



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Físicoquímica

INFIQC – CONICET

Estudio de propiedades  
físicoquímicas de matrices de  
hidrogel y de su interacción con  
biomoléculas para el desarrollo de  
biosensores

Lucas Colombo

2018



El trabajo aquí presentado fue desarrollado en el Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección del Dr. Fernando Sebastián Garay y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Dr. Fernando Sebastián Garay

Director de Tesis

**Comisión Evaluadora**



## Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, al Departamento de Físicoquímica y al INFIQC por darme el lugar y la oportunidad para hacer el doctorado. Al CONICET por la beca otorgada, sin la que no hubiese sido posible esto.

A los entes que financiaron este trabajo de tesis: CONICET, SeCyT y FONCyT.

A mi director Fernando, por darme la oportunidad de compartir este trabajo y por todo el conocimiento brindado. Por confiar en mi trabajo siendo un indocto en la química analítica.

A la comisión de tesis, por asumir el compromiso de acompañarme en este trayecto, por interesarse en el tema, por su tiempo y enseñanzas en cada una de las reuniones de tesis.

A la evaluadora externa, Dra Rossana Madrid, por tomarse el trabajo de leer y evaluar esta tesis.

A Ana Baruzzi, por adoptarme como parte del grupo investigación, por confiar en mí y darme tiempo para discutir datos, enseñarme y aconsejarme. Aprendí cosas muy valiosas en estos años, y un gran porcentaje de ellas no tiene nada que ver con la química. Son las más invaluable.

A Ceci Alvarez por su apoyo y por darme un lugar en su equipo. Por preocuparse por el trabajo y aconsejarme en el tramo final.

A Marcelo Romero, por enseñarme desinteresadamente todo lo necesario para comenzar a trabajar en biosensores.

A todo el personal docente y no docente del departamento, y personal de apoyo del INFIQC.

A todos los compañeros del 110, con los que compartimos mucho tiempo de laboratorio y buenos momentos: Fer, Vico, Chino, Ceci, Eli, Lydia, Lu, Tomás, Cande, Benja, Vicky, Vale S, Lalo, Taqui, Sabri. Todos hicieron que las horas en el sótano sean mucho más agradables.

A Mabel, Vale J, Vero, Rodrigo. Fueron muy importantes en todos estos años con consejos, charlas y apoyo constante.

A los compañeros de tantas horas compartidas, Susi, Florentina, Betha, Cuba, Luri, Maru.

A Fausto, Lucio y Andrés por el camino recorrido.

A mi familia, por apoyarme siempre en todas las decisiones tomadas a lo largo de mis estudios, posgrado y desarrollo profesional, además de estar siempre presentes para todo. Esto fue posible gracias a ustedes.

Al sistema educativo nacional, público y de calidad y a todas la personas que luchan para se siga manteniendo de esta forma.

Y, muy especialmente, a Flor, la compañera de mi vida, mi ejemplo y motivación, mi amiga, que me enseñó que todo se puede sacar adelante.

“La ciencia puede descubrir lo que es cierto, pero no lo que es bueno, justo y humano”

*Marcus Jacobson*

# Índice

<b>I. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>II. CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	<b>18</b>
<b>II.1 BIOSENSORES</b>	<b>18</b>
II.1.1 BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS ENZIMÁTICOS	19
<b>II.2 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS</b>	<b>25</b>
II.2.1 TIPOS DE INMOVILIZACIÓN	26
Atrapamiento	27
Encapsulamiento	27
Adsorción	27
Unión covalente	28
II.2.2 GRUPOS FUNCIONALES EN LAS ENZIMAS	28
Cadenas laterales de aminoácidos	29
Grupos funcionales sintéticos	29
II.2.3 MATERIALES DE SOPORTE	30
<b>II.3 EFECTO DE LA INMOVILIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA</b>	<b>31</b>
II.3.1 EFECTO DEL MICROAMBIENTE	31
Efecto de la partición	32
Efecto de la difusión	33
II.3.2 EFECTO SOBRE LA ENZIMA	34
<b>II.4 BIOSENSORES DESARROLLADOS EN ESTA TESIS</b>	<b>35</b>
II.4.1 ANTECEDENTES DE BIOSENSORES CON GLUCOSA OXIDASA	36
II.4.2 ANTECEDENTES DE BIOSENSORES CON LACASA	38
<b>II.5 CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS UTILIZADAS</b>	<b>42</b>
II.5.1 MECANISMOS ENZIMÁTICOS	42
Reacciones de sustrato único: Mecanismo de Michaelis – Menten	43
Mecanismo de ping pong para las enzimas rédox	46
II.5.2 GLUCOSA OXIDASA (EC 1.1.3.4)	48
II.5.3 LACASA (EC 1.10.3.2)	50

<b>II.6 CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPONENTES DEL SOPORTE DE INMOVILIZACIÓN</b>	<b>52</b>
II.6.1 HIDROGELES: ESTRUCTURA Y PROPIEDADES	53
II.6.2 POLÍMEROS UTILIZADOS COMO SOPORTE ENZIMÁTICO	56
Mucina	56
Albúmina	58
Qitosán	60
Mezclas entrecruzadas con glutaraldehído	63
<b>III. CAPÍTULO III: FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS</b>	<b>66</b>
<b>III.1 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS</b>	<b>66</b>
III.1.1 CRONOAMPEROMETRÍA	68
<b>III.2 ECUACIONES PARA SIMULAR LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR DE GOX</b>	<b>73</b>
Modelo matemático	74
<b>III.3 MEDICIONES REOLÓGICAS</b>	<b>77</b>
Sólidos ideales	78
Líquidos ideales	80
Materiales viscoelásticos	81
III.3.1 REOLOGÍA	81
<b>III.4 HINCHAMIENTO</b>	<b>85</b>
<b>III.5 TRANSPORTE DE SOLUTOS A TRAVÉS DE LA MATRIZ POLIMÉRICA</b>	<b>87</b>
<b>IV. CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES</b>	<b>90</b>
<b>IV.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MATERIALES</b>	<b>90</b>
Soluciones buffer	90
Soluciones enzimáticas	91
Soluciones estándares de analito	91
Solución de entrecruzante	92
Preparación de los polímeros	92
<b>IV.2 PREPARACIÓN DE ELECTRODOS ENZIMÁTICOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>92</b>
Electrodos	94
Membranas permeoselectivas	94

IV.2.1	MATRIZ ENZIMÁTICA DE GLUCOSA	95
IV.2.2	MATRIZ ENZIMÁTICA DE LACASA	95
IV.2.3	PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS ENZIMÁTICOS	95
<b>IV.3</b>	<b>DETERMINACIONES REALIZADAS POR CRONOAMPEROMETRÍA</b>	<b>97</b>
IV.3.1	CURVAS DE CALIBRACIÓN	97
IV.3.2	EFFECTO DEL PH	97
IV.3.3	EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD	97
IV.3.4	MEDIDAS EN SUERO SANGUÍNEO Y ENSAYO DE RECUPERACIÓN	98
<b>IV.4</b>	<b>ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS</b>	<b>99</b>
IV.4.1	ÍNDICE DE HINCHAMIENTO	99
IV.4.2	COEFICIENTE DE PARTICIÓN	100
IV.4.3	COEFICIENTE DE DIFUSIÓN	100
IV.4.4	PERMEABILIDAD	102
IV.4.5	REOLOGÍA	103
<b>V.</b>	<b>CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>104</b>
<b>V.1</b>	<b>DESARROLLO DEL BIOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA</b>	<b>104</b>
V.1.1	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENTRECruzANTE	104
V.1.2	EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ	107
	Evaluación del intervalo lineal de la respuesta	109
	Selección de la matriz para desarrollo analítico	111
V.1.3	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA	112
V.1.4	PROPIEDADES ANALÍTICAS	116
	Reproducibilidad de sensor a sensor	116
	Límite de detección e intervalo lineal	117
V.1.5	ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR DE GLUCOSA	119
	Diferencia en el tiempo de respuesta de acuerdo a la forma de almacenamiento	125
V.1.6	ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	131
<b>V.2</b>	<b>DESARROLLO DEL BIOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE CATECOL</b>	<b>132</b>
V.2.1	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENTRECruzANTE	133
V.2.2	EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ	135

Evaluación del intervalo lineal de la respuesta	137
Selección de la matriz óptima para el desarrollo analítico	139
V.2.3 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LAC	139
V.2.4 EFECTO DE LA VARIACIÓN DEL PH DE LA SOLUCIÓN	141
V.2.5 PROPIEDADES ANALÍTICAS	142
Reproducibilidad de sensor a sensor	143
Límite de detección e intervalo lineal	144
V.2.6 ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR DE CATECOL	145
<b>V.3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LAS MATRICES POLIMÉRICAS</b>	<b>147</b>
V.3.1 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE HINCHAMIENTO	148
V.3.2 COEFICIENTE DE PARTICIÓN DEL SOLUTO	150
V.3.3 ANÁLISIS DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN	151
V.3.4 PERMEABILIDAD	153
V.3.5 PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS MEZCLAS DE POLÍMEROS	154
Mezcla de mucina y albúmina	154
Mezcla de mucina y quitosán	157
Parámetros fisicoquímicos en función de propiedades reológicas	160
<b>V.4 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y DESEMPEÑO ANALÍTICO</b>	<b>162</b>
V.4.1 BIOSENSOR DE GOX	163
V.4.2 BIOSENSOR DE LAC	167
<b>V.5 SENSORES DE GLUCOSA, CATECOL, LACTATO Y OXALATO</b>	<b>171</b>
<b>VI. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>178</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>184</b>



## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

El campo de los biosensores encontró su origen en 1962 de la mano de los trabajos de dos grupos de investigación independientes, uno compuesto por Clark y Lyons<sup>1</sup>, y el otro por Guilbault y colaboradores<sup>2,3</sup>. Estos desarrollos permitieron que, algunos años después, se comercialice el primer dispositivo diseñado para la cuantificación de un analito utilizando un biosensor como elemento de detección. Más adelante, en el año 1986, Di Gleria y colaboradores<sup>4</sup> describieron un procedimiento que sentó las bases para la comercialización masiva de biosensores de uso doméstico mediante la *introducción de mediadores rédox*.

A partir de estos precedentes, los biosensores han tomado un rol analítico significativo en la medicina siendo un aliado fundamental en los controles personales de glucemia en pacientes diabéticos. Sin embargo, también creció su interés en otros campos de aplicación tales como la agricultura, la seguridad alimenticia, el procesamiento de efluentes, el monitoreo medioambiental e industrial, entre otros. Para el año 2015, se dimensionó el mercado de los biosensores alrededor de los 17300 millones de dólares<sup>5</sup>. Esta magnitud se debe no sólo a las aplicaciones en diagnóstico médico, sino también a las aplicaciones industriales, a la popularidad de la tecnología, el aumento en la incidencia de enfermedades crónicas (como la diabetes) y la creciente necesidad de monitoreo medioambiental. Como en cada caso en que una innovación científica se vuelve aplicable, el incremento en cuanto al volumen de bibliografía publicada ha sido fenomenal. Se calcula que año a año se producen más de un 10% del total acumulado de trabajos publicados<sup>6</sup>. En un manuscrito dado a conocer hace ya varios años, pero que mantiene una vigencia absoluta, Kissinger<sup>7</sup> hace foco en esta explosión de publicaciones. El autor discute acerca del motivo por el cual se continúa investigando en el desarrollo de biosensores para la cuantificación de analitos que no presentan interés o necesidad alguna de determinación, alegando que muchos de los biosensores se publican debido a que es posible construirlos y no porque exista una real

necesidad de hacerlo o una aplicabilidad ya sea mediata o inmediata. Incluso, la gran cantidad de trabajos hace que sea engorroso tratar de diferenciar publicaciones en las que se presenta una verdadera innovación en el campo de los biosensores, frente a aquellas en las que se enmascara como biosensor a un determinado arreglo experimental bajo pretexto de su capacidad de detección de una sustancia en particular.

Frente a este panorama es necesario preguntarse, ¿por qué trabajar en el desarrollo de un biosensor que lleve a cabo la misma cuantificación que otro ya elaborado? ¿Tiene sentido investigar en el desarrollo de un biosensor por ejemplo de glucosa, cuando su uso está tan consolidado? La respuesta es que el trabajo será productivo y la investigación tendrá más sustento siempre y cuando el sensor que se desarrolle presente ventajas claramente definidas sobre los existentes, en alguno de los varios aspectos analíticos<sup>7</sup>.

Una forma de clasificar a los biosensores reside en diferenciarlos teniendo en cuenta la forma en que se utilizan<sup>7</sup>. Por un lado existen biosensores que permiten analizar compuestos de manera cuantitativa, semi-cuantitativa, o cualitativa; mientras que por otro lado pueden ser utilizados de manera continua, intermitente e incluso en forma de uso único. Estos últimos son los más comunes cuando se llevan a cabo controles diarios de glucosa en sangre. Tienen la ventaja de que, en la misma tira reactiva se encuentra el elemento sensor, el transductor y la celda de reacción. Asimismo, son fáciles de usar y no requieren de un equipamiento costoso y complejo. La mayoría de los trabajos de investigación se enfocan en el desarrollo de este tipo de sensores, en los que se utilizan diferentes estrategias de inmovilización de enzimas sobre superficies reactivas, incorporando en muchos casos nanotecnología para mejorar las respuestas obtenidas. Sin embargo, estos desarrollos prestan demasiada atención en obtener mejor sensibilidad y límite de detección, olvidando el costo de los materiales utilizados, y la laboriosidad de los procedimientos necesarios para tener la respuesta deseada, lo que conduce a una muy limitada aplicabilidad. Además, en general, la respuesta de estas tiras reactivas no es tan precisa comparada con otros métodos de laboratorio<sup>7</sup>. Una buena parte de los biosensores que se presentan en la

literatura muestran excelente límite de detección e intervalo lineal, incluso buena estabilidad y baja influencia a la presencia de interferentes. Sin embargo, nada dicen acerca de cómo se mantiene el límite de detección o el intervalo lineal, luego de transcurridas semanas de su ensamblado<sup>8</sup>.

Los biosensores de uso intermitente son otra alternativa, en la que el sensor se utiliza en una celda de flujo, que automáticamente renueva su contenido reutilizando el sensor adosado a ella. En términos generales, éstos presentan mayor precisión, exactitud y sensibilidad en la determinación frente a los biosensores de uso único. Esto se complementa con el menor costo por cuantificación debido a que en muchos casos pueden ser utilizados durante semanas, e incluso meses. La principal desventaja que presentan es que su uso no es tan simple como en el caso de los biosensores descartables. Normalmente, requieren de un arreglo experimental un poco más complejo, lo que hace que tecnológicamente sea más difícil su aceptabilidad y subsecuente escalado comercial.

Los biosensores tipo sándwich son un exponente de sensores de uso intermitente. Su elaboración se basa en la inmovilización de una enzima, sensible al analito a cuantificar, dentro de una matriz proteica que se atrapa dentro de dos membranas hidrofílicas. Estas membranas limitan el pasaje de moléculas de gran tamaño y pueden modificarse para impedir el paso de interferentes<sup>8</sup>. Un factor clave en este tipo de sensores es la forma en que se elabora la matriz de anclaje. El tipo de moléculas utilizado en la formación del soporte influye directamente en las propiedades fisicoquímicas y en el microambiente en el que se inserta la enzima. La actividad, la estabilidad y el tiempo de respuesta son consecuencias directas del proceso de inmovilización, de las características geométricas del sensor y del tipo de material electroactivo utilizado en el electrodo transductor<sup>9,10</sup>.

La glucosa es, posiblemente, uno de los compuestos biológicos más importantes para la vida. Siendo el principal combustible para el metabolismo, es responsable de generar gran parte del potencial energético para el crecimiento y reproducción de muchas especies. Existen una gran cantidad de ensayos analíticos que

permiten determinar glucosa en productos alimenticios. Sin embargo, generalmente es difícil identificar y cuantificar glucosa de manera específica, dada la presencia de tantas moléculas bioquímicamente similares. Los primeros intentos rudimentarios implicaron la utilización de métodos colorimétricos que permitieron detectar de forma inespecífica fragmentos de azúcares en sangre y orina<sup>11</sup>. Las nuevas tecnologías y el avance en el conocimiento bioquímico, dieron lugar a métodos específicos para combinaciones de monosacáridos o para glucosa únicamente. Si bien estos métodos se desarrollaron con el objetivo principal de diagnosticar y controlar la diabetes humana, demostraron ser efectivos para cuantificar glucosa en extractos de plantas y productos alimenticios como jugos y miel.

En el campo de la industria alimentaria y de análisis ambiental, ha surgido en el último tiempo la necesidad del monitoreo de compuestos fenólicos de naturaleza generalizada<sup>12</sup>. Estos compuestos son comunes en frutas y verduras, así como también son los responsables de las propiedades organolépticas de productos elaborados como el vino y el aceite de oliva<sup>13,14</sup>. En algunos fármacos y alimentos, fenoles con capacidad antioxidante son agregados para preservar el estado de oxidación de otras especies. Sus propiedades antioxidantes han demostrado ser de ayuda en la prevención del cáncer y algunas enfermedades cardiovasculares<sup>15</sup>. Por otro lado, existen algunos fenoles que son altamente contaminantes, en especial las especies cloradas. Estas especies llegan a las aguas naturales a través de los efluentes que se generan en actividades industriales como las refinerías de carbón, la producción de resinas, pinturas, textiles, pulpa para la fabricación de papel, entre otros. Esto hace que muchos organismos acuáticos, en los que se incluyen los peces, estén afectados por estos contaminantes. Debido a esta toxicidad, algunas especies de fenoles están sujetas a estrictas regulaciones para limitar su presencia en el agua<sup>12</sup>. Tanto la Comisión Europea como la Agencia de Protección Ambiental norteamericana han creado listas y clasificaciones que establecen límites para estas sustancias, tanto en cursos de agua naturales,

como en agua potable. Las técnicas más comunes para determinar compuestos fenólicos son las espectrofotométricas y las cromatográficas. Mediante estas técnicas

es posible identificar y cuantificar fenoles con gran precisión. Sin embargo, estos métodos necesitan de un tratamiento de la muestra algo laborioso, lo que imposibilita el monitoreo de estos analitos en lugar en el que se toma la muestra. El uso de biosensores aparece como una alternativa viable a las técnicas analíticas clásicas, ya que compiten en selectividad y sensibilidad, y son superiores en cuanto al tiempo de ensayo y costo por cada análisis.

El objetivo general de este trabajo es la construcción de biosensores tipo sándwich para glucosa y catecol, que sean aptos para cuantificar estos analitos en matrices complejas como la sangre o productos alimenticios. En este sentido, se pretende que sean lo suficientemente robustos como para soportar distintas condiciones ambientales y que mantengan sus propiedades analíticas durante varios días. Para lograr esto, fue necesario comprender la relación existente entre las propiedades fisicoquímicas de las matrices poliméricas que se utilizaron como medio de inmovilización enzimática y la respuesta analítica de los biosensores que se construyeron con las diferentes matrices. La principal hipótesis de este trabajo radica en poder demostrar que las propiedades del medio de anclaje y su interacción con las biomoléculas son quienes influyen sobre la respuesta electroquímica de un sensor enzimático. Para probar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1: Estudiar la actividad de las enzimas glucosa oxidasa y lacasa cuando se encuentran inmovilizadas en matrices de hidrogel compuestas por proteínas y/o polímeros de origen natural o sintético.
- 2: Evaluar la relación entre la sensibilidad e intervalo lineal del sensor en función tanto de la composición y grado de entrecruzamiento de la matriz de anclaje, como de la concentración de la biomolécula empleada.
- 3: Estudiar propiedades fisicoquímicas como viscoelasticidad, permeabilidad, difusión e hinchamiento de las matrices en función de la composición y del grado de entrecruzamiento.

4: Desarrollar, mediante técnicas de simulación numérica, modelos para evaluar las constantes relacionadas con la cinética enzimática.

5: Vincular características analíticas como el límite de detección, sensibilidad e intervalo lineal de cada sensor con las propiedades fisicoquímicas del hidrogel.

Los experimentos planteados para alcanzar estos objetivos, conjuntamente con los trabajos previos del grupo de investigación, fueron utilizados para entender de manera profunda el comportamiento de las matrices de anclaje y su interacción con las enzimas. De este modo se podría llegar a prever la respuesta que se obtendría al incorporar una determinada enzima en una mezcla de polímeros entrecruzados, y así diseñar las estructuras que se necesitan para la construcción de un determinado biosensor.

## CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### II.1 Biosensores

Uno de los procesos fundamentales dentro de los sistemas biológicos es el reconocimiento molecular. Para ello, existen en la naturaleza una gran variedad de estructuras biomoleculares que son capaces de reconocer con gran selectividad alguna propiedad específica de una especie entre un conjunto de ellas. Esta propiedad puede ser aprovechada con fines analíticos y de este modo diseñar sensores para detectar dichas especies<sup>16</sup>.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a un sensor químico como un dispositivo que transforma información química, como la concentración de un componente en una muestra, en una señal analíticamente útil. La información puede originarse de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema que se encuentra en investigación<sup>17</sup>. Los sensores químicos, generalmente, están compuestos por dos elementos en serie: un sistema de reconocimiento químico (receptor) y un transductor fisicoquímico<sup>18</sup>. El receptor es la parte del sensor donde la información química es transformada en otra forma de energía que puede ser medida por el transductor. A su vez, en el transductor se transforma la energía aportada por la información química en una señal analítica útil. Aquellos sensores químicos en los que el sistema de reconocimiento utiliza un mecanismo bioquímico se denominan **biosensores**<sup>17,18</sup>.

El proceso analítico comienza cuando el sistema de reconocimiento biológico transforma información desde el dominio bioquímico (usualmente la concentración de un determinado compuesto) en una señal que puede ser física o química, con una sensibilidad definida. Esta señal llega al transductor fisicoquímico, en contacto íntimo con el receptor<sup>18</sup> (Figura II-1). El transductor toma la señal del receptor y la transforma, en la mayoría de los casos, en una señal eléctrica posible de ser cuantificada, procesada

y almacenada. Este elemento, por lo tanto, determina la eficacia en el procesamiento de la señal del biosensor. Los transductores más utilizados son los electroquímicos, ópticos, magnéticos, piezoeléctricos y calorimétricos<sup>19</sup>.

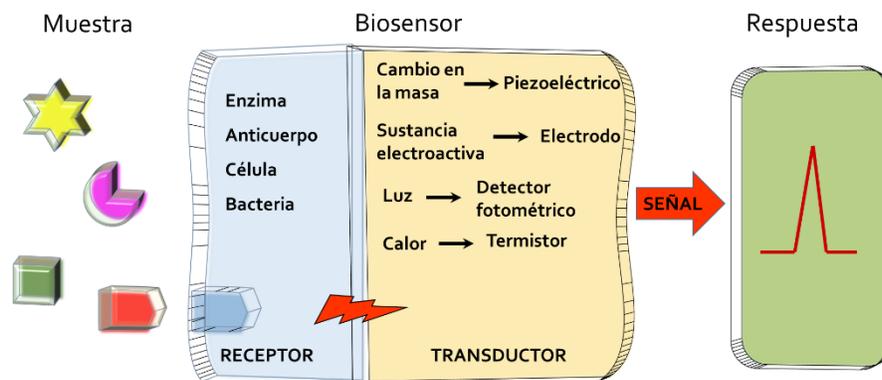


Figura II-1: Esquema generalizado de un biosensor.

El receptor es una de las partes más importantes del biosensor debido al rol indispensable que cumple en el reconocimiento de la molécula de interés. Interactúa selectivamente con el analito con el que se puede complementar ya sea en estructura y/o en composición, lo que proporciona la gran especificidad propia de estos sistemas. Esta interacción entre el receptor y el analito debe tener además gran afinidad y estabilidad, para que el biosensor sea exitoso. Existen dos grandes tipos de receptores biológicos, los biocatalíticos (enzimas, células u organelas celulares, microorganismos) y los bioligandos (anticuerpos, lectinas, ácidos nucleicos, aptámeros)<sup>18,20</sup>.

### II.1.1 Biosensores amperométricos enzimáticos

En la actualidad, la gran mayoría de los biosensores presentados en la literatura y utilizados en análisis clínico se basan en la transducción electroquímica de la señal proveniente del elemento de reconocimiento. Este hecho se debe a que existe una serie de ventajas en el uso de estos transductores. En primer lugar hay una transducción directa e instantánea hacia la señal de lectura debido a la naturaleza eléctrica del fenómeno, lo que permite la monitorización de la cinética de la reacción. Debido a esto, los límites de detección que se obtienen son suficientes y adecuados para la

cuantificación de muchos analitos de interés aún en muy bajas concentraciones, aunque esto no sólo depende del transductor. En segundo lugar, si la señal eléctrica es significativa, la instrumentación que se requiere para su uso es relativamente simple y de bajo costo. En tercer lugar, la naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas hace que se necesiten pequeños volúmenes de muestra para realizar una determinación. Por otra parte, también existen algunas desventajas, como la necesidad de utilizar un electrodo de referencia estable para realizar las medidas y la selectividad relativamente baja de las superficies utilizadas como transductores. Este último inconveniente puede subsanarse en gran medida mediante el uso de sistemas con mayor reconocimiento específico.

Desde su primera aparición en 1962<sup>19</sup>, la cantidad de trabajos publicados asociados al desarrollo de biosensores se ha incrementado año a año<sup>20</sup>. Sin lugar a dudas, el tipo más numeroso de biosensores corresponde a aquellos que utilizan enzimas como elemento de reconocimiento. Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas en los seres vivos. En estas reacciones, la molécula transformada se denomina sustrato y en la mayoría de los casos implica el uso de otro reactivo (cofactor) para poder generar el o los productos de la reacción. Los biosensores enzimáticos pueden cuantificar ya sea el aumento de las especies producidas, así como la disminución de las especies consumidas. La reacción enzimática es eficiente y extremadamente selectiva, por lo que en las aplicaciones analíticas se considera simultáneamente la presencia de dos factores, el factor de reconocimiento y el de amplificación. Una de las mayores ventajas es que, en presencia del mediador, luego de su reacción con el sustrato, las enzimas regeneran su estado inicial y no es necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor. Debido a que comúnmente el proceso de regeneración es bastante rápido, el biosensor responde continua y reversiblemente al analito de interés.

Generalmente los **biosensores amperométricos** utilizan la técnica electroquímica de cronoamperometría para registrar la reacción enzimática. En esta técnica, las especies químicas (sustancias electroactivas) se oxidan o reducen en un

electrodo conductor a potencial constante. Éste es el método que se aplica usualmente en los biosensores que se encuentran disponibles comercialmente. La celda electroquímica, el arreglo experimental donde se colocan los electrodos y el electrolito soporte, generalmente está formada por tres electrodos: el electrodo de trabajo, cuya superficie electroactiva puede estar compuesta por diferentes materiales como platino, carbono vítreo, pasta de carbono, oro; un electrodo de referencia (generalmente Ag|AgCl) que permite controlar el potencial aplicado al electrodo de trabajo; y un contra electrodo o electrodo auxiliar que cierra el circuito eléctrico y evita que se despolarice el electrodo de referencia al impedir que circule corriente en él. En la Figura II-2 se muestra una representación esquemática de un biosensor amperométrico enzimático<sup>21</sup>. Cuando al electrodo de trabajo se le aplica un potencial positivo con respecto al potencial formal de la reacción, se produce la oxidación de la especie electroactiva. Por el contrario, al aplicarse potenciales negativos con respecto al potencial formal de la reacción rédox de un analito electroactivo, la reacción que ocurre es una reducción.

Los sustratos de la reacción difunden a la superficie del electrodo donde se lleva a cabo el proceso rédox, y la corriente que se mide de la celda es proporcional a la concentración del analito de interés en la muestra.

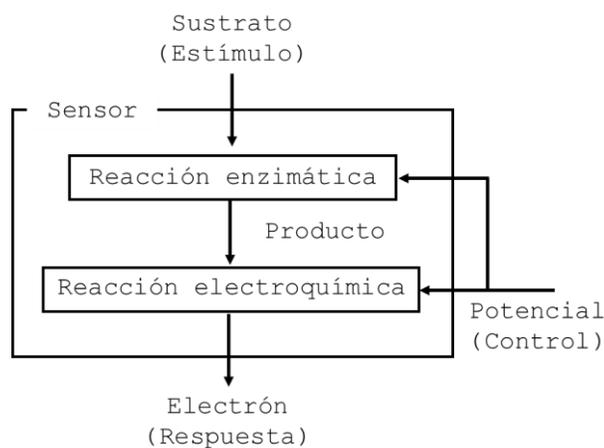


Figura II-2: Esquema de un biosensor amperométrico enzimático<sup>21</sup>.

El primer biosensor amperométrico enzimático descrito en bibliografía, desarrollado por Clark y Lyons<sup>1</sup>, fue un sensor que utilizaba a la enzima glucosa oxidasa

(GOX) inmovilizada sobre la superficie de un electrodo sensor de oxígeno. En él, la enzima se atrapaba mediante el uso de una membrana de diálisis que impedía el paso de moléculas de gran tamaño, pero permitía la difusión de oxígeno y glucosa desde la matriz de trabajo, por lo que la enzima quedaba encerrada cerca de la superficie del electrodo. Muchos biosensores enzimáticos incorporan el uso de membranas permeoselectivas, tanto internas como externas ya que cumplen importantes funciones<sup>18</sup>:

- **Capa protectora.** La membrana externa evita que moléculas de gran tamaño, como proteínas o células en muestras biológicas, entren al sensor e interfieran con la reacción. También, reduce la pérdida de componentes hacia la muestra. Esta membrana es particularmente indispensable para el desarrollo de sensores para uso *in vivo*. Además, la correcta elección de una membrana puede determinar distintas propiedades de permeoselectividad debido principalmente a la diferencia de carga con interferentes, lo que permite disminuir la influencia de estos últimos<sup>18</sup>.
- **Barrera difusional.** Debido a que las enzimas presentan una cinética de reacción que en la mayoría de los casos puede simplificarse de acuerdo al modelo de Michaelis – Menten, la velocidad de reacción generalmente no es lineal con respecto a la concentración del sustrato. Sin embargo, el intervalo lineal puede ser extendido si el sensor responde de manera controlada por la difusión del analito y no por la velocidad de reacción enzimática<sup>22</sup>. Esto, puede lograrse colocando una membrana sobre la superficie enzimática que, mientras más delgada sea, menor será el tiempo de respuesta del sensor. Por otro lado, cuando es grande la cantidad de enzima activa que se utiliza dentro del sensor, la barrera difusional hace que la respuesta sea independiente de su concentración. Además, la membrana le confiere mayor estabilidad a la respuesta ya que funciona como filtro para las perturbaciones mecánicas que pueden generarse en la solución<sup>18</sup>.

- **Biocompatibilidad y bioestabilidad.** Cuando los sensores se ponen en contacto con tejido o fluidos biológicos están sometidos a dos tipos de alteraciones<sup>18</sup>:
  - Alteración de la muestra biológica debido a reacciones causadas por la introducción del sensor. Los sensores pueden ser tóxicos, cancerígenos, generar mutaciones o reacciones inmunológicas, o producir trombos en caso de que se introduzcan directamente en la circulación sanguínea.
  - Modificación de las propiedades operativas del sensor por componentes de la muestra biológica. Las sustancias presentes pueden obstruir los poros de la membrana externa e interna dificultando la difusión de los sustratos y de los productos. Además, ciertos componentes puede inhibir la reacción enzimática.

Para los sensores destinados al uso *in vivo* la elección que se haga de la membrana externa resulta fundamental para tener la estabilidad necesaria una vez implantado. Existen membranas de policarbonato, colágeno o acetato de celulosa, pero también se pueden generar membranas mediante diferentes técnicas, para que el sensor implantado no afecte el funcionamiento del medio en el cual está inmerso, ni que se vea afectado por él.

Las oxidasas son las enzimas mayormente utilizadas en el desarrollo de biosensores amperométricos. En muchos casos, el cofactor natural de estas enzimas es el oxígeno molecular, que se transforma en peróxido de hidrógeno durante la reacción con el sustrato (Figura II-3 – A). Los sensores electroquímicos que incluyen sólo el elemento de bioreconocimiento y el transductor se clasifican como biosensores de **primera generación**<sup>23</sup>. En este caso, el electrodo de trabajo se polariza a un potencial apropiado para oxidar o reducir al peróxido generado. La corriente medida será proporcional a la concentración del sustrato debido al cambio en la concentración del peróxido en la interfase del electrodo. El principal inconveniente de este método es que la alta selectividad lograda por el elemento de reconocimiento puede verse contrarrestada por la baja selectividad de la detección electroquímica, causada por la magnitud de los potenciales que deben ser aplicados.

Si bien existe una gran variedad de combinaciones posibles entre biorreceptores y transductores, muchas veces se detecta la demanda de mejoras en la comunicación entre ambos. En estos casos, se utilizan compuestos intermediarios que actúan como mediadores rédox entre el receptor biológico y el transductor<sup>24</sup>. Los biosensores de **segunda generación** se basan en el reemplazo del cofactor natural por un mediador rédox, que tenga características químicas apropiadas y un potencial estándar adecuado para regenerar el centro rédox de la enzima, Figura II-3 – B. Este tipo de sensores utiliza mediadores que pueden difundir dentro del compartimiento que define la membrana externa o que se encuentran adheridos a la superficie del electrodo. La forma oxidada y reducida de estos compuestos debe ser estable y debe reaccionar rápidamente tanto con la enzima como con la superficie del electrodo. Mediante el uso de mediadores, es posible utilizar potenciales en los cuales se evita la reacción de algunos de los interferentes electroactivos. La principal desventaja es que suele ser necesario llevar a cabo análisis en matrices complejas, en las que la contaminación con el mediador artificial no está permitida. Por otro lado, la reutilización de los sensores puede verse afectada por la pérdida del cofactor a medida que se repiten los ensayos con un mismo sensor.

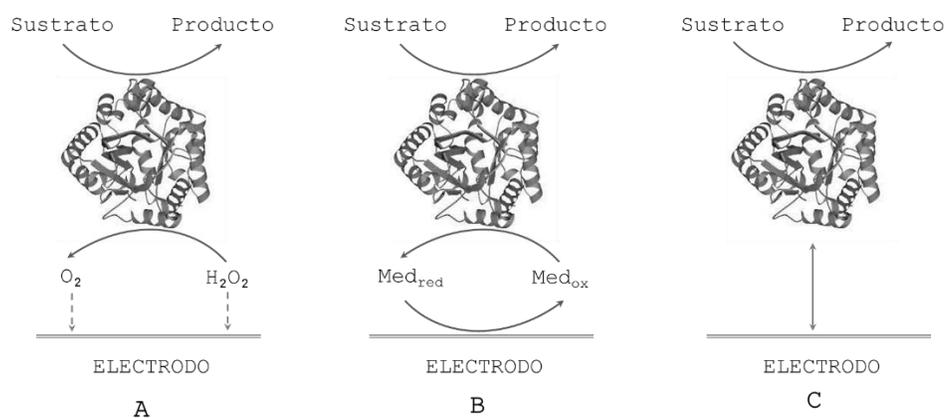


Figura II-3: Esquema de funcionamiento de un biosensor amperométrico que utiliza una enzima del tipo oxidasa, con oxígeno molecular como cofactor (A), con mediadores rédox (B), o mediante transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo (C).

La **tercera generación** de biosensores amperométricos, que es la más reciente, se basa en la eliminación del mediador de la reacción enzimática, Figura II-3 – C. Estos

sensores funcionan a potenciales relativamente bajos, cuyos valores están definidos por el potencial rédox del centro activo de la enzima<sup>23,25</sup>. En este caso, los electrones se transfieren directamente desde la enzima, vía sitio activo, a la superficie del electrodo. Para lograr la transferencia directa de electrones es necesario disminuir notablemente la distancia entre el sitio rédox enzimático y la superficie del electrodo. Actualmente, se considera que este acercamiento se puede lograr con el uso de nanotubos de carbono u otro tipo de nanopartículas. Sin embargo, la capacidad con que se cuenta en la actualidad para manipular nanopartículas en un biosensor es muy limitada. Por consiguiente, el tipo de conexión que se efectúa puede ocasionar cambios conformacionales de la enzima, con la correspondiente pérdida de actividad. Es por esto, que aún existen varios desafíos a sortear en esta clase de sensores<sup>25</sup>.

## II.2 Inmovilización de enzimas

Las enzimas son proteínas desarrolladas evolutivamente para catalizar reacciones específicas dentro las células vivas. Las condiciones en que se llevan a cabo las reacciones enzimáticas dentro de los biosensores difieren ampliamente a las del ambiente natural en que funcionan estas proteínas. La inmovilización debe llevarse a cabo de manera que se permita a la enzima mantener su conformación activa, de modo que sea catalíticamente funcional. Las razones para preparar y utilizar enzimas inmovilizadas son múltiples. La posibilidad de separarlas con facilidad de los productos y la reutilización son dos de los principales beneficios que se obtienen<sup>26</sup>, ya que se simplifica su aplicación y se reducen los costos de su uso.

La inmovilización es un proceso complejo y el desempeño final dependerá de las características individuales de la enzima y de los componentes del soporte, así como del conjunto que ellos formen. Por un lado, deben tenerse en cuenta las propiedades bioquímicas de las enzimas, el tipo de reacción y la cinética enzimática, y por otro lado deben considerarse las características químicas y mecánicas del soporte, ya que ambos determinarán las propiedades del sistema en conjunto. De esto depende la eficiencia

del método de inmovilización, el transporte de masa y la estabilidad operacional, lo que genera variabilidad en el rendimiento alcanzado.

Se puede definir a la inmovilización como el proceso en donde se retienen moléculas de enzima en una fase, fijada en la superficie o dentro de un soporte sólido, permitiéndose el intercambio con la fase solución en la cual están dispersas las moléculas de sustrato<sup>27</sup>. El soporte sólido generalmente estabiliza la estructura de la enzima por lo que se mantiene su actividad. Debido a esto, las enzimas inmovilizadas suelen ser más robustas, estables y resistentes a cambios en el medio con respecto a las que se encuentran libres en solución. No obstante, las enzimas inmovilizadas comúnmente presentan menor actividad debido a la relativa dificultad del sustrato para difundir y alcanzar el sitio activo de la enzima<sup>27</sup>. En muchos casos, la fase que contiene a la enzima está formada por polímeros hidrofílicos de alto peso molecular que son, usualmente insolubles en agua.

### II.2.1 Tipos de inmovilización

Conceptualmente existen dos métodos para la inmovilización: la enzima puede soportarse mediante interacciones físicas o químicas. Cada una de ellas involucra distintas metodologías. Los métodos físicos incluyen el atrapamiento de la enzima en una matriz tridimensional o su encapsulación en un polímero orgánico o inorgánico, mientras que los métodos químicos incluyen adsorción, enlace covalente con el soporte y auto inmovilización (la enzima se entrecruza con sí misma y no se requiere soporte)<sup>28,29</sup>. En muchos casos, la inmovilización no se logra mediante un único método, sino que existen dos o más tipos de interacciones simultáneamente.

El método de inmovilización dependerá de la fase sólida de soporte. Una de las formas más utilizadas es la unión covalente de la enzima a un polímero insoluble<sup>30</sup>. De esta forma se genera una matriz enzimática insoluble y activa. Otra forma, es unir la enzima al polímero mediante mecanismos de unión electrostática o no covalente. La enzima queda atrapada en el polímero debido a que éste forma una red con un tamaño

de poro demasiado pequeño como para permitir que difunda la enzima, pero con el tamaño suficiente para permitir la entrada de los sustratos de bajo peso molecular<sup>31</sup>.

### *Atrapamiento*

El atrapamiento se define como la retención física de una enzima en una matriz sólida porosa<sup>29</sup>. Generalmente se logra usando una red polimérica, con polímeros orgánicos, y se lleva a cabo *in-situ*<sup>32</sup>. La enzima se mantiene en una solución de monómero en la que luego se lleva a cabo la polimerización manteniendo así a la enzima atrapada y evitando que ésta interactúe directamente con el medio. Es un método sencillo en el que la enzima no se altera estructuralmente, pero que presenta como desventajas la significativa disminución en el transporte de masa y la baja carga de enzima que se logra en el polímero. Mediante el ajuste de las condiciones de polimerización se pueden modificar varias características del polímero, como la porosidad, la estructura de red y la funcionalidad superficial<sup>32</sup>.

### *Encapsulamiento*

El encapsulamiento también protege a la enzima del contacto directo con el medio, pero de igual forma limita el transporte de masa y en consecuencia la catálisis de sustratos de gran tamaño<sup>32</sup>. En esta técnica, la enzima se rodea con un material semipermeable, como polímeros (polietiliminina) o materiales inorgánicos (SiO<sub>2</sub>)<sup>29</sup>, con los cuales se pueden formar films delgados para confinarla en un espacio determinado.

### *Adsorción*

La adsorción es un método de inmovilización relativamente sencillo y económico, en el que se intenta que no se modifique estructuralmente a la enzima. Su principal limitación es que la enzima tiende a disiparse de la superficie en la que se adsorbe, especialmente cuando se trabaja con solventes acuosos, por lo que se limita su aplicación<sup>32</sup>. La inmovilización se basa en fuerzas de atracción de distinta índole entre la proteína y la superficie, como interacciones iónicas, fuerzas de van der Waals,

interacciones hidrofóbicas o enlaces hidrógeno, por lo que debe tenerse en cuenta el pH y la fuerza iónica del medio y la hidrofobicidad de la superficie<sup>29</sup>.

### *Unión covalente*

La inmovilización mediante unión covalente de la enzima con el sustrato de soporte es quizás la técnica de inmovilización más utilizada. La principal ventaja es que debido a la naturaleza estable de la unión entre la proteína y la matriz soporte, la enzima no difunde a la solución luego del uso. En este caso, los grupos funcionales del soporte se activan para reaccionar con grupos nucleofílicos en la proteína<sup>29</sup>. La mayoría de las enzimas se unen a través los grupos amino de la lisina, ya que se encuentran frecuentemente en la superficie de diversas proteínas y son suficientemente reactivos como para reaccionar<sup>32</sup>. Una dificultad que se presenta en la práctica es que se debe evitar generar enlaces covalentes con los aminoácidos que son esenciales para la actividad catalítica, y así lograr buenos niveles de actividad enzimática luego de la unión<sup>33</sup>.

El material soporte debe contener suficiente cantidad de grupos reactivos para que se lleve a cabo la reacción y éstos deben estar suficientemente separados de la superficie para que no existan impedimentos estéricos por los que pueda fracasar la inmovilización<sup>29</sup>.

### II.2.2 Grupos funcionales en las enzimas

Las enzimas son proteínas compuestas por cadenas de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos, por lo que pueden considerarse como macromoléculas polifuncionales con densidad de carga variable y con estructura tridimensional medianamente flexible. Algunas están compuestas por más de una cadena de aminoácidos, enlazadas por interacciones electrostáticas, puentes hidrógeno o puentes disulfuro<sup>26</sup>.

### *Cadenas laterales de aminoácidos*

La reactividad de las proteínas generalmente depende de la reactividad de las cadenas laterales de los aminoácidos y de su microambiente. Diferentes estudios de modificación química demostraron que sólo unas pocas cadenas laterales de aminoácidos son realmente reactivas<sup>34</sup>. Son en total seis grupos activos: el grupo guanidinil de la arginina, el grupo  $\gamma$ -carboxil del ácido glutámico, el grupo  $\beta$ -carboxil del ácido aspártico, el grupo tiol de la cisteína, el grupo imidazol del triptófano y el grupo fenol de la tirosina<sup>26</sup>.

La mayoría de las reacciones de modificación de enzimas son nucleofílicas, en particular reacciones de sustitución nucleofílica bimolecular. Por lo tanto, la reactividad es básicamente una función de la nucleofilicidad de las cadenas laterales. El nitrógeno del grupo amino es un centro electrofílico relativamente débil, pero debido a su abundancia en las enzimas es a quien principalmente atacan los grupos nucleófilos<sup>26</sup>.

La reactividad de los residuos está fuertemente influenciada por el pH. Generalmente se obtienen mejores tasas de reacción a pH más alcalinos, ya que a pH por debajo del  $pK_a$  se protonan los grupos amino accesibles y se vuelven menos reactivos. También, la accesibilidad hacia estos grupos depende del microambiente, ya que pueden existir impedimentos estéricos de grupos vecinos o moléculas de solvente<sup>26</sup>.

### *Grupos funcionales sintéticos*

Se pueden introducir grupos reactivos adicionales a la enzima mediante modificaciones químicas. Una reacción particularmente interesante es la conversión de los ácidos carboxílicos en sales de carboxilato-amino sustituidas, generando un residuo más nucleofílico y modificando la carga superficial. Este método puede reducir la actividad de la enzima por lo que se debe balancear cuidadosamente la cantidad de reactivo condensante (generalmente carbodiimidas solubles en agua) para no atacar carboxilos que comprometan la actividad catalítica<sup>26</sup>.

