaron el glutaraldehído y el amortiguador A.

Volumenes a mezclar. (ml)	Volumen requerido (ml).			
	40	50	80	90
Glutaraldehído al 25% en agua.	29.6	37	59.2	66.6
Amortiguador A	10.4	13	20.8	23.4

II) Glutaraldehído al 5% en amortiguador C.

Para preparar esta solución, se construyó una tabla a partir de la cual según el volumen requerido se hicieron las mezclas.

Volumenes a mezclar (ml)	Volumen requerido (ml)			
Glutaraldehído al 25% en agua	8	10	16	18
Amortiguador C.	32	40	64	72

III.- Polietilenimina al 10% en agua.

El volumen usado en este caso fue de 50 ml para el cual se colocaron 10 ml de polietilenimina (al 50% en solución acuosa) en una probeta de 50 ml hasta completar el volumen.

Bibliografía.

- Aston, W.J. y Turner, A. P. F., (1984). "Biosensor and biofuel cells", en Biotecnology and Genetic Engineering Reviews, 1, 69-120.
- Ashwel, G., (1976); "Colorimetric analysis de sugars". Methods in enzymology.
- Bautista, E. D., (1983); "Diseño, construcción y aplicación de un electrodo microbiológico para la detección de penicilinas". U.A.P., Escuela de Ciencias Químicas., Tests de licenciatura
- Blaedel, W. J. y Olson, C., (1964); Anal. Chem. 36, 343
- Bunting, P. S. y Laidler, K. J., (1973). "The chemical kinetics of enzyme action ". Oxford Univ. Press (Clarendon), London and New York.
- Caras, S. y Janata, J., (1980). Anal. Chem., 52, 1935.
- Carr, W. P. y Bowers, L. D. (1980). "Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry. Jhon Wiley & Sons, New York, 197-
- Chang, T. H. S., (1964); Science, 146, 524.
- Chang, T. H. S., (1971); Nature, 229, 117-
- Clark, L. C., Jr., (1970); "Membrane polarographic electrode system and method with electrochemical compensation". U.S. Patent No. 3,539,411.

- Clark, L. C., Jr. y Lyons, C., (1962): "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". Ann. N. Y. Acad. Sci. 102, 29-45.
- Clark, L. C. y Duggan, C. A., (1982): "Implanted electroenzymatic glucose sensors". Diabetes care, 5, 174-180.
- Corcoran, C. A. y Rechnitz, G. A., (1985): "Cell based biosensors". Trends in Biotechnology, 3, (4), 92-96.
- Dizche, Z., (1929); Mikrochemie, 7, 33
- Dizche, Z. y Borenfreund, E., (1951); J. Biol. Chem. 192, 583-
- Dobson, J. V., Snodin, R. P. y Thirsk, H. R., (1976); "EMF measurements of cell employing metal-metal oxide electrodes in aqueous chloride and sulphate electrolytes at temperatures between 25- 250 C °". Electrochim. Acta, 21, 527-533
- Edelman, G. M., Rutishauser, U. y Millete, F., (1971); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 2153.
- Fleigt, C., (1905); Chem. Zentr. 79, II.
- Fogt, E. J., Dodd, L. M., Jennings, E. M. y Clemens, A. H., (1978). : Development and evaluation of a glucose analyzer for a glucose controlled insulin infusion system (biostator). Clin. Chem 24, 1366- 1372.

- Galindo, F. E.. (1986); "Electrodos biológicos"; Ciencia y desarrollo, Nov-Dic
- Gerbig, K.. (1986); Un nuevo método altamente sencillo para la determinación de glucosa ". Diagnóstica Merck.
- Gibson, H. G., Bennett, E.P.S. y Massey, V., (1964); "Kinetic and mechanism of action of glucose oxidase". J. Biol. Chem., 239, (11), 3927-3934.
- Goldstein, L., Freeman, A. y Sokolovsky, M., (1974); " Chemical modified nylons as supportys for enzyme immobilization ". Biochem. J., 143, 497-509.
- Guilbault, G. G., Tyson, B., Kramer, D. y Cannon, F. L., (1963) Anal. Chem. 35, 582-
- Guilbault, G. G. y Lubrano, G. J., (1972); "Enzyme electrode for glucose". Anal. Chem. Acta. 60, 254-256.
- Guilbault, G. G. y Lubrano, G. J., (1973); "An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose ". Anal. Chim. Acta. 64, 439-455.
- Guilbault, g.. (1976)* Enzyme electrodes and solid surface fluorescence methods". Methods in enzymology. Edited by Kolowick, S., y Kaplan, 44, Academic Press, New York.
- Guilbault, G.. (1980); "Enzyme electrode probes". Enzyme Microb. Technol. 2, 258-264.

Guilbault, G. G., (1982): "Analytical uses of immobilized enzymes" in Enzyme Engineering, G. Plenum Press., 395-404.

Gronow, H., (1984): "Biosensors", Trends in Biotech. Sci., 336-339

Gurin, S. y Hood, L. B. (1939); J. Biol. Chem. 131, 211.

Hartemeier, W., (1985): "Immobilized biocatalyst from simple to complex systems", Trends in Biotech. 3, (6), 149-153.

Higgins, I. J., Cardosi, M. and Turner, A. P., (1985): "Harnessing biologically catalysed electron transfer reactions for biosensors", Expert NATO ASI Series, (life Sciences), Plenum, Press.

Ho, M. H., Guilbault, G. G. y Reitz, B. (1980). Anal. Chem. 44, 2161.