La carga superficial de la enzima puede ser alterada modificando tioles o aminas con moléculas que presenten grupos carboxílicos, y de esta forma lograr interacciones iónicas más fuertes con matrices de intercambio iónico. Por otro lado, la técnica de ADN recombinante permite diseñar sitios de unión específicos en la proteína, aunque también puede verse afectada la actividad catalítica<sup>26</sup>.

También se pueden entrecruzar enzimas para lograr agregados macromoleculares. Para esto existe una gran variedad de agentes entrecruzantes, como bis-epóxidos o dialdehídos. El entrecruzamiento directo produce una fuerte disminución de la catálisis enzimática, debido principalmente a la rigidez y compresión a la que se somete a la proteína. Se logran mejores resultados cuando se entrecruza a la enzima a materiales inertes como polímeros<sup>26</sup>.

Una estrategia diferente consiste en introducir grupos vinilo en la enzima y luego polimerizar con derivados de la acrilamida, formando una red entrecruzada polimérica. Mediante esta técnica se lograron biocatalizadores industriales estables para aplicaciones farmacéuticas<sup>26</sup>.

### II.2.3 Materiales de soporte

Las características del material de soporte tienen gran influencia en el desempeño de la enzima inmovilizada y deben tenerse en cuenta al momento de elegirlo. El tipo, la distribución y la densidad de grupos funcionales del material de soporte determinan el rendimiento de la inmovilización y la estabilidad operacional del conjunto enzima – soporte. La mayor permeabilidad y área superficial facilitan la incorporación de la enzima, y favorecen la difusión de los sustratos. La hidrofiliidad del material de soporte influye sobre el tipo y la fuerza de las atracciones no covalentes entre éste y la enzima, mientras que el entrecruzamiento evita que el soporte se disuelva y se pierda la enzima.

Los polímeros naturales orgánicos son muy utilizados como soporte de inmovilización. Se pueden utilizar proteínas estructurales (como colágeno o queratina),

proteínas globulares (como albúmina) o carbohidratos. Estos últimos son muy interesantes debido a que son altamente hidrofílicos, lo que genera un microambiente muy favorable para muchas enzimas. El quitosán es otro polímero útil por la cantidad de aminas primarias que pueden reaccionar para formar enlaces.

## II.3 Efecto de la inmovilización sobre la actividad de la enzima

Cuando una enzima se encuentra inmovilizada, sus propiedades están determinadas por las características del material soporte, al igual que por el número y la naturaleza de las interacciones entre la enzima y la matriz soporte. Esto afecta tanto a las propiedades cinéticas como a la estabilidad de las enzimas ya que la matriz soporte impone numerosas modificaciones en el microambiente de la enzima<sup>33</sup>.

Por un lado, uno de los principales problemas asociados a la inmovilización de una enzima es su pérdida de actividad catalítica debido al acceso limitado de los sustratos al sitio activo de la enzima. Para solucionar este inconveniente, se debe seleccionar con cuidado el material soporte y la técnica de inmovilización a emplear. También puede perderse actividad catalítica debido a cambios conformacionales en la estructura cuaternaria en la enzima cuando ésta reacciona con la matriz. Por otro lado, al inmovilizar una enzima se incrementa su estabilidad operacional, soportando cambios en la temperatura de trabajo y medios más hostiles, tales como la presencia de solventes orgánicos<sup>33</sup>. En diversos trabajos se ha demostrado relación entre la estabilización y el número de enlaces covalentes entre una enzima y su matriz soporte<sup>35,36</sup>.

### II.3.1 Efecto del microambiente

La matriz soporte crea condiciones que afectan al microambiente por el que se encuentra rodeada la enzima. Uno de estos efectos consiste en modificar los equilibrios de partición de los sustratos y los productos entre la matriz enzimática y la solución.

Además, la difusión en el interior del soporte cambia radicalmente frente a las especies en solución. El soporte puede atraer o repeler a los sustratos, productos o a otras moléculas, logrando disminuir o aumentar su concentración en el espacio que rodea a la enzima. En otras palabras, si se ubica la matriz enzimática sobre la superficie del electrodo, ésta constituye una barrera difusional para las sustancias que se transportan desde o hacia la enzima<sup>37,38</sup>.

### *Efecto de la partición*

La forma en que se distribuyen los sustratos, productos y otras moléculas en la matriz enzimática cuando ésta se pone en contacto con una solución, depende de múltiples factores vinculados a las propiedades físicas y químicas de cada especie interviniente. No obstante, el factor que más influye es la carga eléctrica de cada una de estas especies.

Un sistema en el que el polímero que actúa como soporte es un polianión y el sustrato enzimático es un compuesto catiónico, tendrá como consecuencia la acumulación del sustrato dentro de la matriz en donde se inmoviliza la enzima. De esta forma, en la cercanía de la enzima se observará una concentración alta del sustrato, aun cuando en la solución la concentración del sustrato sea muy baja<sup>39</sup>. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no sólo se concentrará el soluto catiónico, sino también otros cationes que existan en el medio, por lo que puede generarse la disminución local de pH en el interior del soporte. Cuando el polímero y el sustrato tengan la misma carga sucederá el proceso inverso, ya que el sustrato sólo podrá ingresar a la matriz enzimática en menores concentraciones respecto a las de la solución<sup>40</sup>.

Puede suceder también que el sustrato enzimático sea neutro mientras que la matriz esté compuesta por un polímero poliiónico. En este caso, la distribución del sustrato debería ser similar entre la solución y la matriz enzimática. Sin embargo, las concentraciones de los demás iones alrededor de la enzima pueden ser distintas con respecto a sus valores en el seno de la solución.

### *Efecto de la difusión*

Las limitaciones difusionales que existen entre el soluto y el polímero soporte son debidas en gran mayoría al diámetro de poro. Cuando la matriz enzimática posee un tamaño de poro similar al de la molécula de sustrato, el acceso estará restringido y difícilmente podrá llevarse a cabo la reacción enzimática<sup>41</sup>.

La difusión es un proceso que condiciona al gradiente de concentración que se establece, no sólo debido a la diferencia de concentración que puede existir para el sustrato entre el seno de la solución y el interior de la matriz polimérica, sino también a la barrera difusional interna que constituye la matriz soporte<sup>41</sup>. Los gradientes de concentración que se establecen entre la solución y la matriz inmisible dependen por un lado de la velocidad que tengan las moléculas que difunden hacia el interior del soporte y por otro, de la actividad enzimática. Una vez que la matriz que contiene a la enzima se mezcla con la solución donde se encuentra el sustrato, comenzará la difusión a través del soporte y el sustrato alcanzará a la enzima. La catálisis se llevará a cabo a una velocidad que depende de la concentración de sustrato. Cuando la concentración de sustrato es relativamente baja, se observa que rápidamente se establece un gradiente de concentración ya que hay menor concentración de sustrato en la cercanía de la enzima con respecto a un punto alejado de ella. Cuando la velocidad de difusión se iguala a la velocidad enzimática, se alcanzará el estado estacionario.

La barrera difusional externa se encuentra en la zona de contacto entre el soporte enzimático y la solución. Esta zona se denomina capa de Nernst y su espesor depende de la velocidad de agitación de la solución en la que se encuentra el sustrato y de la permeabilidad del soporte enzimático. Mientras más vigorosa sea la agitación de la solución, más rápido ocurrirá la homogeneización del medio en la cercanía de la matriz enzimática, y más angosta será la capa de Nernst. Sin embargo, si el coeficiente de difusión del analito es bajo dentro del soporte enzimático y este soporte es lo suficientemente ancho (alrededor de 50  $\mu\text{m}$ ), entonces la barrera difusional interna será la única que determine el perfil cronoamperométrico del biosensor.

### II.3.2 Efecto sobre la enzima

La inmovilización de una enzima puede afectar a la macromolécula de diversas maneras. La influencia de cada efecto dependerá del proceso de inmovilización que se utilice, del tipo de enzima, y en particular, de la naturaleza de los reactantes.

Cuando una enzima actúa como catalizador para un determinado sustrato, en algunos casos deben cumplirse simultáneamente dos condiciones: que la conformación de la proteína sea la correcta para poder unirse al sustrato, y que durante la reacción la enzima pueda cambiar su conformación para llevar a cabo el proceso catalítico. Si una enzima se inmoviliza mediante reacciones covalentes con la matriz soporte, es factible que ese proceso produzca cambios conformacionales que restrinjan los movimientos y que de este modo se vea afectada la actividad.

El proceso que se lleva a cabo para inmovilizar la enzima puede, en muchos casos, necesitar de condiciones drásticas de reacción, como pH muy alto o muy bajo, presencia de agentes oxidantes y radicales libres. Estos factores pueden provocar la inactivación de una fracción de la enzima inmovilizada. Esto se debe a que estas condiciones pueden generar cambios en los grupos funcionales de las enzimas que conduzcan a la inactivación del sitio activo, aún cuando no se vea afectada estructuralmente la conformación de la enzima.

También debe tenerse en cuenta que la posibilidad de que un determinado sustrato alcance al sitio activo de una enzima incorporada en el interior de una red polimérica disminuye cuanto más grande es el sustrato. Otro tipo de restricciones estéricas pueden causar que el sitio activo de la enzima se encuentre bloqueado e impida que ocurra la reacción con el sustrato.

Los procesos de inmovilización generalmente afectan la estabilidad de una enzima, la que hace referencia a la capacidad para conservar la actividad catalítica con el paso del tiempo. En este sentido, es importante diferenciar la estabilidad de almacenamiento frente a la estabilidad operacional. La primera es provista por la formulación comercial de la enzima, que la protege de la desnaturalización bajo ciertas

condiciones de almacenamiento. La segunda, se relaciona con la enzima inmovilizada en un soporte específico y con la capacidad para mantener su actividad en él, ya sea cuando se la reutiliza en múltiples ocasiones, o cuando simplemente se almacena el sistema bajo diferentes condiciones ambientales. La estabilidad operacional depende de las condiciones de trabajo en las que se desempeña una enzima inmovilizada, ya que pueden existir múltiples factores (pH, temperatura, impurezas, solventes) que contribuyan a la desnaturalización o modificación de la proteína. En reacciones controladas por difusión, como es el caso de una enzima inmovilizada en una matriz polimérica, la eficiencia catalítica es generalmente baja, ya que la enzima inmovilizada no se encuentra funcionando a su máxima capacidad de catálisis. Si durante el uso se desnaturaliza una parte de la enzima inmovilizada, es posible que se mantenga constante la velocidad catalítica debido a un aumento en la eficiencia de la catálisis llevada a cabo por la enzima remanente. Ésta es una de las razones por la que las enzimas inmovilizadas son consideradas erróneamente más estables que las enzimas libres. Una comparación adecuada debería llevarse a cabo estudiando la actividad de la enzima inmovilizada en un sistema donde no existan limitaciones difusionales<sup>26</sup>.

#### II.4 Biosensores desarrollados en esta tesis

Durante el desarrollo de esta tesis se construyeron biosensores amperométricos utilizando enzimas como elemento de bioreconocimiento, para la determinación de glucosa a pH = 7 y de catecol a pH = 5. Para el desarrollo de biosensores de glucosa se inmovilizó glucosa oxidasa (GOX) en una matriz compuesta por mucina, albúmina, y alguna de sus mezclas. Para el desarrollo de los biosensores de catecol se utilizó la enzima lacasa (LAC) inmovilizada en una matriz formada por mucina, quitosán y/o una mezcla de ellas. En ambos casos, la matriz enzimática se depositó entre dos membranas de policarbonato, formando una estructura tipo sándwich.

#### II.4.1 Antecedentes de biosensores con glucosa oxidasa

El concepto de biosensor fue propuesto en 1962, cuando Clark y Lyons desarrollaron un electrodo amperométrico enzimático mediante el uso de GOX<sup>1</sup>. Desde ese momento, se llevaron a cabo una gran cantidad de trabajos enfocados hacia el desarrollo de biosensores que permitan medir con gran precisión la concentración de glucosa, especialmente en la sangre, para obtener dispositivos que controlen la diabetes. Paralelamente se comenzó a trabajar en dispositivos para otras aplicaciones que van desde análisis alimentario, al monitoreo de procesos industriales. La gran importancia en la determinación de glucosa ha generado un enorme número de publicaciones, que continúa en aumento año a año<sup>25</sup>.

El primer dispositivo sensor construido por Clark y Lyons consistía en una película muy fina de GOX, atrapada sobre un electrodo de oxígeno mediante una membrana de diálisis<sup>1</sup>. De este modo, se monitoreaba el oxígeno consumido durante la siguiente reacción catalizada enzimáticamente:



Se aplicaba un potencial negativo al cátodo de platino para poder monitorear el consumo de oxígeno mediante una reacción de reducción:



La patente presentada por Clark a partir del biosensor desarrollado, incluía el uso de una o más enzimas que permitían cuantificar sustratos mediante la conversión en productos electroactivos. Para corregir el efecto de interferentes se medía la corriente diferencial utilizando dos electrodos, uno de los cuales se encontraba modificado con la enzima. Esta tecnología fue transferida a Yellow Spring Instrument Company, que en 1975 lanzó al mercado el primer analizador de glucosa para medición directa en sangre.

En 1973, Guilbault y Lubrano<sup>42</sup> describieron por primera vez un electrodo que permitía la determinación de glucosa en sangre mediante la detección amperométrica del peróxido de hidrógeno liberado en la reacción enzimática:



Posteriormente, se desarrollaron múltiples electrodos amperométricos enzimáticos, muchos de ellos basados en el uso de oxidasas y en la cuantificación del peróxido generado. La variabilidad en los sensores se vio reflejada en el diseño del electrodo, el material soporte de inmovilización, la técnica utilizada en la inmovilización enzimática, la composición de las membranas utilizadas, entre otros factores.

*Tabla II-1: Hitos importantes en el desarrollo de biosensores electroquímicos de glucosa<sup>43</sup>.*

Fecha	Evento	Referencia
1962	Primer electrodo enzimático de glucosa	Clark et al <sup>3</sup>
1973	Electrodo enzimático de glucosa basado en la detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Guilbault et al <sup>42</sup>
1975	Lanzamiento del primer dispositivo comercial sensor de glucosa	YSI Inc.
1982	Monitoreo <i>in vivo</i> de nivel de glucosa	Shichiri et al <sup>44</sup>
1984	Desarrollo de mediadores de ferroceno	Cass et al <sup>45</sup>
1987	Lanzamiento del primer medidor personal de glucosa	Medisense Inc.
1987	Conexión eléctrica de enzimas	Degani et al <sup>46</sup>
1999	Lanzamiento de sensor comercial para monitoreo de glucosa <i>in vivo</i>	Minimed Inc.
2000	Introducción de monitor de glucosa no invasivo	Cygnus Inc.

Durante la década de 1980, el desarrollo y la optimización de biosensores fueron temas muy discutidos en los trabajos de investigación. En este período se comenzó el desarrollo de los biosensores de glucosa de segunda generación. Se introdujeron al mercado las primeras tiras reactivas para auto monitoreo de los niveles de glucosa, y aparecieron los primeros trabajos donde se utilizaban electrodos modificados para mejorar la performance de la determinación<sup>43</sup>.

En la década de 1990, se realizaron investigaciones tendientes a establecer comunicación eléctrica directa entre el sitio rédox de la GOX y la superficie del

electrodo, mientras que paralelamente se trabajó en el desarrollo de sensores miniaturizados para desarrollar dispositivos implantables mínimamente invasivos<sup>23</sup>. En la Tabla II-1, se resumen algunos de los hitos más importantes en el desarrollo de los biosensores electroquímicos de glucosa<sup>43</sup>.

Con el auge de la nanotecnología, en el comienzo del nuevo siglo, se abrieron nuevos horizontes para la química bioanalítica<sup>23</sup>. El desarrollo de nanomateriales permitió mejorar la conductividad eléctrica de los soportes enzimáticos y facilitó el avance en el desarrollo de biosensores de tercera generación. Se utilizaron múltiples nanomateriales, como nanopartículas de oro, platino, plata y nanotubos de carbono con el objetivo de conectar el sitio redox de la enzima con la superficie del electrodo en la fabricación de biosensores de glucosa<sup>25</sup>.

En la actualidad, existen más de cien mil publicaciones que hacen referencia a electrodos amperométricos enzimáticos que utilizan GOX para la determinación de glucosa, principalmente por la robustez y versatilidad que se obtiene con esta enzima. Por esta razón, la GOX se considera una enzima modelo, y es la razón por la cual se la utiliza como enzima de prueba en el desarrollo de nuevos materiales para soporte de inmovilización enzimática.

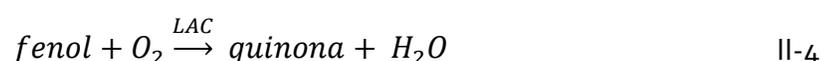
#### II.4.2 Antecedentes de biosensores con lacasa

Las enzimas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos son ampliamente utilizadas en la naturaleza y son de gran importancia en aquellos organismos que producen compuestos polifenólicos. De manera general, se denominan polifenol oxidasas (PPO) a aquellas proteínas provenientes de hongos, papas, y varias otras fuentes, que contienen cobre en su sitio activo y que son capaces de oxidar varias clases de fenoles.

El primer trabajo acerca de la aplicación de una PPO para la construcción de un biosensor fue publicado en 1977 por Macholan y Sachanel<sup>47</sup>. En él se inmovilizaron PPOs obtenidas de papa y hongos, con el uso de glutaraldehído y albúmina sobre la superficie

del electrodo de oxígeno de Clark, cuantificando así fenoles mediante el consumo del oxígeno. Desde entonces se han publicado numerosos trabajos relacionados a este proyecto pionero, pero utilizando distintos tipos de PPOs, como lacasa (LAC), tirosinasa y peroxidasa, entre otros<sup>12</sup>.

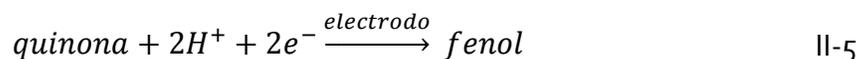
Biosensores basados en el uso de LAC fueron utilizados para la cuantificación de catecol, fenoles y catecolaminas. En 1984, Lee y otros<sup>48</sup> adsorbieron irreversiblemente LAC sobre un electrodo de carbono pirolítico para su uso como catalizador de la reducción de oxígeno a agua, según la siguiente reacción:



Ghindilis y otros<sup>49</sup> inmovilizaron LAC sobre una membrana de celulosa y la incorporaron dentro de un sistema de análisis en flujo continuo con un sensor de oxígeno asociado. Compararon las respuestas obtenidas en la detección de catecol en flujo continuo y en *batch*. Mediante este sistema determinaron polifenoles en muestras de té.

En 1993, Wang y otros<sup>50</sup> estudiaron la actividad biocatalítica de LAC en medios no acuosos, desarrollando un biosensor amperométrico apto para el uso en medio orgánico. Para esto, inmovilizaron LAC sobre la superficie de un electrodo de carbono vítreo utilizando un film polimérico estable en medio orgánico para atrapar la enzima. El sensor se utilizó para cuantificar catecol e hidroquinona en varios alcoholes, mediante análisis por inyección en flujo continuo (FIA).

La detección de fenoles con aplicación en el análisis medioambiental es un tema ampliamente tratado. En 1994, Yaropolov y colaboradores<sup>51</sup> diseñaron un biosensor mediante la co-inmovilización de LAC y tirosinasa mediante adsorción sobre la superficie de un electrodo de grafito. El electrodo bienzimático fue utilizado en un sistema de FIA. En este caso, la cuantificación se basó en la reducción de los productos de la catálisis a un potencial levemente inferior a cero frente a un electrodo de referencia de Ag|AgCl (reacción II-5).



En otro trabajo se inmovilizó LAC en un gel sintetizado por hidrólisis y polimerización de silicatos. En este caso, Simkus y colaboradores<sup>52</sup> desarrollaron un sensor de transducción óptica. Si bien la respuesta analítica de este sensor no era la óptima para análisis en tiempo real, fue uno de los primeros trabajos en el que se inmovilizó LAC con el propósito de cuantificar especies mediante esta técnica.

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad alcanzada, en 1997 Lisdat y colaboradores<sup>53</sup> desarrollaron un sensor bienzimático mediante la inmovilización de LAC y glucosa deshidrogenasa (GDH) sobre la superficie de un electrodo de carbono vítreo. En este caso, se preparó una solución de LAC, GDH, polivinil alcohol y gelatina, que luego se depositó sobre el electrodo y se cubrió con una membrana de diálisis. El sensor así desarrollado se utilizó para la detección de catecolaminas en fluidos biológicos en concentraciones en el orden de los nano moles por litro. En la literatura existen múltiples ejemplos de sensores bienzimáticos<sup>29</sup> que utilizan al menos una polifenol oxidasa.

En 2001, Freire y colaboradores<sup>54</sup> analizaron el efecto que produce el proceso de inmovilización de LAC en el desarrollo de un biosensor para la detección de fenoles. Se estudió la adsorción física, el entrecruzamiento con glutaraldehído y la reacción mediante una carbodiimida sobre un electrodo de fibra de carbono. Para analizar el desempeño de los biosensores construidos se estudió la sensibilidad, el intervalo lineal, el pH y el potencial aplicado en cada proceso de inmovilización.

También en 2001, Barton y colaboradores<sup>55</sup> publicaron un trabajo en el que inmovilizaron LAC sobre un electrodo de fibra de carbono, logrando la transferencia electrónica directa entre el electrodo y la enzima, mediante el uso de un polímero rédox. El electrodo desarrollado se utilizó para la reducción electrocatalítica de oxígeno, con el objetivo de desarrollar luego celdas de combustible.

Timur y colaboradores<sup>56</sup> desarrollaron un film sensor inmovilizando LAC de distintas fuentes en una matriz de polianilina para la detección de compuestos fenólicos. Este polímero es conocido por su alta conductividad, durabilidad y estabilidad en el medio. La cuantificación del oxígeno consumido se relacionó con la oxidación del analito.

La utilización de una pasta formada con nanotubos de carbono y quitosán como matriz para el agregado de enzimas fue estudiada por Liu y colaboradores<sup>57</sup>. En este caso, se incorporó LAC a la matriz sin el uso de un agente entrecruzante y se utilizó el electrodo para la determinación de catecol y oxígeno, entre otros. El uso de nanotubos de carbono, así como de otros nanomateriales con propiedades conductoras o magnéticas fue la razón de estudio de numerosos trabajos publicados, ya sea para el desarrollo de biosensores como para celdas de combustible<sup>29</sup>.

Quan y colaboradores<sup>58,59</sup> inmovilizaron LAC sobre la superficie de un electrodo de platino. En este caso, introdujeron grupos hidroxilo mediante oxidación electroquímica de la superficie, la funcionalizaron con grupos amina y luego inmovilizaron LAC con glutaraldehído. Con este método elaboraron biosensores para la detección de hidroquinona, ácido homogentísico, para-fenilendiamina y otros compuestos. El tiempo de respuesta fue de dos segundos para todas las determinaciones y la estabilidad alcanzada estuvo cerca de los 60 días.

En 2009, Tan y colaboradores<sup>60</sup> utilizaron quitosán modificado con glutaraldehído para formar un biopolímero funcionalizado que luego reaccionó con LAC para formar una matriz que pueda utilizarse en soluciones ácidas. El compuesto fue colocado sobre la superficie de un electrodo de carbono vítreo, y utilizado para catalizar la reducción de oxígeno con el fin de construir una celda de combustible. Además, se evaluó también la aplicación del electrodo para la determinación de catecol a pH = 3.

Chawla y colaboradores<sup>61</sup> describieron la construcción de una plataforma biosensora para la determinación del contenido total de fenoles en jugo de frutas. Para ello utilizaron nanopartículas de níquel cubiertas con nanotubos de carbono

carboxilados funcionalizados con polianilina, que luego se modificaron con LAC y se depositaron sobre la superficie de un electrodo de oro. De esta forma, se buscó combinar la elevada conductividad eléctrica de los nanotubos de carbono con los atributos característicos de la catálisis enzimática.

## II.5 Características de las enzimas utilizadas

Los catalizadores son sustancias que modifican la cinética de una reacción química. Su funcionamiento se basa en la disminución de la energía de activación mediante la generación de un estado de transición diferente al de la reacción espontánea. No forman parte de la reacción química global, pero forman parte del complejo activado y se regeneran al final del proceso. La reacción catalizada utiliza exactamente los mismos sustratos y genera los mismos productos que aquella no catalizada. Además, el catalizador no altera el equilibrio entre los productos y los reactivos<sup>62</sup>.

Las enzimas son catalizadores extraordinarios. En algunos casos incrementan la velocidad de una reacción por un factor de  $10^{18}$  y son capaces de reaccionar con un sustrato con muy alta especificidad. Su presencia en los seres vivos es esencial, pues el metabolismo sería extremadamente lento sin la existencia de las enzimas y la vida sería inviable en la forma que la conocemos.

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizaron las enzimas glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) y lacasa (EC 1.10.3.2) como elementos de biorreconocimiento en los sensores elaborados.

### II.5.1 Mecanismos enzimáticos

De un modo simple, se puede considerar a las enzimas (E) como macromoléculas proteicas que modifican a otras moléculas, en este caso los sustratos

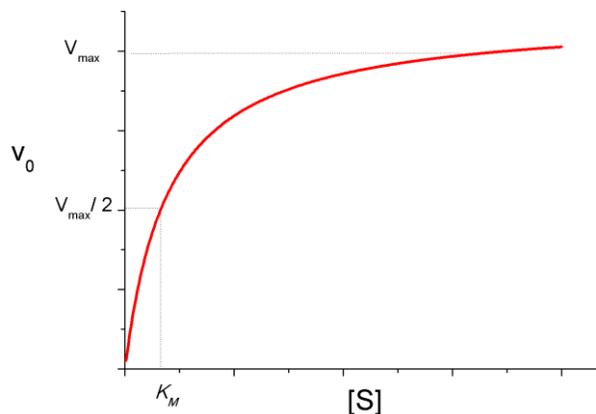
enzimáticos (S). Éstos se unen al sitio activo de la enzima y son transformados en productos a través de una serie de pasos que componen los mecanismos enzimáticos.

Existen diferentes mecanismos enzimáticos pero, en general, pueden dividirse en dos grandes grupos: reacciones de catálisis enzimática de sustrato único y reacciones de sustratos múltiples<sup>62</sup>.

#### *Reacciones de sustrato único: Mecanismo de Michaelis – Menten*

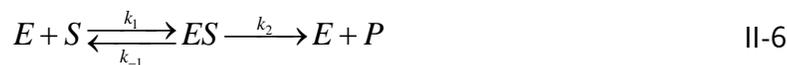
En cinética enzimática es habitual medir la velocidad inicial ( $v_o$ ) de una reacción en particular, la que corresponde a una cantidad conocida y fija de sustrato (S). A medida que la reacción se desarrolla, la concentración de S disminuye.

La Figura II-4 muestra la variación de  $v_o$  para una reacción catalizada por una enzima, con respecto a la concentración de S. Para bajas concentraciones de sustrato [S]  $v_o$  aumenta linealmente con pendiente elevada, mientras que a medida que aumenta [S] la pendiente de  $v_o$  disminuye gradualmente hasta alcanzar un valor límite. En esta última región, todas las moléculas de enzima están reaccionando con S, y la  $v_o$  no cambia con el aumento de [S]<sup>63</sup>.



*Figura II-4: Gráfico de la velocidad inicial de una reacción enzimática en función de la concentración del sustrato. Determinación gráfica de la velocidad máxima y de la constante de Michaelis – Menten.*

El mecanismo utilizado para describir reacciones en las que participa un único reactante y un único producto fue propuesto por Michaelis y Menten en 1913<sup>64</sup>:



Donde E, S y P corresponden a las respectivas concentraciones de enzima, sustrato y producto, mientras que ES indica la concentración del complejo enzima – sustrato. La velocidad inicial de formación de producto,  $v_0$ , está dada por:

$$v_0 = \left( \frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_2 [ES] \quad \text{II-7}$$

Inicialmente, hay una reacción entre la enzima y el sustrato que da como resultado la formación del complejo ES. El modelo considera que este paso se lleva a cabo rápidamente por lo que se establece un pseudo - equilibrio con la especie intermediaria. Así, Michaelis y Menten asumieron que  $k_{-1} \gg k_2$ . La ruptura del complejo ES para formar E + P se considera la etapa limitante de la reacción<sup>63</sup>. La constante de disociación  $K_s$  está dada por:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{II-8}$$

Una segunda ecuación, usualmente conocida como ecuación de conservación, relaciona la concentración total de enzima  $[E_0]$  con la concentración de la enzima en estado libre y formando complejo con S:

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad \text{II-9}$$

Despejando [E] en II-9 y reemplazando en II-8:

$$K_s = \frac{([E_0] - [ES])[S]}{[ES]} \quad \text{II-10}$$

Resolviendo la ecuación para [ES] se obtiene:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_s + [S]} \quad \text{II-11}$$

Sustituyendo esta última, en la ecuación en II-7:

$$v_0 = \left( \frac{d[P]}{dt} \right)_0 = \frac{k_2 [E_0][S]}{K_s + [S]} = \frac{k_2 [E_0]}{1 + K_s/[S]} \quad \text{II-12}$$

Consecuentemente, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración total de enzima. A bajas concentraciones de sustrato,  $[S] \ll K_s$  y entonces  $v_0 \approx (k_2/K_s) [E_0] [S]$ . A altas concentraciones de sustrato,  $[S] \gg K_s$  y  $v_0 \approx k_2 [E_0]$ . En este caso, la velocidad inicial corresponde al valor de  $V_{\max}$  (porción asintótica del gráfico de la Figura II-4).

De esto modo, cuando todas las moléculas de enzima se encuentren acomplejadas con el sustrato formando ES, la velocidad alcanzará su valor máximo ( $V_{\max}$ ) y entonces:

$$V_{\max} = k_2 [E_0] \quad \text{II-13}$$

Posteriormente Briggs y Haldane<sup>65</sup> postularon a partir de la teoría desarrollada por Michaelis y Menten, que tan pronto la enzima y el sustrato se ponen en contacto, la concentración de ES alcanza un valor constante, y puede aplicarse la siguiente aproximación de estado estacionario:

$$\begin{aligned} \frac{d[ES]}{dt} = 0 &= k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] \\ &= k_1 ([E_0] - [ES])[S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \end{aligned} \quad \text{II-14}$$

Y resolviendo la ecuación para [ES]:

$$[ES] = \frac{k_1[E_0][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad \text{II-15}$$

Sustituyendo la ecuación II-15 en II-7 y reacomodando:

$$v_0 = \frac{k_1 k_2 [E_0][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} = \frac{k_2 [E_0][S]}{[(k_{-1} + k_2) / k_1] + [S]}$$

$$v_0 = \frac{k_2 [E_0][S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{II-16}$$

Donde  $K_M$  es la constante de Michaelis

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{II-17}$$

Comparando la ecuación II-16 con la ecuación II-12 se puede observar que en ambos casos hay una dependencia similar con la concentración del sustrato, pero  $K_M \neq K_S$  a menos que  $k_{-1} \gg k_2$ .

Cuando la velocidad inicial es la mitad de la velocidad máxima, la ecuación II-16 se vuelve  $K_M = [S]$ . En otras palabras, también se puede concluir que mientras más grande es  $K_M$ , más sustrato se necesita para alcanzar la velocidad máxima<sup>62</sup>.

### *Mecanismo de ping pong para las enzimas rédox*

La mayoría de las reacciones enzimáticas involucran dos o tres sustratos y/o productos y por consiguiente, la velocidad de reacción en estos casos depende de la concentración de esos dos o tres sustratos. El orden en que interactúan los sustratos determina las propiedades cinéticas de estas reacciones. En ciertos mecanismos de doble desplazamiento, también conocidos como mecanismos de *ping-pong*, el producto del primer paso de reacción se libera de la enzima antes de que otro sustrato se una con ella<sup>63</sup>.

El mecanismo de reacción *ping-pong* se esquematiza en la Figura II-5. Allí, la enzima se encuentra representada como una línea horizontal. Por debajo de ella se indican la enzima libre E y otras formas intermedias. Los sustratos se designan con las letras A y B, mientras que los productos se representan con P y Q. Las flechas indican reacciones bidireccionales con sus correspondientes constantes de estabilidad<sup>63</sup>.

En una primera etapa, el sustrato A se une a la enzima formando el complejo EA. Este complejo reacciona para dar lugar a la formación y liberación del producto P. Luego de liberar el primer producto, la enzima se mantiene en la forma F a la espera de la reacción con el segundo sustrato B. Entonces, se forma el complejo intermedio FB, se produce la catálisis del segundo sustrato y su producto es liberado como la especie Q. Como puede observarse en la Figura II-5, luego de estas etapas la enzima restablece su estado inicial. El nombre del mecanismo (*ping pong* bi bi) se debe a que se desarrolla en dos etapas sucesivas con el uso de dos sustratos y la generación de dos productos (bi bi)<sup>63</sup>.

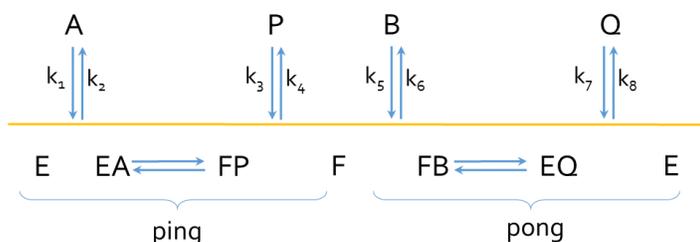


Figura II-5: Esquema para una reacción enzimática del tipo *ping pong*<sup>63</sup>.

Bajo condiciones de velocidad inicial, donde las concentraciones de P y Q se consideran cero, se puede demostrar<sup>63</sup> que la ecuación de velocidad que se obtiene para esta reacción es la siguiente:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_a}{[A]} + \frac{K_b}{[B]}} \quad \text{II-18}$$

Donde:

$$V_{\max} = k_3 k_7 [E_T] / (k_3 + k_7) \quad \text{II-19}$$

$$K_a = k_7 (k_2 + k_3) / \{k_1 (k_3 + k_7)\} \quad \text{II-20}$$

$$K_b = k_3 (k_6 + k_7) / \{k_5 (k_3 + k_7)\} \quad \text{II-21}$$

En este trabajo se utilizan enzimas rédox que funcionan mediante este mecanismo. Sin embargo, teniendo en cuenta las distintas condiciones en que se desarrolla la reacción enzimática, en algunos casos puede considerarse despreciable el efecto del sustrato B en el control de la velocidad, y la ecuación se reduce a una con la forma de la cinética de Michaelis y Menten<sup>62</sup> (ecuación II-16).

#### II.5.2 Glucosa Oxidasa (EC 1.1.3.4)

La GOX ( $\beta$ -D-glucosa: oxígeno 1-oxido-reductasa) cataliza la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico, utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones y produciendo peróxido de hidrógeno<sup>66,67</sup>. La fuente más común de obtención de GOX es a través de la producción fermentativa de hongos del género de *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Saccharomyces*. La mayoría de la enzima obtenida comercialmente es aislada a partir del organismo *Aspergillus Niger*.

La GOX es una glicoproteína homodimérica que contiene dos subunidades polipeptídicas idénticas que se encuentran covalentemente enlazadas mediante un puente disulfuro. La GOX cuenta con una porción glucosídica que constituye el 10-16% de su peso molecular, y en la cual posee un alto contenido en residuos manosa. El punto isoeléctrico es 4,2, por lo que a pH fisiológico la GOX es una enzima aniónica<sup>67</sup>, y la superficie cargada negativamente puede formar complejos electrostáticos con polímeros catiónicos<sup>68</sup>. Los carbohidratos están unidos a la proteína por enlaces O-glucosídicos y N-glucosídicos. La proteína tiene una masa de aproximadamente 160 kDa<sup>69</sup> y cada subunidad contiene una coenzima flavin-adenin dinucleótido (FAD). El grupo FAD está unido no covalentemente a la enzima y es el sitio principal que actúa en

la catálisis de óxido-reducción. La enzima tiene alta especificidad hacia  $\beta$ -D-glucosa, mientras que  $\alpha$ -D-glucosa no es un sustrato adecuado para la GOX. Algunos metales como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y otras sustancias químicas como hidroxilamina, hidracina, fenilhidracina, dimedona y bisulfato de sodio inhiben la actividad de la GOX<sup>66</sup>.

La estructura primaria de cada subunidad de GOX es una cadena polipeptídica con 583 residuos de aminoácidos<sup>70</sup>. El sitio activo tiene Tyr-73, Phe-418, Trp-430, Arg-516, Asn-518, His-520 y His-563, siendo Arg-516 el aminoácido más involucrado en la unión eficiente de  $\beta$ -D-glucosa a la enzima, mientras que Asn-518 contribuye en menor medida. Los residuos de Tyr-73, Phe-418 y Trp-430 son importante en la orientación correcta del sustrato. Las His-520 y His-563 forman puentes hidrógeno con el grupo hidroxilo en posición 1 de la  $\beta$ -D-glucosa. La GOX puede ser entrecruzada a través de los aminoácidos lisina (Lys) de la secuencia de la enzima. Posee 30 Lys (2,6% respecto del total de aminoácidos) pero ninguna de estas Lys forma parte del sitio catalítico<sup>66,68</sup>.

La reacción catalítica se produce mediante un mecanismo *ping-pong* con una etapa de oxidación y una de reducción. En el paso de reducción, GOX cataliza la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa a D-glucono- $\delta$ -lactona que se hidroliza espontáneamente a ácido glucónico y consecuentemente FAD es reducido a  $\text{FADH}_2$  y en el paso de oxidación la enzima reducida es oxidada por oxígeno produciendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  tal como se muestra en la Figura II-6.

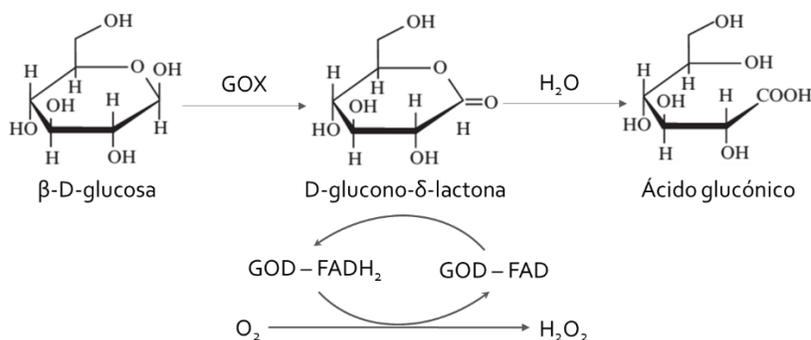


Figura II-6: Mecanismo de reacción de la glucosa oxidasa<sup>66</sup>.

### II.5.3 Lacasa (EC 1.10.3.2)

Las LACs son miembros de la familia de oxidasas "azules" que contienen cobre en el sitio activo. Se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos eucariotas (hongos, plantas) y en los procariotas (bacterias), principalmente como enzimas extracelulares y llevan a cabo funciones diversas en cada uno de ellos. Han sido estudiadas durante mucho tiempo debido a su capacidad de oxidar una amplia variedad de sustratos orgánicos y de reducir el oxígeno molecular en agua<sup>74,72</sup>. Debido a su capacidad para catalizar la oxidación de una gran variedad de especies orgánicas sin generar efectos secundarios perjudiciales, las LACs recibieron la atención de áreas vinculadas al medioambiente y la biotecnología<sup>73</sup>. Por este motivo fueron aplicadas en muchos procesos industriales, como la decoloración de tinturas<sup>74</sup>, la deslignificación de la pulpa en la industria de papel<sup>75</sup> y la oxidación de contaminantes orgánicos<sup>73</sup>. Otro tipo de aplicación tecnológica de las LACs involucra el desarrollo de biosensores<sup>76,77</sup> y celdas de combustible<sup>78</sup>.

Como todas las oxidasas "azules", las LACs son glicoproteínas donde la fracción de carbohidratos puede constituir desde el 10% al 45% del peso de la proteína<sup>79</sup>. La masa molecular varía dependiendo de la fuente de la que provienen, donde la mayor diferencia se encuentra en la cantidad de carbohidratos presentes. En general, LACs provenientes de hongos tienen una masa molecular de entre 60 kDa y 80 kDa y un punto isoeléctrico de 4 a 7, dependiendo de la glicosilación<sup>12,71</sup>.

Las oxidasas que transfieren 4 electrones al oxígeno para formar agua sin la formación de peróxido de hidrógeno, generalmente son enzimas complejas. En esta familia de enzimas complejas, las LACs representan a un grupo de enzimas que presentan un mecanismo de reacción relativamente simple<sup>79</sup>. El centro activo está formado por un grupo de cuatro átomos de cobre, los que a su vez se dividen en tres subgrupos, dependiendo de las características obtenidas por UV/visible y mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR). El cobre tipo I (T1, implica los residuos His-428, Cys-500, His-505 y posiblemente Leu-510<sup>79</sup>) es responsable del color azul de la

enzima ya que tiene una intensa absorbancia electrónica a 600 nm y es detectable mediante EPR. El cobre tipo II (T<sub>2</sub>, ligado con His-431 y His-435) no muestra absorción en el espectro visible, pero se detecta mediante EPR. El cobre tipo III se divide en dos sitios en los que sus átomos de cobre están acoplados anti –ferromagnéticamente (cada uno de estos sitios T<sub>3</sub> está ligado por tres His. Un sitio por las: His-435, His-499, His-501 y el otro sitio T<sub>3</sub> por las His-95, His-97, His-140). El cobre tipo III presenta una absorción débil a 330 nm mientras que no se detecta mediante EPR<sup>80,81</sup>.

Las LACs tienen actividad hacia grupos orto, para y difenoles, incluyendo mono, di y polifenoles, aminofenoles, metóxfenoles, aminas aromáticas y ascorbato, con la correspondiente reducción de oxígeno a agua<sup>71</sup>. Además, oxidan una serie de complejos de iones metálicos inorgánicos y orgánicos entre ellos el ferrocianuro, ferrocenos y citocromo c<sup>80</sup>. Los inhibidores conocidos son iones de azidas y halogenuros que en general son inhibidores inespecíficos de las oxidasas azules. Sólo se conocen unos pocos inhibidores selectivos de LAC<sup>80</sup>.

El mecanismo catalítico comienza cuando el sitio T<sub>1</sub> dona un electrón al sustrato (Figura II-7), seguido por una transferencia interna de electrones desde el sitio T<sub>1</sub> reducido hacia los sitios T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>. Cada uno de los sitios de cobre T<sub>3</sub> funcionan como aceptores de un par de electrones en el proceso de oxidación aeróbica, en el cual es necesaria la presencia del cobre T<sub>2</sub>. La reducción del oxígeno a agua toma lugar en el grupo que forma el sitio T<sub>2</sub> con dos sitios T<sub>3</sub> y durante su desarrollo se forma un peróxido intermediario<sup>12</sup>.

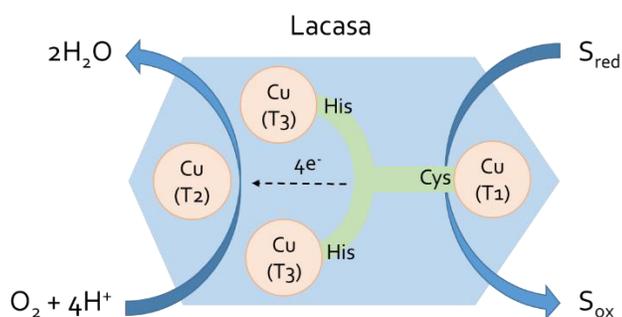


Figura II-7: Mecanismo simplificado de reacción de LAC, cuando oxida un sustrato adecuado.

El sitio de doble núcleo en LAC puede formarse por residuos de aminoácidos localizados en las áreas de la cadena polipeptídica que forman sitios "azules" y "no azules". Este, es un evento fundamental en las oxidasas multinucleares ya que, a través de los diversos átomos de cobre, optimiza los procesos de transferencia de electrones intramoleculares desde el sustrato oxidado (oxígeno) hasta el segundo sustrato (fenol), sin liberación de intermediarios de oxígeno de alta reactividad<sup>79</sup>.

El mecanismo catalítico de la LAC es del tipo *ping pong bi bi* de dos sitios, lo que significa que durante la reacción, los productos se liberan antes de la unión de nuevos sustratos<sup>82</sup>.

## II.6 Características de los componentes del soporte de inmovilización

La función del soporte de inmovilización es la de mantener anclado al elemento de bioreconocimiento. Este anclaje debe evitar, en la mayor medida posible, que ocurran cambios en la conformación de la enzima que alteren el sitio activo. Por otro lado, se debería considerar que aquellos soportes que se asemejen al microambiente nativo en el que catalizan estas proteínas proveerán mejores condiciones para mantener la actividad de las mismas. Muchas de las matrices que cumplen de manera satisfactoria con este propósito son altamente hidrofílicas, por lo que son capaces de incorporar gran cantidad de agua dentro de su estructura tridimensional sin perder su conformación.

Los hidrogeles son redes poliméricas entrecruzadas hinchables en agua. En este tipo de material, las cadenas poliméricas se encuentran conectadas a través de uniones que impiden el despliegue del entramado polimérico lo cual los hace insolubles<sup>83</sup>. El entrecruzamiento de las cadenas que conforman la estructura puede ser por uniones del tipo físicas o químicas. Las uniones físicas que generan entrecruzamiento se deben a los enredos macromoleculares que son estables tanto por interacciones secundarias tales como fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes hidrógeno o fuerzas electrostáticas. Por otro lado, las fuerzas de unión que dan origen al entrecruzamiento químico implican uniones covalentes entre

cadenas poliméricas. Independientemente de la naturaleza de las fuerzas atractivas, el entrecruzamiento le confiere las características estructurales y de integración física a la red polimérica<sup>84,85</sup>.

Los hidrogeles pueden ser clasificados según diferentes parámetros<sup>86</sup>. Si se tiene en cuenta el origen de los polímeros que forman la estructura, pueden existir hidrogeles naturales, sintéticos o semisintéticos. Por otro lado, de acuerdo a los tipos de grupos funcionales expuestos, se clasifican en iónicos o neutros. De acuerdo con la morfología que adquiere la red polimérica pueden existir hidrogeles amorfos o semicristalinos. Por último, de acuerdo a la estructura de la red se pueden clasificar en macroporosos, microporosos y no porosos.

En este trabajo se utilizaron polímeros naturales como la mucina, la albúmina y el quitosán. Todos ellos se entrecizaron con glutaraldehído para formar los distintos soportes de inmovilización empleados en la construcción de biosensores. Las mezclas de polímeros entrecruzados suelen ser mecánicamente débiles según la forma en que se preparan. Durante su manipulación puede verse comprometida su estructura, y por ello es necesario protegerlos con un material que sea mecánicamente más resistente. Para esto se ubica una membrana a cada lado de la matriz de forma tal que quede atrapada entre ellas, con lo que se obtiene una estructura que se denomina sándwich y que se puede manipular con facilidad. Es interesante además que cuando se utilizan estas matrices en biosensores, al menos una de las membranas sea permeoselectiva con el fin de evitar el efecto de interferentes.

### II.6.1 Hidrogeles: estructura y propiedades

La estructura de los hidrogeles se puede definir a partir de tres parámetros importantes<sup>87</sup>. El primero es la fracción de volumen de polímero en estado hinchado ( $v_{2,s}$ ). Es una medida de la cantidad de agua que puede absorber la matriz en cuestión.

El segundo parámetro de interés es el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento ( $M_c$ ), que da idea del promedio de los pesos moleculares de las

porciones de cadena polimérica entre dos puntos de entrecruzamiento (Figura II-8). Este parámetro se encuentra asociado al grado de entrecruzamiento ( $X$ ). Mientras más grande sea el valor de  $M_c$ , menos entrecruzada se encontrará la red polimérica, y las propiedades mecánicas de la matriz se verán afectadas en consecuencia con ello.

Por último, el tamaño de poro de la red polimérica ( $\xi$ ) representa la distancia entre puntos consecutivos de entrecruzamiento y es una medida de la porosidad de la red que forman los polímeros del hidrogel (Figura II-8).

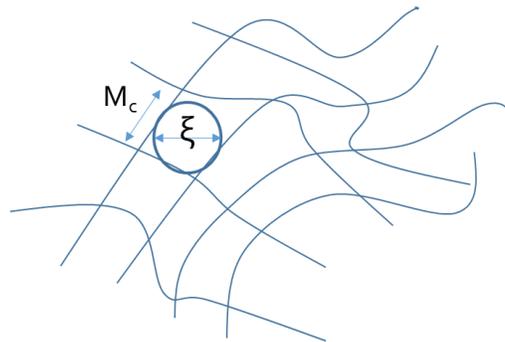


Figura II-8: Representación de la estructura entrecruzada de un hidrogel, donde  $M_c$  es el peso molecular y  $\xi$  es el tamaño de poro.

En muchas oportunidades, estos parámetros teóricos no pueden ser determinados en la caracterización de las redes poliméricas que se forman debido principalmente a que se utilizan macromoléculas naturales de gran tamaño disponibles comercialmente, por lo que es difícil conocer el peso molecular del monómero. Sin embargo, se pueden establecer otras propiedades mecánicas y cinéticas de interés mediante distintos ensayos, como la determinación de las propiedades viscoelásticas, el índice de hinchamiento, o los procesos de transporte de materia a través de la matriz.

Los estudios realizados en polímeros indican que éstos poseen un comportamiento viscoelástico. El término viscoelasticidad en la caracterización de un material hace referencia a la coexistencia simultánea de propiedades viscosas y elásticas. La respuesta de una muestra que se somete a un experimento donde se le aplican fuerzas mecánicas oscilatorias depende de la escala temporal del experimento en relación con el tiempo natural del material. Esto es, si el experimento es

relativamente lento la muestra se podría considerar como si fuese un sistema líquido en el que se amortigua la señal de perturbación (esto se denomina componente viscoso de la muestra). En este caso, la perturbación mecánica es más lenta que la respuesta del material. Mientras que si el experimento es relativamente rápido, la respuesta de la muestra mostrará su resistencia a la perturbación mecánica y se parecerá mayormente a un sistema rígido (esto se denomina componente elástico de la muestra). A tiempos intermedios, se observa la coexistencia de ambas observaciones, y el comportamiento será viscoelástico. Es decir que, si se aplican fuerzas de diferentes magnitudes en un intervalo amplio de tiempos se pueden observar en la respuesta del material tanto propiedades líquidas como sólidas, o una combinación de ambas<sup>88</sup>.

De acuerdo a sus propiedades viscoelásticas, los geles poliméricos pueden ser clasificados en tres grupos: materiales covalentemente entrecruzados, redes enrolladas y geles físicos. Los materiales covalentemente entrecruzados se forman por entrecruzamiento de cadenas de alto peso molecular o mediante polimerización de monómeros multifuncionales. Estos materiales pueden considerarse como moléculas gigantes de peso molecular extremadamente grande. Por otro lado, las redes enrolladas están formadas por la simple interacción de cadenas poliméricas. Estas se pueden disolver cuando se agrega un exceso de disolvente, lo que no ocurre en geles entrecruzados. Las redes enrolladas fluyen como líquidos de alta viscosidad a muy bajas frecuencias de perturbación. Por último, los geles físicos son redes entrecruzadas por uniones no covalentes de baja energía. El número de enlaces y la posición dependen del tiempo de reacción y de la temperatura. Las uniones no covalentes pueden ser coulómbicas, dipolo-dipolo, de Van der Waals, transferencia de carga, hidrofóbicas, puente hidrógeno, entre otras. Los geles físicos se clasifican en fuertes y débiles. Cuando se les aplican pequeñas deformaciones la mayoría de los geles responden como sólidos, pero frente a grandes deformaciones los geles fuertes son sólidos mientras que los geles débiles son fluidos estructurados y fluyen como líquidos.

## II.6.2 Polímeros utilizados como soporte enzimático

### *Mucina*

El mucus es una secreción viscosa adherente secretada por las células caliciformes que revisten el epitelio de las mucosas de órganos expuestos al medio externo, como el tracto respiratorio, el gastrointestinal o el reproductivo. Este tipo de secreción cumple múltiples funciones en cada uno de los lugares en que se encuentra, ya que actúa como lubricante para facilitar el pasaje de elementos sólidos, mantiene una fina lámina de hidratación sobre el epitelio, constituye una barrera frente a agentes nocivos y patógenos, y funciona como lámina semipermeable para el intercambio de gases y nutrientes con el tejido subyacente<sup>89</sup>.

En adición a las funciones de protección, el mucus juega un papel muy importante durante los procesos infecciosos al ser la primera barrera con la que muchos nutrientes y drogas deben interactuar, para luego difundir a través de él. Esta es la forma en que son absorbidos para llegar luego al sistema circulatorio y finalmente alcanzar al órgano que es su objetivo. Además, tiene alta resistencia a la digestión enzimática y capacidad para amortiguar pequeñas cantidades de ácido o base<sup>89,90</sup>.

El mucus está compuesto aproximadamente por un 95% de agua, pero también contiene sales, lípidos como ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, proteínas que cumplen funciones defensivas y factores de crecimiento. Sin embargo, la glicoproteína mucina es el principal componente responsable de su comportamiento viscoso como gel viscoelástico<sup>89</sup>.

Las mucinas son glicoproteínas extracelulares de pesos moleculares que van desde 0,5 MDa a 20 MDa. Están altamente glicosiladas constituyendo el 80% del peso total de la glicoproteína. Los constituyentes de la porción glucosídica son: N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa, galactosa y ácido siálico, también se encuentran trazas de manosa y sulfato. La parte glicosilada (también llamada glucosilada) está formada por oligosacáridos ramificados. Estos oligosacáridos a su vez están constituidos por 5 a 15 monómeros que se encuentran unidos a la proteína por

uniones O-glucosídicas a los grupos hidroxilos de las cadenas laterales de serina y treonina y están dispuestos en forma de “cepillo de probeta” en torno al núcleo proteico<sup>89</sup>.

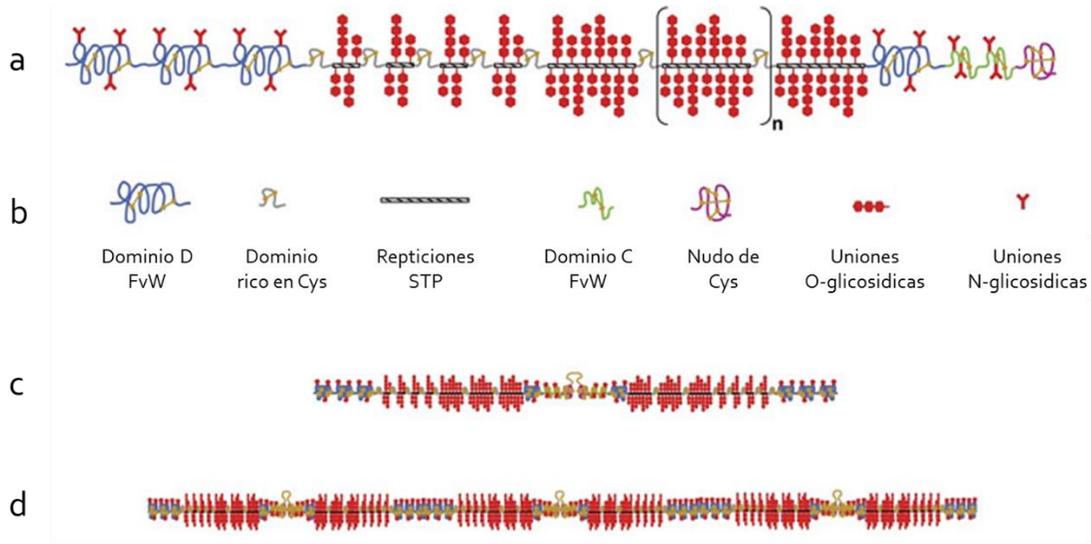


Figura II-9: (a) Esquema de la estructura del monómero de mucina de estómago porcino que muestra las regiones glicosiladas separadas de las regiones de baja glicosilación. (b) Símbolos que representan los diferentes dominios. (c) Dímero unido por puente disulfuro. (d) Unión de dímeros durante la polimerización de mucina que da lugar al alto peso molecular y la polidispersidad de las mucinas secretorias<sup>89</sup>.

La porción proteica constituye el 20% remanente de la masa molecular (200-500KDa) y se organiza en regiones diferentes. Está conformada por una región central compuesta por un gran número de repeticiones alternadas de grupos ricos en serina, treonina y prolina (repeticiones STP). Estos grupos pueden representar más del 60% de los aminoácidos de la proteína y es la parte que permanece unida al polisacárido. Hacia los extremos N-terminal y C-terminal, y algunas veces entre las repeticiones STP, se encuentran regiones peptídicas con pocos sitios O-glucosilados y N-glucosilados ricos en el aminoácido cisteína (>10%). Estos sitios tienen alto contenido de cisteínas y poseen secuencias similares a los dominios C y D del factor de von Willebrand (FvW) y al dominio nudo de cistinas en el C-terminal. Además, estos sitios están involucrados en la formación de dímeros a través de enlaces disulfuro y en consecuencia de la polimerización de mucina<sup>89,91</sup> (Figura II-9).

La determinación del potencial zeta permitió obtener un punto isoeléctrico para la mucina entre 2 y 3. Esto se debe a la proporción de ácido siálico ( $pK_a = 2,6$ ) que se encuentra tanto en la fracción glucosídica, como en las regiones peptídicas descubiertas que no se encuentran asociados a carbohidratos. Esto hace que las moléculas de mucina se comporten como un polielectrolito aniónico a pH neutro, disminuyendo su carga a medida que el pH cambia a valores más ácidos<sup>89</sup>.

Muchas sustancias mucoadhesivas tienden a unirse a la mucina ya que pueden formar interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes hidrógeno<sup>92</sup>. Es conocida la interacción de mucina con lípidos lo cual evidencia la presencia de dominios hidrofóbicos. También es posible la interacción de mucina, especialmente cuando está cargada negativamente, con iones como el Cr(III) que produce cambios conformacionales y la consecuente agregación de la glicoproteína<sup>91</sup>.

La mucina es una matriz que puede incorporar grandes cantidades de agua en su red y ha mostrado retener eficientemente la actividad de las enzimas con las cuales se ha ensayado. Es una matriz de difícil manipulación debido a que tiene consistencia gelatinosa laxa aún después del entrecruzamiento, por lo que suele mezclarse con otras proteínas. Se utilizó en sensores combinada con carbopol o con quitosán, obteniéndose excelentes resultados para un sensor de oxalato en medio ácido<sup>93,94</sup>. Las combinaciones de mucina y albúmina resultaron exitosas en el desarrollo de biosensores para la detección de lactato<sup>10</sup> y de glucosa<sup>9</sup>.

### *Albúmina*

La albúmina es una de las proteínas más abundantes del sistema circulatorio de los mamíferos y es sintetizada en el hígado. La fracción albúmina-globulina es aproximadamente del 55%, mientras que al resto de las proteínas plasmáticas se las denomina en conjunto globulinas. Esta proteína cumple un rol fundamental en el transporte de ácidos grasos, metabolitos y drogas, sean éstos compuestos endógenos o exógenos. La presencia de albúmina es muy importante para el mantenimiento de la presión osmótica, necesaria para la distribución correcta de líquidos corporales entre el

compartimiento intravascular y extravascular. Al pH sanguíneo, la carga eléctrica predominante es negativa, lo que evita su pérdida por filtración glomerular debido a la carga negativa del glomérulo<sup>95</sup>.

La propiedad más destacada de la albúmina es su capacidad para unirse reversiblemente a una gran variedad de ligandos. Su unión a proteínas les permite mayor solubilidad en el plasma, menor toxicidad hacia el medio y mayor protección contra la oxidación del ligando unido<sup>95,96</sup>. Su abundancia hace que sea un factor importante en el comportamiento farmacocinético de muchos fármacos, afectando su eficacia y tasa de liberación. La albúmina también es responsable de la mayor parte de la capacidad antioxidante del suero humano, ya sea porque se une directamente a radicales libres, porque transporta captadores de radicales, o debido a que secuestra iones de metales de transición con actividad oxidante<sup>96,97</sup>.

La albúmina de suero bovino es una proteína globular pequeña (66 kDa) compuesta por 583 aminoácidos en una cadena polipeptídica simple. Contiene pocos restos de triptófano o metionina, pero abundancia de residuos cargados, como lisina y ácido aspártico, destacándose la ausencia de grupos prostéticos o carbohidratos. Esto hace que su punto isoeléctrico sea 4,9.

Estudios cristalográficos mostraron que la albúmina posee una estructura terciaria en forma de corazón, pero en solución es elipsoidal. Su estructura está compuesta mayormente por  $\alpha$ -hélices. La proteína está compuesta de 3 dominios homólogos (Figura II-10), cada uno de ellos conteniendo dos subdominios (A y B). Los subdominios se mueven uno con respecto al otro por medio de bucles flexibles proporcionados por residuos de prolina que, junto a la flexibilidad proporcionada por puentes disulfuro que unen cada dominio, favorece la unión de los ligandos<sup>98,99</sup>.

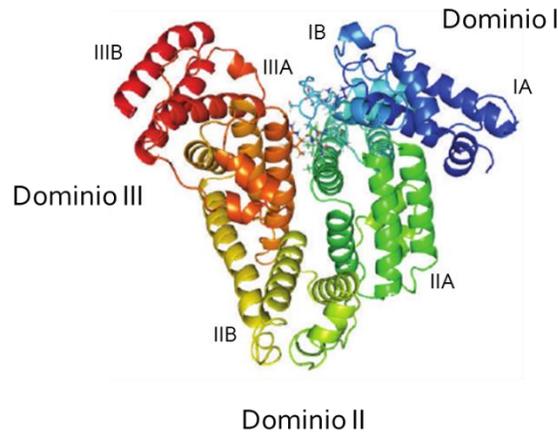


Figura II-10: Estructura de la albúmina de suero bovino obtenida por modelado, donde se observan los tres dominios que la forman y cada una de sus sub unidades<sup>99</sup>.

La albúmina contiene una gran cantidad de lisina, constituyendo alrededor del 10% del total de los aminoácidos. Por ello, puede formar numerosos enlaces con el glutaraldehído, lo cual propicia la formación de una red polimérica muy compacta y rígida comparada con la mucina. Esta proteína se ha utilizado como matriz para la construcción de sensores químicos en especial mezclada con mucina, con muy buenos resultados analíticos<sup>9,10,100</sup>.

### Quitósán

La quitina ( $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa) es un polisacárido natural de gran importancia, análogo al colágeno en animales superiores y a la celulosa en plantas terrestres. Este biopolímero es sintetizado por una enorme cantidad de organismos vivos. Así como las plantas producen celulosa en la pared celular, los insectos y crustáceos producen quitina en sus exoesqueletos. En ambos casos, la función de estos polisacáridos es brindar integridad y protección. En la naturaleza se presenta como microfibras cristalinas ordenadas, que dan forma a numerosos elementos estructurales en los exoesqueletos de artrópodos o en la pared celular de algunas levaduras y hongos. La celulosa es un homopolímero, mientras que la quitina y el quitosán son heteropolímeros. La quitina se diferencia de la celulosa ( $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-

$\beta$ -D-glucosa) en que posee un grupo acetamida en el carbono 2, en lugar de un grupo hidroxilo<sup>101-103</sup> (Figura II-11).

La quitina es un copolímero de los azúcares  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa y  $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa, cuya relación es aproximadamente de 0,9 (acetamido/amino). El cociente es denominado grado de acetilación, e indica la presencia de grupos aminos con gran influencia en la solubilidad de la quitina. La quitina se presenta en tres formas polimórficas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), que se diferencian principalmente en el empaquetamiento y la polaridad de cadenas adyacentes<sup>104</sup>. Las propiedades físicas del quitosán dependen de muchos parámetros como el peso molecular (entre 10 kDa y 1 MDa), el grado de desacetilación (representa la proporción de unidades desacetiladas y está comprendida entre 50-95%), la secuencia de los grupos amino y acetamida, y la purificación del producto<sup>105</sup>.

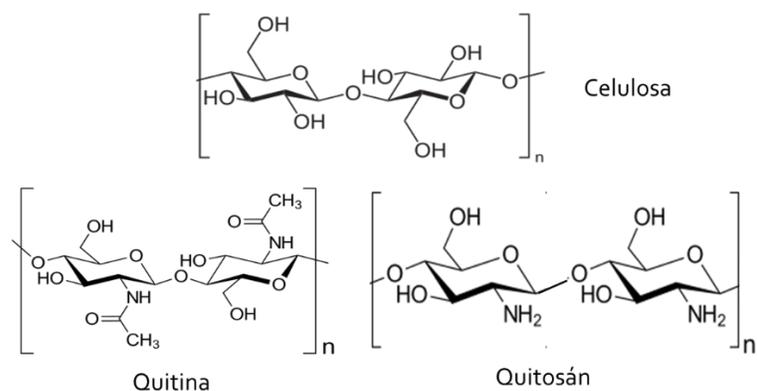


Figura II-11: Estructuras químicas de celulosa, quitina y quitosán.

El orden molecular de quitina depende del rol fisiológico y de la característica del tejido. Las cadenas de polisacáridos están unidas entre sí a través de puentes hidrógeno y se organizan en forma de hojas o láminas. En la estructura  $\alpha$  se produce un mejor empaquetamiento de las cadenas de polisacárido, a diferencia de la forma  $\beta$ , que presenta una estructura más expandida.

El quitosán se obtiene a partir de la desacetilación parcial alcalina de la quitina para obtener un grado de acetilación menor a 0,35. Cuando el pH de una solución de quitosán disminuye, se produce la protonación de los grupos amino ( $pK_a \approx 6,3$ ) y el

polisacárido adquiere carga positiva. Esto hace que el quitosán sea un polielectrolito catiónico soluble en agua, uno de los pocos que se encuentran en la naturaleza. Por el contrario, cuando el pH aumenta por encima de 6, el polímero pierde sus cargas positivas, se agrega y se vuelve insoluble<sup>103</sup>.

El quitosán posee características químicas y biológicas distintivas. A lo largo de su cadena lineal de alto peso molecular tiene grupos amino e hidroxilos reactivos que se encuentran disponibles para realizar modificaciones químicas. Cuando se solubiliza quitosán en medio ácido los grupos amino de su cadena adquieren carga positiva, lo que propicia su adherencia a superficies cargadas negativamente o a compuestos polianiónicos, otorgándole excelentes propiedades para la formación de geles. Además, tiene la propiedad de quelar iones metálicos pesados. El quitosán es biocompatible, biodegradable, no tóxico, fisiológicamente inerte y tiene gran afinidad con las proteínas, entre otras propiedades<sup>105</sup> por lo que es muy utilizado en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Al ser bioadhesivo, promueve la cicatrización de heridas y tiene efecto bacteriostático<sup>106</sup>. En las aplicaciones médicas y farmacéuticas es utilizado como componente de hidrogeles<sup>105</sup>.

El quitosán puede formar hidrogeles físicos o químicos. La formación de hidrogeles físicos se logra principalmente por interacciones iónicas e interacciones secundarias, mientras que los hidrogeles químicos se forman especialmente por uniones covalentes entre las cadenas de polisacáridos. El glutaraldehído se utiliza para generar este tipo de uniones mediante la reacción con los grupos aminos de los azúcares de la cadena del polímero. Su uso como matriz se ha incrementado en los últimos años, ya que se ha utilizado para inmovilizar biomoléculas covalente y electrostáticamente<sup>105</sup>. La preparación de geles se basa en la disolución rápida del quitosán en soluciones levemente ácidas de muchos ácidos orgánicos, incluido el fórmico, acético, tartárico y cítrico, para formar soluciones viscosas que precipitan cuando se incrementa el pH del medio.

### *Mezclas entrecruzadas con glutaraldehído*

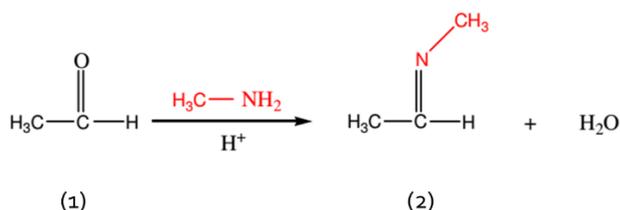
La mezcla de macromoléculas es un proceso favorecido entrópicamente, que también depende de las interacciones atractivas entre los polímeros, es decir, de la entalpía de la mezcla. Si la entalpía de mezcla es negativa, se producen mezclas de polímeros miscibles donde las interacciones intermoleculares son del tipo uniones puente hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo o complejos de transferencia de carga. Existen numerosos casos de mezclas estables en las que no se produce separación de fase<sup>107</sup>. Si la mezcla de polímeros se entrecruza covalentemente, se producen redes poliméricas estables con diferentes grados de interpenetración, dependiendo de la composición inicial de la mezcla.

Los hidrogeles en los que se utiliza un polímero químicamente entrecruzado pueden clasificarse en tres tipos<sup>102</sup>. El *polímero entrecruzado consigo mismo*<sup>102</sup>, es la estructura más simple e involucra el entrecruzamiento entre unidades de monómeros que pueden o no pertenecer a la misma cadena polimérica. *Las redes poliméricas híbridas*<sup>102</sup>, se obtienen por entrecruzamiento entre dos cadenas poliméricas, sin descartar las uniones entre cadenas del mismo tipo (consigo misma u otra diferente). Finalmente se encuentran los hidrogeles que forman *redes poliméricas interpenetradas*<sup>102</sup> los cuales contienen un polímero que no reacciona químicamente con el otro, pero donde cada uno puede entrecruzarse para formar una red interpenetrada con la red del otro polímero. En todos estos hidrogeles las uniones covalentes son las principales interacciones, pero no se pueden obviar las interacciones secundarias. Los hidrogeles que forman redes poliméricas híbridas e interpenetradas presentan interacciones puente hidrógeno que contribuyen a la estructura del gel.

Los entrecruzantes son moléculas que poseen al menos dos grupos funcionales reactivos que permiten la formación de puentes entre las cadenas poliméricas. Se han usado muchas moléculas bifuncionales de pequeño tamaño para entrecruzar cadenas de polímeros, incluyendo diglicidil éter, genipina, diisocianato, diacrilato y otros<sup>108</sup>, siendo el glutaraldehído uno de los más comunes<sup>109</sup>. Los dialdehídos permiten la reacción directa en medio acuoso, en condiciones suaves y sin la adición de moléculas

auxiliares, siendo una ventaja en términos de biocompatibilidad. Sin embargo, el principal inconveniente de los dialdehídos como el glutaraldehído es que generalmente se consideran tóxicos<sup>109</sup>. Se han probado con éxito múltiples implantes prostéticos en las últimas décadas, indicando que el entrecruzamiento con glutaraldehído ha sido aceptable clínicamente<sup>109</sup>. Por ejemplo, se han empleado microesferas de gelatina reticuladas con glutaraldehído como portadores para el crecimiento y propagación de fibroblastos y células endoteliales. Sin embargo, se conoce que el glutaraldehído es tóxico si se libera a la circulación<sup>109</sup>.

El glutaraldehído reacciona preferentemente con grupos aminos primarios de aminoácidos básicos como la lisina. En distintos trabajos se ha demostrado que los aminoácidos lisina son claves en la formación de agregados a partir de proteínas<sup>110</sup>. La reacción de entrecruzamiento con glutaraldehído requiere habitualmente catálisis ácida y ocurre por adición nucleofílica de un grupo amino sobre el carbonilo electrofílico del grupo aldehído (1) formándose un hemiaminal inestable como intermediario, el que por pérdida de una molécula de agua produce la imina (2) correspondiente como muestra el siguiente esquema<sup>111</sup>:



A medida que se lleva a cabo la reacción de entrecruzamiento, se van uniendo las cadenas de polímero por medio de puentes formados por moléculas de glutaraldehído. Conforme se desarrolla el proceso de entrecruzamiento, aumenta tanto la viscosidad como la elasticidad de la solución, mientras se incrementa el peso molecular y el número de sitios de entrecruzamiento. Generalmente, comienza a ser más importante el comportamiento elástico de la mezcla hasta el punto en que se considera que la muestra se ha gelificado. Entonces, el polímero es insoluble y, si la

reacción avanza lo suficiente, se obtendría teóricamente una molécula macroscópica del mismo tamaño que la muestra.

El entrecruzamiento de las cadenas le otorga a la mezcla mayor estabilidad estructural y térmica. El aumento de los puntos de anclaje en la red restringe el movimiento y mantiene las cadenas en su posición, lo que hace también que aumente la fragilidad y disminuya la flexibilidad.

Los hidrogeles obtenidos a partir de las mezclas de mucina/albúmina o mucina/quitosán, entrecruzadas con glutaraldehído, generan redes poliméricas híbridas. Esto, se debe a que simultáneamente pueden ocurrir múltiples combinaciones de entrecruzamiento. Es decir que se pueden formar uniones covalentes entre polímeros de la misma naturaleza, como mucina/mucina, albúmina/albúmina, quitosán/quitosán o bien entre polímeros diferentes como mucina/albúmina o mucina/quitosán<sup>102</sup>. También pueden existir interacciones físicas y secundarias entre cadenas. De los tres polímeros utilizados, el quitosán es quien posee mayor cantidad de grupos amino, por lo que en una mezcla con mucina será el polímero más involucrado en el entrecruzamiento. Por otro lado, cuando se mezclen mucina y albúmina, esta última será la macromolécula que se entrecruce más, debido a la mayor densidad de lisina en su estructura. De acuerdo a la concentración de reactivos que se utilice, se obtendrán redes más o menos rígidas. Cuando se mezcla mucina, ya sea con quitosán o con albúmina, disminuye la cantidad de grupos aminos totales y por consiguiente disminuye también el grado de entrecruzamiento. Por lo tanto, las características finales que se obtengan de la mezcla dependerán tanto de la concentración de cada polímero como de la concentración utilizada de entrecruzante.

## CAPÍTULO III: FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS

### III.1 Técnicas electroquímicas

Las reacciones químicas que se dan sobre la superficie de un conductor eléctrico, pueden ser exploradas mediante diferentes técnicas de barrido de potencial o corriente, y permite estudiar variados procesos de múltiple complejidad. Las reacciones en las que existe una transferencia de electrones entre dos moléculas son reacciones rédox. Una reacción rédox involucra siempre dos especies que sufren una transformación: una especie oxidada (*O*) y una especie reducida (*R*). Cuando ambas especies son solubles en el solvente utilizado, las ecuaciones de transferencia de carga pueden ser escritas de acuerdo con el siguiente modelo<sup>112</sup>:

- a- La molécula reactiva se acerca a la superficie electroactiva por procesos de transferencia de masa como difusión, convección o migración.
- b- La especie que sufre una reacción de transferencia de carga se reestructura.
- c- La reacción de transferencia de carga se lleva a cabo una vez aplicado el potencial eléctrico según la técnica electroquímica de que se trate. La ecuación que representa este proceso es:



donde  $\bar{k}$  y  $k$  son las constantes de velocidad para el proceso de reducción y de oxidación, respectivamente, y  $n$  el número de electrones involucrados.

- d- La especie que se forma se reorganiza.
- e- El producto que se genera por la reacción sobre la superficie del electrodo puede trasladarse al seno de la solución mediante procesos de transferencia de masa.

Como resultado de las etapas descritas, se obtendrá una respuesta eléctrica que, adquirida y almacenada con el equipamiento adecuado, permitirá analizar y caracterizar al sistema electroquímico en estudio.

Cuando sobre la superficie electroactiva se coloca un biosensor tipo sándwich, las etapas anteriores se modifican debido a la barrera difusional agregada, y a la presencia de la enzima que incorpora una reacción previa en el sistema. En este caso, las etapas se resumen como sigue:

- i. El sustrato llega a la superficie expuesta del biosensor mediante procesos de transferencia de masa.
- ii. El sustrato difunde primero por la membrana permeoselectiva, y luego a través de la matriz polimérica hasta alcanzar el sitio activo de la enzima.
- iii. Se produce la reacción enzimática, en este caso una reacción de oxidación.
- iv. El producto de la reacción enzimática se transporta desde la matriz hacia el seno de la solución, como hacia la superficie del electrodo.
- v. El producto de la reacción enzimática se oxida o reduce en la superficie del electrodo de acuerdo al potencial eléctrico aplicado, y se registra la corriente generada por este proceso, lo que corresponde a la señal analítica del sistema.

El transporte de masa en las etapas anteriores puede darse por diferentes fenómenos de movimiento<sup>112</sup>. Cuando se trata de migración, las especies cargadas consiguen moverse debido a la influencia de un campo eléctrico aplicado externamente. Sin embargo, cuando se utiliza un electrolito inerte en exceso como soporte de la reacción, este efecto se atenúa en gran medida. Por otro lado, cuando el seno de la solución se agita mecánicamente, se produce transporte por convección o transporte hidrodinámico. Para asegurar la homogeneidad de los procesos de transferencia por convección, es fundamental mantener controlada la velocidad de la agitación. En el caso de un biosensor tipo sándwich, este control hace que se mantenga una velocidad constante de llegada del sustrato a la membrana externa. Por último, los movimientos

por difusión de una especie se producen cuando se presenta un gradiente de concentración en los distintos espacios físicos. Dentro de la superficie del electrodo no existe influencia por convección hidrodinámica, por lo que el fenómeno de difusión es el que gobierna el movimiento de las especies dentro de la matriz, tanto de sustratos como de productos. Este fenómeno siempre se encuentra presente, y su magnitud dependerá del aumento o disminución en la concentración del sustrato y de los productos enzimáticos.

### III.1.1 Cronoamperometría

La medición de la corriente que circula a través de la superficie electroactiva se obtiene a partir de la aplicación de un potencial a la celda electroquímica. La función de potencial que se aplica determina el tipo de técnica utilizada, y por lo tanto el tipo de respuesta obtenida. Si bien la técnica cronoamperometría es una de las más sencillas, es la técnica más eficiente para la construcción de las curvas de calibración de biosensores y para caracterizar cada uno de los electrodos enzimáticos que se han construido a partir de las diferentes matrices estudiadas. La técnica se basa en aplicar una diferencia de potencial constante a la interfaz electroquímica mientras se registra la corriente faradaica que se genera debido a las reacciones de oxidación – reducción. En cronoamperometría, generalmente se espera que la corriente generada sea proporcional a la concentración del analito en el seno de la solución. No obstante, cuando se desea expresar la corriente en función de las especies dentro de la matriz enzimática, resulta más apropiado indicar que la corriente es proporcional al gradiente de concentración de la especie electroactiva que se genera o consume, debido a la reacción enzimática. Además, debe tenerse en cuenta que comúnmente la concentración del analito cae prácticamente a cero dentro de la matriz, como consecuencia de la reacción enzimática. También se puede decir que la corriente ( $I$ ) que circula durante la electrólisis es directamente proporcional a la velocidad de reacción electroquímica sobre el electrodo de acuerdo a la ley de Faraday<sup>112</sup>:

$$I = nF \frac{dN}{dt} \quad \text{III-2}$$

donde  $dN/dt$  es la velocidad de oxidación o de reducción en moles por segundo,  $N$  es el número de moles de la especie electroactiva presente,  $t$  es el período de tiempo considerado, y  $F$  es la constante de Faraday ( $F = 96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Por otro lado, la cantidad de moles que reaccionan en un período de tiempo representa el flujo de materia  $J$  de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{dN}{dt} = AJ \quad \text{III-3}$$

donde  $J$  es el flujo de materia y  $A$  la superficie del electrodo.

La naturaleza heterogénea del proceso hace que la corriente dependa de la velocidad de transferencia de carga en la interfaz, y del transporte de masa de la especie redox hacia el electrodo desde el seno de la solución. En el momento en que se aplica el potencial que genera la electrólisis, la concentración de la especie  $O$  (Reacción III-1) sobre el electrodo, se hace menor que en el seno de la solución ya que  $O$  se convierte en  $R$ . En el caso de que la solución no se encuentre agitada hidrodinámicamente y que la migración de las especies se mantenga controlada, la difusión será la única forma de transporte de masa. En este caso, el flujo de  $O$  con dirección a la superficie del electrodo, para un determinado tiempo  $t$ , será proporcional al gradiente de concentración de  $O$  a la distancia  $x$ . De este modo el flujo de carga puede describirse mediante la primera ley de Fick<sup>113</sup>:

$$J(x,t) = D_0 \frac{d[c(x,t)]}{dx} \quad \text{III-4}$$

donde  $J(x,t)$  representa al flujo medido a una distancia  $x$  del electrodo a un tiempo  $t$ , y  $c$  es la concentración de la especie  $O$ , que difunde en la solución con un coeficiente de difusión  $D_0$ .

Si se combinan las ecuaciones III-2 y III-3 sobre la superficie del electrodo (es decir cuando  $x=0$ ), la corriente con una superficie  $A$  para el electrodo se puede definir de acuerdo a la siguiente ecuación<sup>112</sup>:

$$I = nFAJ(0, t) \quad \text{III-5}$$

y la expresión para la corriente en función del tiempo será:

$$I_d = nFAD_0 \left[ \frac{d[c(0, t)]}{dx} \right] \quad \text{III-6}$$

Cuando el potencial al que se polariza es lo suficientemente elevado, es posible que se alcancen condiciones de corriente límite en las que la concentración del sustrato sobre el electrodo se aproxima a cero. En este caso, la velocidad de la reacción es máxima y se alcanza el estado en que la corriente es controlada por difusión. Con estas condiciones, el perfil de concentración con respecto a la distancia del electrodo se representa de acuerdo a la Figura III-1. Allí, el eje de las abscisas representa la distancia al electrodo, siendo el punto de origen la superficie del mismo. En el eje de las ordenadas se representa la concentración de la especie electroactiva. La concentración máxima está representada por  $c^*$ , que es la concentración en el seno de la solución, y que se considera constante.

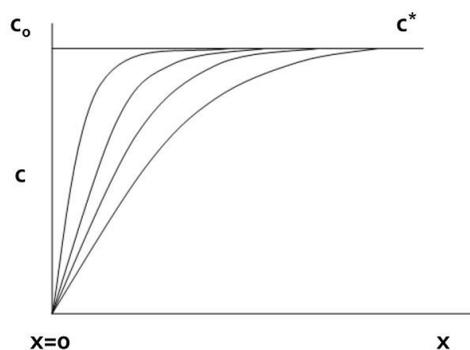


Figura III-1: Perfil de concentración versus distancia al electrodo al potencial al cual se alcanza la corriente límite. Cada una de las curvas representadas ocurre a distinto tiempo  $t$ .

Se conoce como capa difusional de Nernst ( $\delta$ ) a la región en la que la concentración disminuye desde su valor en el seno hasta cero sobre la superficie del electrodo<sup>113</sup>. Esta capa tiene un espesor que depende de la viscosidad de la solución que se utilice, pero después de cierto tiempo el espesor se mantiene constante, debido a que se ha alcanzado la condición de estado estacionario. Considerando los perfiles linealizados con el Modelo de Capa Difusional de Nernst, se puede representar matemáticamente el gradiente de concentración según la siguiente ecuación:

$$\frac{dc}{dx} = \frac{(c^* - c_0)}{\delta} \quad \text{III-7}$$

Cuando la concentración del analito en la superficie del electrodo  $c_0$  es cero, esta ecuación puede ser simplificada como sigue:

$$\frac{dc}{dx} = \frac{c^*}{\delta} \quad \text{III-8}$$

Teniendo en cuenta el flujo en la superficie del electrodo se puede definir la corriente estacionaria ( $I_{est}$ ) como<sup>112</sup>:

$$I_{est} = \frac{nFAD_0c^*}{\delta} \quad \text{III-9}$$

$$I_{est} = nFAk_m c^* \quad \text{III-10}$$

donde  $k_m$  es la constante de velocidad de transporte de masa, calculada como el cociente entre el coeficiente de difusión del sustrato,  $D_s$ , y el espesor de la capa difusional ( $\delta$ ). Esta última expresión es la corriente estacionaria que se obtiene de la electrólisis de un analito y, como puede deducirse de la ecuación III-9, es directamente proporcional a la concentración en el seno de la solución y al coeficiente de difusión, e inversamente proporcional al espesor de la capa difusional de Nernst. Cuando se aplica el pulso de potencial a  $t=0$  la corriente es máxima y comienza a caer asintóticamente a

medida que transcurre el tiempo, hasta alcanzar el estado estacionario  $I_{est}$ . El perfil de corriente se muestra en la Figura III-2.

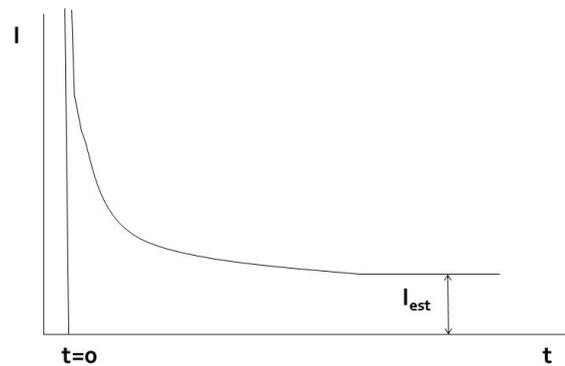


Figura III-2: Perfil de corriente en función del tiempo obtenido al aplicar un pulso de potencial.

En el caso de un biosensor tipo sándwich, la capa difusional generalmente se extiende desde la superficie del electrodo hasta el límite externo del sándwich. Si bien los sustratos y productos de la reacción enzimática deben alcanzar un estado estacionario en el interior de la matriz proteica, las concentraciones de estas especies en la solución acuosa se consideran constantes debido a la diferencia de coeficientes de difusión en uno y otro medio. El transporte del sustrato a través del soporte de anclaje se representa por la reacción III-11, y su velocidad estará determinada por la diferencia de concentración que existe entre el seno de la solución y el interior del biosensor, según ecuación III-12.



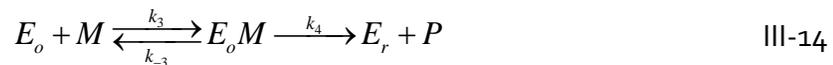
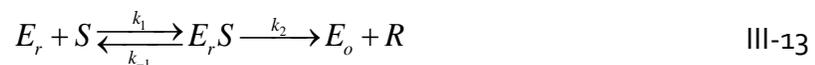
$$J_s = k_s ([S]^* - [S]_0) \quad \text{III-12}$$

donde  $J_s$  es el flujo de sustrato,  $[S]^*$  y  $[S]_0$  son las concentraciones de sustrato en el seno de la solución y en la superficie del electrodo, respectivamente.

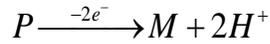
## III.2 Ecuaciones para simular la respuesta del biosensor de GOX

Mediante el uso de sistemas de cálculo, es posible llevar a cabo simulaciones computacionales que permitan modelar el comportamiento de las reacciones que ocurren cuando se utiliza un biosensor. Para esto, se tiene en cuenta la difusión de los solutos y productos dentro del sensor y las ecuaciones que describen a las reacciones enzimáticas y electroquímicas.

El sensor que se utilizó en este trabajo tiene la forma de un sándwich, en el que la matriz enzimática que retiene a la enzima se encuentra atrapada entre dos membranas de policarbonato. Este arreglo se deposita sobre la superficie del electrodo, donde se desarrollan las reacciones electroquímicas. El conjunto sándwich – electrodo se coloca en una celda de reacción, en la que electrolito soporte se encuentra en agitación constante para asegurar que en todo momento la solución es homogénea. El movimiento de convección del electrolito se detiene en la membrana externa, por lo que el flujo de sustratos y productos está controlado por la difusión dentro del sándwich (Figura III-3). La GOX es una oxidasa que cataliza la oxidación del sustrato  $S$  (glucosa) y la reducción del mediador  $M$  (oxígeno) mediante un mecanismo *ping-pong*. Los dos productos de la reacción enzimática pueden difundir desde la matriz hacia el exterior. Sólo la especie  $P$  (peróxido de hidrógeno) es electroactiva. Las reacciones que ocurren en la matriz enzimática se pueden resumir de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



$E_r$  y  $E_o$  corresponden respectivamente a las formas reducida y oxidada de la enzima, mientras que  $E_rS$  y  $E_oM$  son los complejos intermediarios de la enzima con el sustrato y con el mediador, respectivamente. La reacción que toma lugar en la superficie del electrodo es la siguiente:



III-15

La oxidación del producto catalítico  $P$  sobre la superficie del electrodo regenera al mediador  $M$ . Es decir, el oxígeno consumido por la GOX en cada ciclo catalítico se convierte en peróxido de hidrógeno, que regenera al oxígeno molecular al oxidarse sobre la superficie del electrodo.

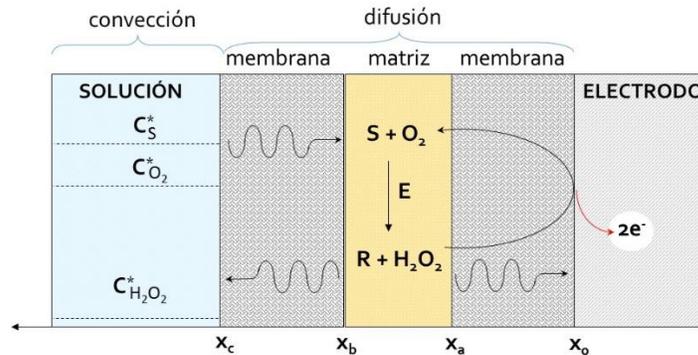


Figura III-3: Esquema de un biosensor tipo sándwich.