Hornby, W.E. y Filippusson, H. (1970). Biochim. Biophys. Acta. 220,343-

Horvath, C. and Solomon, B. (1972). Biotechnol. Bioeng. 14, 865-

Inman, D. y Hornby, W. (1972). "The immobilization of enzymes on nylon structures and their use in automated analysis", Biochem. J. 129, 265-262.

Inman, D. y Hornby, W. (1974). "Preparation of some immobilized enzyme systems and their use in the automated determination of disaccharides", Biochem. J. 137, 25-32.

- Jerker, F. y Rolf, A. (1976). "Immobilized enzymes to agar, agarosa and sephadex supports. Methods in Enzymology.
- Kadish, A. y Hall, D. (1965). Clin. Chem. 11, 869
- Kajihara, T. y Hagihara, B. (1961). Biochim. Biophys. Acta.
- Keilin, D. y Hartree, E. (1948). Biochem. J., 42, 230
- Kondo, T., Ito, K, Ohkura, K. y Ikeda S. (1982); "A miniature glucose sensor implantable in the blood stream". Diabetes care , 5, 216 - 221.
- Kuisl, M. y Klein, M. (1982); "The application of ion selective field effect transistors (ISFETs) without reference electrode". NTG Fachber 19, 289-94.
- Layne, E. C., Schultz, R. D., Thomas, L. J., Slama, G., Sayler, D. F. y Bessman, S. P. (1976); "Continuous extracorporeal monitoring of animal blood using the glucose electrode". Diabetes care, 25, 81,89.
- Lowe, C. R., Goldfinch, M. J., Lias, R. J.. (1983). Biotech 83. On line Publications, Northood. 633.
- Lowry, O., Rosebrough, J., Farr, A., Rondall, E.. (1951). "Protein measurement with the foliphenolreagent". J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Neil, L. D., y Malloy, J. T.. (1975). "A model for the amperometric enzyme electrodes obtained through digital simulations and applied to the immobilized glucose oxidasa system". Anal. Chem. 47, 804-808.

- Nilsson, H., Akerlund, A. G. y Mosbach, K., (1973). "Determination of glucose, urea, and penicillin using enzyme pH electrodes". Biochim. Biophys. Acta. 320, 529-534.
- Notin, M., Guillien, R., y Nabet, P., (1972). "Le dosage du glucose sanguin a l'aide d'une electrode a enzyme". Ann. Biol. Clin. 30, 193-197.
- Peterson, J. I., Goldstein, S. R., Fitzgerald, K. V. y Bucknold, F. K., (1980). Anal. Chem. 52, 864.
- Romette, J. L., Froment, B. y Thomas, D., (1979). "Glucose oxidase in samples exhibiting high variability oxygen content". Clin. Chim. Acta. 95, 249-253.
- Salleh, A. B., (1982). "Activation of Nylon Alkaline Glutaraldehyde Solution for Enzyme Immobilization". Biotechnol. Lett. 4, (12) 769-774.
- Scheller, F., Wollenberger, U., Shubert, F., Pfeiffer, D., Kanneberg, R., Janchen, M., Wanzel, H., Weise, H., Bertermann, K. (1982). "Biospecific sensors". in Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, 18, (4), 454-470.
- Shichiri, M., Kawamori, R., Yamasaki, I., Hakui, N. y Abe, H., (1982). "Wearable artificial endocrine pancreas with needle type glucose sensor". Lancet 11, 1129-1131.
- Sundaram, P. V. y Hornby, W. E., (1970). FEBS Lett. 10, 325.

- Sutherland, R. M., Dahne, C., Place, T. F. y Kingrose, A. S., (1984).
Clin. Chem. 30, 1533.
- Susuki, S. y Karube, I., (1979). "Microbial electrodes for fermentation processes". Biochem. Engin. Annals of the New York Acad. Sci. 326, 255-269.
- Susuki, S. y Karube, I., (1981). "Bioelectrochemical sensors based on immobilized enzymes, whole cells and proteins". Appl. Biochem. Bioeng. 3, 145-174.
- Tramper, J., (1985). "Immobilizing biocatalysts for use in syntheses". Trends in Biotechnol. 3, (2), 45-50.
- Turner, A. P. F., (1983). "Applications of direct electron transfer bioelectrochemistry in sensors and fuel cell". in Biotech 83. On line Publications Northwood. 643-654.
- Updike, S. J. y Hicks, G. P., (1967). "Glucose electrode based on an oxygen probe". Nature, 214, 980-.
- Weetall, H. H., (1975). "Immobilized enzymes, antigens, antibodies and peptides, preparation and characterization". Ed. Dekker New York.
- Uingard, L. B., Schiller, J. G., Wolfson, S. K., Liu, C. C., Drash, A. L. y Yao, S. J., (1979). "Immobilized enzyme electrodes for the potentiometric measurement of glucose concentration. immobilization techniques and materials". J. Biomed. Mater. Res. 13, 921-935.

Wingard, L. B., (1983)a. "Prospects for electrochemical devices and processes based on biotechnology". In Biotech 83. On line Publications, Nortwood. 613-624.

Wingard, L. B., Cantin, L. A. y Catsner, J. F., (1983). "Effect of enzyme matrix composition on potentiometric response to glucose using glucose oxidase immobilized on platinum". Biochim. Biophys. Acta. 748, 21-27.

Zaborsky, O., (1977). "Immobilized enzymes". CRC. Press Inc. 5-46.