Para analizar las reacciones III-13 y III-14 se necesita conocer la concentración de las especies involucradas dentro de la matriz enzimática. La concentración de los sustratos y de los productos puede variar de acuerdo a su posición con respecto a la superficie del electrodo. Por este motivo, la combinación de las contribuciones cinética y difusional hace que la señal amperométrica que se genera no pueda ser descrita por medio de una única ecuación analítica<sup>114</sup>. Por este motivo, las simulaciones numéricas se pueden aplicar no sólo para calcular la respuesta de un biosensor sobre un amplio intervalo de parámetros experimentales, sino que puede entregar información sobre los perfiles de concentración de las especies involucradas dentro de la matriz enzimática<sup>114,115</sup>.

### Modelo matemático

En el desarrollo de un modelo teórico que describa un biosensor enzimático basado en el esquema de la Figura III-3, se debe asumir que<sup>114</sup>:

- La enzima se encuentra sólo en la matriz enzimática, y mantiene una concentración constante ( $C_E$ ).
- En el inicio del experimento donde  $t = 0$ , la concentración de  $M$  ( $C_M$ ) es una constante y las concentraciones de  $S$  ( $C_S$ ) y  $P$  ( $C_P$ ) son iguales a cero, ya sea en la solución como dentro del sensor.
- Dentro del sensor, el coeficiente de difusión de cada una de las especies involucradas es constante, y la enzima no puede difundir en la matriz al estar inmovilizada debido al proceso de entrecruzamiento.
- Sobre la superficie del electrodo, el producto de la reacción enzimática  $P$  es instantáneamente oxidado, por lo que  $(C_P)_{x=0} = 0$ .
- El grosor del sensor ( $\Delta x$ ) estará comprendido entre 10  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , considerados valores de espesor típicos para un biosensor tipo sándwich<sup>116</sup>.
- La concentración del electrolito soporte es suficientemente alta como para no considerar los efectos asociados con la migración de las especies.

La ecuación de velocidad que se obtiene para una reacción enzimática con mecanismo *ping-pong bi bi* está dada por la Ecuación II-18, expresada de la siguiente manera:

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + K_S/C_S + K_M/C_M}$$

Para describir la transferencia de masa a través del eje  $x$ , es decir en dirección normal a la superficie del electrodo, se debe diferenciar la porción del sándwich por la que está difundiendo la especie en cuestión. Si la transferencia de masa ocurre dentro de las membranas de policarbonato, cuando ( $x_c \geq x > x_b$ ) y ( $x_a \geq x > x_o$ ), la difusión puede ser descrita mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad \text{III-16}$$

donde  $i$  representa a cualquiera de las especies  $S, M, P, R$  y  $D_i$  es el coeficiente de difusión correspondiente a cada una de ellas en el interior de la membrana.

Por otro lado, cuando las especies difunden dentro de la matriz enzimática, es decir que  $x$  toma valores de  $(x_b \geq x > x_a)$ , la difusión se describe mediante:

$$\frac{\partial C_S}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2 C_S}{\partial x^2} - \frac{v_{\max}}{1 + K_S/C_S + K_M/C_M} \quad \text{III-17}$$

$$\frac{\partial C_M}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 C_M}{\partial x^2} - \frac{v_{\max}}{1 + K_S/C_S + K_M/C_M} \quad \text{III-18}$$

$$\frac{\partial C_P}{\partial t} = D_P \frac{\partial^2 C_P}{\partial x^2} + \frac{v_{\max}}{1 + K_S/C_S + K_M/C_M} \quad \text{III-19}$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 C_R}{\partial x^2} + \frac{v_{\max}}{1 + K_S/C_S + K_M/C_M} \quad \text{III-20}$$

Estas ecuaciones nos indican que, para el caso de los sustratos de la reacción enzimática (oxígeno y glucosa,  $M$  y  $S$ , respectivamente) su concentración en el tiempo está dada por la difusión de éstos al interior de la matriz enzimática menos lo consumido por la catálisis. Lo opuesto sucede para los productos, peróxido de hidrógeno ( $P$ ) y ácido glucónico ( $R$ ) que son generados en la reacción enzimática. Finalmente, sobre la superficie del electrodo, el flujo de las especies está determinado por:

$$\frac{I(t)}{n_e F A} = -D_P \left( \frac{\partial C_P}{\partial x} \right)_{x=0} = D_M \left( \frac{\partial C_M}{\partial x} \right)_{x=0} \quad \text{III-21}$$

$$\left( \frac{\partial C_S}{\partial x} \right)_{x=0} = \left( \frac{\partial C_R}{\partial x} \right)_{x=0} = 0 \quad \text{III-22}$$

Para evaluar los perfiles de concentración y los respectivos resultados del modelo planteado, las Ecuaciones III-4 a III-10 se reformulan de acuerdo a las expresiones obtenidas por el método de diferencias finitas<sup>114,115</sup> que se escriben a

continuación. Cuando se evalúan los valores de  $x$  correspondientes al interior de las membranas de policarbonato, la ecuación que se obtiene es la siguiente:

$$(C_i)_j^{t+1} = (C_i)_j^t + \frac{D_i \Delta t}{\Delta x^2} [(C_i)_{j-1}^t - 2(C_i)_j^t + (C_i)_{j+1}^t] \quad \text{III-23}$$

mientras que para valores de  $x$  correspondientes al interior de la matriz enzimática la ecuación queda:

$$(C_i)_j^{t+1} = (C_i)_j^t + \frac{D_i \Delta t}{\Delta x^2} [(C_i)_{j-1}^t - 2(C_i)_j^t + (C_i)_{j+1}^t] \pm \frac{v_{\max}}{1 + K_S/(C_S)_j^t + K_M/(C_M)_j^t} \quad \text{III-24}$$

En la ecuación anterior, el signo menos se utiliza para las ecuaciones III-5 y III-6, mientras que en las ecuaciones III-7 y III-8 se emplea el signo más. El subíndice  $i$  representa a las especies presentes, mientras que el superíndice  $j$  corresponde a una dada posición dentro del sensor. Por último, sobre la superficie del electrodo se expresa:

$$\psi(t) = \frac{I(t)}{n_e F A C_S^*} \frac{t}{\Delta x} = \frac{D_P \Delta t N}{\Delta x^2} \frac{(C_P)_1^t}{C_S^*} \quad \text{III-25}$$

donde,  $\psi(t)$  corresponde a la corriente adimensional en el momento de tiempo  $t = N\Delta t$ . Las ecuaciones III-11, III-12 y III-13 aportan los estados transitorios teóricos desde los cuales pueden determinarse las corrientes de estado estacionario, para poder simular las distintas condiciones experimentales.

### III.3 Mediciones reológicas

La Reología es la disciplina científica en la que se estudia la relación entre la tensión y la deformación a la que son sometidos aquellos materiales capaces de fluir. Los materiales que se incluyen en su campo de aplicación van desde líquidos a sólidos pasando por los viscoelásticos, que presentan un comportamiento intermedio entre

estos extremos. Los polímeros se encuentran dentro de aquellos que poseen comportamiento viscoelástico. Para una mejor comprensión de esta característica, es necesario entender los extremos del espectro de la respuesta mecánica, es decir la respuesta que se obtiene de sólidos y líquidos puros.

Para estudiar las propiedades reológicas de un material, se lo somete a una tensión conocida y se mide la magnitud de la deformación producida por esta fuerza de estrés. También, es posible medir la relación contraria, sometiendo al material a una deformación conocida y midiendo la fuerza que el material ejerce en oposición a la deformación y tendiente a restablecer su forma original.

### *Sólidos ideales*

El comportamiento viscoelástico o reológico de sólidos ideales es descrito por la ley de Hooke que establece una relación directamente proporcional entre la deformación y la fuerza aplicada a una muestra del material<sup>88</sup>. El estrés, en tanto, se define como el cociente entre la fuerza aplicada y el área sobre la que se aplica esta fuerza. El estrés produce una deformación, que es la relación entre el cambio en la dimensión de la muestra frente a la dimensión original.

El estrés de tracción ( $\sigma$ ), representado en la Figura III-4 (A), produce sobre el bloque rectangular una deformación  $\varepsilon = dl/l$ . Aquí,  $l$  es la longitud original del bloque y  $dl$  es el cambio producido debido a la aplicación de la fuerza en el área  $A_0$ . En este caso, ocurre un flujo extensional de materia en el que las partículas adyacentes tienden a separarse unas de otras en la misma dirección de la fuerza externa aplicada, mientras que tienden a acercarse en el sentido perpendicular a la fuerza. Para estudiar este sistema se define el módulo de tracción o módulo de Young ( $E$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F / A_0}{dl / l} \quad \text{III-26}$$

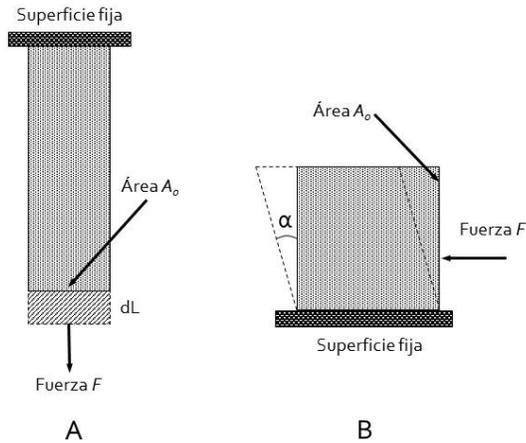


Figura III-4: Esfuerzo de tracción (A) y esfuerzo de corte (B) aplicado a geometrías ideales.

El estrés de corte ( $\tau$ ), representado en la Figura III-4 (B), produce una deformación debida a un desplazamiento paralelo a una cara o superficie fija. En este caso, la deformación de corte ( $\gamma$ ) está representada por la tangente del ángulo  $\alpha$ . Cuando las deformaciones son pequeñas, se puede considerar que  $\tan \alpha \approx \alpha$ . En este tipo de deformación, sucede que las partículas de un plano se desplazan en el sentido opuesto a las del plano subyacente. El módulo de corte o módulo de rigidez ( $G$ ) se define según:

$$G = \frac{\tau}{\gamma} = \frac{F / A_0}{\tan \alpha} \quad \text{III-27}$$

Cuando las deformaciones son pequeñas,  $\tan \alpha \approx \alpha$  y  $G$  se puede calcular también como:

$$G \approx \frac{F}{A_0 \alpha} \quad \text{III-28}$$

Los sólidos ideales recuperan completamente su forma una vez que cesa el estrés que actúa sobre ellos. En la práctica, la linealidad entre tensión y deformación se mantiene hasta que se alcanza el límite elástico del material. Una vez superado, las tensiones aplicadas producen deformaciones permanentes y el material no recupera su forma original luego de que la fuerza deja de actuar.

## Líquidos ideales

Cuando se trata de líquidos ideales, o newtonianos, el flujo de corte se puede representar mediante un modelo hipotético de capas<sup>88</sup>. En el modelo se representan distintas capas de fluidos que se deslizan una con respecto a la otra como resultado de la aplicación de una tensión de corte (Figura III-5). De acuerdo a esto, el caso más simple se encuentra cuando la velocidad con que se mueve cada capa del fluido se incrementa de forma lineal con respecto a la capa que está inmediatamente por debajo. Así, la capa que se encuentra al doble de la distancia de cualquier capa estacionaria se mueve al doble de velocidad. El gradiente de velocidad que se forma con dirección perpendicular al flujo se denomina velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) y la fuerza por unidad de área producida por el flujo es el esfuerzo ( $\tau$ ).

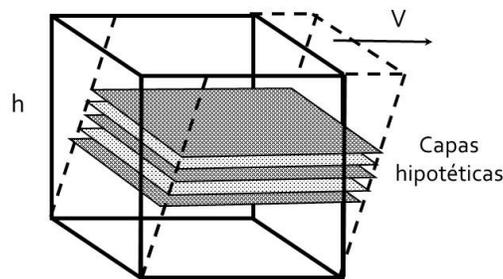


Figura III-5: Modelo hipotético de capas en flujo de corte para un líquido newtoniano.

De acuerdo con lo anterior, la viscosidad ( $\eta$ ) se define como:

$$\eta = \frac{\tau}{d\gamma / dt} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{III-29}$$

A diferencia de los materiales sólidos, los líquidos son incapaces de recuperar su forma original luego de aplicada la tensión de corte. La energía utilizada para deformar la muestra se pierde en forma de calor. Cuando se trata de líquidos no ideales, la relación lineal entre tensión y velocidad de deformación se pierde.

### *Materiales viscoelásticos*

La gran mayoría de los compuestos formados por polímeros presentan un comportamiento mixto entre un material sólido y un líquido. De esta forma combinan las propiedades elásticas propias de los materiales sólidos y la viscosidad de los líquidos. Así, el estrés aplicado será proporcional tanto a la deformación como a la velocidad en que ésta se produce.

Los sistemas viscoelásticos en los que predominan las características de un sólido, ante la aplicación de un estrés constante, no mantienen una deformación constante. Esta característica se debe a que el material continúa deformándose luego de que el estrés deja de ser aplicado, fenómeno que se denomina deslizamiento. En cambio, aquellos materiales con predominante característica líquida almacenan parte de la energía aplicada que luego utilizan para recuperar parcialmente su forma luego de la deformación inducida por el estrés.

#### III.3.1 Reología

Las propiedades viscoelásticas de los materiales se estudian mediante la técnica Reología. Esta técnica consiste en aplicar una deformación sinusoidal a una muestra y medir la respuesta mecánica en función de la frecuencia a la que oscila la fuerza de estrés.

Cuando se aplica una onda de deformación sinusoidal a un sólido ideal, el estrés máximo se alcanza cuando se aplica la máxima deformación. En este caso, la onda de estrés está en la misma fase que la onda de deformación. En cambio, un líquido ideal sometido a una deformación sinusoidal, mostrará un desfase de 90 grados entre la onda de estrés y la de deformación. Cuando el material tiene características tanto líquidas como sólidas, el ángulo de desfase entre el estrés y la deformación estará comprendido entre 0 y 90 grados. El valor dependerá de la prevalencia de una u otra característica viscoelástica.

Como el método de medición es dinámico, algunos sistemas responden de manera diferente de acuerdo con la frecuencia de oscilación. Las altas frecuencias pueden hacer que un sistema tipo gel se comporte como un sólido elástico, por lo que la recuperación será completa luego de que se elimina la tensión aplicada. Por el contrario, a baja frecuencia de oscilación, las muestras reaccionan como un material viscoso. La deformación entonces es irreversible cuando se aplica la tensión. Las frecuencias intermedias exponen características de ambos tipos de comportamientos. En definitiva, lo mencionado anteriormente indica que todos los materiales se pueden comportar como líquidos o sólidos, de acuerdo al tiempo en que ocurre la deformación. A tiempos mayores, los sólidos amorfos fluyen como líquidos cuando son sometidos al estrés. A tiempo muy cortos, por el contrario, los líquidos se comportan como lo hace un material sólido.

La Figura III-6 esquematiza el principio de oscilación sinusoidal con amplitud  $\gamma^0$  y frecuencia oscilatoria  $\omega$  que se aplica sobre una muestra. Durante el ensayo, la deformación sinusoidal aplicada puede expresarse como<sup>88</sup>:

$$\gamma(t) = \gamma^0 \text{sen}(\omega t) \quad \text{III-30}$$

Entonces, la velocidad a la que se produce la deformación de corte es:

$$\dot{\gamma}(t) = \gamma^0 \omega \text{cos}(\omega t) = \dot{\gamma}^0 \text{cos}(\omega t) \quad \text{III-31}$$

donde  $\gamma(t)$  y  $\dot{\gamma}(t)$  corresponden respectivamente a los valores instantáneos de la deformación y la velocidad de deformación de corte.

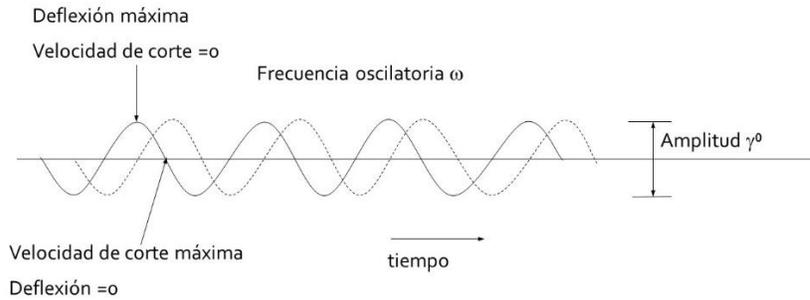


Figura III-6: Principio de oscilación sinusoidal de frecuencia oscilatoria  $\omega$  y amplitud  $\gamma^0$ .

En el caso de que el material ensayado sea perfectamente elástico, la onda de esfuerzo resultante estará puntualmente en fase con la onda de deformación. En caso contrario, un sistema puramente viscoso estará 90 grados desfasada con respecto a la deformación impuesta por la fuerza externa. Como estos son casos extremos para materiales ideales, generalmente la onda de esfuerzo tendrá una diferencia de fase  $\delta$ , comprendida entre  $0^\circ$  y  $90^\circ$ . El valor que tome el ángulo, o usualmente su tangente, es una medida de la relación viscosidad / elasticidad para un determinado material, a una frecuencia de oscilación  $\omega$ . La respuesta tiene entonces dos componentes, y se representa comúnmente utilizando la deformación compleja  $G^*$ :

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + jG''(\omega) \quad \text{III-32}$$

donde  $\omega$  denota la frecuencia angular de la onda experimental,  $j$  es la unidad imaginaria, producto de la raíz cuadrada de  $-1$ ,  $G'$  es el componente real y refleja la naturaleza elástica de la respuesta, y  $G''$  es el componente imaginario que representa la naturaleza viscosa. Ambas componentes están relacionadas por la tangente del ángulo  $\delta$  y su valor muestra la proporción entre ambos componentes:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{III-33}$$

También puede decirse que  $G'$  representa la energía almacenada durante la deformación y por eso se lo conoce como módulo de almacenamiento. Si la energía mecánica aplicada no es almacenada elásticamente, se pierde como calor a través de la

fricción molecular. Esto es como una disipación viscosa dentro del material, y por ello  $G''$  se conoce como módulo de pérdida. El módulo de almacenamiento de corte  $G'$  (en fase) y el módulo de pérdida de corte  $G''$  (fuera de fase) se definen de la siguiente manera:

$$G^* = \frac{\tau^*}{\gamma^0} = \sqrt{(G'^2 + G''^2)} \quad \text{III-34}$$

Esta teoría se cumple únicamente en el caso que las deformaciones producidas sean relativamente pequeñas, de modo que no se supere el límite elástico que producen deformaciones que alterarían permanentemente la estructura del material. Para esto, se debe utilizar un reómetro, instrumento diseñado para obtener muy alta resolución, para el control de pequeñas deformaciones y elevada sensibilidad para detectar pequeñas variaciones en la detección del esfuerzo.

En el reómetro se utilizan normalmente dos tipos de herramientas o geometrías para el estudio de materiales viscoelásticos. En la Figura III-7 se muestra un esquema de un arreglo experimental donde se coloca la muestra entre dos placas paralelas (A) y entre un cono móvil y una placa paralela (B). En el primer caso, para sólidos viscoelásticos la deformación máxima de corte se calcula como  $r\theta/h$ , mientras que para líquidos viscoelásticos la velocidad de deformación es  $\dot{\gamma} = \omega/\beta$ .

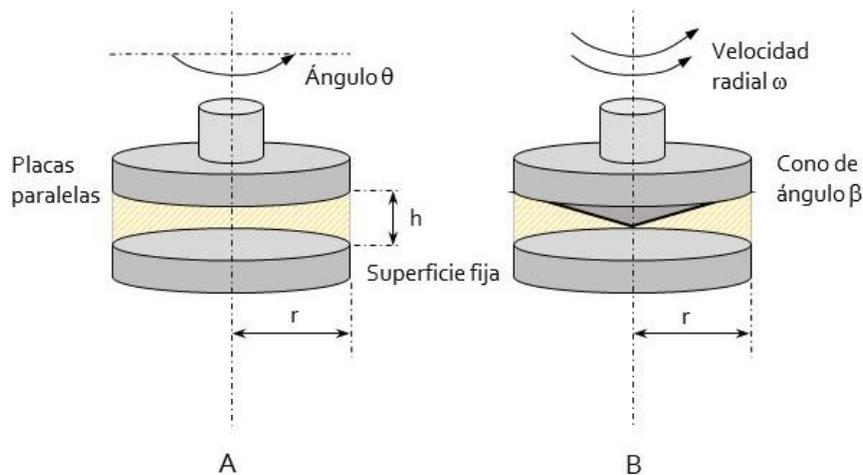


Figura III-7: Herramientas utilizadas para el estudio de tensión-deformación de corte: placas paralelas para sólidos viscoelásticos (A), plato-cono para líquidos viscoelásticos (B).

### III.4 Hinchamiento

El hinchamiento es un efecto que se produce cuando las redes poliméricas absorben e incorporan en su estructura al solvente con el que se encuentran en contacto. Durante el proceso, las cadenas de la red se desenrollan y estiran de acuerdo a cuán favorable sea la interacción entre el polímero y el solvente. Como contraparte, existe una fuerza retráctil opuesta al hinchamiento que actúa ejerciendo una presión desde las cadenas de la red hacia el solvente incorporado. La magnitud de las fuerzas de atracción y repulsión dependen de la polaridad de los segmentos poliméricos y de sus características químicas. Si las interacciones polímero-solvente están más favorecidas respecto de las fuerzas atractivas polímero-polímero, las cadenas comienzan a absorber moléculas de solvente, se despliegan de su forma enredada y el polímero se hincha aumentando su volumen. Si las interacciones entre cadenas de polímeros son muy débiles, este proceso puede evolucionar hacia una solución.

En el caso de materiales cristalinos, entrecruzados o aquellos que presentan interacciones puente hidrógeno en los que las interacciones polímero – polímero son lo suficientemente fuertes, el proceso de solvatación avanza hasta un determinado punto y se detiene. Esto se debe a que a medida que la red se hincha, aumentan las fuerzas retráctiles de las cadenas enlazadas. En el estado de equilibrio, existe un balance de fuerzas atractivas y repulsivas. En este momento, se habrá incorporado al polímero una cantidad de solvente que determinará el aumento de volumen, dando como resultado un gel hinchado<sup>117</sup>.

El cambio de volumen de una red polimérica, depende termodinámicamente de la energía libre total y por lo tanto, el hinchamiento estará favorecido cuando  $\Delta G_{total} < 0$ . En hidrogeles neutros, la energía libre total está compuesta por la energía libre de mezcla ( $\Delta G_{mix}$ ) y la energía libre de elasticidad ( $\Delta G_{elast}$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{mix} + \Delta G_{elast}$$

III-35

Durante el proceso de hinchamiento,  $\Delta G_{mix}$  aumenta y generalmente tiene signo negativo debido al incremento en la entropía en la mezcla del solvente con el polímero.  $\Delta G_{mix}$  se puede descomponer en una contribución entálpica ( $\Delta H_{mix}$ ) y en una entrópica ( $\Delta S_{mix}$ ) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S_{mix} \quad \text{III-36}$$

$\Delta H_{mix}$  se relaciona con el cambio de energía que se produce en las interacciones entre las moléculas de polímero-solvente con respecto a las interacciones polímero-polímero y solvente-solvente.  $\Delta S_{mix}$  es proporcional a la fracción molar de solvente en la red y se incrementa con el ingreso de éste en la estructura del polímero.

$\Delta G_{elast}$  refleja la resistencia de la estructura al hinchamiento y tiene un valor mayor a cero ya que la entropía disminuye cuando se estiran las cadenas de polímero y se produce tensión en los puntos de anclaje. La relación entre la energía libre de elasticidad y la entropía de elasticidad ( $\Delta S_{elast}$ ) está dada por:

$$\Delta G_{elast} = -T\Delta S_{elast} \quad \text{III-37}$$

En los hidrogeles iónicos, la red polimérica contiene grupos funcionales que pueden ser de tipo aniónicos o catiónicos. Los grupos funcionales de los hidrogeles aniónicos no están ionizados por debajo del  $pK_a$  y el hinchamiento depende de la compatibilidad termodinámica entre el polímero y el agente de hinchamiento. A valores de pH por arriba del  $pK_a$ , los grupos funcionales están ionizados y el hinchamiento se produce como consecuencia de la fuerza osmótica que generan las cargas fijas del polímero. En cambio, los grupos funcionales de los geles catiónicos no están ionizados por encima del  $pK_b$ , pero adquieren carga por debajo del mismo<sup>118</sup>.

El hinchamiento que sufren los hidrogeles iónicos depende también del grado de ionización de la red polimérica, el equilibrio de ionización entre el gel y el solvente, y el tipo de contraíón presente en el medio. Los modelos que buscan explicar el

hinchamiento de geles iónicos introducen el término de energía libre iónica ( $\Delta G_{ión}$ ) en la ecuación de energía libre total del sistema:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{mix} + \Delta G_{elast} + \Delta G_{ión} \quad \text{III-38}$$

### III.5 Transporte de solutos a través de la matriz polimérica

La permeabilidad que presenta una matriz proteica a distintas sustancias, es una característica que depende simultáneamente de la difusión dentro del polímero y de las limitaciones a la transferencia de masa. Éste, es un parámetro importante cuando se quiere comprender el mecanismo de transporte de un soluto de interés en el interior de la matriz. La difusión de solutos a través de un hidrogel puede describirse a través de la teoría de difusión de Fick. Para el caso de difusión en una dimensión, la Ley de Fick puede expresarse de la siguiente forma<sup>113</sup>:

$$J_i = -D \frac{dC_i}{dX} \quad \text{III-39}$$

donde  $J_i$  es el flujo molar del soluto por unidad de área ( $\text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ),  $C_i$  es la concentración del soluto, y  $D$  es el coeficiente de difusión del soluto en el hidrogel.

La difusión es un proceso complejo, donde las velocidades de difusión son intermedias entre las de materiales sólidos y líquidos. Éstas dependen en gran medida de los gradientes de concentración y del grado de hinchamiento de la matriz. La difusión del solvente está asociada a las propiedades físicas de la red del polímero y la interacción entre el polímero y el solvente. Cuando se trata de un proceso de difusión en estado estacionario, en el que el tanto el flujo molar como el coeficiente de difusión son constantes y las concentraciones dentro y fuera del polímero están relacionadas por una constante, la integración de la ecuación III-39 resulta:

$$J_i = K_d \frac{D\Delta C_i}{d} = P\Delta C_i \quad \text{III-40}$$

donde  $d$  es el espesor del hidrogel,  $K_d$  es el coeficiente de partición y  $P$  es el coeficiente de permeabilidad. La permeabilidad es directamente proporcional al  $K_d$  y a la difusión del soluto pero inversamente proporcional al espesor del hidrogel. El  $K_d$  está definido como el cociente entre la concentración de soluto en el hidrogel y la concentración del soluto en la solución, después de haber alcanzado el equilibrio<sup>39</sup>:

$$K_d = \frac{[\text{solute}]_{\text{matriz}}}{[\text{solute}]_{\text{solución}}} \quad \text{III-41}$$

El transporte a través de matrices poliméricas, en especial en aquellas que no tienen una estructura definida con un marcado comportamiento viscoso, como las compuestas por mucina, es un proceso complejo y depende de muchos factores. Entre ellos se puede mencionar la concentración del componente glicoproteico, el tamaño y la carga eléctrica de las especies que difunden, la densidad de entrecruzamiento y el efecto de barrera causado por las interacciones físicas entre las cadenas macromoleculares. Por ello, en estos sistemas resulta más conveniente realizar determinaciones experimentales utilizando directamente el analito que se desea investigar. En este caso, se utilizó un método experimental desarrollado por Peppas, que permite determinar el transporte de solutos en geles y mucus<sup>41</sup>.

Cuando el transporte de un soluto a través de una matriz polimérica es constante en el tiempo, el coeficiente de difusión se puede determinar a través del análisis de estado estacionario. Para esto, el soporte polimérico se coloca en un espacio de dimensiones conocidas, diseñado de tal forma que se interpone entre dos cámaras que contienen soluciones con agitación del soluto al que se desea medir el coeficiente de difusión. Cada una de las cámaras posee soluto en concentraciones  $c_1$  y  $c_2$ . El analito difunde desde la cámara que lo contiene en mayor concentración, llamada celda donora, hacia la celda receptora. Después de un determinado tiempo, se alcanza un

estado estacionario en el cual la variación de la concentración del soluto en el tiempo en la celda receptora se torna constante<sup>41</sup>.

Se asume que la resistencia de la transferencia de masa desde el seno de la solución a la superficie del polímero es despreciable, y el proceso de difusión dentro de la matriz polimérica está regido por<sup>113</sup>:

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2} \quad \text{III-42}$$

donde  $c$  es la concentración del soluto dentro del hidrogel,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $t$  es el tiempo y  $x$  es la distancia de acuerdo a las condiciones de contorno:

$$c = c_1 \text{ cuando } x = 0 \text{ y } c = c_2 \text{ cuando } x = l \quad \text{III-43}$$

En el estado estacionario, la ecuación III-42 se expresa de la siguiente manera:

$$0 = D \frac{d^2c}{dx^2} \quad \text{III-44}$$

No resulta sencillo obtener una expresión para el perfil de concentración y para el flujo. Integrando dos veces la ecuación III-44, se llega a la siguiente ecuación:

$$c = a + bx \quad \text{III-45}$$

Las constantes  $a$  y  $b$  se obtienen a partir de las condiciones de contorno expresadas en III-43, obteniéndose el perfil de concentración en el estado estacionario:

$$c = c_1 + (c_2 - c_1) \frac{x}{l} \quad \text{III-46}$$

Derivando la ecuación anterior, se obtiene el flujo en el estado estacionario:

$$J_i = -D \frac{dc}{dx} = D \frac{c_1 - c_2}{l} \quad \text{III-47}$$

## CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

### IV.1 Preparación de soluciones y materiales

Todas las soluciones utilizadas en este trabajo fueron preparadas con agua ultra pura obtenida de un sistema Milli-Q Millipore, con una resistividad de 18,2 M $\Omega$ .cm.

#### *Soluciones buffer*

La *solución amortiguadora concentrada (10:1) de fosfato* tiene concentración 1,0 M y se prepara pesando la masa necesaria de fosfato diácido de potasio (Merck, Alemania) y fosfato monoácido de potasio (Merck, Alemania) de forma tal que, al disolverlas en agua ultra pura, se obtenga una solución 0,5 M de estas dos especies de fosfato. Mediante el agregado de pequeñas cantidades de una solución concentrada de KOH (Merck, Alemania) o de HCl (Baker, Estados Unidos) se ajusta a pH = 7,0. La solución *amortiguadora madre de fosfato* se conserva a 4 °C.

La *solución amortiguadora de fosfato para el uso diario* se denomina Buffer Fosfato y se prepara diluyendo diez veces la solución madre de fosfato en agua ultra pura. El Buffer Fosfato tiene concentración analítica de 0,1 M y se prepara al momento de ser utilizada.

La *solución amortiguadora concentrada (20:1) Britton Robinson (BR)* se prepara disolviendo fosfato diácido de potasio (Merck, Alemania), ácido bórico (Sigma-Aldrich, Argentina) y ácido acético (Sigma-Aldrich, Argentina) en agua ultra pura. Se pesa la masa de fosfato monoácido y ácido bórico y se mide el volumen necesario de ácido acético para obtener una solución 1 M de cada componente. La solución se conserva a 4 °C.

La *solución amortiguadora 1:1 de Britton-Robinson para el uso diario* se denomina Buffer Britton Robinson (BBR) y se prepara diluyendo veinte veces la solución madre de BR en agua ultra pura, obteniendo de este modo una concentración 0,05 M de cada componente. Esta solución de BBR se prepara al momento de ser utilizada y el pH se ajusta mediante el agregado de soluciones concentradas de KOH o HCl.

### *Soluciones enzimáticas*

*Solución de glucosa oxidasa (GOX):* se agregan 500 µl de Buffer Fosfato en un recipiente conteniendo 2000 U de GOX (147900 U/g) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Se mezcla la solución para disolver la enzima teniendo especial cuidado en evitar la formación de espuma. Posteriormente se toma una alícuota de 400 µl de la solución concentrada de GOX y se realiza una dilución 1:4 en un vial de 1,5 ml. Finalmente se dividen las dos soluciones de GOX resultantes en fracciones de 20 µl colocando en viales estériles de 200 µl. De este modo se obtienen alícuotas de GOX de 20 µl con 80 U y 20 U. Estas alícuotas se conservan a -20 °C hasta el momento de su uso. Cuando se usa la enzima se la descongela de forma rápida.

*Solución de lacasa (LAC):* se agregan 200 µl de BBR, pH = 5, en un recipiente conteniendo 6400 U de LAC M120 (116000 U/g) (Amano Enzymes, Japón). Se mezcla cuidadosamente para disolver la enzima evitando que se forme espuma. Luego se toman alícuotas de esta solución concentrada de LAC para realizar diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 en viales de 200 µl y 1,5 ml. Las soluciones resultantes se dividen en fracciones de 20 µl colocando las alícuotas en viales estériles de 200 µl. De esta forma se prepararon alícuotas de LAC con 80U, 160 U, 320 U y 640 U. Estas alícuotas se conservan a -20 °C hasta el momento de su uso. En el momento de usar la enzima se la descongela de forma rápida.

### *Soluciones estándares de analito*

*Solución de glucosa:* se prepara diluyendo glucosa sólida (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) con agua ultra pura en un matraz de 10 ml para obtener una solución de concentración analítica 1 M. Esta solución se conserva a 4 °C. Las *soluciones estándar* de glucosa se preparan por dilución 1:10 y 1:100 de la solución madre en agua ultra pura. De esta forma se obtienen soluciones de concentración analítica 0,1 M y 0,01 M. Estas diluciones se preparan diariamente.

*Solución de catecol:* se prepara diluyendo catecol sólido (Sigma-Aldrich, Argentina) con agua ultra pura en un matraz de 10 ml para obtener una solución de concentración analítica 0,1 M. Esta solución se conserva a 4 °C. Las *soluciones estándar* de catecol se

preparan por dilución 1/10 y 1/100 de la solución madre en agua ultra pura para obtener soluciones de concentración analítica 0,01 M y 0,001 M. Cada una de estas se prepara diariamente.

#### *Solución de entrecruzante*

*Solución de glutaraldehído:* Se obtiene diluyendo la solución comercial de glutaraldehído (Merck, Alemania) (25% v/v) con agua ultra pura en un vial de 1,5 ml. Se preparan soluciones de 1%; 3%; 5%; 7%; 10%, 12,5% y 15%. Las soluciones no son estables, y se preparan en el momento de ser utilizadas.

#### *Preparación de los polímeros*

La mucina de estómago porcino (Sigma-Aldrich, Argentina) se presenta comercialmente en estado sólido en forma de escamas secas deshidratadas. Para su uso, se pesan 10 g en un vaso de precipitado y se muele utilizando un mortero de ágata. El polvo que se obtiene se conserva a 4°C en un recipiente hermético hasta su uso.

La albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, Argentina) se presenta comercialmente en estado sólido deshidratado en forma de granos macroscópicos. Antes de su uso, se pesan 10 g en un vaso de precipitado y se muele en un mortero de ágata. El polvo obtenido se almacena en un recipiente hermético a 4°C.

## IV.2 Preparación de electrodos enzimáticos y diseño experimental

Los electrodos sensores elaborados en este trabajo se caracterizan por el uso de un par de membranas permeoselectivas entre las cuales se coloca la matriz enzimática, que está compuesta por polímeros en donde se inmoviliza la enzima. Este arreglo se conoce como membrana enzimática o "sándwich" y es el elemento biosensor propiamente dicho. Mediante el uso de un capuchón plástico y un aro de goma ("o-ring") se sostiene firmemente el sándwich sobre la superficie del electrodo, que actúa como elemento transductor. En la Figura IV-1 se muestra en detalle los componentes del biosensor.

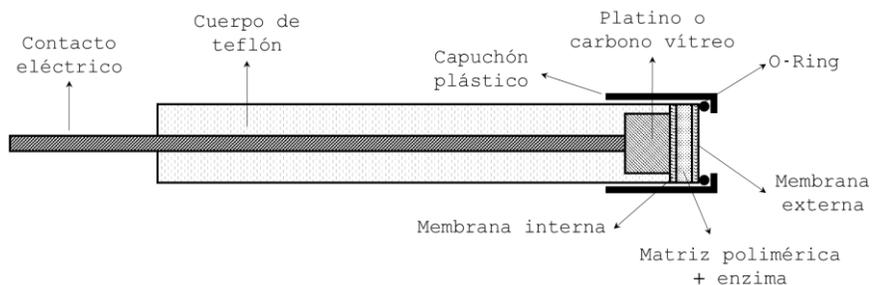


Figura IV-1: Esquema del electrodo biosensor.

En la Figura IV-2 se muestra un esquema donde se detallan los componentes de la celda de trabajo. En un recipiente de vidrio (beacker 10 ml) se colocan 4 ml de solución buffer, el electrodo biosensor, denominado electrodo de trabajo o *work* (simbolizado por la letra "W") y dos electrodos adicionales: el electrodo de referencia ("R") y el contra electrodo ("C"). Éstos, se utilizan para mantener una diferencia de potencial constante entre los electrodos W y R, y para medir la corriente que circula entre los electrodos W y C. Para la determinación de glucosa, cuando se utiliza el electrodo de GOX, se aplica un potencial constante de 0,65 V al electrodo de trabajo con respecto de un electrodo de referencia de Ag|AgCl|KCl(3 M). En cambio, durante el análisis de fenoles en el que se utiliza el electrodo de LAC, se aplica un potencial de -0,2 V al electrodo de trabajo versus el electrodo de referencia. La corriente generada se registra en intervalos de 0,5 segundos mientras se agita la solución con una barra magnética de 10 mm que gira a 120 rpm durante todo el experimento. Los experimentos se realizan utilizando un potenciostato OMNI 90, controlado desde una PC mediante una interface análogo/digital (National Instruments, Estados Unidos) y un programa desarrollado en lenguaje LabView 8.0.

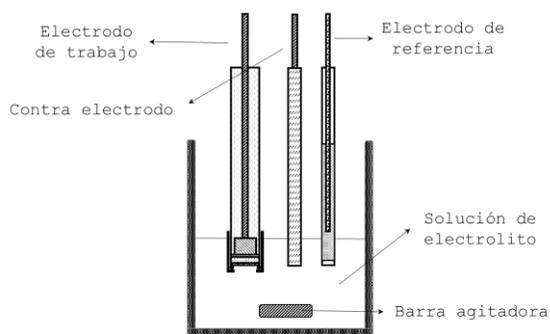


Figura IV-2: Esquema de la celda de reacción y electrodos.

## *Electrodos*

Se utilizaron dos electrodos de trabajo, según el biosensor elaborado. Antes de su uso, se los trató a ambos de la misma manera. La superficie de trabajo se pule durante 10 minutos con el uso de alúmina (grano de  $0,3\ \mu\text{m}$ ), apoyando el electrodo sobre un paño para pulido, adherido a una superficie plana, humedecido con agua ultra pura. Luego, se lava con agua ultra pura y se sumerge en una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico 3:1 durante una hora. Posteriormente se lava nuevamente con abundante agua ultra pura.

Para la construcción del biosensor de GOX se utilizó un electrodo de trabajo de platino (CH Instruments, USA). La superficie activa es un disco de platino de 2 mm de diámetro, y el cuerpo está recubierto de resina epoxi.

En la elaboración del biosensor de LAC, fue utilizado un electrodo de carbono vítreo (CH Instruments, USA), cuya superficie reactiva es un disco de 3 mm de diámetro. El cuerpo está recubierto de resina epoxi.

## *Membranas permeoselectivas*

En la construcción de los biosensores se utilizaron dos tipos de membranas porosas, con similares características, pero de diferentes fabricantes. Ambas membranas se cortan mediante el uso de un sacabocado en discos de 8 mm de diámetro. Antes de su uso se lavan con agua ultra pura y se secan dentro de un recipiente evitando el ingreso de polvo. Se manipulan con el uso de pinzas.

En la elaboración del sensor de GOX se utilizaron membranas de policarbonato Isopore – Millipore presentada en discos de 47 mm de diámetro, con un espesor de  $7\ \mu\text{m}$  a  $22\ \mu\text{m}$  y un tamaño de poro de  $0,05\ \mu\text{m}$ .

Para el biosensor de LAC fueron utilizadas membranas de policarbonato Nucleopore – Whatman, en discos de 47 mm de diámetro, con un espesor de  $7\ \mu\text{m}$  a  $20\ \mu\text{m}$  y un tamaño de poro de  $0,05\ \mu\text{m}$ .

#### IV.2.1 Matriz enzimática de Glucosa

Los biosensores de glucosa se prepararon utilizando como soporte mucina y albúmina. La matriz se prepara pesando en balanza analítica 6,00 mg totales de polímero que se disuelve en 40 µl de solución estándar de fosfato. Se mezcló manualmente con el uso de un tip durante 5 minutos. Se trabajó con diferentes relaciones porcentuales en peso de mucina y albúmina (100%/0%, 70%/30%, 50%/50%, 30%/70% y 0%/100%). Estas composiciones se nombraron muc 100, muc/alb 70/30, muc/alb 50/50, muc/alb 30/70 y alb 100, respectivamente.

La *matriz enzimática* se prepara agregando 20 µl de solución de glucosa oxidasa a 40 µl de matriz hidratada y mezclando cuidadosamente durante 2 minutos. Esta mezcla se prepara al momento de ser utilizada y se conserva hasta 96 h a 4 °C.

#### IV.2.2 Matriz enzimática de lacasa

Los sensores que utilizan lacasa como elemento de bioreconocimiento se preparan utilizando una matriz proteica de mucina y quitosán. En una balanza analítica se pesa 6,90 mg totales de polímero que se disuelven en 80 µl de solución BBR pH = 5 y se mezcla con el uso de un tip durante 5 minutos. Para la elaboración de los sensores se utilizaron diferentes relaciones porcentuales en peso de mucina y quitosán (100%/0%, 70%/30%, 50%/50%, 30%/70% y 0%/100%). Estas composiciones se nombraron muc 100, muc/quit 70/30, muc/quit 50/50, muc/quit 30/70 y quit 100, respectivamente.

Para la preparación de la *matriz enzimática* se toman 40 µl de la matriz hidratada y se mezclan cuidadosamente durante 2 minutos con 20 µl de solución de lacasa. Esta mezcla se prepara al momento de ser utilizada y se conserva hasta 96 h a 4 °C.

#### IV.2.3 Preparación de los electrodos enzimáticos

Se utiliza el mismo procedimiento para la elaboración de los sensores enzimáticos de GOX y LAC. En el caso de GOX se utiliza la solución buffer fosfato pH = 7, mientras que para LAC se usa BBR pH = 5. El proceso se esquematiza en la Figura IV-3. En un primer paso,

se coloca 1  $\mu\text{l}$  de solución estándar sobre la superficie del electrodo para humedecerla y facilitar la adhesión del sándwich. Luego se coloca un disco de 8 mm de membrana de policarbonato e inmediatamente por encima 4  $\mu\text{l}$  de matriz enzimática. El entrecruzamiento entre los polímeros y la enzima se logra agregando 3  $\mu\text{l}$  de solución de glutaraldehído sobre la gota de matriz enzimática, y de inmediato se mezcla cuidadosamente durante 2 minutos. Se agrega luego la segunda membrana de policarbonato para formar el sándwich. Se coloca el o-ring sobre la segunda membrana y se tapa con el capuchón plástico, presionando firmemente para lograr un sellado adecuado entre el sándwich y el electrodo de trabajo. A los 5 minutos del agregado del entrecruzante, se lava el sensor sumergiendo el electrodo en solución buffer 1:1, de fosfato o Britton-Robinson, para remover el excedente de glutaraldehído que no reaccionó. Luego, el biosensor se mantiene 5 minutos más en la solución de lavado. Una vez realizado este procedimiento, el biosensor se puede utilizar inmediatamente o almacenar para su posterior uso.

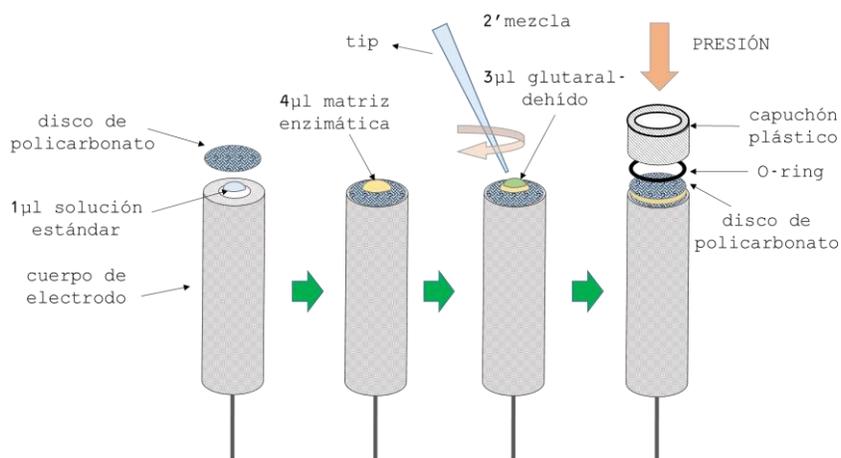


Figura IV-3: Procedimiento para la elaboración del electrodo biosensor.

## IV.3 Determinaciones realizadas por cronoamperometría

### IV.3.1 Curvas de calibración

Las curvas de calibración para los distintos electrodos se realizaron colocando 4 ml de solución de electrolito en la celda de medida y aplicando el potencial correspondiente a cada electrodo durante al menos 2000 segundos. De esta forma, se asegura una corriente de base estable. Luego se realizan agregados de solución estándar de analito de distintas concentraciones, usualmente 4  $\mu$ l en cada agregado, y se registra la corriente generada en el electrodo de trabajo.

### IV.3.2 Efecto del pH

Para estudiar el efecto del pH sobre la respuesta de los sensores, se realizaron curvas de calibración registrando la corriente generada por el agregado de 4  $\mu$ l de solución estándar de analito, cuando en la celda de reacción se emplean 4 ml de solución buffer. El ajuste del pH de las soluciones buffer se lleva a cabo utilizando soluciones concentradas de HCl o KOH, mientras el cambio de pH se registra con un pH-metro Seven Compact de Mettler Toledo.

Primero, se realiza una curva de calibración al pH que se considera como óptimo para la enzima en solución, a partir de datos de bibliografía<sup>67,79</sup>. Luego, se efectúan sucesivas curvas de calibración descendiendo en cada una de ellas 0,5 unidades de pH y este proceso se continúa hasta que la respuesta deja de ser significativa. A continuación, se vuelve a realizar una curva de calibración al valor de pH inicial, y finalmente se efectúa un conjunto de curvas incrementando el valor de pH en 0,5 unidades hasta que nuevamente la respuesta deja de ser significativa.

### IV.3.3 Evaluación de la estabilidad

Para estudiar la estabilidad de los biosensores se analizaron, en función del tiempo de ensamblado, las respuestas electroquímicas obtenidas por el uso intermitente de los

distintos biosensores estudiados. Las curvas de calibración se compararon con aquellas obtenidas en el momento de su elaboración. Luego del uso inicial del sensor, se quitó el capuchón plástico, y con la ayuda de una pinza se retira de la superficie del electrodo el biosensor tipo sándwich. Se evaluaron tres condiciones distintas de almacenamiento. El primero, se almacenó dentro de un vial con 1 ml de solución buffer a 4 °C. El segundo, se guardó en un vial limpio y a 4 °C. El tercero, se guardó dentro de un vial limpio de 1,5 ml a temperatura ambiente.

#### IV.3.4 Medidas en suero sanguíneo y ensayo de recuperación

En este trabajo, también se midieron muestras de suero sanguíneo obtenidas del laboratorio de análisis clínico de un hospital de la Ciudad de Córdoba cuantificando previamente el contenido de glucosa. El suero obtenido se colocó en un tubo heparinizado mantenido en hielo y la medición se realizó inmediatamente después de recibida la muestra.

Para las medidas amperométricas, se utilizó un biosensor de glucosa preparado con 2,7 U de GOX en una matriz muc/alb 30/70, entrecruzado con glutaraldehído al 3% y elaborado 7 meses antes de la medición del suero (almacenado seco a temperatura ambiente, desde su elaboración). Para calibrar apropiadamente el biosensor, se realizó una curva de calibración con la misma solución estándar de glucosa (193 mg/dl de glucosa) que utiliza el laboratorio del hospital. Para esto, se colocan 4 ml de buffer fosfato en la celda de reacción y se deja estabilizar la corriente registrada. Posteriormente se agrega una muestra de suero sanguíneo y se registra la respuesta del biosensor. Inmediatamente después, se agregan 8 µl de solución estándar de glucosa 0,1 M y se registra la respuesta. Se limpia la celda de reacción y se repite el procedimiento con otra muestra de suero.

El porcentaje de recuperación se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$R\% = \frac{Q_A(O + S) - Q_A(O)}{Q_A(S)} \times 100 \quad \text{IV-1}$$

Donde  $R\%$  es el porcentaje de recuperación,  $Q_A(S)$  es la cantidad de analito A agregado,  $Q_A(O)$  es la cantidad de analito que contiene la muestra original, y  $Q_A(O+S)$  es la cantidad de analito de la muestra original más la agregada.

## IV.4 Estudio de las propiedades fisicoquímicas

El procedimiento experimental para determinar las propiedades fisicoquímicas de las matrices poliméricas usadas tanto en el desarrollo de biosensores de GOX como de LAC es el mismo. Con ambas matrices se utiliza BBR 50 mM. En las matrices preparadas con mucina y albúmina, se ajusta el pH a 7, mientras que en el caso de las matrices compuestas de mucina y quitosán, se ajusta el pH a 5.

### IV.4.1 Índice de hinchamiento

El estudio de hinchamiento se realizó para matrices muc 100 (a pH 7 y 5), muc/alb 70/30 (a pH 7), muc/alb 50/50 (a pH 7), muc/alb 30/70 (a pH 7), alb 100 (a pH 7), muc/quit 70/30 (a pH 5), muc/quit 50/50 (a pH 5), muc/quit 30/70 (a pH 5) y quit 100 (a pH 5). En cada caso se pesó una masa total de 11,67 mg de los respectivos polímeros que luego se mezclaron con 200  $\mu$ l de solución BBR hasta obtener una mezcla homogénea. Las matrices se entrecruzaron con 150  $\mu$ l de glutaraldehído 5% en ausencia de enzima. A los 5 minutos de agregar el entrecruzante se incorpora 1 ml de solución BBR y se deja en reposo durante 92 h a temperatura constante, para equilibrar la matriz. Se elimina el sobrenadante y se registra el peso de la matriz hinchada. Se agrega solución estándar nuevamente y se deja en reposo 24 horas. Se quita el sobrenadante y se registra el peso. Cuando se encuentra que la diferencia entre ambas pesadas es menor al 1%, se puede considerar que la matriz se encuentra en equilibrio con el solvente y la última masa registrada se denomina "peso hinchado" ( $P_h$ ). Posteriormente, se quita la tapa de cada uno de los viales y se colocan las muestras en una estufa a 30 °C durante 24 horas. Se mide la masa de las matrices para obtener el "peso seco" ( $P_s$ ) de cada una de ellas. El índice de hinchamiento ( $H_P$ ) se calcula de acuerdo a la ecuación IV-2:

$$H_p = \frac{P_h - P_s}{P_s} \times 100 \quad \text{IV-2}$$

#### IV.4.2 Coeficiente de partición

Las medidas del coeficiente de partición ( $K_d$ ) se realizan para los sistemas evaluados para el índice de hinchamiento y se efectúa el mismo procedimiento hasta llegar a matrices en equilibrio con el solvente. En ambos casos, se adicionan 800  $\mu\text{l}$  de catecol 1 mM, preparado en solución BBR, al pH correspondiente a cada matriz. Se deja en reposo durante 72 horas para que el analito se equilibre con la matriz. Luego, se toma una alícuota de sobrenadante y se mide la concentración de catecol mediante espectrofotometría UV visible. El coeficiente de partición se calcula utilizando la ecuación IV-3, en la que  $c_m$  y  $c_s$  corresponden respectivamente, a la concentración de catecol en la matriz y en el sobrenadante,  $V_m$  y  $V_s$  indican el volumen de la matriz y del sobrenadante, y  $c_o$  y  $c_e$  son las concentraciones iniciales y en equilibrio del analito en el sobrenadante.

$$K_d = \frac{c_m}{c_s} = \frac{V_s(c_o - c_e)}{V_m c_o} \quad \text{IV-3}$$

#### IV.4.3 Coeficiente de difusión

Para medir el coeficiente de difusión ( $D$ ) de un analito a través de las matrices utilizadas en el desarrollo de los biosensores, se utilizó una celda de difusión modificada de Falk et al.<sup>119</sup>, Figura IV-4. El sistema consta de una celda donora hecha de teflón, una cubeta espectrofotométrica de cuarzo que funciona como celda aceptora y distintos discos de teflón que aseguran la difusión del analito entre una y otra celda. Se utilizó el catecol como analito difusor.

Las mediciones de difusión se realizaron en las matrices mencionadas en el punto IV.4.1. En cada caso se pesó una masa total de 11,67 mg de los respectivos polímeros que luego se mezclaron con 200  $\mu\text{l}$  de solución BBR hasta obtener una mezcla homogénea. Las matrices se entrecruzaron con 150  $\mu\text{l}$  de glutaraldehído 5% en ausencia de enzima.

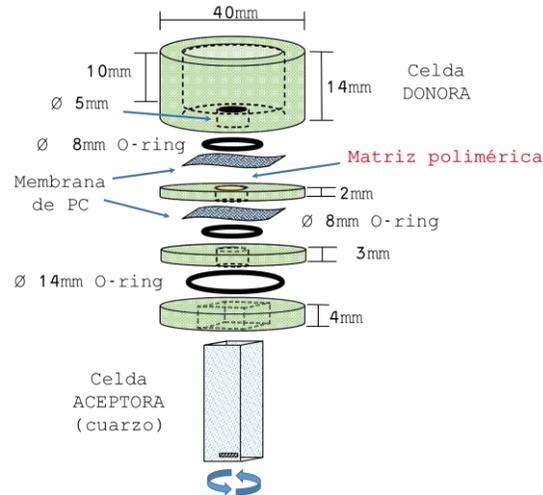


Figura IV-4: Esquema de la celda de difusión utilizada.

Para armar el sistema, se ubica la celda donora invertida sobre una superficie plana y se pone un *o-ring* de 8 mm. Sobre éste se coloca una membrana permeoselectiva de policarbonato y se agrega el disco de teflón de 2 mm. Se humedece la membrana con 4  $\mu$ l de buffer, y posteriormente se llena el espacio con matriz polimérica previamente hidratada y entrecruzada. Luego, se coloca la segunda membrana de policarbonato, y los discos de teflón de 3 mm y 4 mm, con sus respectivos *o-rings*. Finalmente, se ajustan los tornillos de fijación, de modo que se desplaza el excedente de matriz enzimática entre las membranas. Una vez transcurridos 5 minutos desde el agregado del entrecruzante, se sumerge el sistema en solución BBR y se lava durante 10 minutos para quitar el exceso de glutaraldehído de la matriz. Se coloca un buzo magnético dentro de la cubeta espectrofotométrica y se llena con solución BBR, con el pH correspondiente al tipo de matriz que se utiliza. Luego, se coloca la celda preparada anteriormente sobre la cubeta, cuidando de que no queden burbujas de aire que afecten la difusión. El sistema se ubica en el porta muestra del espectrofotómetro y se agrega un agitador adaptado a las medidas del equipo. La celda donora se carga con una solución de catecol 0,1 M preparada en BBR, respetando el pH correspondiente a cada matriz polimérica. El espectrofotómetro se programa para que realice un espectro de absorbancia desde 250 nm a 320 nm cada 300 segundos, durante 8 horas.

Para poder relacionar los datos obtenidos de absorbancia en función del tiempo con la concentración del analito en la celda aceptora, se construyeron curvas de calibración para cada pH de trabajo. Para ello, se colocaron 3 ml de solución BBR en la cubeta espectrofotométrica y se realizaron agregados de solución estándar de catecol 0,01 M. La absorbancia resultante se midió en el mismo intervalo de longitudes de onda que durante el experimento de difusión.

El coeficiente de difusión se calcula a partir de la siguiente ecuación<sup>113</sup>:

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln \left( \frac{C_1(t) - C_2(t)}{C_1^0 - C_2^0} \right) \quad \text{IV-4}$$

Donde  $c_1(t)$  y  $c_2(t)$  son las concentraciones de catecol en función del tiempo en las celda donora y receptora respectivamente,  $c_1^0$  y  $c_2^0$  son las concentraciones iniciales en estas celdas y  $\beta$  es un parámetro físico que depende del diseño de la celda, que se calcula con la siguiente expresión:

$$\beta = \left( \frac{A_H}{W_H} \right) \left( \frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right) \quad \text{IV-5}$$

Donde  $A_H$  y  $W_H$  corresponden al área y al ancho de la matriz expuesta respectivamente,  $V_1$  es el volumen de la celda donora y  $V_2$  el de la cuba espectrofotométrica.

#### IV.4.4 Permeabilidad

La permeabilidad ( $P$ ) de las matrices al catecol se calcula a partir de los datos obtenidos en los estudios del coeficiente de partición y del coeficiente de difusión. Para ello se utiliza la siguiente ecuación:

$$P = \frac{DK_d}{W_H} \quad \text{IV-6}$$

#### IV.4.5 Reología

El estudio de las propiedades mecánicas de las matrices se llevó a cabo sobre las matrices mencionadas en el punto IV.4.1. Para esto, se pesó una masa total de 100 mg de cada mezcla de polímeros con 1 ml de solución BBR. En cada caso se toman cuatro alícuotas de 200  $\mu$ l de matriz y se agrega 150  $\mu$ l de glutaraldehído, antes de colocarlas en el reómetro. Las concentraciones de entrecruzante evaluadas fueron 0%, 1%, 5% y 10%. El experimento se realiza con un equipo Rheoplus Physica MCR 301 (Anton Paar) que registra el módulo elástico  $G'$ , el módulo viscoso  $G''$  y la fuerza normal  $N$ , utilizando para esto una geometría de placas paralelas de 25 mm de diámetro (PP25). El estudio de la dinámica del entrecruzamiento de las matrices se lleva a cabo a temperatura constante, y se evalúa el progreso de la reacción en el tiempo. Las mediciones se llevan a cabo en la región lineal viscoelástica de las matrices. Se utiliza una amplitud que garantice que la deformación sea despreciable con respecto al tiempo característico de síntesis del hidrogel. Todas las condiciones experimentales intentan asegurar que el análisis reológico no interfiera en la formación de la red. La frecuencia en la oscilación se define realizando un barrido previo, y eligiendo un valor donde los módulos elástico y viscoso no varíen frente a la frecuencia. Las medidas se realizan a razón de una por minuto durante 30 minutos, aplicando una perturbación sinusoidal, con una frecuencia de 1 Hz y una deformación máxima de 1,0°. Los 350  $\mu$ l de muestra se colocan en el plato del reómetro, se hace descender la placa superior hasta alcanzar una separación de 0,500 mm y finalmente se limpia el excedente de matriz que desborda del espacio entre las placas.

## CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 Desarrollo del biosensor para la determinación de glucosa

Con el objetivo de seleccionar la matriz más adecuada para funcionar como soporte enzimático en la construcción de los biosensores de GOX, se llevó a cabo una serie de experimentos que involucraron la elaboración de múltiples sensores de glucosa con el correspondiente análisis de su respuesta electroquímica. En esta sección se presentan los resultados, que permitieron obtener las condiciones óptimas de composición, grado de entrecruzamiento y cantidad de enzima inmovilizada. Se analizó la forma en que estas condiciones afectan el funcionamiento analítico de los sensores, como así también el desempeño de los mismos frente a muestras reales y en distintas condiciones de almacenamiento. Se estudiaron mezclas de mucina con distintas proporciones de albúmina, entrecruzadas con diferente concentración de glutaraldehído.

#### V.1.1 Efecto de la concentración de entrecruzante

La concentración de la solución de glutaraldehído utilizada para entrecruzar los polímeros de la matriz y para atrapar a la enzima es un parámetro muy importante, ya que condiciona la eficacia del proceso de inmovilización afectando la actividad de la enzima y por ende la sensibilidad del sensor. El efecto de la composición del agente entrecruzante sobre la respuesta electroquímica de los sensores de glucosa se observa en la Figura V-1. En la realización de estos experimentos se emplea una matriz de muc/alb 70/30 mezclada con 0,27 UE de GOX y se utilizan distintas concentraciones de agente entrecruzante para la elaboración de cada sensor. En la Figura V-1 (A) se grafican los transitorios de corriente cuando se realizan sucesivos agregados de 4  $\mu$ l de glucosa 0,1 M en la celda electroquímica, mientras que en la Figura V-1 (B) se muestran las curvas de calibración construidas tomando la corriente límite obtenida luego de cada agregado de solución estándar. Los resultados muestran que todos los sensores construidos presentan un excelente

comportamiento lineal en el intervalo de concentración evaluado. Los perfiles amperométricos para sensores entrecruzados con glutaraldehído de concentración igual o mayor al 3% muestran cierta similitud. Esto se refuerza al comparar las curvas de calibración obtenidas en cada caso. Como se observa, la respuesta disminuye notablemente cuando la concentración utilizada de entrecruzante cae por debajo del 3%.

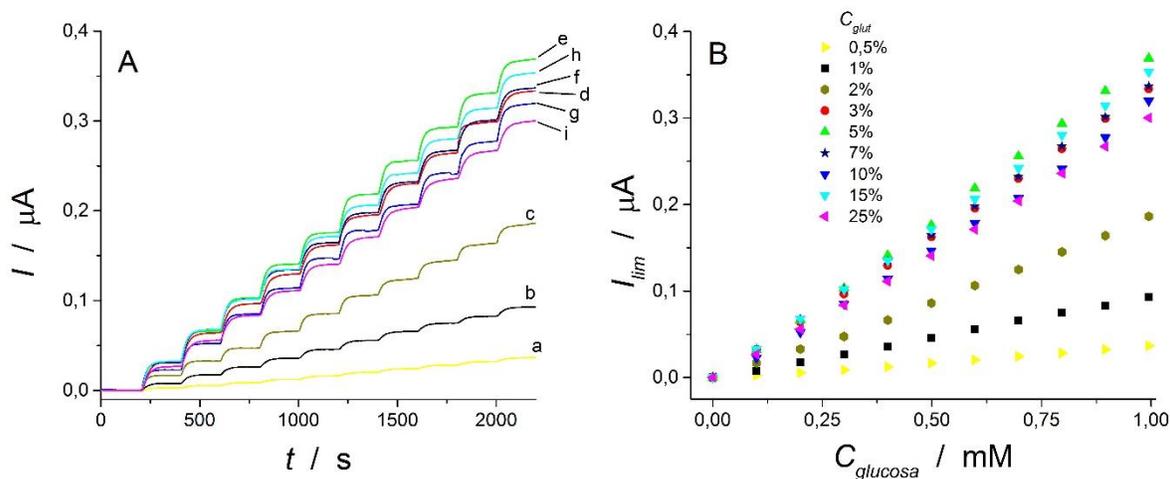


Figura V-1: (A) Perfiles cronoamperométricos para matrices enzimáticas cuando se entrecruzan con soluciones de glutaraldehído de concentración: (a) 0,5%; (b) 1%; (c) 2%; (d) 3%; (e) 5%; (f) 7%; (g) 10%; (h) 15%; (i) 25%. La respuesta corresponde a agregados de 0,1 mM de glucosa. (B) Curvas de calibración de cada sensor calculadas con los valores de  $I_{lim}$  correspondiente a cada agregado de solución estándar. Sensores con 0,27 UE de GOX en una matriz muc/alb 70/30.

La sensibilidad de cada sensor obtenida a partir de las pendientes de las curvas de calibración en función de la concentración de entrecruzante se muestra en la Figura V-2 (A). Los valores de las pendientes y su correspondiente error se muestran en la Tabla V-1. Aquí se observa con mayor claridad que el uso de entrecruzante de concentración menor al 3% produce una rápida disminución en el valor de la sensibilidad del sensor. Por otro lado, concentraciones mayores a ese valor no producen grandes cambios en las pendientes de las curvas de calibración. Si bien se alcanza un máximo de sensibilidad cuando se usa glutaraldehído al 5%, los valores de pendiente se mantienen relativamente constantes.

Cuando se evalúa el tiempo de respuesta de los sensores en función de la concentración del agente entrecruzante, se obtiene el gráfico de la Figura V-2 (B). Se observa que conforme aumenta la concentración del glutaraldehído la respuesta electroquímica demora más tiempo en alcanzar el estado estacionario. Concentraciones

de entrecruzante iguales o por debajo al 5% resultan en tiempos de respuesta relativamente similares. Cuando se supera este valor de concentración el tiempo de respuesta crece linealmente y se obtienen sensores más "lentos" cuanto más concentrada sea la solución de glutaraldehído utilizada.

Estos resultados, con las condiciones evaluadas hasta este punto muestran que un sensor óptimo se construye utilizando un 5% de glutaraldehído, lo que implica un máximo de sensibilidad y un tiempo de respuesta bajo frente al resto de los sensores.

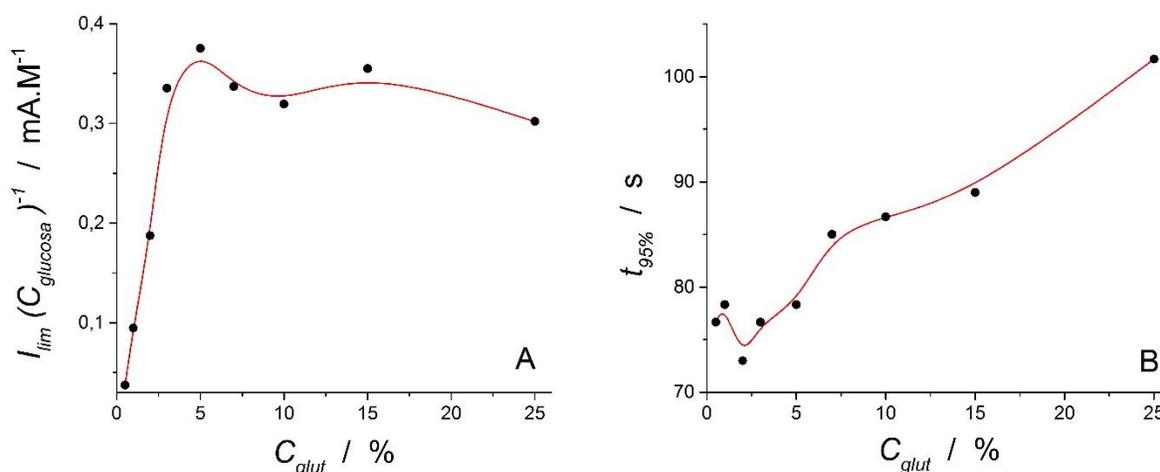


Figura V-2: Dependencia de (A) la sensibilidad ( $I_{lim} C_{glucosa}^{-1}$ ) y (B) del tiempo que toma alcanzar el 95% de la corriente límite ( $t_{95\%}$ ) frente a la concentración de glutaraldehído utilizado. Sensores con 0,27 UE de GOX en matriz muc/alb 70/30.

Tabla V-1: Pendientes de las curvas de calibración y error asociado. Sensores con 0,27 UE de GOX en matriz muc/alb 70/30.

$C_{glut}$ / %	$I_{lim}(C_{glucosa})^{-1}$ / $\text{mA.M}^{-1}$	Error / $\text{mA.M}^{-1}$
0,5	0,0375	0,0009
1	0,0948	0,0008
2	0,187	0,003
3	0,335	0,002
5	0,375	0,003
7	0,337	0,002
10	0,319	0,006
15	0,355	0,002
25	0,302	0,004

### V.1.2 Efecto de la composición de la matriz

El efecto que produce la variación de la composición polimérica de la matriz en la elaboración de los biosensores se estudia modificando el porcentaje en peso de cada proteína constituyente. Con cada una de las mezclas evaluadas se elaboran diferentes sensores a partir del uso de glutaraldehído de distinta concentración.

En la Figura V-3 (A) se presentan los valores de las pendientes de las curvas de calibración para múltiples sensores preparados con distintas concentraciones de glutaraldehído, mucina y albúmina. La sensibilidad de los sensores cae notablemente cuando la concentración del glutaraldehído es menor al 3%, independientemente de la concentración de mucina y de albúmina que se haya empleado. Con respecto al efecto de mucina en la composición del sensor, las matrices que se encuentran formadas únicamente por mucina presentan valores mínimos de sensibilidad. Los valores de  $I_{lim}$  crecen con la incorporación de albúmina en la matriz y con soluciones de entrecruzante más concentradas. La sensibilidad puede considerarse que se mantiene constante en aquellos sensores construidos con matrices enzimáticas preparadas con glutaraldehído de concentración igual o mayor que el 3%, y cuando al menos un 30% en peso de las proteína que forman el hidrogel corresponde a albúmina. Si se observa con detenimiento, se encuentra un máximo de  $I_{lim}$  cuando la matriz enzimática se prepara con 5% de glutaraldehído y 30% de mucina.

El comportamiento observado en estos experimentos se puede explicar, por un lado, teniendo en consideración la función que cumple el glutaraldehído como entrecruzante de especies ya que reacciona con los grupos amino de otras moléculas. Por otro lado, es importante tener en cuenta que la mucina es una glicoproteína con baja densidad de grupos amino, por lo que no puede interactuar activamente en una reacción de entrecruzamiento. Como consecuencia, aquellas matrices preparadas con baja cantidad de glutaraldehído o alto porcentaje de mucina no se encontrarán lo suficientemente entrecruzadas, por lo que la enzima difundirá durante el lavado del sensor y mientras esté siendo utilizado. Del mismo modo que el glutaraldehído actúa como generador de puntos

de unión entre los polímeros de la matriz, también puede reaccionar con la enzima por un extremo y por el otro con una molécula proteica, manteniendo así a la enzima anclada a la matriz polimérica. De esta forma, al disminuir su concentración en el sensor es probable que algunas moléculas de enzima no se inmovilicen y que fluyan al medio cuando el sensor entra en contacto con el solvente.

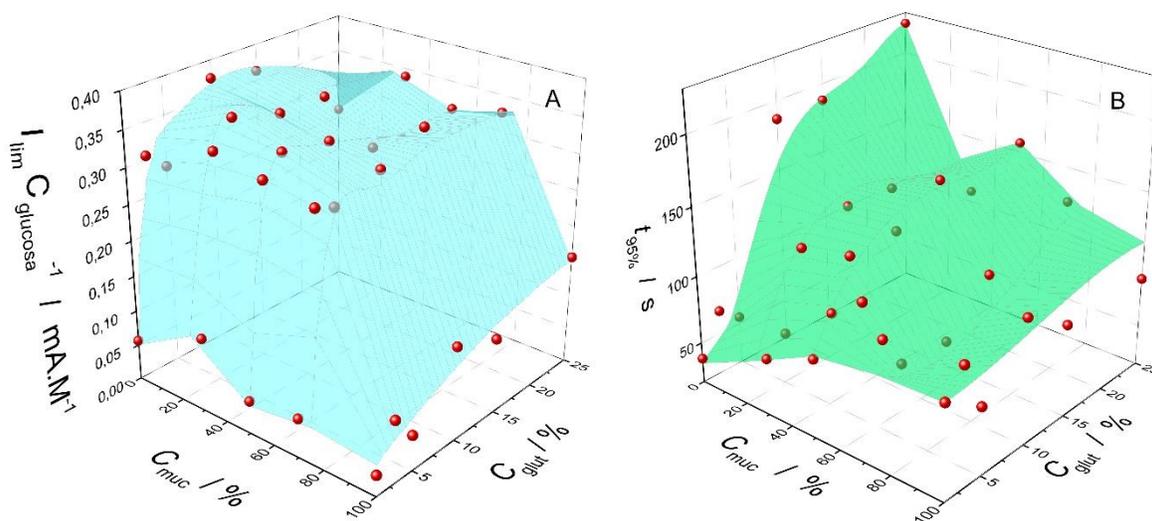


Figura V-3: Dependencia de (A) la sensibilidad ( $I_{lim} C_{glucosa}^{-1}$ ) y (B) del tiempo de respuesta ( $t_{95\%}$ ) con respecto a la concentración de glutaraldehído ( $C_{glut}$ ) y a la relación en peso mucina / albúmina ( $C_{muc}$ ) utilizadas en la construcción de las matrices enzimáticas de sensores de GOX. En todos los casos se utilizó 0,27 UE de GOX por sensor.

La dependencia del tiempo de respuesta con respecto a la concentración de glutaraldehído y al porcentaje de cada macromolécula en la matriz, se consideran factores importantes a la hora de decidir cuál es la matriz enzimática que presenta las mejores condiciones para el desarrollo de un biosensor. En la Figura V-3 (B) se observa que aquellos sensores que son preparados en matrices formadas por 100% de albúmina y aquellos con una concentración de entrecruzante relativamente alta son los que presentan los mayores tiempos de respuesta dentro del grupo de sensores analizados. De manera opuesta, las respuestas más rápidas se encuentran cuando los biosensores son preparados con baja concentración de glutaraldehído, independientemente de la relación porcentual de las proteínas en la matriz. Un comportamiento similar se evidencia cuando se analiza el tiempo de respuesta de los sensores construidos con alto porcentaje de mucina en su matriz. Estos resultados sugieren que existe un mayor nivel de entrecruzamiento, ya sea

por mayor concentración de entrecruzante o por la mayor proporción de albúmina. En ambos casos se limitaría la difusión tanto de los reactivos como de los productos a través de la matriz, aumentando por consiguiente el tiempo de respuesta<sup>9,10</sup>.

### Evaluación del intervalo lineal de la respuesta

La mayor concentración de analito que cada biosensor puede cuantificar antes de que la corriente pierda el comportamiento lineal, constituye el límite superior del intervalo lineal. En la Figura V-4 se muestran las respuestas cronoamperométricas (A) y las curvas de calibración (B) que se obtienen cuando se construyen sensores con una matriz muc/alb 70/30, para distintas concentraciones de glutaraldehído. En cada determinación, los primeros 10 agregados de solución de glucosa corresponden a una concentración de 0,1 mM, mientras que los 6 restantes corresponden a la concentración de 1 mM de glucosa por agregado. Una primera vista de la figura muestra que, cuanto menor es la concentración utilizada de glutaraldehído, más se prolonga el intervalo lineal de los sensores. Por consiguiente, cuanto mayor es la sensibilidad alcanzada, menor es el intervalo en que la respuesta electroquímica se comporta de manera lineal frente a los aumentos de concentración del analito.

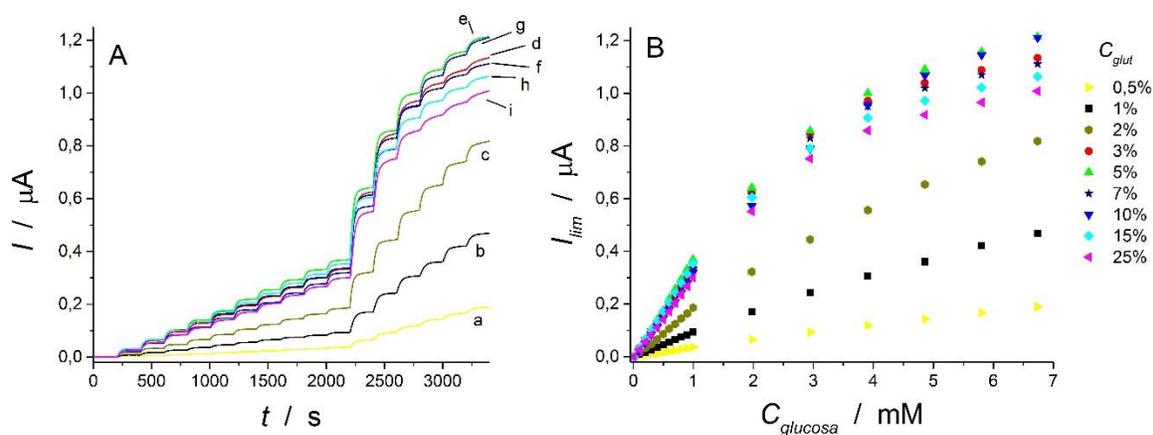


Figura V-4: (A) Perfiles cronoamperométricos para matrices enzimáticas cuando se entrecruzan con soluciones de glutaraldehído de concentración: (a) 0,5%; (b) 1%; (c) 2%; (d) 3%; (e) 5%; (f) 7%; (g) 10%; (h) 15%; (i) 25%. La respuesta corresponde a 10 agregados de 0,1 mM y 6 agregados de 1 mM de glucosa. (B) Curvas de calibración de cada sensor calculadas con los valores de  $I_{lim}$  correspondiente a cada agregado de solución estándar. Datos correspondientes a sensores con 0,27 UE de GOX en una matriz muc/alb 70/30.

El comportamiento de la respuesta lineal del sensor con respecto a la concentración de entrecruzante también se analiza en la Figura V-5 (A). Allí se grafica el valor de la máxima concentración de glucosa que presenta una respuesta directamente proporcional en la señal de corriente frente la concentración de entrecruzante. Como se observa, para concentraciones de glutaraldehído mayores al 3%, el intervalo lineal oscila entre los 2 mM y 3 mM de glucosa, mientras que cuando la concentración de entrecruzante es menor a 3% el límite lineal crece hasta un máximo de alrededor de 6 mM. Por otro lado, se puede evaluar también el comportamiento lineal teniendo en cuenta la composición de la matriz enzimática. En la Figura V-5 (B) se establece una relación entre el porcentaje utilizado de mucina y el intervalo lineal para matrices entrecruzadas con glutaraldehído diluido al 3%. Se observa que es mayor el intervalo de respuesta lineal, cuanto mayor es el porcentaje de mucina. Para explicar esto, hay que tener en cuenta que a menor concentración de glutaraldehído y a mayor porcentaje de mucina existe posiblemente menor grado de entrecruzamiento de la matriz, por lo que parte de la enzima difunde fuera del sensor. La cantidad de oxígeno, mediador natural de la reacción enzimática, está regulada por difusión y al haber menos GOX habrá más oxígeno disponible por unidad enzimática para llevar a cabo la catálisis. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que para determinar el límite superior del intervalo lineal se utiliza elevada concentración de sustrato, por lo que el mediador es la especie que se vuelve limitante de la reacción enzimática. En otras palabras, la linealidad de la respuesta se pierde cuando la llegada de oxígeno limita la reacción enzimática.

Teniendo en cuenta estas respuestas, se puede prever el comportamiento del intervalo lineal para distintas matrices y concentraciones de entrecruzante. Cuanto mayor cantidad de mucina y menor concentración de glutaraldehído, menor será la sensibilidad del sensor y por consiguiente, mayor será su intervalo lineal. Por el contrario, al aumentar la cantidad porcentual de albúmina y la concentración de glutaraldehído, el sensor mostrará mayor sensibilidad, pero al mismo tiempo será menor el intervalo de respuesta lineal frente a adiciones de glucosa.

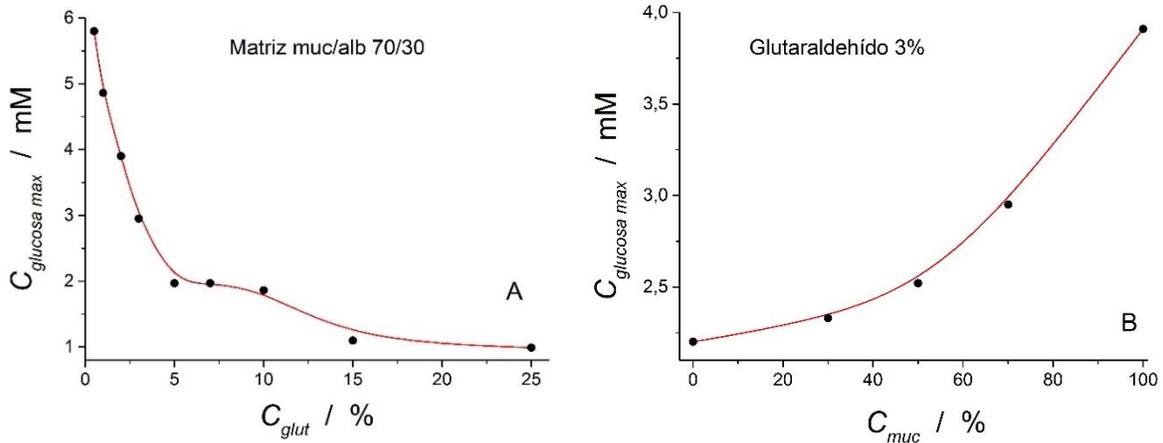


Figura V-5: Concentración máxima de glucosa medida con comportamiento lineal frente a (A) la concentración de glutaraldehído cuando la matriz enzimática está compuesta por 70% de mucina y 30% de albúmina y (B) frente a la composición de la matriz cuando se utiliza 3% de glutaraldehído. En ambos casos se utiliza 0,27 UE de GOX por sensor.

### Selección de la matriz para desarrollo analítico

Con los resultados obtenidos se realizó la selección de la matriz enzimática más adecuada para la elaboración de los biosensores. Evaluando conjuntamente los resultados que se muestran en la Figura V-3 se puede calcular la relación punto a punto entre los datos de A y los de B, correspondiéndose a la relación entre sensibilidad y tiempo de respuesta para cada sensor. Con este análisis, se seleccionó una matriz que se compone por 30% de mucina, 70% de albúmina y se entrecruzó con una solución de glutaraldehído diluida al 3%. De esta forma, se trabajó con sensores que presentan buena sensibilidad (valor muy cercano al máximo encontrado) y un tiempo de respuesta por debajo de 100 segundos, valor que se ubica también dentro del lote óptimo en cuanto a este parámetro. Si bien el uso de 30% de mucina, de acuerdo con la Figura V-5 (B), no permite medir linealmente la mayor concentración de glucosa posible, el uso de glutaraldehído al 3% ubica este parámetro dentro de los valores medios experimentales (Figura V-5 (B)). En este sentido se priorizaron los parámetros de sensibilidad y tiempo de respuesta frente al valor de intervalo lineal. Esto se debe a que se requeriría un cambio sustancial en la composición de la matriz para mejorar el intervalo de respuesta lineal y este cambio sería en desmedro de los otros parámetros analíticos.

### V.1.3 Efecto de la concentración de la enzima

En esta etapa se evalúa el efecto que produce la variación en la cantidad de enzima inmovilizada sobre la respuesta analítica de los sensores desarrollados. Para ello se preparan múltiples sensores con diferente concentración de GOX en cada uno de ellos. En la Figura V-6 (A) se muestran las respuestas cronoamperométricas para estos sensores, elaborados todos en matrices muc/alb 30/70 entrecruzadas con glutaraldehído al 3%. Cada adición de estándar corresponde a un valor de 0,2 mM de glucosa en la solución resultante. Si se toman las pendientes de las curvas de calibración construidas con estas respuestas, frente a la concentración de enzima en cada sensor, se obtiene el gráfico de la Figura V-6 (B). Aquí se observa que mientras mayor es la concentración de enzima, la sensibilidad crece rápidamente hasta que alcanza un valor máximo, dado que luego la sensibilidad se mantiene relativamente constante. La pendiente se incrementa hasta que se emplean 1,34 UE, mientras que el aumento de la concentración a 2,7 UE de GOX no se traduce en un incremento apreciable de la sensibilidad. Para explicar esto, se debe tener en cuenta que la respuesta del sensor se encuentra limitada por la difusión del sustrato y del oxígeno, mediador natural de la reacción (Figura II-6). Cuando la cantidad de GOX es relativamente baja, tanto la velocidad de difusión del sustrato como del oxígeno dentro del sensor es suficiente para mantener activa a la enzima. A medida que la cantidad de GOX aumenta, particularmente la difusión del sustrato comienza a limitar su concentración dentro del sándwich y por ende, la velocidad de la reacción enzimática. Debido a esto, el incremento de GOX en el sensor no mejora necesariamente la respuesta electroquímica.

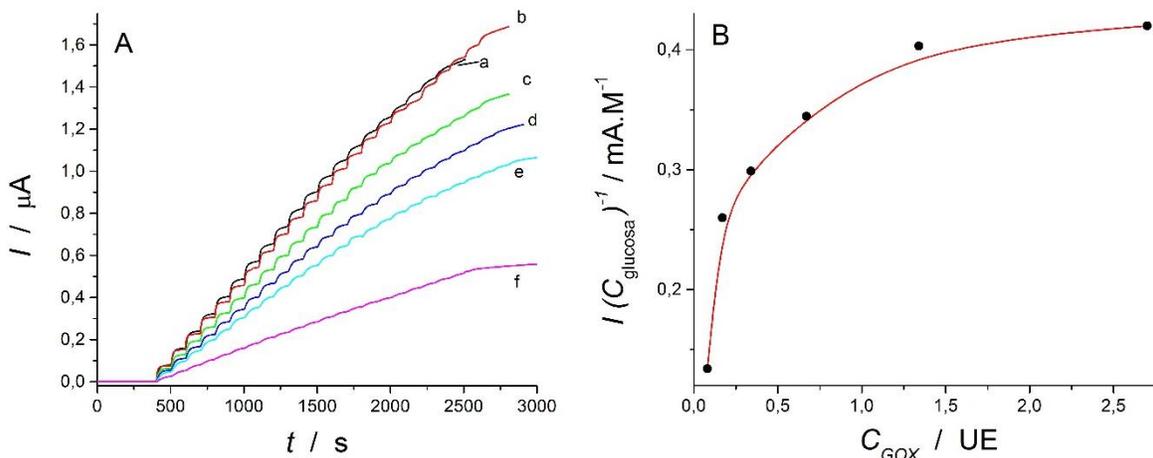


Figura V-6: (A) Perfiles cronoamperométricos para matrices enzimáticas compuestas por 30% de mucina y 70% de albúmina entrecruzadas con glutaraldehído al 3%, cuando la concentración de enzima es de: (a) 2,7 UE; (b) 1,34 UE; (c) 0,67 UE; (d) 0,34 UE; (e) 0,17 UE; (f) 0,08 UE. La respuesta corresponde a sucesivos agregados de 0,2 mM de glucosa. (B) Dependencia de la sensibilidad  $(I_{\text{lim}} C_{\text{glucosa}})^{-1}$  frente a la concentración de GOX utilizada.

En distintos trabajos se han evaluado aspectos de los biosensores tipo sándwich<sup>114,115</sup>, donde se señala que el tiempo de respuesta de los sensores se reduce mientras que la corriente límite se incrementa con el aumento de  $v_{\text{max}}$ , que es proporcional a la concentración de enzima (ecuación II-18). Ambos resultados concuerdan con la forma de las curvas cronoamperométricas de la Figura V-6 (A). A pesar de que inicialmente se predijo<sup>114</sup> que la corriente límite ( $\psi_{\text{lim}}$ ) se debería incrementar linealmente cuando aumenta  $v_{\text{max}}$ , la Figura V-7 muestra que  $\psi_{\text{lim}}$  se incrementa linealmente para  $v_{\text{max}} < 0,01 \text{ Ms}^{-1}$  (curva (b)). Para valores más grandes, la dependencia de  $\psi_{\text{lim}}$  con  $v_{\text{max}}$  se desvía de la linealidad y  $\psi_{\text{lim}}$  alcanza un máximo para  $v_{\text{max}} > 0,3 \text{ Ms}^{-1}$ . La comparación de los resultados teóricos y experimentales revela una forma simple para estimar que un sensor preparado con 1,34 UE de GOX tendrá un valor de  $v_{\text{max}} = 0,13 \text{ Ms}^{-1}$ , Figura V-7 curvas (a) y (b). Esta aproximación se logra simplemente comparando los perfiles teóricos y experimentales. Más importante aún, los datos demuestran que el uso de una mayor concentración de GOX no cambia la respuesta del sensor, debido a que la respuesta está limitada por la difusión de la glucosa y del  $\text{O}_2$ , mediador natural de la reacción.

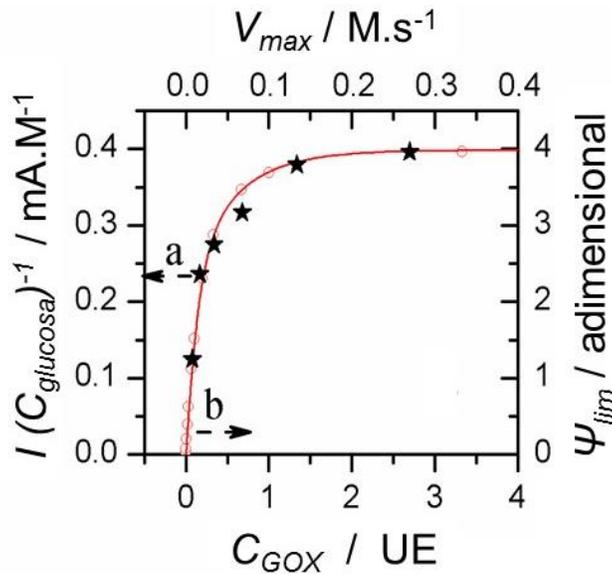


Figura V-7: Dependencia de (a)  $I_{lim}$  experimental con  $C_{GOX}$  (estrellas) y de (b)  $\psi_{lim}$  (teórica) con  $v_{max}$  (círculos). En el modelo,  $D_{glucosa} = 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_{H_2O_2} = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_{O_2} = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $C_{O_2} = 0.274 \text{ mM}$ ,  $K_{O_2} = K_{glucosa} = 0.1 \text{ M}$ ,  $v_{max} = 0.10 \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $C_{glucosa} = 0.1 \text{ mM}$ , ancho del sensor:  $100 \mu\text{m}$ .

La evaluación del tiempo de respuesta se grafica en la Figura V-8 (A). A medida que la concentración de GOX aumenta, disminuye el tiempo necesario para que la respuesta alcance el 95% del valor de la corriente límite. Cuando se utilizan más de 0,67 UE de GOX, el tiempo de respuesta se encuentra alrededor de 50 segundos. Con menores concentraciones de GOX, el tiempo de respuesta aumenta. En el esquema de la Figura V-9 se muestra lo que sucede dentro del biosensor, inmediatamente después del agregado de una cantidad determinada de glucosa en la solución, representada por  $C^*$ . El valor de  $C^*$  es constante en todo el volumen de la celda, pero no dentro del biosensor. Cuando el analito supera la membrana externa e ingresa en la matriz enzimática, comienza inmediatamente a ser consumido por la enzima. Cuando la concentración de enzima es elevada con respecto a la cantidad de sustrato agregada, la velocidad de catálisis es sustancialmente mayor que el tiempo que requiere el sustrato para difundir en el sensor. De esta forma, la concentración de glucosa dentro de la matriz será menor cuanto mayor sea la cantidad de enzima presente. Como la enzima genera una molécula de peróxido de hidrógeno por cada molécula catalizada de glucosa, los perfiles de concentración para este producto serán inversos a los mostrados para el sustrato. Fenomenológicamente, también se observa que

cuanto mayor sea la cantidad de GOX en la matriz, la señal del sensor alcanzará más rápido el estado estacionario, disminuyendo así su tiempo de respuesta.

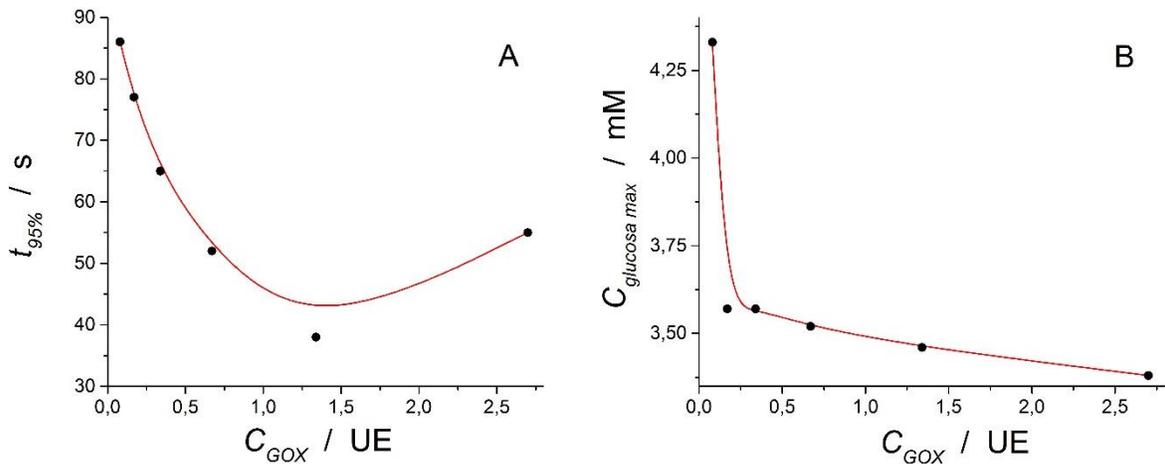


Figura V-8: Dependencia del (A) tiempo de respuesta y de (B) la concentración máxima de glucosa medida linealmente frente a la concentración de GOX utilizada por sensor. En todos los casos se utiliza una matriz muc/alb 30/70 con 3% de glutaraldehído.

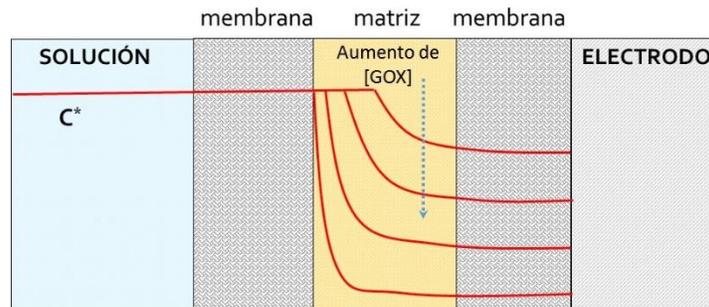


Figura V-9: Esquema de los perfiles que tendría la concentración de glucosa dentro de un biosensor tipo sándwich, si a un determinado instante se consideran mayores concentraciones de GOX en la matriz enzimática.

No todos los sensores responden de la misma manera en el intervalo de concentraciones de glucosa evaluados. En la Figura V-8 (B) se grafica la concentración máxima de glucosa medida con comportamiento lineal frente a la concentración de GOX utilizada en cada caso. Como consecuencia, cuanto menor es la cantidad de GOX utilizada, mayor es la concentración de glucosa que puede ser cuantificada. Este resultado concuerda con lo mostrado en la Figura V-5, en la que se observó que con el uso de menor concentración de glutaraldehído y mayor cantidad de mucina se obtienen matrices con menor entrecruzamiento. En el caso de la Figura V-5, parte de la enzima se escapa del

sensor, dando lugar a una menor concentración efectiva de GOX dentro del mismo. Debido a esto, también se logra que más oxígeno esté disponible para la catálisis, logrando así extender el intervalo de respuesta lineal. Esto mismo ocurre cuando se agrega menos enzima en la composición del biosensor.

#### V.1.4 Propiedades analíticas

Los experimentos desarrollados en las secciones anteriores permiten determinar la composición y el entrecruzamiento óptimo para un sensor de glucosa con las características deseadas. Para determinar características analíticas tales como límite de detección, intervalo lineal, reproducibilidad y estabilidad se utilizan sensores donde se inmoviliza GOX en una matriz de muc/alb 30/70 entrecruzada con glutaraldehído al 3%.

##### *Reproducibilidad de sensor a sensor*

En la Figura V-10 (A) se muestran las respuestas cronoamperométricas de dos biosensores en los que se utiliza la misma cantidad de GOX, pero que fueron preparados en distinto momento, a partir de matrices independientes. Como se muestra, ambas respuestas cronoamperométricas son muy similares. Para poder diferenciarlas entre sí, las dos primeras adiciones en la curva (a) se realizan con 0,1 mM de glucosa mientras que las restantes adiciones corresponden a 0,2 mM de concentración. El desvío estándar de las curvas de calibración construidas es menor al 1%, Figura V-10 (B). Por otro lado, a partir del análisis de seis curvas de calibración correspondientes a seis sensores independientes preparados a partir de la misma matriz, se observa que la pendiente varía 10% alrededor de un valor promedio de 0,36 mA.M<sup>-1</sup>, lo que demuestra muy buena reproducibilidad tanto en la preparación como en la respuesta obtenida por parte de los distintos sensores para este sistema. Para lograr esto, no sólo es importante haber seleccionado la matriz enzimática apropiada, sino también ser cuidadoso al momento de la preparación de la matriz y en el ensamblado del sensor<sup>9,10</sup>.

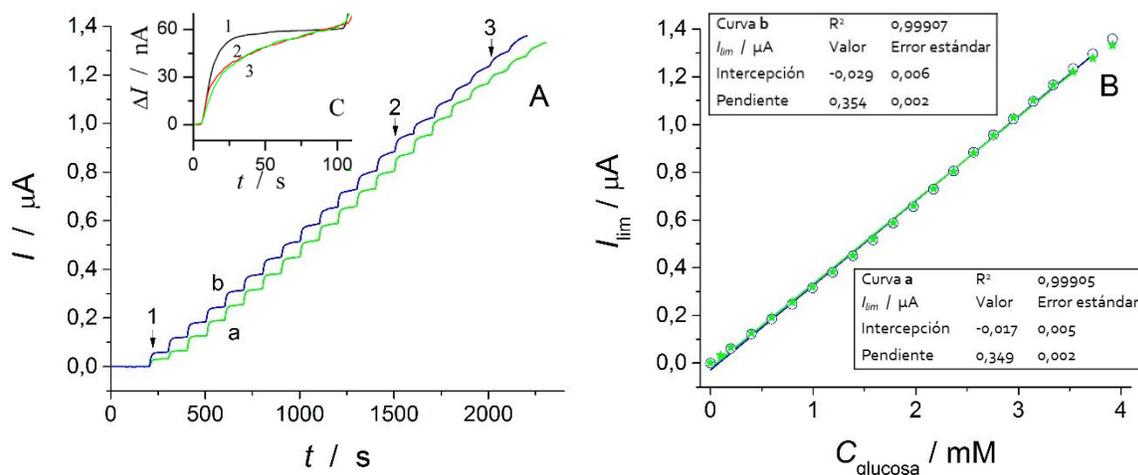


Figura V-10: (A) Perfiles cronoamperométricos de dos biosensores independientes compuestos por 2,7 UE de GOX por sensor. (B) Curvas de calibración para cada sensor calculadas tomando los valores de  $I_{\text{lim}}$ . (C) Perfiles cronoamperométricos para las adiciones 1, 2 y 3. Los dos primeros agregados de la curva (a) corresponden a 0,1 mM de glucosa, mientras que el resto son de 0,2 mM de glucosa. Se utiliza una matriz muc/alb 30/70 con 3% de glutaraldehído.

En el gráfico inserto en la Figura V-10 (C) se compara la forma de tres saltos de corrientes en el registro (b), que son los indicados con las flechas correspondientes en la Figura V-10 (A). Aquí se deja en evidencia que el tiempo de respuesta del sensor se incrementa cuando lo hace la concentración del analito en solución. Este hecho ocurre particularmente en soluciones con más de 2,4 mM de glucosa. En un principio, se consideró que este comportamiento era debido a la pérdida por difusión de la enzima que no se encontraba adecuadamente entrecruzada con la matriz y lentamente se liberaba en la solución. Sin embargo, la comparación de distintos perfiles amperométricos demuestra que múltiples sensores, preparados con diferente concentración de glutaraldehído, incrementan su tiempo de respuesta cuando la concentración de glucosa supera 2,4 mM. Como resultado, se concluye que la pérdida de linealidad depende de la difusión de los sustratos, en particular del oxígeno molecular a través de la matriz enzimática. Y como se determinó anteriormente, este problema puede ser resuelto disminuyendo la concentración de GOX en el sensor.

#### Límite de detección e intervalo lineal

La Figura V-11 (A) muestra el perfil amperométrico de un biosensor tipo sándwich preparado con una matriz muc/alb 30/70, glutaraldehído 3% y 1,34 UE de GOX. La

respuesta observada surge de sucesivas adiciones de 8  $\mu\text{l}$  de soluciones estándar de glucosa de 1 mM, 10 mM y 100 mM en la celda electroquímica. La celda se llena inicialmente con 4 ml de buffer fosfato pH 7 y se utilizó el método de adiciones de estándar para determinar el límite de detección y el intervalo lineal del sensor. El inserto (B) de la figura muestra la respuesta cronoamperométrica del sensor luego de 5 adiciones en las que cada una incrementó la concentración en 2  $\mu\text{M}$  de glucosa, mientras que el último agregado de glucosa en la Figura V-11 (A) corresponde a una concentración final en celda de 4,7 mM.

De acuerdo con la definición dada por IUPAC<sup>120</sup>, el valor del límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) puede ser determinado por el valor que corresponde a 3 veces la desviación estándar de la señal de base ( $\sigma_b$ ) dividida por la pendiente de la curva de calibración. El valor de  $\sigma_b$  se calcula a partir del conjunto de datos obtenidos 400 segundos antes de la primera adición de estándar de glucosa en la celda, lo que arroja un valor de 0,9  $\mu\text{M}$ . Si bien este valor es consistente con los datos que se presentan en la Figura V-11 (B), esta definición de LOD no considera la calidad del análisis de regresión lineal que se lleva a cabo para el cálculo de la pendiente de la curva de calibración. En este sentido, la regresión lineal de los datos para una concentración de glucosa por debajo de 3,5 mM (marcado con una flecha en la figura) arroja un coeficiente de correlación cuadrático ( $R^2$ ) igual a 0,9999, mientras que si se incluyen la totalidad de los datos (hasta 4,7 mM de concentración de glucosa) este parámetro toma un valor de 0,9990. Ambos análisis de regresión arrojan prácticamente el mismo valor de pendiente, aunque sus errores son sensiblemente diferentes. El cálculo del LOD sugerido por el ICH<sup>121</sup> (International Conference of Harmonisation) arroja un valor de 3  $\mu\text{M}$ . Se calcula como 3 veces la desviación estándar de la intercepción del eje y ( $\sigma_y$ ) sobre la pendiente de la curva de calibración para los datos registrados por debajo de 3,5 mM en las adiciones estándar de glucosa. Esta forma de calcular el valor del LOD es consistente con los datos obtenidos en la Figura V-11, y considera el ruido instrumental de la señal y además la dispersión de los datos obtenidos de la regresión lineal.

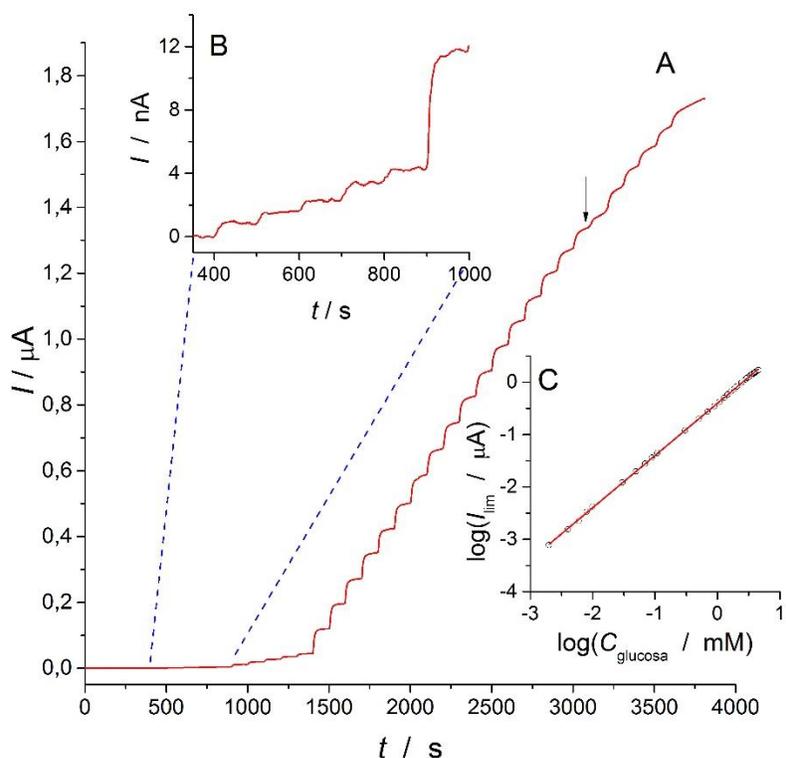


Figura V-11: (A) Perfil cronoamperométrico de un biosensor preparado con una matriz muc/alb 30/70 entrecruzada con glutaraldehído 3%. El registro corresponde a 5 agregados de  $2 \mu\text{M}$  (detalle de la respuesta en inserto (B)), 5 agregados de  $20 \mu\text{M}$  y múltiples agregados de  $0,2 \text{ mM}$  de glucosa. (C) Dependencia logarítmica de la corriente límite frente a la concentración de glucosa.

El inserto (C) de la Figura V-11 es un gráfico logarítmico de la corriente límite frente a la concentración de glucosa. Claramente se observa que el sensor construido tiene un amplio intervalo de comportamiento lineal. La dependencia lineal de  $I_{lim}$  implica más de tres órdenes de magnitud de concentración, desde algunos  $\mu\text{-moles}$  hasta casi cuatro mil moles de glucosa por litro de solución.

### V.1.5 Estabilidad del biosensor de glucosa

La Figura V-12, muestra las respuestas de dos biosensores construidos en igual momento, utilizando la misma matriz enzimática pero que fueron almacenados en distintas condiciones luego de su uso. El sensor de la Figura V-12 (A), se almacenó en un vial con buffer fosfato a  $4^\circ\text{C}$ , mientras que el biosensor de la Figura V-12 (B) se enjuagó con buffer luego del uso y se guardó en un vial a  $4^\circ\text{C}$ . Las respuestas fueron normalizadas con el objetivo de simplificar la comparación de sus perfiles cronoamperométricos. El biosensor

almacenado en buffer (Figura V-12 (A)) muestra perfiles muy reproducibles entre sí. La forma de estos cronoamperogramas es prácticamente la misma independientemente del día en que se realizó el análisis. Todas las curvas muestran valores de corriente de estado estacionario muy bien definidos, lo que permite el cálculo de la sensibilidad analítica del sensor. Como consecuencia de esto, se pudo establecer que las características biocatalíticas, geométricas y fisicoquímicas no presentan cambios significativos con el transcurso de las semanas de uso. Esto refuerza el hecho de que la composición de la matriz enzimática no sólo es responsable de la buena sensibilidad del sensor, sino que también asegura muy buena estabilidad para la enzima que se inmoviliza<sup>9</sup>.

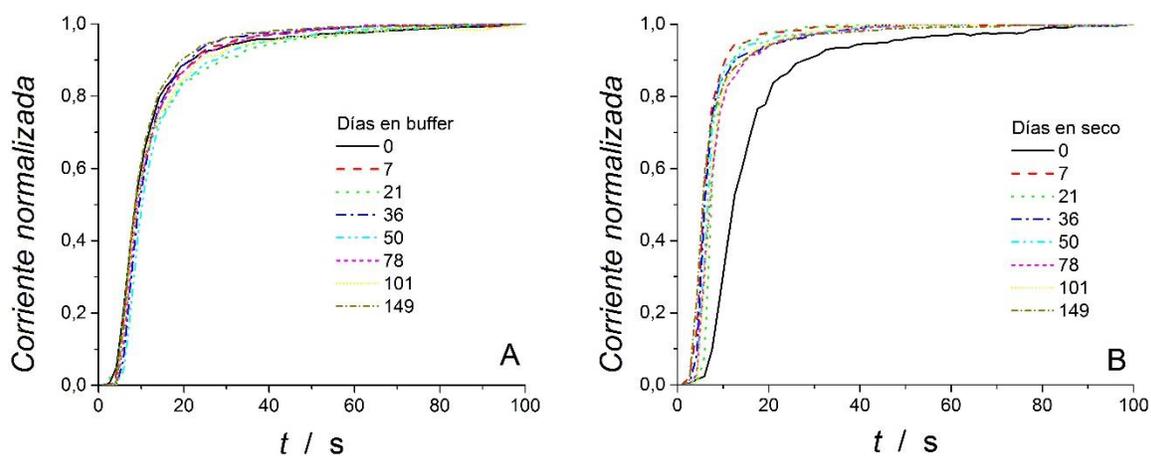


Figura V-12: Perfiles cronoamperométricos normalizados de dos biosensores luego de la adición de 0,2 mM de glucosa. Las curvas corresponden a la respuesta de cada biosensor luego de transcurridas distintas cantidades de días desde el ensamblado. Los sensores fueron almacenados en Buffer (A) y dentro de un vial vacío (B) a 4 °C.

En la Figura V-12 (B) se observa una situación algo diferente. La forma de la señal se modifica desde el primer día de análisis. La intención de este estudio fue la de determinar qué tan robusto era el biosensor de glucosa cuando era almacenado bajo condiciones que pueden ser críticas o extremas para la mayoría de los sensores presentados en bibliografía<sup>8</sup>. Se encontró que luego de una semana de ensamblado, el sensor alcanzó el estado estacionario en menor tiempo que el determinado para un sensor recientemente preparado. El biosensor, almacenado prácticamente en seco, mostró su respuesta más rápida luego de una semana de ensamblado, siendo la más lenta la determinada en el día cero.

Cuando se evaluó la sensibilidad de los biosensores en función del tiempo transcurrido desde el momento del armado, se encontró que la señal cae luego de transcurrida la primera semana. La respuesta desciende a alrededor del 80% del valor encontrado para un sensor preparado recientemente. Este comportamiento se muestra en la Figura V-13, que resume la información de un conjunto de biosensores que fueron evaluados por más de un año. Durante este tiempo, fueron llevadas a cabo al menos 20 curvas de calibración en las que se realizaron más de 10 agregados de solución de estándar de glucosa para cada biosensor.

Luego de la primera semana, los sensores almacenados en frío mantuvieron su sensibilidad relativamente constante por aproximadamente 3 meses. Esto se observa en las curvas a y b de la Figura V-13. Transcurrido ese tiempo, gradualmente incrementaron su sensibilidad durante los siguientes 5 meses. En el caso de la curva a, la sensibilidad se incrementó desde 80% al 100%, mientras que para el biosensor correspondiente a la curva b, el incremento de la sensibilidad fue de alrededor 130% de la señal determinada en el primer día de medida. Como se puede observar, ambos biosensores mantuvieron sus valores de sensibilidad durante aproximadamente un año luego del ensamble.

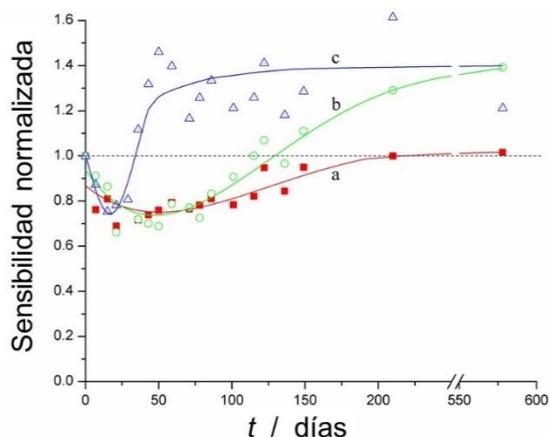


Figura V-13: Sensibilidad normalizada de tres biosensores de glucosa luego de diferentes días desde el armado. Los sensores fueron almacenados en distintas condiciones: en buffer a 4 °C (a), en un vial vacío a 4 °C (b), y en un vial vacío a temperatura ambiente (c).

El cambio en la sensibilidad fue más abrupto en el caso evaluado en la curva c de la Figura V-13, donde el biosensor fue almacenado a temperatura ambiente. La sensibilidad

de este biosensor decayó alrededor del 80% durante los primeros días. Sin embargo, luego de transcurrido un mes de uso, la señal analítica se incrementó a valores cercanos al 130% del valor inicial. Aunque el sensor c mantuvo su respuesta cronoamperométrica relativamente constante por más de un año, su sensibilidad mostró variaciones de una semana de análisis a la otra. Las variaciones descritas no son importantes para un biosensor tipo sándwich, ya que está pensado para uso intermitente. Incluso cuando se piensa en un sensor de uso más intensivo, estas variaciones no presentan un inconveniente mayor en el desempeño analítico si se realizan calibrados periódicos. De todos modos, las variaciones observadas para el sensor almacenado a temperatura ambiente fueron claramente más importantes que aquellas de los sensores almacenados en frío.

La Figura V-14 muestra la dependencia del tiempo de respuesta frente a al tiempo transcurrido desde el armado del sensor. Los datos fueron normalizados con el objetivo de comparar estas curvas en su forma más simple. El biosensor almacenado en buffer es el que muestra mayor dispersión en los tiempos de respuesta. Sin embargo, todos los valores asociados a su tiempo de respuesta se encontraron alrededor de un valor medio de  $(5 \pm 2) \times 10^1$  s. El error se calculó a partir de la desviación estándar de los datos.

Los sensores almacenados en condiciones de sequedad mostraron una tendencia diferente del tiempo de respuesta frente al tiempo de almacenamiento. Luego de la primera semana de almacenamiento, mostraron un significativo descenso en el tiempo de respuesta. El valor promedio para sus respuestas fue de  $(23 \pm 6)$  s para el sensor almacenado en frío y de  $(25 \pm 4)$  s para el sensor que se mantuvo a temperatura ambiente. En ambos casos, el tiempo de respuesta fue aproximadamente la mitad que el encontrado en el momento del armado del sándwich biosensor. Sin embargo, transcurrido 5 meses después de los experimentos, el biosensor almacenado seco a temperatura ambiente, incrementó su tiempo de respuesta a 55 s, mientras que el almacenado seco en frío, mantuvo su tiempo de respuesta invariable. Estos resultados se observan en las curvas b y c de la Figura V-14.

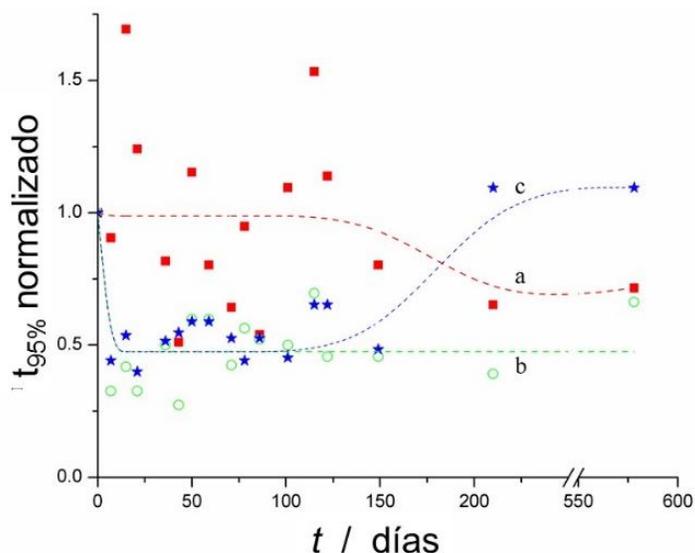


Figura V-14: Tiempo de respuesta normalizado de tres biosensores de glucosa en función de los días transcurridos desde el ensamblado. Los sensores fueron almacenados en distintas condiciones: en buffer a 4 °C (a), en un vial vacío a 4 °C (b), y en un vial vacío a temperatura ambiente (c).

El tiempo de respuesta y la sensibilidad son parámetros muy importantes para un biosensor y, a pesar de las distintas condiciones en que fue almacenado, el biosensor elaborado mostró una excelente performance para ambos parámetros durante un período de tiempo superior a un año y medio.

La Figura V-15 muestra las curvas de calibración registradas el día 222 luego del ensamblado de dos biosensores. Ambos fueron almacenados en la heladera a 4°C, sólo que uno en solución buffer fosfato y el otro seco, dentro de un vial. Antes de ser empleados para la obtención de los registros mostrados, ambos sensores fueron utilizados en múltiples ocasiones para la construcción de curvas de calibración según lo mostrado en la Figura V-13. La flecha en la Figura V-15 (A) indica la corriente obtenida cuando en la celda de reacción la concentración de glucosa es igual a 3 mM. En este punto de la curva, el coeficiente de correlación fue  $r^2 \geq 0,999$  y se considera a ese valor como el límite máximo en que la relación entre la concentración de analito y la corriente muestra un comportamiento verdaderamente lineal para el biosensor.

Los valores de desviación estándar calculados a partir de los últimos 200 s del registro de la línea de base para cada curva de calibración, fueron de  $2 \times 10^{-5} \mu\text{A}$  para la curva

(a) y de  $1 \times 10^{-5}$   $\mu\text{A}$  para la curva (b). El cociente entre estos valores y la pendiente de las respectivas curvas de calibración arrojan un valores de LOD de  $0,2 \mu\text{M}$  para la curva (a) y de  $0,1 \mu\text{M}$  para la curva (b) de cada sensor. Sin embargo, estos valores de concentración no pueden ser detectados experimentalmente con ninguno de estos sensores (Figura V-15 (B)). Teniendo en consideración este hecho, es más apropiado calcular el LOD multiplicando por 3 el desvío estándar de la intercepción de la recta de regresión con el eje de las abscisas y dividiendo ese valor por la pendiente de la curva de calibración. Los valores calculados de este modo arrojan resultados más realistas para el LOD, siendo de  $8 \mu\text{M}$  y  $5 \mu\text{M}$  para los biosensores almacenados en solución buffer y en seco, respectivamente. Estas magnitudes de LOD se encuentran más correlacionadas con los datos que se muestran en la Figura V-15 (B), en la que se muestra la señal de corriente para sucesivas adiciones de  $2 \mu\text{M}$  de glucosa. El inserto (C) de la Figura V-15 muestra cómo, luego de 7 meses de ensamblados los sensores, el intervalo lineal de la respuesta se mantiene superior a 3 órdenes de magnitud de concentración de glucosa. Esta asombrosa respuesta indica, nuevamente, la notable estabilidad que logra la enzima una vez que se inmoviliza en la matriz desarrollada.

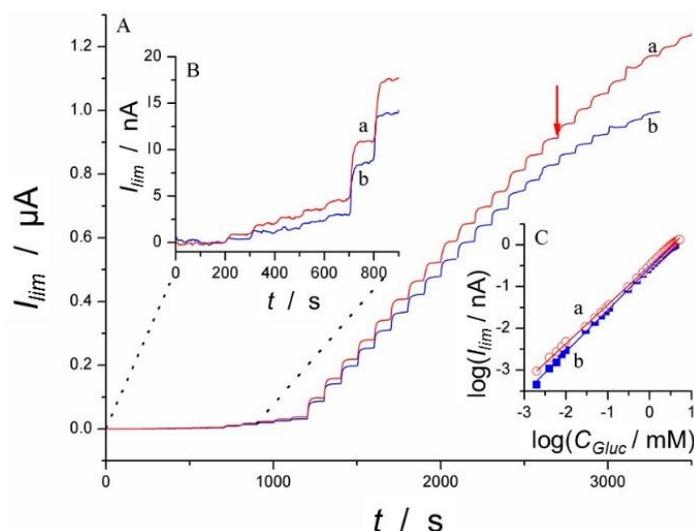


Figura V-15: (A) Perfiles cronoamperométricos de dos biosensores. Las adiciones de glucosa corresponden a  $2 \mu\text{M}$  (inserto B),  $20 \mu\text{M}$ , y  $0,2 \mu\text{M}$ . (C) Dependencia logarítmica de  $I_{lim}$  frente a  $C_{Gluc}$ . Las curvas corresponden a sensores expuestos a uso intermitente durante 222 días que fueron almacenados a  $4^\circ\text{C}$ , en un vial vacío (a) y en un vial con Buffer (b).

### Diferencia en el tiempo de respuesta de acuerdo a la forma de almacenamiento

El biosensor de glucosa mostró muy buenas características de sensibilidad, intervalo lineal, estabilidad y tiempo de respuesta. Sin embargo, es curioso el resultado mostrado en la Figura V-14, donde se observó que el tiempo de respuesta de los biosensores almacenados en seco se reducía notablemente frente al tiempo de respuesta del sensor almacenado en buffer. Para resolver este interrogante es necesario considerar el modelo matemático propuesto para este tipo de biosensores (Capítulo III). En la Figura V-16 (A) se muestra el esquema de un biosensor tipo sándwich inmediatamente luego de su preparación, donde se atrapa la matriz enzimática dentro de dos membranas de policarbonato. El espesor de este tipo de membranas se estima cercano a  $13\ \mu\text{m}$ <sup>8,115</sup>. Las membranas permiten la difusión de los analitos mientras que mantienen la matriz soporte en el espacio entre ellas. La matriz enzimática es un hidrogel con un espesor cercano a los  $20\ \mu\text{m}$ , y provee el ambiente adecuado para la contención de la enzima.

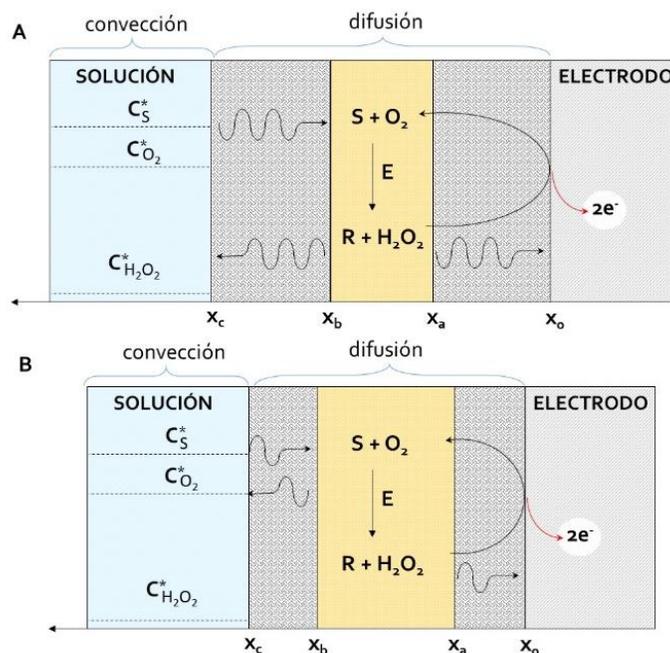


Figura V-16: Esquemas de un biosensor cuando la matriz enzimática no permea dentro de las membranas (A) y cuando el sensor es deshidratado y rehidratado en múltiples ocasiones (B).

El esquema de la Figura V-16 (B) corresponde a un biosensor que fue secado y rehidratado en reiteradas ocasiones. Como consecuencia de las sucesivas etapas de

deshidratación – hidratación, la matriz enzimática podría penetrar y difundir dentro de los poros de la membrana de policarbonato. Otra hipótesis es que la matriz no recuperaría la forma original, debido a que se colapsaría en las sucesivas etapas de deshidratación - hidratación, dando como resultado un espesor menor de matriz. Debido al hecho de que la matriz no sufre una deshidratación cuando se almacena el sensor en buffer, no se producen cambios en el espesor del sensor cuando se guarda en solución acuosa. Esta hipótesis fue incluida en el modelo matemático para evaluar las respuestas cronoamperométricas experimentales y describir los perfiles de concentración de las especies involucradas en la respuesta<sup>8</sup>.

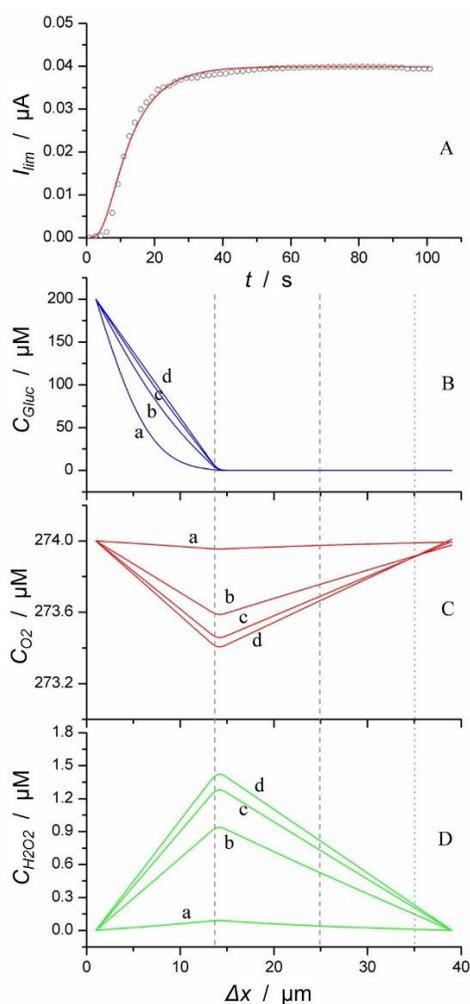


Figura V-17: (A) Respuesta cronoamperométrica experimental (círculos) y simulada (línea) para un biosensor recientemente preparado luego de la adición de 2,0 mM de glucosa. Perfiles de concentración para el sustrato (B), oxígeno (C) y peróxido de hidrógeno (D) dentro de un biosensor de 38  $\mu\text{m}$  de espesor. Los perfiles fueron calculados: (a) 4 s, (b) 14 s, (c) 24 s, (d) 60 s luego de la adición de 0,2 mM de glucosa. Las líneas discontinuas indican los límites de las membranas de policarbonato. Las líneas punteadas muestran los límites de la matriz enzimática.

En la Figura V-17 (A) se muestran las respuestas experimentales y simuladas para un biosensor recientemente preparado. Debido a que el coeficiente de difusión de la glucosa es menor a los coeficientes para el  $O_2$  y el  $H_2O_2$ , la difusión del sustrato a través de la membrana externa limita el tiempo de respuesta del sensor. La cantidad de enzima activa dentro del sensor es relativamente alta, dando como resultado un rápido consumo de sustrato dentro de la matriz. La curva cronoamperométrica simulada permite conocer cómo cambian los perfiles de concentración de las especies involucradas dentro del biosensor. El espesor de la membrana de policarbonato tiene un valor estimado de  $13\ \mu\text{m}$ , que es un valor consistente con los datos suministrados por el fabricante<sup>115</sup>. En la Figura V-17 (B), (C) y (D) se muestran los perfiles de concentración de la glucosa,  $O_2$ , y  $H_2O_2$  respectivamente. Como se mencionó, estos perfiles de concentración se obtienen a partir de la simulación de la curva en Figura V-17 (A).

Las líneas discontinuas indican los límites de las membranas de policarbonato, mientras que las líneas punteadas señalan los límites de la matriz enzimática. A  $13\ \mu\text{m}$  hacia la derecha hay una línea discontinua que indica el límite exterior de la membrana de policarbonato y de la matriz enzimática. De acuerdo con el modelo, la matriz se extiende desde el borde de la membrana externa (aquella en contacto con la solución) hasta  $9\ \mu\text{m}$  dentro de la membrana interna (aquella que descansa sobre la superficie del electrodo). Esto se debe a que la matriz puede difundir en la membrana interna durante el proceso de ensamblado del biosensor<sup>8</sup>. Entonces, las moléculas de glucosa deben difundir  $13\ \mu\text{m}$  hasta poder reaccionar con la enzima. Una vez que la glucosa alcanza la matriz, es rápidamente consumida debido a la alta concentración de enzima activa en el sensor. Es interesante notar que el perfil de concentración de glucosa es prácticamente lineal en el interior de la membrana externa luego de  $24\ \text{s}$  de la adición del analito. Esto indicaría que el sensor se acerca a la condición de estado estacionario, Figura V-17 (B). Otro hecho que indica la proximidad de la respuesta al estado estacionario, es que el gradiente de concentración de la glucosa no cambia significativamente durante el tiempo siguiente.

Comúnmente, los coeficientes de difusión de  $O_2$  y  $H_2O_2$  son mayores que los de la glucosa. Como resultado de esto, los perfiles de concentración de estas especies son

usualmente lineales y sus valores de concentraciones mínimas y máximas necesitan al menos 24 s para llegar a la condición de estado estacionario, Figura V-17 (C) y (D). Esto se debe a que los gradientes de concentración de estas especies dependen de los perfiles de concentración de la glucosa y del espesor del sensor. Las concentraciones máxima y mínima de las especies se manifiestan en el límite de la matriz enzimática cercano a la membrana externa, debido a la alta concentración de enzima y a la relativamente baja concentración de sustrato utilizada en los experimentos<sup>9,100</sup>.

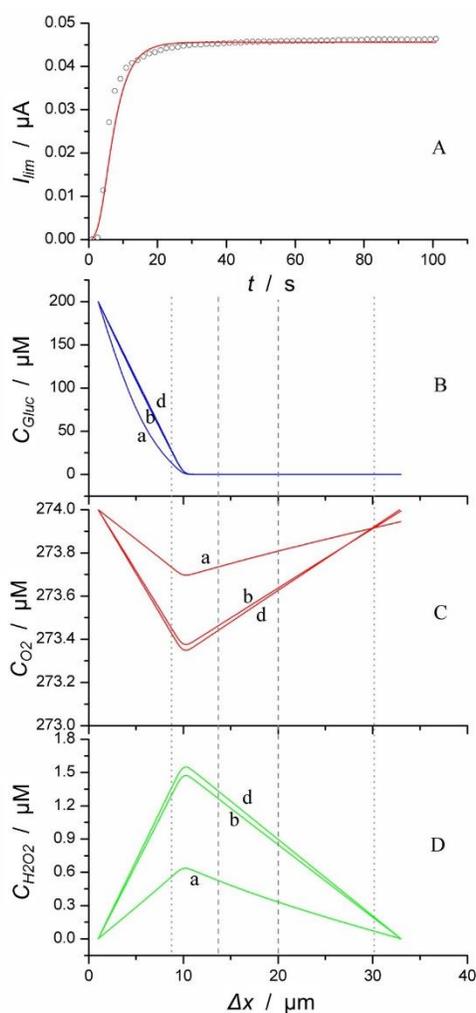


Figura V-18: (A) Perfil cronoamperométrico experimental (círculos) y simulado (línea) para un biosensor almacenado en un vial vacío a 4 °C por 149 días, luego de la adición de 0,2 mM de glucosa. Perfiles de concentración para el sustrato (B), oxígeno (C) y peróxido de hidrógeno (D) dentro de un biosensor de 33 μm de espesor. Los perfiles fueron calculados: (a) 4 s, (b) 14 s, (d) 60 s luego de la adición de 0,2 mM de glucosa. Las líneas discontinuas indican los límites de las membranas de policarbonato. Las líneas punteadas muestran los límites de la matriz enzimática.

En la Figura V-18 (A) se muestran los perfiles cronoamperométricos experimental y simulado correspondientes a un biosensor tipo sándwich, luego de 149 días de haber sido ensamblado. Este sensor fue almacenado en un vial vacío a 4° C y utilizado para múltiples curvas de calibración desde el momento del ensamblado. Los datos asociados con la sensibilidad y la respuesta temporal se resumen en las Figura V-13 y Figura V-14. Luego de 5 meses, el tiempo de respuesta del biosensor es prácticamente la mitad y la sensibilidad es 20% mayor que la obtenida el primer día en que el sensor fue ensamblado. Para explicar la mejora en estos parámetros analíticos, es necesario considerar los perfiles de concentración de las especies involucradas. En la Figura V-18 (B), (C) y (D) se muestran los perfiles de concentración para la glucosa, O<sub>2</sub>, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidos de la respuesta simulada. Nuevamente, las líneas discontinuas indican los límites de las membranas de policarbonato, mientras que las punteadas señalan los límites de la matriz enzimática. La matriz se habría introducido unos micrones dentro de la membrana externa. Como resultado de esto, el biosensor se vuelve más delgado que uno recientemente preparado y el analito debe difundir a través de una distancia menor que cuando el sensor se acaba de ensamblar. Esto se debe a que el sensor pierde agua durante el período de almacenamiento. Por consiguiente, la matriz enzimática se encoje y permea dentro de la membrana de policarbonato. Este proceso de permeación es más relevante en la membrana externa, ya que en la membrana interna la matriz fue entrecruzada dentro de la estructura. Entonces, la permeación del soporte enzimático dentro de la membrana externa disminuirá el tiempo de respuesta del biosensor.

Los perfiles de concentración de la Figura V-18 (B), (C) y (D) muestran que el estado estacionario se alcanza a los 20 s no sólo para la glucosa, sino también para O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Si bien este resultado es consistente con el tiempo de respuesta correspondiente a la curva cronoamperométrica experimental, no explica el porqué del incremento en un 20% en la sensibilidad del biosensor. La sensibilidad del biosensor depende, esencialmente, de la distancia que debe difundir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desde la región de su máxima concentración hasta la superficie del electrodo<sup>100</sup>. La magnitud de este parámetro define el gradiente de concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por ello la señal de corriente. Como se explicó, el hecho de que la

matriz enzimática se introduzca en las membranas, hace que disminuya el grosor de la membrana externa así como la sección transversal del sensor. El primer proceso hace que el tiempo de respuesta sea menor, mientras que el último es el responsable de la mejora en la sensibilidad.

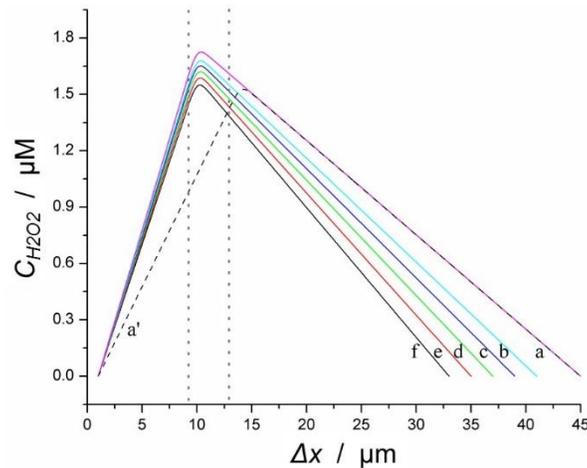


Figura V-19: Perfiles de concentración de peróxido de hidrógeno dentro de biosensores con distinto espesor. Los perfiles fueron calculados luego de 60 s de la adición de 0,2 mM de glucosa y para una  $C_{O_2} = 0,274$  mM. Las líneas punteadas indican los límites de la matriz enzimática.

La Figura V-19 muestra los perfiles de concentración teóricos de  $H_2O_2$  calculados a partir de un conjunto hipotético de biosensores tipo sándwich en los que el espesor es alterado gradualmente. Todas las curvas corresponden a perfiles de concentración de  $H_2O_2$  cuando el sensor ha alcanzado el estado estacionario. Para asegurar esto, las curvas fueron calculadas luego de 60 s de la adición del analito. El espesor del sensor se puede determinar observando los puntos en donde la concentración de  $H_2O_2$  llega a cero. Las curvas (a) y (a') muestran perfiles correspondientes al mismo espesor. Del análisis, es posible comprender que el tamaño y la posición del máximo en la concentración de  $H_2O_2$  cambian con el cambio en la posición de la matriz enzimática. Sin embargo, ambas curvas tendrán el mismo gradiente de concentración para el  $H_2O_2$  en la superficie del electrodo. La posición del máximo se puede asociar con el tiempo de respuesta del sensor, mientras que el gradiente de concentración determina la sensibilidad para un dado sensor. Las curvas (a) – (f) son perfiles de concentración para un conjunto de biosensores que deberían mostrar el mismo tiempo de respuesta, pero diferente valor de sensibilidad. Teniendo esto en cuenta, el

sensor de la curva f sería aquel con mayor sensibilidad, debido a que tiene el máximo gradiente de concentración de  $H_2O_2$  en la superficie del electrodo.

#### V.1.6 Análisis de muestras reales

En las secciones anteriores se ha descrito la performance y la robustez de los biosensores desarrollados. Con el objetivo de mostrar de forma más completa el desempeño, se evalúa la performance de los sensores frente a muestras reales de suero sanguíneo. Las muestras fueron provistas un hospital de la Ciudad de Córdoba dentro de viales de paredes protegidas por heparina.

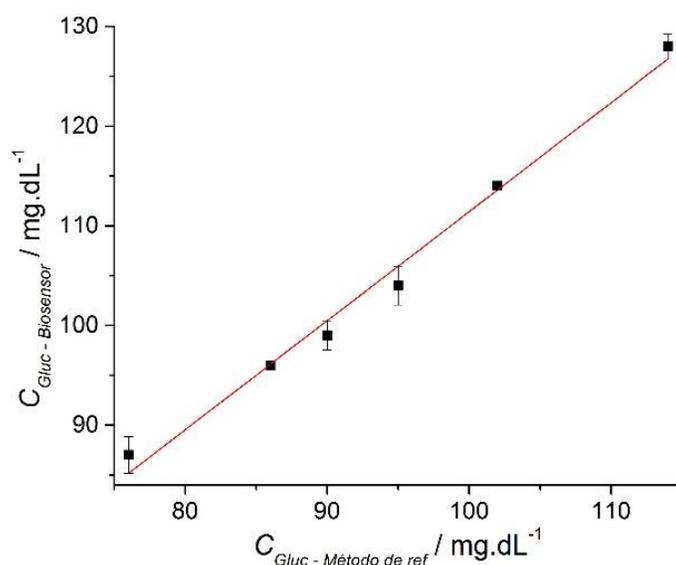


Figura V-20: Comparación del contenido de glucosa en muestras de suero, cuantificada mediante el uso de un biosensor tipo sándwich almacenado en un vial vacío por 222 días a temperatura ambiente frente a los datos suministrados por el hospital.

El gráfico de la Figura V-20 muestra la respuesta del biosensor desarrollado en comparación con el método estándar espectrofotométrico con hexoquinasa, utilizado en el hospital. El análisis de estas muestras fue realizado con un sensor de 7 meses de antigüedad, almacenado en un vial vacío a temperatura ambiente. Como se puede observar, hay muy buena correlación entre ambos conjuntos de datos. La pendiente obtenida de la regresión lineal es  $1,09 \pm 0,05$  y la dispersión de los datos es menor al 5%. El sensor utilizado fue expuesto, antes del análisis, a alrededor de 500 agregados de estándar

asociados con distintas curvas de calibración a través de 222 días. A pesar del uso, los datos obtenidos con las muestras reales satisfacen los requerimientos establecidos en la norma ISO 15197:2003<sup>122</sup>.

## V.2 Desarrollo del biosensor para la determinación de catecol

El desarrollo del biosensor para la determinación de fenoles implicó la utilización de diferentes polímeros para la construcción de las matrices como soporte enzimático, así como diferentes tipos de electrodos como transductor electroquímico. El primer intento se llevó a cabo utilizando la misma combinación de proteínas que la utilizada para el sensor de glucosa, para aprovechar la experiencia obtenida con ese sistema. Sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios hasta cambiar el electrodo de platino por uno de carbono vítreo. Aún con esta superficie de electrodo, la respuesta electroquímica de los sensores resultó ser irreproducible, lo cual fue un obstáculo importante siendo que se intentaba obtener un sensor confiable y robusto.

A partir de distintos trabajos encontrados en bibliografía<sup>105,123-125</sup> se decidió utilizar quitosán combinado con mucina en la composición de la matriz soporte. De esta forma, se desarrollaron experimentos basados en la elaboración de una serie de sensores de LAC y la obtención de su respuesta electroquímica. A continuación se presentan los resultados que permitieron obtener las condiciones óptimas de composición de la matriz, grado de entrecruzamiento y cantidad de enzima inmovilizada. También se analiza cómo afectan estos parámetros al desempeño analítico de los sensores. Sólo se muestran los estudios de las mezclas más exitosas de proteínas, vinculados a mezclas de mucina con distintas proporciones de quitosán entrecruzadas con diferente concentración de glutaraldehído.

### V.2.1 Efecto de la concentración de entrecruzante

El efecto que produce la cantidad de entrecruzante sobre la respuesta electroquímica de los sensores de LAC se ilustra en la Figura V-21. En estos experimentos se emplea una matriz muc/quit 50/50 que se mezcla con 5,33 UE de LAC. La concentración del glutaraldehído utilizado para entrecruzar cada sensor es una variable importante ya que condiciona la cantidad de enzima inmovilizada y su actividad, afectando de esta forma la sensibilidad del sensor.

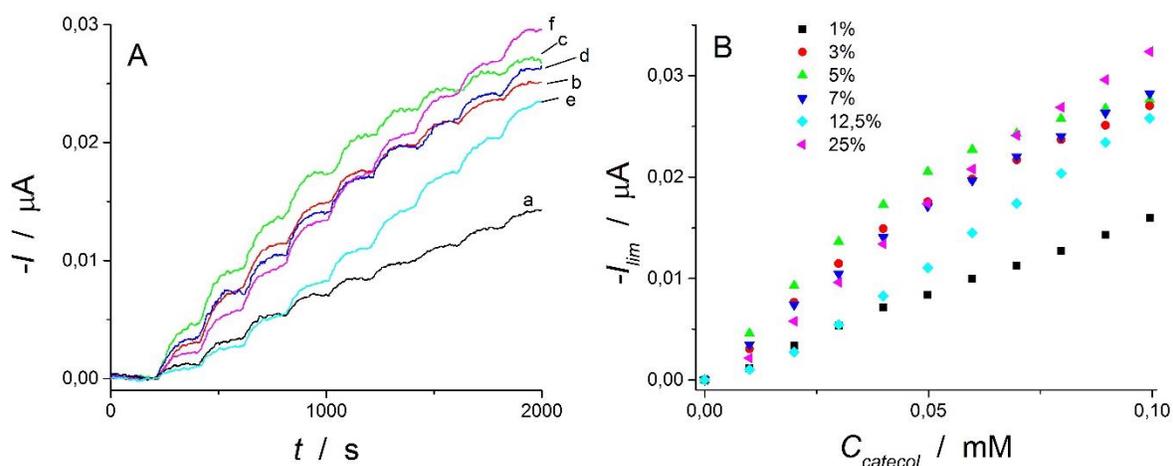


Figura V-21: (A) Perfiles cronoamperométricos para sensores con 5,33 UE de LAC en muc/quit 50/50 entrecruzada con soluciones de glutaraldehído de concentración (a) 1%; (b) 3%; (c) 5%; (d) 7%; (e) 12,5%; (f) 25%. La respuesta corresponde a agregados de 0,01 mM de catecol. (B) Curvas de calibración de cada sensor calculadas con los valores de  $I_{lim}$  correspondiente a cada agregado de solución estándar.

En la Figura V-21 (A) se grafican los transitorios de corriente cuando se realizan sucesivos agregados de 4 µl de catecol 0,01 M en la celda electroquímica, mientras que en la Figura V-21 (B) se muestran las curvas de calibración correspondientes. En este sistema se aplica un potencial de -0,2 V para que ocurra la reducción de las quinonas generadas enzimáticamente, por lo que la corriente que se registra es negativa. En el intervalo de concentración de catecol que se estudia, no se observa un comportamiento lineal de la respuesta de todos los sensores. La mayor sensibilidad de la respuesta se observa cuando se utiliza entrecruzante diluido al 5%, aunque la linealidad de esta respuesta se pierde por encima de 50 µM. Por otro lado, al observar los perfiles cronoamperométricos se puede inferir que en todos ellos se alcanza el estado estacionario a tiempos similares. La

sensibilidad y el tiempo de respuesta de los sensores se muestran en la Figura V-22. Los valores de las pendientes y su correspondiente error se muestran en la Tabla V-2. La sensibilidad de cada sensor, obtenida a partir de las pendientes de las curvas de calibración, en función de la concentración de entrecruzante se muestra en la Figura V-22 (A). A partir de este análisis se concluye que si bien la sensibilidad alcanza un máximo cuando se emplea glutaraldehído 5%, por encima de este porcentaje la sensibilidad del sensor disminuye, pero los valores de corriente límite se mantienen relativamente constantes. A su vez, para concentraciones de glutaraldehído por debajo de 3% la sensibilidad cae abruptamente. Por otra parte, a pesar de que con 3% ,7% y 25% se obtienen valores inferiores para las pendientes de curvas de calibración, el intervalo de respuesta lineal es notablemente mayor.

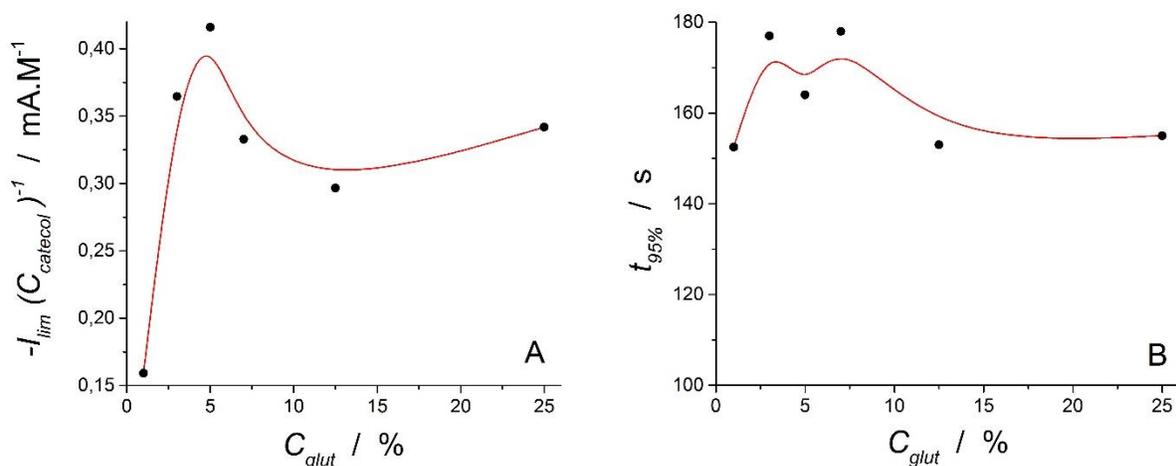


Figura V-22: Dependencia de (A) la sensibilidad ( $-I_{lim}(C_{catecol})^{-1}$ ) y (B) el tiempo de respuesta ( $t_{95\%}$ ) frente a la concentración de glutaraldehído utilizado. Sensores elaborados con 5,33 UE de GOX en una matriz muc/quit 50/50.

Tabla V-2: Pendientes de las curvas de calibración y error asociado. Sensores con 5,33 UE de LAC en matriz muc/quit 50/50.

$C_{glut} / \%$	$-I_{lim}(C_{catecol})^{-1} / \text{mA.M}^{-1}$	Error / $\text{mA.M}^{-1}$
1	0,159	0,005
3	0,36	0,02
5	0,42	0,02
7	0,33	0,01
12,5	0,30	0,01
25	0,342	0,008

La evaluación del tiempo de respuesta en función de la concentración de entrecruzante se observa en la Figura V-22 (B). A partir de este análisis queda claro que todos los sensores presentan un tiempo de respuesta similar alrededor de los 160 segundos. El estado estacionario de la corriente se alcanza con mayor rapidez cuando se utiliza 1% de entrecruzante aunque, como contrapartida, en estas condiciones la sensibilidad es mínima. La concentración de entrecruzante afecta de forma diferente a la sensibilidad y al tiempo de respuesta. Mientras el tiempo de respuesta se mantiene invariable en un cierto intervalo, la sensibilidad alcanza un máximo entre 5% y 3% de glutaraldehído.

### V.2.2 Efecto de la composición de la matriz

La evaluación del efecto de la composición de la matriz enzimática en la que se inmoviliza la enzima en función de la sensibilidad y el tiempo de respuesta del sensor resultante, se estudió modificando tanto el porcentaje en peso de cada proteína constituyente, como la concentración de glutaraldehído empleado.

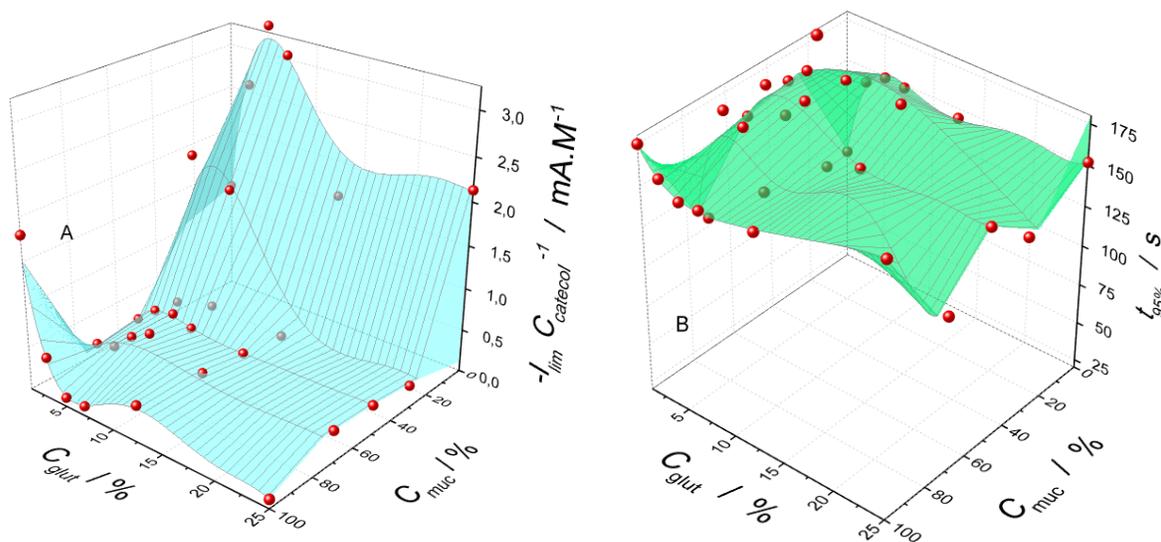


Figura V-23: Dependencia de (A) la sensibilidad ( $-I_{lim} C_{catecol}^{-1}$ ) y (B) del tiempo de respuesta ( $t_{95\%}$ ) con respecto a la concentración del glutaraldehído utilizado ( $C_{glut}$ ) y a la relación en peso mucina / quitosán ( $C_{muc}$ ) en la construcción de las matrices enzimáticas de sensores de GOX. En todos los casos se utilizó 5,33 UE de LAC por sensor.

Los valores de las pendientes de las curvas de calibración para los sensores preparados con distintas concentraciones de entrecruzante, mucina y quitosán se presentan en la Figura V-23 (A). Como puede observarse, los sensores preparados en matrices constituidas solamente por quitosán alcanzan los valores más altos de sensibilidad, independientemente de la concentración empleada de glutaraldehído. La incorporación de mucina a la matriz hace que los valores de corriente límite caigan notablemente. Cuando se utiliza 50% o más de mucina, la sensibilidad toma valores relativamente constantes para todas las concentraciones de entrecruzante evaluadas. El efecto de la concentración de glutaraldehído se hace más evidente en las matrices elaboradas con un alto porcentaje de quitosán (70% y 100%). En estos casos, se observa un máximo de sensibilidad para soluciones con concentración de glutaraldehído entre 5% y 7%. Soluciones más concentradas hacen que la sensibilidad disminuya manteniéndose en valores relativamente constantes para sensores preparados con diluciones de glutaraldehído superiores al 12%. Los resultados muestran que es necesario utilizar altos porcentajes de quitosán para que la LAC se encuentre anclada a la matriz y conserve su actividad enzimática. El quitosán resulta esencial para la composición de la matriz de los sensores de LAC, mientras que el glutaraldehído permite encontrar el punto óptimo de entrecruzamiento que maximiza la actividad de la enzima.

La escasa presencia de grupos amino en la estructura de la mucina hace que esta proteína no pueda interactuar de manera significativa durante la reacción de entrecruzamiento. Lo opuesto sucede con el quitosán, que presenta una gran densidad de grupos amino en su estructura y es el polímero más involucrado en el proceso de entrecruzamiento. Como consecuencia, aquellas matrices en las que existe alto porcentaje de mucina no estarán, posiblemente, lo suficientemente entrecruzadas como para mantener la enzima anclada en la estructura, permitiendo que ésta se escape del sensor durante el lavado o durante el uso, disminuyendo así la respuesta de corriente obtenida. Si se utilizan altos porcentajes de quitosán, se forman distintos tipos de matrices de acuerdo a la concentración de glutaraldehído que se utilice. Cuando el entrecruzante se agrega en soluciones relativamente concentradas (mayores al 7%), las matrices que se forman están

más densamente entrecruzadas, son más rígidas y al mismo tiempo se incrementan las interacciones con los grupos funcionales reactivos de la LAC, lo que inactiva a la enzima. Este efecto conjunto hace que disminuya la sensibilidad de estos sensores. Por el contrario, cuando la concentración de glutaraldehído es menor al 3%, la matriz que se forma no se encuentra lo suficientemente entrecruzada como para retener toda la LAC en su interior, y por consiguiente una parte de la enzima difunde durante el lavado y la respuesta no es la que presenta la máxima sensibilidad.

En la Figura V-23 (B) se establece la dependencia del tiempo de respuesta frente a la concentración de glutaraldehído y al porcentaje de cada macromolécula presente en los sensores de LAC. Este parámetro es un factor importante a tener en cuenta cuando se quiere determinar la composición óptima de una matriz para la construcción de sensores. Como se observa en esta figura, el comportamiento del tiempo de respuesta en función de la composición de la matriz es muy diferente al de la sensibilidad ya que no existe una zona en la que el desempeño difiera significativamente de otra. Aquellos sensores contruidos a partir de matrices con algún porcentaje de mucina en su composición, presentan tiempos de respuesta que se mantienen dentro de un cierto intervalo de valores, asemejándose a una zona de meseta. Cuando se analizan matrices con 100% de quitosán, se observan tiempos de respuesta que son levemente inferiores a los de las demás matrices. La respuesta cronoamperométrica de los sensores tiende a disminuir el tiempo de respuesta cuando la cantidad utilizada de glutaraldehído es menor al 3%. Los resultados sugieren que el tiempo de respuesta de este tipo de biosensores no depende significativamente de la concentración de entrecruzante utilizada, y que existiría una leve dependencia con la concentración de mucina en la matriz. Con respecto a este último punto, se podría decir que no conviene agregar mucina a la matriz para lograr sensores con menores valores de tiempo de respuesta.

#### *Evaluación del intervalo lineal de la respuesta*

En el estudio de las respuestas de los sensores también se determina el valor de la máxima concentración que puede ser cuantificada mientras el sensor todavía muestra

comportamiento lineal. Este valor, junto con el límite de detección, determina el intervalo lineal de la respuesta, y al igual que la sensibilidad y el tiempo de respuesta, da cuenta del desempeño de los distintos sensores construidos.

En la Figura V-24 se muestra cómo depende el intervalo lineal de la respuesta de los sensores de LAC con la composición de la matriz. En la Figura V-24 (A) y (B) se grafican las curvas de calibración de distintos sensores entrecruzados con 7% de glutaraldehído y elaborados con distinto porcentaje en peso de mucina y quitosán. Además de la diferencia en sensibilidad, se evidencia un intervalo de comportamiento lineal que es distinto para cada sensor. El máximo intervalo lineal se obtiene cuando los sensores se construyen utilizando una matriz compuesta únicamente por quitosán, Figura V-24 (C). Cuando se incorpora mucina, no sólo disminuye el intervalo lineal de la respuesta sino que también lo hace la sensibilidad. Este comportamiento es muy diferente al obtenido en la elaboración de los sensores de glucosa, en los que con el aumento de mucina en la matriz se mejora la linealidad. En este caso, el quitosán proporciona no sólo una mejor sensibilidad en la respuesta, sino también el mejor intervalo lineal. Cuando se incorpora mucina, la matriz formada no puede retener efectivamente la enzima, por lo que la poca cantidad de LAC que se inmoviliza es saturada rápidamente frente a los incrementos de catecol en la celda de reacción.

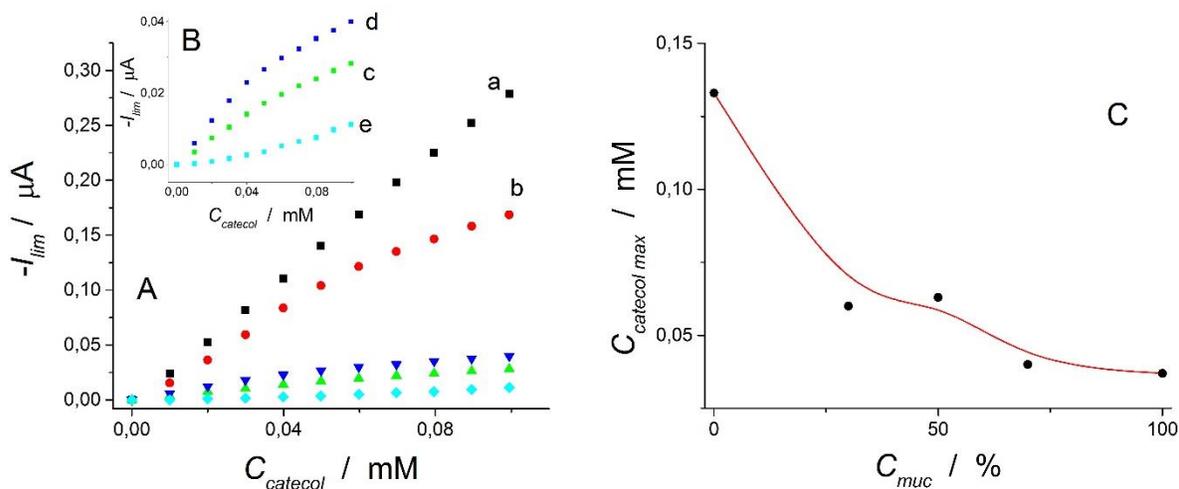


Figura V-24: (A) y (B) Curvas de calibración para sensores entrecruzados con glutaraldehído 7%, elaborados a partir de matrices enzimáticas de diferente composición: (a) quit 100; (b) muc/quit 30/70; (c) muc/quit 50/50; (d) muc/quit 70/30; (e) muc 100. Las respuestas corresponden a agregados de 0,01 mM de catecol. Sensores con 5,33 UE de LAC. (C) Máxima concentración de catecol medida con comportamiento lineal frente al porcentaje de mucina de la matriz.

### *Selección de la matriz óptima para el desarrollo analítico*

Los resultados obtenidos en estos experimentos proporcionan una herramienta para llevar a cabo la selección de la matriz óptima que permite obtener biosensores de LAC con el mejor desempeño. El análisis de manera simultánea, mediante el cálculo del cociente entre sensibilidad y tiempo de respuesta, de los datos mostrados en la Figura V-23 (A) y (B), expone claramente que el mejor sensor está conformado por una matriz de quitosán 100% entrecruzada con una solución de glutaraldehído 5%. En este sentido, el análisis de la Figura V-24 refuerza esta elección, ya que muestra que el uso de esta matriz asegura mejor comportamiento lineal frente a las demás. De esta forma se concluye que este tipo de biosensor es el que ofrecería la mejor sensibilidad, tiempo de respuesta e intervalo lineal dentro de los analizados.

#### **V.2.3 Efecto de la concentración de LAC**

Con el objetivo de evaluar el efecto que produce la cantidad de LAC utilizada sobre el desempeño de los sensores, se prepararon sensores utilizando soluciones con distinta concentración de enzima. Las respuestas cronoamperométricas de estos sensores se grafican en la Figura V-25 (A). Para este experimento, en todos los casos se utiliza una matriz compuesta únicamente por quitosán y que se entrecruza durante 5 minutos con una solución de glutaraldehído 5%. Cada adición de analito corresponde a un aumento de 0,02 mM de catecol en la solución de medida del sensor. Las curvas de calibración construidas a partir de los valores de corriente límite registrado para cada agregado de catecol, se muestran en Figura V-25 (B). Se observa que todos los sensores responden de manera lineal con la concentración de sustrato dentro del intervalo de concentración evaluado. Por el contrario, la sensibilidad y el tiempo de respuesta cambian con la concentración de enzima.

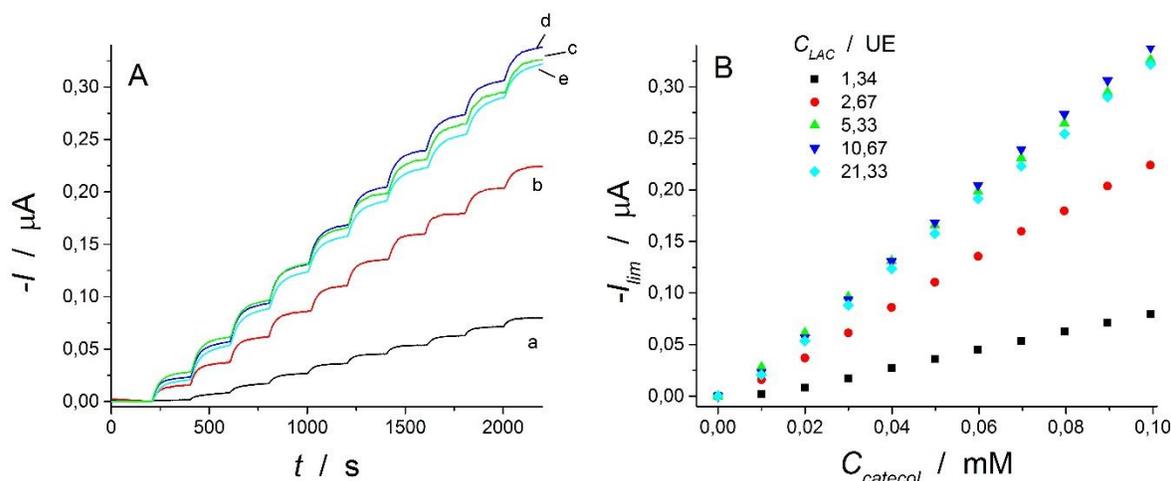


Figura V-25: (A) Perfiles cronoamperométricos para sensores preparados con: (a) 1,34 UE; (b) 2,67 UE; (c) 5,33 UE; (d) 10,67 UE (e) 21,33 UE de LAC en una matriz de quitosán entrecruzada con glutaraldehído 5%. La respuesta corresponde a agregados de 0,01 mM de catecol. (B) Curvas de calibración de cada sensor calculadas con los valores de  $I_{lim}$  correspondientes a cada agregado de solución estándar.

El análisis de la sensibilidad en función de la concentración de enzima se presenta en la Figura V-26 (A). La sensibilidad alcanzada crece a medida que aumenta la cantidad de LAC inmovilizada en la matriz, hasta que llega a un máximo cuando es igual a 5,33 UE de LAC. Por arriba de este valor, no se observa aumento en la respuesta de corriente, sino que este parámetro se mantiene prácticamente constante para los sensores construidos con mayor cantidad de enzima. La cantidad de oxígeno disuelto en el electrolito soporte se considera constante durante todo el experimento. En el momento en que se pone en contacto al sensor con la solución, el oxígeno difunde dentro de la matriz y alcanza rápidamente un equilibrio. Cuando se aumenta la cantidad de LAC inmovilizada, también aumenta la cantidad de producto generado catalíticamente, y por ello, la respuesta electroquímica que se observa. No obstante, este crecimiento de la señal está limitado por la cantidad de oxígeno que pueda difundir hasta la enzima. Este mediador difundirá desde la solución al interior del sándwich ya que constantemente es consumido por la enzima. Cuando la cantidad de LAC supera cierto límite, la respuesta electroquímica deja de crecer linealmente con la cantidad de enzima ya que se encuentra limitada por la difusión del mediador enzimático. Este comportamiento puede observarse experimentalmente en la Figura V-26 (A) y concuerda con resultados teóricos obtenidos mediante métodos de simulación numérica para sistemas como el descrito<sup>126</sup>. La desviación del comportamiento

lineal observado en la Figura V-26 (A) puede ser utilizada para estimar la cantidad de enzima activa dentro del sensor<sup>9,126</sup>.

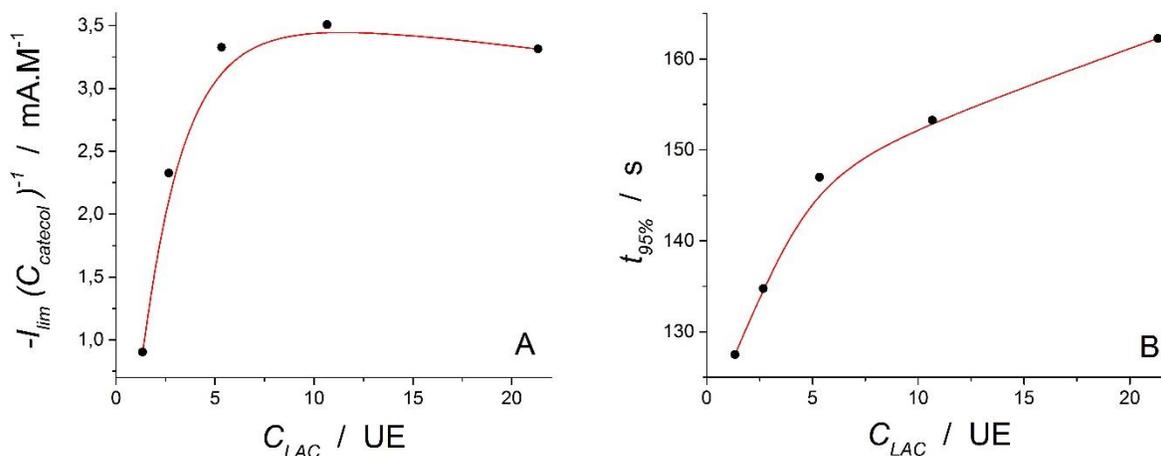


Figura V-26: Dependencia de (A) la sensibilidad ( $-I_{lim} C_{catecol}^{-1}$ ) y (B) del tiempo de respuesta ( $t_{95\%}$ ) frente a la concentración de LAC utilizada. Sensores elaborados en una matriz de quitosán entrecruzada con glutaraldehído 5%.

La evaluación del tiempo de respuesta de los sensores en función de la cantidad de LAC se muestra en la Figura V-26 (B). Se observa que a medida que aumenta el número de unidades enzimáticas inmovilizadas en la matriz se hace mayor el tiempo que le toma al biosensor alcanzar el valor de corriente límite. Cada molécula de sustrato catalizada por la enzima es reconvertida en el mismo sustrato (catecol) debido a que las quinonas generadas son reducidas sobre la superficie del electrodo. Este ciclo de realimentación hace que la cantidad de oxígeno disponible disminuya proporcionalmente más que para otros biosensores, tal como los de glucosa<sup>8,9</sup> y lactato<sup>10</sup>. Durante la etapa electroquímica de estos otros biosensores se regenera el oxígeno, no el sustrato. Esta falta de oxígeno en los sensores de fenoles hace que la respuesta se vuelva cada vez más lenta, cuando la cantidad de sustrato aumenta.

#### V.2.4 Efecto de la variación del pH de la solución

Con el objetivo de estudiar el comportamiento del sensor de LAC frente a los cambios de pH en el medio, se analiza su desempeño cuando en la celda de reacción se utiliza solución buffer de diferente pH. En este experimento, se utiliza el mismo sensor para

todos los pH evaluados. Los resultados se muestran en la Figura V-27 (A), y revelan que el sensor presenta prácticamente la misma sensibilidad dentro del intervalo de pH comprendido entre 4 y 5,5. Sin embargo, la sensibilidad cae rápidamente cuando el pH se aleja de este intervalo. Por otro lado, cuando el sensor es utilizado a pH 3 o pH 7 y luego se agrega ácido o base para retornar el sistema a pH 5, la respuesta analítica es aproximadamente la misma que la obtenida antes de cambiar el pH original desde 5 a 3 ó 7 (Figura V-27 (B)). Estos resultados demuestran que una vez que se inmoviliza la enzima en la matriz polimérica se adquiere gran robustez frente al grado de acidez del medio, no sólo manteniendo actividad maximizada dentro de un amplio intervalo de valores de pH, sino también logrando recuperar totalmente su actividad luego de ser expuesta a soluciones con pH que eventualmente podrían afectar a la enzima en solución. El método de inmovilización y el material soporte utilizado hacen posible este comportamiento.

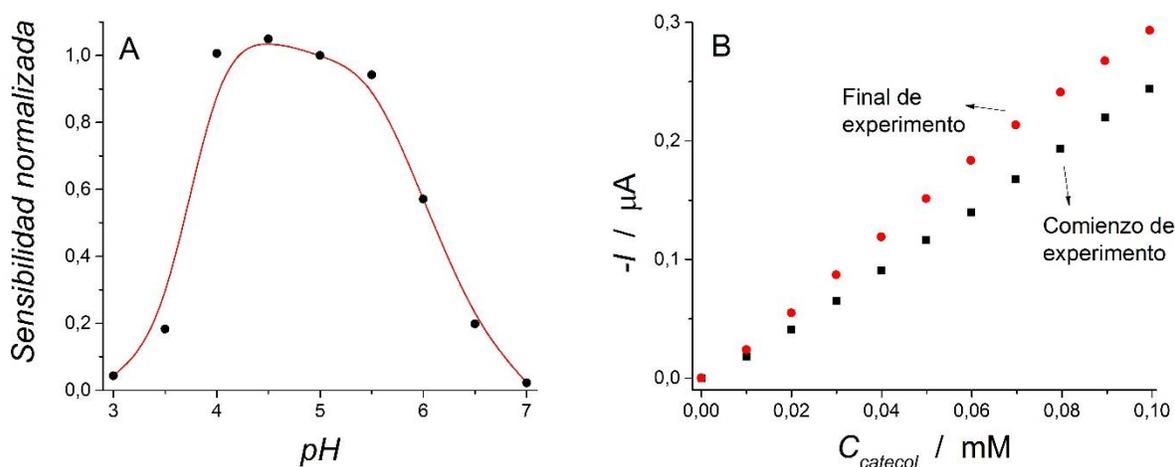


Figura V-27: (A): Sensibilidad normalizada frente a los cambios de pH del medio. (B): Curvas de calibración del sensor de LAC medidas a pH = 5 al comienzo del experimento y después de ser utilizado a pH = 3 y a pH = 7. Matriz enzimática compuesta por 5,33 UE de LAC inmovilizada en 100% quitosán con glutaraldehído 5%.

### V.2.5 Propiedades analíticas

Los experimentos desarrollados permiten determinar la composición y la cantidad óptima de entrecruzante para un sensor de catecol tipo sándwich. Las características analíticas más relevantes del biosensor tales como límite de detección, intervalo lineal, reproducibilidad y estabilidad, fueron evaluadas en sensores preparados en una matriz de quit 100 entrecruzada con glutaraldehído 5%.

### Reproducibilidad de sensor a sensor

Las respuestas cronoamperométricas de dos biosensores elaborados con la misma cantidad de LAC, pero preparados en distinto momento, a partir de dos matrices independientes de quitosán entrecruzadas con glutaraldehído 5%, se muestran en la Figura V-28 (A). Los perfiles de corriente obtenidos son muy similares entre sí. En ambos casos, la velocidad de respuesta luego de cada agregado de solución estándar es casi la misma, y se mantiene dentro de un intervalo de valores prácticamente iguales a una constante durante todo el experimento.

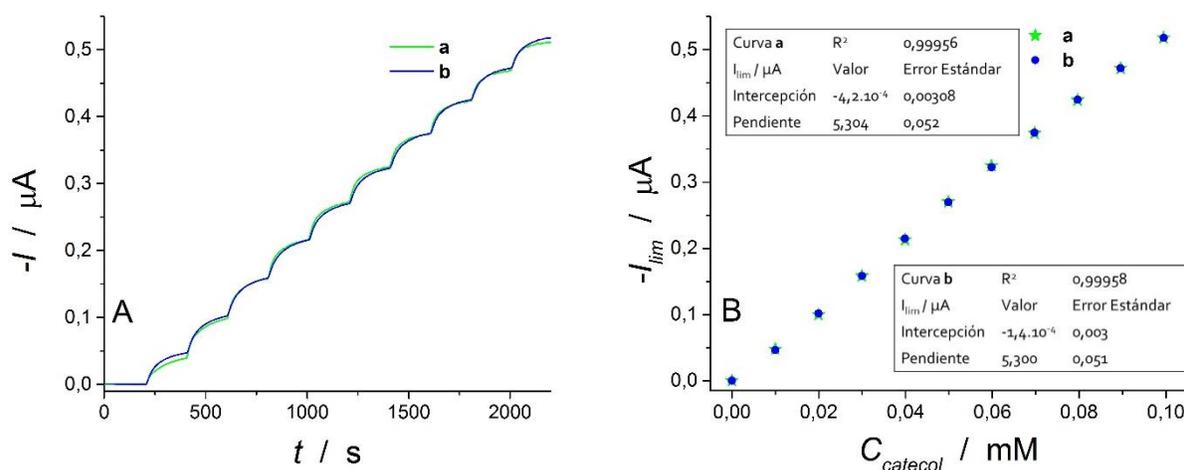


Figura V-28: (A) Perfiles cronoamperométricos de dos biosensores independientes compuestos por 5,33 UE de LAC por sensor. (B) Curvas de calibración para cada sensor calculadas tomando los valores de  $I_{lim}$ . Las respuestas corresponden a agregados de 0,01 mM de catecol. Se utiliza una matriz quit 100 con 5% de glutaraldehído.

Las curvas de calibración construidas luego de registrar el valor de corriente límite para cada agregado de solución de catecol, muestran que el desvío estándar entre ellas es menor al 1%, Figura V-28 (B). En un análisis similar, en el que se consideran cinco curvas de calibración correspondientes a cinco sensores independientes preparados con la misma matriz, se determina que la pendiente varía sólo 5% alrededor de un valor promedio de 5,2  $\text{mA} \cdot \text{M}^{-1}$ . Esto muestra la excelente reproducibilidad que se logra a partir del cuidado de las condiciones de preparación de la matriz enzimática y del ensamblado del sensor.

### Límite de detección e intervalo lineal

La Figura V-29 muestra el perfil cronoamperométrico de un biosensor tipo sándwich preparado a partir de una matriz quit 100, glutaraldehído 5% y 5,33 UE de LAC. Para la construcción de esta curva, se realizaron sucesivas adiciones de 4  $\mu\text{l}$ . La celda se llena inicialmente con 4ml de BBR pH 5 y se utilizan soluciones estándar de catecol de 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM y 10 mM, para determinar el límite de detección y el intervalo lineal del sensor. La parte (B) de la figura muestra la respuesta del sensor luego de 5 agregados de 100  $\mu\text{M}$  y 5 agregados de 1 mM de catecol. Si se tiene en cuenta el volumen de la celda y de las adiciones, el catecol de cada agregado de solución estándar se diluye 1000 veces. De este modo, el último agregado de catecol en la parte (A) corresponde a una concentración final en celda de 0,21 mM.

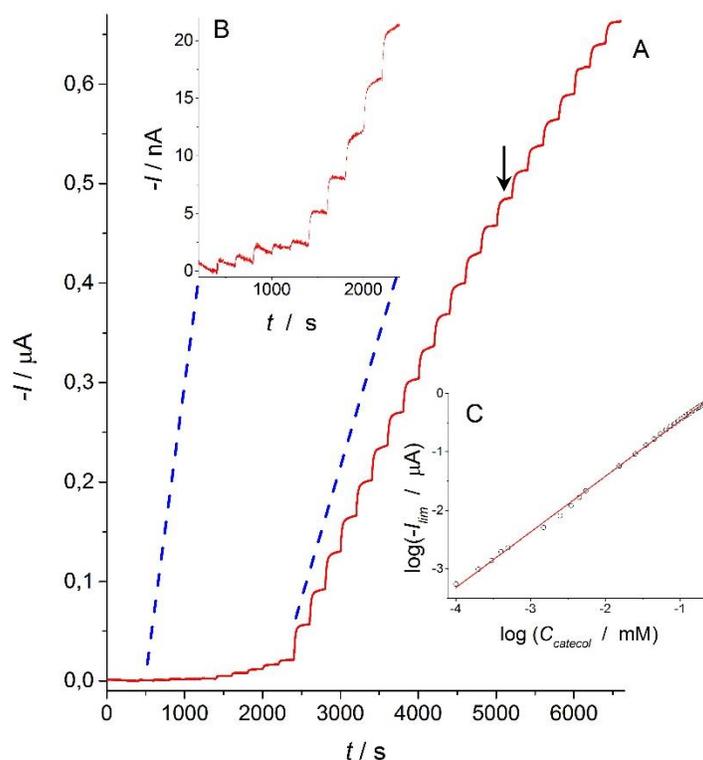


Figura V-29: (A) Perfil cronoamperométrico de un biosensor preparado con una matriz quit 100 entrecruzada con glutaraldehído 5%. Las concentraciones finales de estos registros corresponden a 5 agregados de 0,1  $\mu\text{M}$  (detalle de la respuesta en inserto (B)), 5 agregados de 1  $\mu\text{M}$  y múltiples agregados de 10  $\mu\text{M}$  de catecol. (C) Dependencia logarítmica de la corriente límite frente a la concentración de catecol

Si se calcula el valor del LOD como el triple de la desviación estándar de la señal de base sobre la pendiente de la curva de calibración (IUPAC<sup>120</sup>), se obtiene un valor de 0,45  $\mu\text{M}$ , consistente con los datos presentados en la Figura V-29. Sin embargo, esta definición no tiene en cuenta los parámetros que informan sobre la calidad del análisis de regresión lineal llevado a cabo para calcular la pendiente. El análisis de regresión lineal de los datos para una concentración de catecol por debajo de 0,14 mM (marcado con una flecha en la figura) arroja un coeficiente de correlación cuadrático ( $R^2$ ) igual a 0,9992. El cálculo del LOD de acuerdo con sugerencias del ICH<sup>121</sup>, se lleva a cabo calculando el cociente entre el triple de la desviación estándar de la intercepción del eje y la pendiente de la curva de calibración. De esta forma, el LOD arroja un valor de 0,2  $\mu\text{M}$ . Este valor es coherente con los datos de la figura y además considera el ruido instrumental de la señal analítica así como los datos obtenidos del análisis de regresión.

En el inserto (C) de la Figura V-29 se muestra la dependencia logarítmica de la corriente límite frente a los cambios de concentración de catecol en la solución. El sensor desarrollado presenta un excelente intervalo de linealidad. Específicamente, el comportamiento lineal de la  $I_{lim}$  implica más de tres órdenes de magnitud de concentración, desde prácticamente 0,1  $\mu\text{M}$  hasta más de 100  $\mu\text{M}$  de catecol.

#### V.2.6 Estabilidad del biosensor de catecol

El desempeño del sensor de LAC luego de transcurridos distintos períodos de tiempo se muestra en la Figura V-30. Para llevar a cabo esta evaluación, se preparó un sensor con 5,33 UE de LAC en una matriz quit 100 entrecruzada con 5% de glutaraldehído, y se realizó una curva de calibración mediante agregados de solución estándar de catecol. Luego del uso, se retiró el sándwich de la superficie del electrodo y se lo almacena seco a temperatura ambiente. La magnitud de la respuesta del sensor cae un poco después de su primer uso, pero luego se mantiene casi constante durante 48 días después de su preparación en los que mantiene el 75% de la sensibilidad inicial. Las curvas de calibración muestran que el sensor conserva el comportamiento lineal de la corriente frente a los incrementos de la concentración de catecol.

El registro de corriente mostrado en la parte (A) de la Figura V-30 indica que mientras más tiempo transcurre desde el armado del sensor, menos tiempo se requiere para alcanzar la corriente estacionaria. Este comportamiento se muestra más claramente en la parte (C) de la figura, donde la corriente correspondiente al segundo agregado de estándar se normaliza calculando el cociente con el valor de la corriente límite de cada registro. Si bien inicialmente el tiempo de respuesta es de 150 s, luego de tres semanas disminuye a 117,6 s y después de 48 días es de sólo 72 s. Esta característica se observó también para los sensores de glucosa, y la disminución en el tiempo de respuesta se debe al mismo fenómeno explicado anteriormente. Debido a las sucesivas deshidrataciones en las etapas del almacenamiento, y a las rehidrataciones durante los momentos de uso, la matriz enzimática difunde dentro de los poros de la membrana de policarbonato. Esto hace que disminuya la distancia efectiva que debe difundir el catecol hasta alcanzar a la enzima activa. De este modo, es menor el tiempo que le toma al sensor alcanzar el estado estacionario.

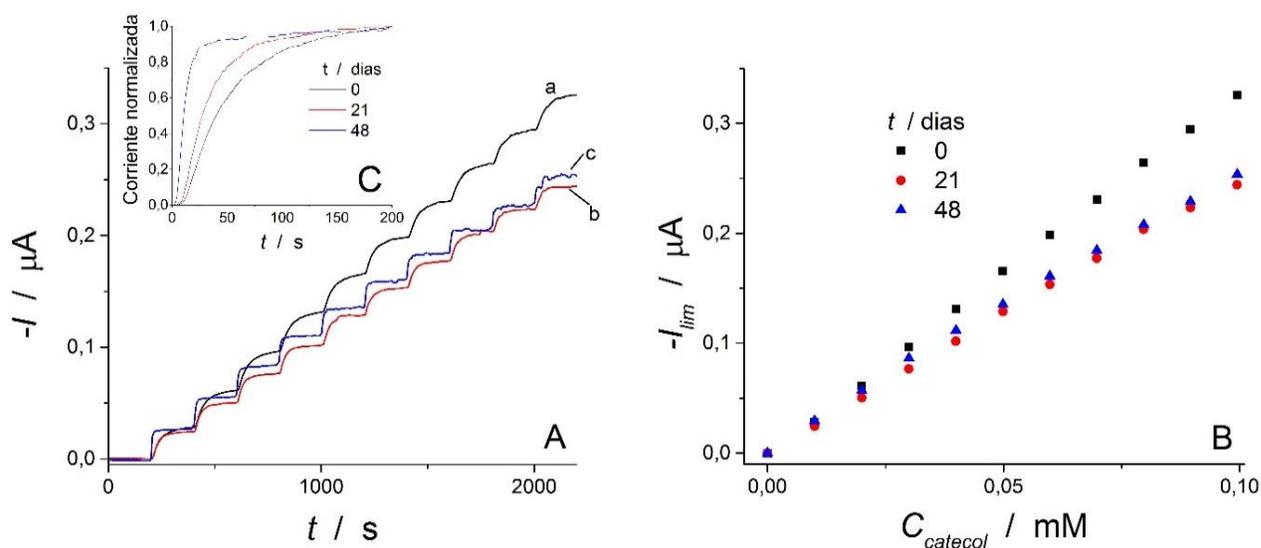


Figura V-30: Estabilidad a largo plazo de un sensor elaborado con 5,33 UE de LAC en una matriz quit 100 y 5% de glutaraldehído. (A) Respuestas cronoamperométricas (a) luego del armado del sensor, (b) 21 días y (c) 48 días después del ensamblado. (B) Curvas de calibración construidas a partir de la corriente límite de las respuestas. (C) Respuesta de corriente normalizada correspondiente al segundo agregado de solución estándar de catecol. Cada agregado corresponde a 0,01 mM de catecol en la celda de reacción.

### V.3 Determinación de parámetros fisicoquímicos de las matrices poliméricas

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las distintas matrices poliméricas que se utilizan para el desarrollo de los biosensores de GOX y LAC resulta de vital importancia para entender el papel que desarrolla cada componente de la matriz desde un aspecto distinto al puramente analítico. Poder relacionar características físicas y químicas del soporte polimérico con la magnitud y velocidad de la respuesta enzimática ayuda a entender cuáles son las condiciones de inmovilización que optimizan el desempeño de los biosensores desarrollados.

En esta sección se determinan algunas de las propiedades fisicoquímicas de las matrices de mucina, albúmina, quitosán y las mezclas con que se ha trabajado. Asimismo, se evalúa cómo afecta en el grado de entrecruzamiento de acuerdo a la concentración de glutaraldehído que se utilice.

La variación del índice de hinchamiento de los hidrogeles en función de su composición es de utilidad para evaluar el ambiente hidrofílico en el que se encuentra la enzima. La capacidad de las mezclas poliméricas para retener solvente en su estructura es una de las propiedades por la que estas estructuras funcionan adecuadamente como matrices soporte de las enzimas utilizadas. La partición del analito en un sistema heterogéneo compuesto por el hidrogel, que conforma la matriz enzimática y el electrolito soporte, se utiliza para conocer la diferencia de solvatación entre las dos fases. Los ensayos de permeabilidad permiten evaluar el coeficiente de difusión del analito dentro de la membrana sensora y conocer las propiedades de transporte de la matriz. La permeabilidad a su vez depende del grado de entrecruzamiento, la partición y el tamaño de poro de la matriz. El grado de hinchamiento también se puede relacionar con la difusión del analito dentro del polímero, mientras que la composición de la matriz influye en la permeabilidad y partición del soluto. Los ensayos reológicos se utilizan para conocer parámetros mecánicos. Éstos permiten caracterizar la cinética de entrecruzamiento, el grado de formación de la red polimérica y su influencia en la respuesta electroquímica de los biosensores.

### V.3.1 Determinación del índice de hinchamiento

Los índices de hinchamiento definen el grado de hidratación de los soportes poliméricos, con incidencia directa en el microambiente en el que se encuentra la enzima. A su vez, el volumen que ocupan los hidrogeles es variable a causa de los diferentes estados de equilibrio que se pueden establecer entre la matriz y el solvente que se utiliza. El estado de equilibrio se modifica cuando lo hacen las interacciones entre las cadenas poliméricas y el solvente, y perdura hasta que el sistema alcanza nuevamente un diferente valor de energía mínima. Un mayor índice de hinchamiento indica que las interacciones de las cadenas poliméricas con el solvente predominan por sobre las interacciones polímero – polímero y que existe menor densidad de entrecruzamiento entre las cadenas, permitiendo de este modo mayor incorporación de solvente. Se midieron los índices de hinchamiento de hidrogeles de diferente composición para analizar cómo varía este parámetro con respecto a las proporciones de mucina, albúmina y quitosán empleadas en una dada matriz enzimática.

El cambio del índice de hinchamiento ( $H_P$ ) en función del porcentaje de mucina para matrices constituidas por una mezcla muc/alb y muc/quit, se muestra en la Figura V-31. Ambos hidrogeles se prepararon disolviendo los polímeros en BBR sin embargo, la mezcla muc/alb se preparó a pH 7, mientras que en la mezcla muc/quit se utilizó buffer de pH 5. Todas las matrices se entrecruzan utilizando glutaraldehído 5%. Para las dos composiciones evaluadas, se puede observar que el hinchamiento máximo se alcanza en aquellos hidrogeles compuestos únicamente por mucina. Si bien el hinchamiento aumenta a medida que se incrementa el porcentaje de mucina, la mezcla muc/alb presenta valores relativamente similares cuando los hidrogeles se componen con menos del 70% de mucina. Por arriba de este valor, el hinchamiento se incrementa rápidamente. Este comportamiento está relacionado con la estructura de cada polímero que forma esta matriz. Por un lado, la mucina posee una capa glucídica que rodea las cadenas proteicas, en la que hay baja disponibilidad de grupos aminos secundarios. Por otro lado, la albúmina no presenta glúcidos en su estructura y tiene una capacidad relativamente alta para entrecruzarse cuando reacciona con el glutaraldehído. La presencia de lisina en su

estructura (10% del total de los aminoácidos) explica la mayor facilidad para formar redes entrecruzadas. La albúmina estabiliza la mezcla, resultando en valores de índices de hinchamiento relativamente similares cuando se encuentra presente. Por el contrario, si sólo se utiliza mucina, se constituye una red lábil capaz de incorporar mayores cantidades de solvente en su interior.

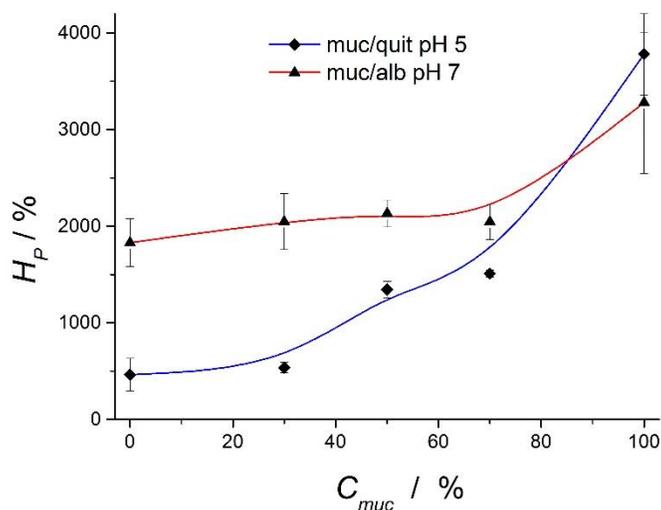


Figura V-31: Índice de hinchamiento en función de la concentración de mucina para matrices formadas por la mezcla muc/alb y muc/quit. Entrecruzamiento con glutaraldehído 5%. Las barras indican la dispersión de los resultados.

En el caso de la mezcla muc/quit se observa que cuanto mayor es la cantidad de quitosán presente en la mezcla, menor es el grado de hinchamiento alcanzado. La mucina reacciona escasamente con el glutaraldehído, por lo que participa en menor medida en el proceso de entrecruzamiento. Sin embargo, a medida que aumenta la cantidad de quitosán en el hidrogel, aumenta la densidad de entrecruzamiento debido a la cantidad de grupos amino presentes en el polímero. Por ello, cuando se incorpora mucina, la densidad de entrecruzamiento disminuye y la red se hace más laxa permitiendo que el hinchamiento aumente. El comportamiento no lineal que se observa para esta mezcla indica que pueden existir enrollamientos entre las cadenas de mucina y quitosán. Esto se sustenta en el hecho de que a pH 5 la mucina se comporta como un polielectrolito aniónico, mientras que el quitosán es un polielectrolito catiónico favoreciendo que se establezcan interacciones electrostáticas entre ellos.

### V.3.2 Coeficiente de partición del soluto

El modo en que se distribuye el soluto en un biosensor tipo sándwich depende de múltiples factores, siendo la carga de cada uno de los componentes del sistema, uno de los elementos más influyentes. La molécula de glucosa, analito utilizado para el sensor de GOX, no posee carga neta a pH 7. Lo mismo sucede a pH 5 con el catecol, analito del sensor de LAC, ya que presenta un  $pK_a = 9,48$ . Estos dos compuestos muestran alta solubilidad en medios acuosos y presentan densidad similar, a pesar de que la masa molecular de la glucosa es algo mayor a la del catecol. Sin embargo, debido a que el catecol absorbe radiación dentro del espectro UV-Vis, se utiliza este compuesto como analito para la medición de la partición para las matrices muc/alb a pH 7 y muc/quit a pH 5.

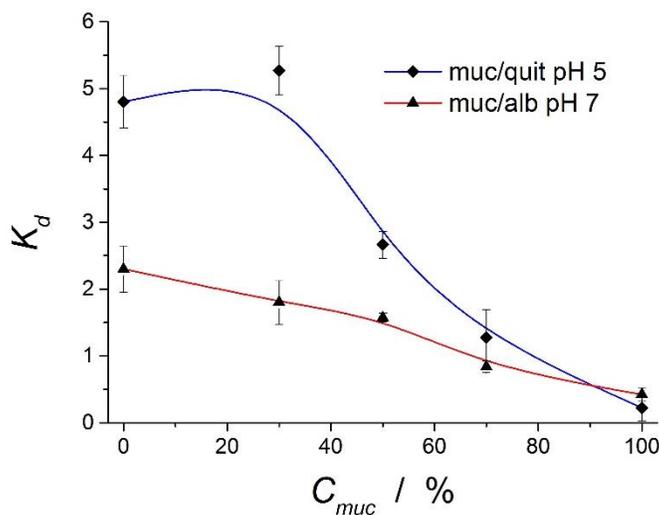


Figura V-32: Cambio del coeficiente de partición de catecol en función de la concentración de mucina para matrices formadas por la mezcla muc/alb y muc/quit. Entrecruzamiento con glutaraldehído 5%. Las barras indican la dispersión de los resultados.

En la Figura V-32 se muestra cómo varía el coeficiente de partición ( $K_d$ ) del catecol en función del porcentaje de mucina para diferentes matrices de muc/alb y muc/quit. Ambos conjuntos de hidrogeles se preparan disolviendo la mezcla en BBR, a pH 7 para muc/alb y a pH 5 para muc/quit. Todas las matrices se entrecruzan utilizando glutaraldehído 5%.

El coeficiente de partición disminuye a medida que aumenta el porcentaje de mucina, ya sea que se encuentre mezclada con albúmina o con quitosán. En matrices

elaboradas únicamente con mucina se observa que el coeficiente toma valores menores a la unidad. Esto significa que el analito se encuentra más concentrado en el electrolito soporte que dentro del sensor. En la mezcla muc/alb,  $K_d$  crece casi linealmente con el incremento de la cantidad de albúmina, es decir que el analito aumenta su preferencia por la matriz. Si se evalúa la mezcla muc/quit,  $K_d$  crece de manera constante hasta el 50% de mucina en la matriz. Cuando el hidrogel se prepara con más del 70% de quitosán, el coeficiente de partición se mantiene relativamente constante, indicando que la preferencia del catecol por la matriz frente al electrolito soporte no se modifica significativamente por pequeños cambios en la composición de un hidrogel de quitosán.

### V.3.3 Análisis del coeficiente de difusión

La determinación del coeficiente de difusión ( $D$ ) dentro de la matriz enzimática ayuda a entender los fenómenos de transporte del analito dentro del sándwich. En la Figura V-33 se observa la variación de  $D$  para catecol cuando cambia el porcentaje de mucina en hidrogeles formados por muc/alb a pH 7 y muc/quit a pH 5. El entrecruzamiento se produce con el agregado de una solución de glutaraldehído 5%. Como se explicó, el catecol es el analito utilizado para las determinaciones en ambos sistemas ya que puede ser analizado más fácilmente mediante espectrofotometría UV-Vis. A los valores de pH en que se realizan los ensayos, esta molécula se encuentra sin carga neta. Además, en solución acuosa tiene dimensiones y coeficiente de difusión semejantes a los de la glucosa.

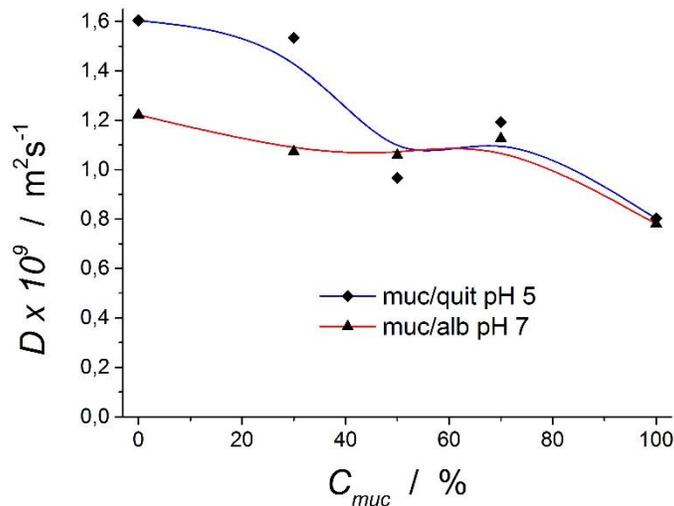


Figura V-33: Cambios en el valor de coeficiente de difusión de catecol en función de la concentración de mucina para matrices formadas por mezclas de muc/alb y muc/quit. Entrecruzamiento con glutaraldehído 5%.

En el sistema formado por la mezcla de mucina y albúmina se muestra que el coeficiente de difusión toma valores muy similares cuando la matriz contiene al menos 30% de albúmina en su composición. Por el contrario, el valor de  $D$  cae cuando el hidrogel sólo está formado por mucina entrecruzada. De aquí se desprende que el  $D$  de catecol se estabiliza cuando se incorpora albúmina en la matriz. La mezcla muc/quit, por otro lado, tiene un comportamiento distinto. La difusión del catecol se ve un poco más favorecida con respecto al sistema muc/alb. Los valores de  $D$  crecen con el aumento en la cantidad de quitosán presente, y se observa un máximo valor en la difusión de catecol en la matriz quit 100. Cuando la concentración de mucina es igual o mayor que el 50%, se puede decir que el valor de  $D$  para catecol no cambia tanto en presencia de albúmina o quitosán en la matriz. Como puede observarse en la figura, el  $D$  para catecol depende casi exclusivamente de la concentración de mucina cuando su porcentaje en el hidrogel supera el 50%, ya que no se observa una diferencia significativa entre las matrices preparadas con albúmina a pH 7 o quitosán a pH 5. Otro punto interesante que se puede destacar cuando se tiene en cuenta el valor de pH, es que a valores de pH 5 y 7 la medida de  $D$  para catecol arrojó el mismo valor en matrices constituidas por 100% de mucina. Esto se debe a que la mucina es aniónica a ambos valores de pH y por consiguiente no modifica su estructura ni sus propiedades. Un resultado curioso que se obtuvo a partir de este estudio, es que para

ambos conjuntos de hidrogeles el coeficiente de difusión aumenta cuanto menor es el hinchamiento de la matriz. Esto implicaría que tanto con albúmina como con quitosán se obtienen hidrogeles con cierta estructura porosa por la que pueden transportarse los analitos, mientras que la mucina presentaría una disposición más abierta y amorfa, sin definir poros para el transporte de especies solubles.

### V.3.4 Permeabilidad

La permeabilidad de una matriz al paso de un soluto, está determinada por los coeficientes de difusión y de partición de ese soluto en la matriz analizada. Este valor indica no sólo la facilidad de una molécula para ingresar dentro de la matriz, sino que también muestra la capacidad de la matriz para liberar al soluto una vez que ha difundido en el hidrogel.

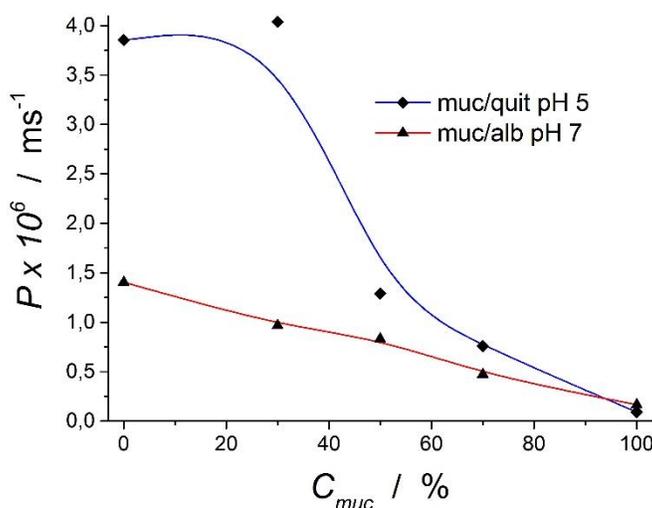


Figura V-34: Permeabilidad de catecol en función de la concentración de mucina para matrices formadas por la mezcla muc/alb y muc/quit. Entrecruzamiento con glutaraldehído 5%.

El cambio de la permeabilidad (P) de catecol, soluto que permite el seguimiento mediante UV – vis, en función del porcentaje de mucina para las matrices constituidas por muc/alb y muc/quit, se muestra en la Figura V-34. Allí se observa una tendencia similar a la encontrada para D. Cuando las matrices están formadas por 100% de mucina, la permeabilidad es la misma para ambos sistemas y toma un valor mínimo. A medida que disminuye la cantidad de mucina, P aumenta de manera lineal para la mezcla muc/alb. Para

este sistema se concluye que el catecol particiona y difunde de mejor manera cuando la matriz está compuesta por mayor cantidad de albumina. En la mezcla muc/quit, por otro lado, la permeabilidad se ve ampliamente favorecida cuando se incrementa la cantidad de quitosán por arriba del 50%. Esto indica que no sólo el ingreso del catecol se encuentra favorecido en estas matrices, sino también que puede ser liberado fácilmente de ellas.

### V.3.5 Propiedades reológicas de las mezclas de polímeros

Los estudios reológicos permiten la evaluación de la viscoelasticidad de las diferentes matrices poliméricas preparadas. El comportamiento mecánico depende de las macromoléculas que se seleccionen para formar la matriz, así como de la concentración de glutaraldehído utilizada en la reacción de entrecruzamiento. La estabilidad y reproducibilidad del soporte de inmovilización de las enzimas influirá en el desempeño de los sensores elaborados. Por ello, los resultados obtenidos se relacionan con la respuesta analítica de los biosensores preparados bajo las condiciones evaluadas.

#### *Mezcla de mucina y albúmina*

En la Figura V-35 se muestra el cambio del componente elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en función del tiempo, para matrices compuestas por 30% de mucina, 70% de albúmina y diferentes concentraciones de glutaraldehído. Como puede verse, la concentración de entrecruzante produce notables cambios en la rigidez de las matrices, tanto en el componente elástico como en el viscoso. El aumento en la concentración de glutaraldehído produce un incremento importante tanto en  $G'$  como en  $G''$ .

En todos los casos los cambios que ocurren debido al agregado de glutaraldehído son muy importantes. Esta afirmación también es válida para el comportamiento cinético de las matrices con  $C_{glut} = 1\%$  y  $C_{glut} = 0\%$  que, si bien parecen tener tendencias muy similares, al comienzo del experimento su componente líquida se incrementa casi un 100% debido al agregado de entrecruzante diluido al 1% mientras que su componente sólida lo hace en un 200%. Un aspecto que resulta curioso en estas curvas se observa en el comportamiento cinético de la matriz con  $C_{glut} = 0\%$ , ya que sus componentes simplemente

crecen debido a un mayor ordenamiento entre sus cadenas poliméricas y por consiguiente a una mayor interacción entre ellas. Luego de los 1800 s del experimento, tiempo suficiente para que sus cadenas se hayan acomodado, las componentes líquidas de las matrices con  $C_{glut} = 1\%$  y  $C_{glut} = 0\%$  son muy similares. No obstante, todavía existe casi un 100% de diferencia entre sus componentes sólidas.

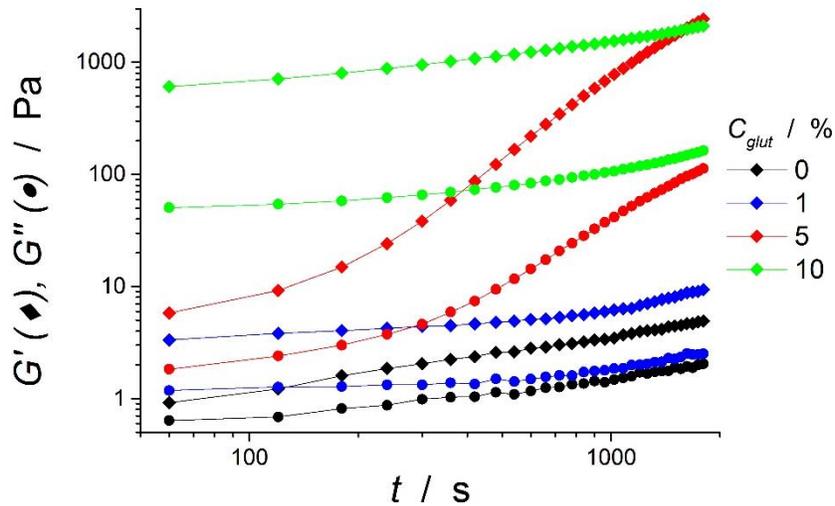


Figura V-35: Cambios de los componentes sólido ( $G'$ ) y líquido ( $G''$ ) en función del tiempo, para matrices muc/alb 30/70 entrecruzadas con soluciones de glutaraldehído de distinta concentración: 0% (negro), 1% (azul), 5% (rojo) y 10% (verde). Placas paralelas de 25 mm de diámetro, perturbación sinusoidal,  $f = 1$  Hz,  $1^\circ$ , gap 0,500 mm y  $20^\circ\text{C}$ .

Los cambios son mucho más importantes cuando se incrementa la concentración de glutaraldehído a 5% y 10%. En estos casos la interacción física entre cadenas poliméricas se torna menos relevante y prevalecen los enlaces químicos que se producen. Particularmente, si se comparan los valores que toman el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida de las curvas para  $C_{glut} = 10\%$  y  $C_{glut} = 5\%$ , se puede notar cierta conexión en el comportamiento observado en cada caso. A pesar de que sus valores son muy diferentes al comienzo del experimento, al finalizar el ensayo  $G'$  y  $G''$  toman valores similares para ambas concentraciones de glutaraldehído. En el caso de  $C_{glut} = 10\%$ , sus módulos no varían sustancialmente en el tiempo y una vez que se agrega el entrecruzante la matriz adquiere casi instantáneamente sus propiedades finales. Por otro lado, cuando  $C_{glut} = 5\%$ , la matriz presenta un cambio en sus propiedades reológicas a medida que transcurre el tiempo de ensayo, volviéndose proporcionalmente mucho más rígida que a tiempo cero.

Los efectos que producen las variaciones del porcentaje en peso de cada polímero y de la concentración de glutaraldehído en las propiedades reológicas de cada matriz se estudia llevando a cabo un análisis como el de la Sección V.2.2 para cada una de las combinaciones. La Figura V-36 muestra cómo varían  $G'$  y  $G''$  en función de los porcentajes de mucina, albúmina y glutaraldehído utilizados para preparar las distintas matrices. Para esto, se toman los valores de los módulos elástico y viscoso al final del ensayo reológico ( $t = 1800$  s).

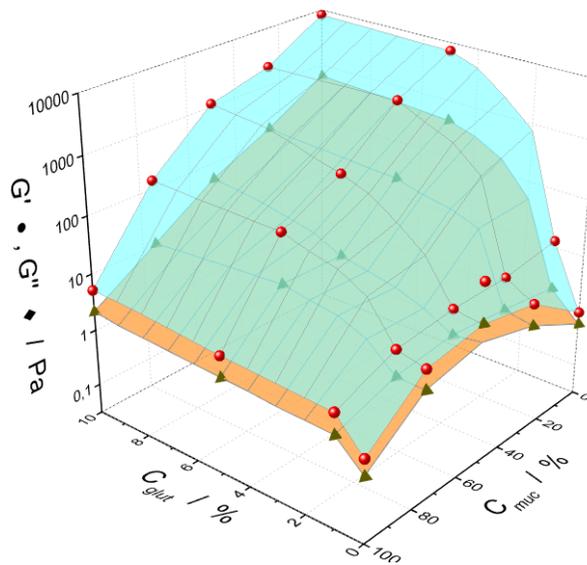


Figura V-36: Dependencia del módulo elástico ( $G'$ ) y del módulo viscoso ( $G''$ ) con respecto a la concentración de glutaraldehído utilizado ( $C_{glut}$ ) y a la relación en peso mucina / albúmina ( $C_{muc}$ ) en la preparación de las matrices proteicas. Placas paralelas de 25 mm de diámetro, perturbación sinusoidal,  $f = 1$  Hz,  $1^\circ$ , gap 0,500 mm y  $20^\circ\text{C}$ .

Lo primero que se observa al analizar la Figura V-36 es que en todas las condiciones evaluadas, independientemente de  $C_{muc}$  y de  $C_{glut}$  el módulo elástico es más grande que el módulo viscoso. Si se presta atención al gráfico para  $C_{glut} = 0\%$ , puede verse que  $G'$  y  $G''$  presentan valores máximos cuando la mezcla se prepara con muc/alb 50/50, y que estos valores son mínimos cuando está presente sólo uno de los polímeros. Esto se debe a que existe un entrecruzamiento físico a causa de interacciones secundarias entre las cadenas de las macromoléculas y alcanza un máximo de sinergismo reológico cuando se encuentran en la misma proporción.

Las matrices preparadas con baja concentración de glutaraldehído y sin la presencia de albúmina son aquellas que muestran los valores de  $G'$  y  $G''$  más bajos. Por el contrario, el aumento tanto de la concentración de entrecruzante como en la de albúmina hace que las matrices se vuelvan más rígidas. Esto se debe a las características estructurales de cada polímero que forma el hidrogel. La mucina posee baja disponibilidad de grupos amino en su estructura externa, mientras que la albúmina tiene mayor presencia de lisina que le otorga capacidad para entrecruzarse al reaccionar con el glutaraldehído. La mayor presencia de este último facilita la formación de enlaces covalentes entre las cadenas que rigidizan la estructura formada.

Como puede observarse en la Figura V-36, cuando el porcentaje de glutaraldehído es de 5% o superior, los valores de los módulos de almacenamiento y de pérdida se mantienen relativamente constantes independientemente del porcentaje de mucina utilizado. Esto es debido a que en todos los casos han transcurrido 1800 s desde el agregado del entrecruzante y el comportamiento cinético de los ensayos reológicos para el resto de las matrices fue muy similar al mostrado para la mezcla muc/alb 30/70 (Figura V-35). Es decir que en todo los casos, las mezclas entrecruzadas con  $C_{glut} = 10\%$  y con  $C_{glut} = 5\%$  alcanzan al final de cada experimento valores similares en cada una de sus componentes  $G'$  y  $G''$ .

#### *Mezcla de mucina y quitosán*

Los cambios de los componentes elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en función del tiempo, para matrices compuestas por 50% de mucina, 50% de quitosán y diferentes concentraciones de glutaraldehído se muestran en la Figura V-37. De manera similar al comportamiento encontrado para las mezclas de muc/alb, la concentración de entrecruzante produce importantes cambios en la respuesta reológica, tanto en el módulo de almacenamiento como en el de pérdida. A medida que aumenta la concentración de glutaraldehído, las matrices preparadas presentan mayores valores de  $G'$  y  $G''$ . En todos los casos evaluados, al inicio del experimento se observa que el componente elástico es mayor al viscoso lo que significa que las matrices poseen cierto grado de entrecruzamiento.

Curiosamente, la magnitudes de  $G'$  y  $G''$  no se modifican sustancialmente con el paso del tiempo. En todos los casos se observa que los valores al final del ensayo son similares a los de tiempo cero. Independientemente de  $C_{glut}$ , una vez que se agrega el entrecruzante a la mezcla polimérica ésta adquiere casi instantáneamente sus propiedades finales y por consiguiente se observan valores casi constantes en las medidas de cinética de entrecruzamiento. Las curvas para  $C_{glut} = 10\%$  y  $C_{glut} = 5\%$  son muy similares entre sí, tanto para  $G'$  como para  $G''$ . Esto se observa particularmente al finalizar cada uno de los ensayos, lo que indica que en cada una se llegaría a un entrecruzamiento máximo, y mayores concentraciones de glutaraldehído no modificarían en gran medida las respuestas. El resultado para  $C_{glut} = 0\%$ , donde el componente elástico es más importante que el líquido aun cuando no se ha incorporado entrecruzante en la mezcla, indica que existe una interacción física entre las macromoléculas. No obstante, de acuerdo a los valores observados, las fuerzas intervinientes serían más leves que en el caso de las mezclas de mucina y albúmina.

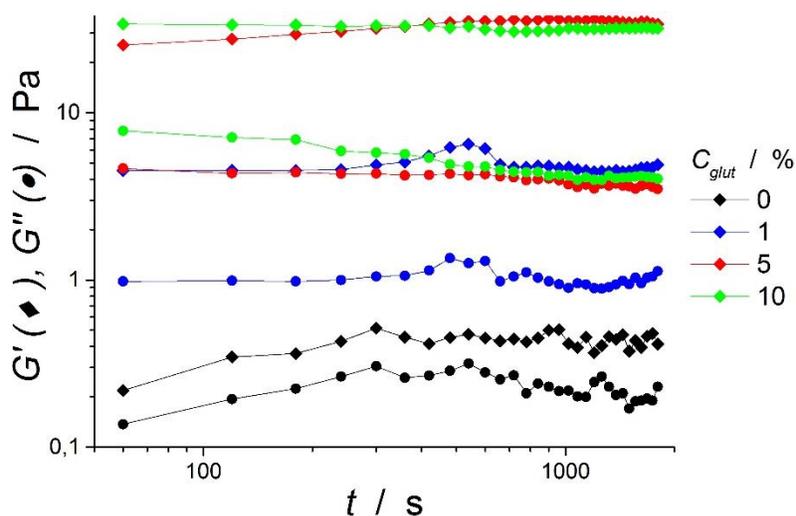


Figura V-37: Componente sólido ( $G'$ ) y componente líquido ( $G''$ ) en función del tiempo, para matrices muc/quit 50/50 entrecruzadas con soluciones de glutaraldehído de distinta concentración: 0% (negro), 1% (azul), 5% (rojo) y 10% (verde). Placas paralelas de 25 mm de diámetro, perturbación sinusoidal,  $f = 1$  Hz,  $1^\circ$ , gap 0,500 mm y  $20^\circ\text{C}$ .

Para conocer el efecto de la variación del porcentaje en peso de cada polímero y de la concentración de glutaraldehído en las propiedades reológicas de la matriz, es necesario llevar a cabo un estudio como el de la Figura V-36 donde se tienen en cuenta las distintas combinaciones. En la Figura V-38, se muestra la variación de  $G'$  y  $G''$  en función de

los porcentajes de mucina, quitosán y glutaraldehído utilizados para preparar las distintas matrices. En este caso, se grafican los valores de los módulos elástico y viscoso una vez que concluye el ensayo reológico.

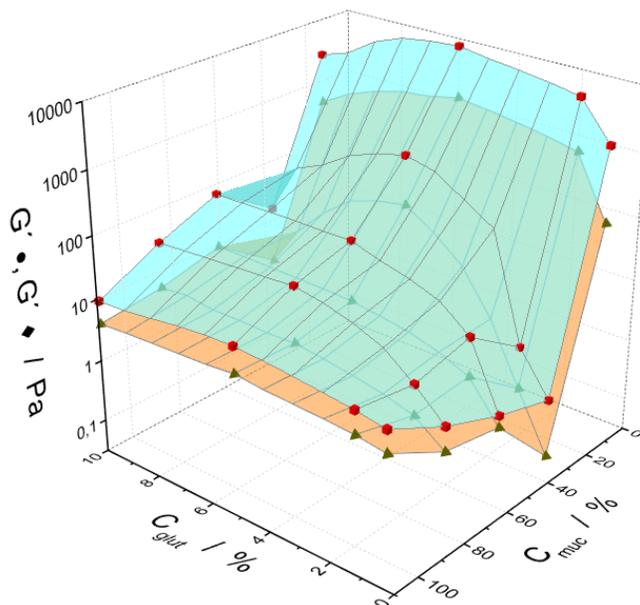


Figura V-38: Dependencia de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) con respecto a la concentración del glutaraldehído utilizado ( $C_{glut}$ ) y a la relación en peso mucina / quitosán ( $C_{muc}$ ) en la preparación de las matrices proteicas. Placas paralelas de 25 mm de diámetro, perturbación sinusoidal,  $f = 1$  Hz,  $1^\circ$ , gap 0,500 mm y  $20^\circ\text{C}$ .

La Figura V-38 revela que se forman matrices más rígidas cuando sólo se utiliza quitosán con glutaraldehído en la composición de la muestra. Por otro lado, a diferencia de lo observado en el sistema muc/alb, los valores de  $G'$  y  $G''$  disminuyen cuando se realizan mezclas de las componentes sin agregar glutaraldehído. Esto significa que las macromoléculas no se estarían entrecruzando y minimizan su interacción física. Este es un resultado curioso ya que, como se dijo anteriormente, la mucina tiene carga negativa mientras que el quitosán estaría cargado positivamente al pH de trabajo. Aparentemente ambas macromoléculas mantendrían su interacción con los iones que las rodean en lugar de interactuar entre sí. Además, los mínimos en las componentes elástica y viscosa se observan cuando la relación en peso de las macromoléculas es 30% de mucina con 70% de quitosán. Esta proporción produciría la máxima repulsión entre las cadenas de las macromoléculas. El quitosán 100% sin glutaraldehído es notablemente más rígido que soluciones equivalentes de mucina o albúmina. Aparentemente el agregado de mucina

perturba significativamente las interacciones intramoleculares de quitosán. Cuando se agrega glutaraldehído, el entrecruzamiento físico tiene menor incidencia y generalmente se observa un incremento en los valores de  $G'$  y  $G''$ . Si bien se observan ciertas variaciones en las componentes viscoelásticas de la matriz con 30% de mucina, las demás muestran, particularmente para  $C_{glut} > 5\%$ , que se mantienen constantes los módulos de  $G'$  y  $G''$ . Esto indica que con  $C_{glut} = 5\%$  se logra el máximo entrecruzamiento posible para cada una de estas matrices. El uso de mayores concentraciones de glutaraldehído sólo afectaría a la inmovilización de la enzima que se incorpora en la matriz, sin elevar el grado de entrecruzamiento de la misma.

El aumento en la concentración de glutaraldehído y en la fracción porcentual de quitosán rigidiza las matrices. Este comportamiento indica que, a pesar de que las macromoléculas preferirían no interactuar entre ellas, las mismas se entrecruzan en presencia de glutaraldehído. Esto significa que o bien las moléculas de mucina reaccionan químicamente con el entrecruzante en uno o más puntos de unión, o bien quedan atrapadas entre las uniones que va formando el glutaraldehído con los grupos aminos de quitosán.

#### *Parámetros fisicoquímicos en función de propiedades reológicas*

La dependencia del valor del coeficiente de difusión de catecol en función del módulo elástico de las matrices se muestra en la Figura V-39 (A). Las matrices fueron entrecruzadas con glutaraldehído 5% y se emplearon diferentes porcentajes de mucina y albúmina o quitosán. Tanto para la mezcla muc/alb como para muc/quit, el coeficiente de difusión para el catecol aumenta a medida que las matrices se vuelven más rígidas. En ambos casos, la rigidez se debe a la disminución del porcentaje en peso de mucina en el hidrogel. Para el caso de muc/alb, el valor de  $D$  crece 50% cuando la composición del hidrogel pasa de estar constituida totalmente por mucina a estar formada solamente por albúmina, mientras que en el caso de las matrices muc/quit el valor de  $D$  también crece con la disminución de mucina pero en este caso el incremento es del 100%. En ambos casos, el

aumento en la rigidez es proporcional a los incrementos en  $D$  y por consiguiente, a la disminución de mucina en la matriz.

Estos resultados indican que aquellas matrices con mayor entrecruzamiento, formarían una estructura porosa más estructurada que facilitaría los procesos difusionales. Por el contrario, las mezclas menos rígidas dificultarían la difusión y no presentarían la estructura permeable dada por el entrecruzamiento.

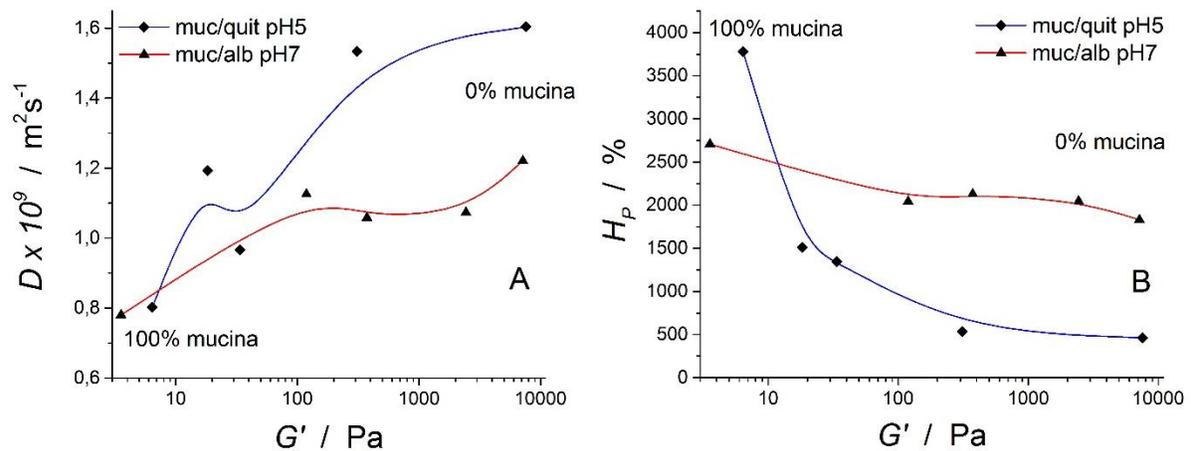


Figura V-39: (A) Coeficiente de difusión ( $D$ ) en función del valor del módulo elástico ( $G'$ ). (B) Índice de hinchamiento ( $H_p$ ) versus el módulo elástico ( $G'$ ). Matrices formadas por la mezcla muc/alb y muc/quit, entrecruzadas con glutaraldehído 5%.

En Figura V-39 (B) se muestra cómo cambia el índice de hinchamiento en función del módulo elástico, para matrices preparadas con glutaraldehído 5% y diferentes porcentajes de muc/alb o muc/quit. Ambas mezclas disminuyen sus valores de  $H_p$  a medida que aumenta la rigidez de la matriz, lo que ocurre como consecuencia de la disminución del porcentaje de mucina en la composición de cada hidrogel. En este sentido es importante notar que el aumento en el módulo elástico de ambas matrices crece casi 1000 veces a medida que disminuye el porcentaje de mucina en la matriz. Para la mezcla de muc/alb, el valor de  $H_p$  disminuye casi 50% entre una matriz constituida sólo por mucina y otra preparada únicamente con albúmina. Mientras que en el caso de las matrices muc/quit, la disminución de  $H_p$  es cercana al 800% si se comparan las matrices de sus componentes puros. Si bien el módulo elástico aumenta casi 50 veces cuando la composición de la matriz cambia de muc/quit 30/70 a muc/quit 0/100, los valores de  $H_p$  y  $D$  no varían significativamente. Esto indicaría que el empleo de quitosán 100% permite un mayor

entrecruzamiento que principalmente rigidiza la matriz, pero donde la presencia de pequeñas fracciones de mucina no afectaría a la difusión de sustratos ni a la capacidad de hinchamiento del hidrogel. Por el contrario, sólo agregando un 30% de quitosán en la matriz se afecta notablemente la capacidad de hinchamiento de una matriz de mucina.

Como es de esperar, aquellas matrices que se entrecruzan en mayor proporción, serán más rígidas y podrán incorporar menor cantidad de solvente. Las cadenas poliméricas presentan múltiples puntos de anclajes unas a las otras, formando un hidrogel con características más rígidas, que presentaría mayor porosidad, pero limitando la incorporación de solvente y, de esta forma, el hinchamiento que puede alcanzar.

#### V.4 Propiedades fisicoquímicas y desempeño analítico

Los sensores construidos para la determinación de glucosa poseen apropiada respuesta analítica cuando se entrecruza GOX en matrices compuestas por una mezcla de 30% de mucina y 70% de albúmina. Por otro lado, los sensores de catecol muestran mejor desempeño analítico cuando se inmoviliza LAC en una matriz compuesta únicamente por quitosán entrecruzado. Para poder comprender las diferencias entre las respuestas electroquímicas obtenidas, se compara la sensibilidad y el tiempo de respuesta de los biosensores con las propiedades fisicoquímicas de las matrices utilizadas, y de esta forma se pretende conocer o interpretar el funcionamiento del sistema utilizado desde un enfoque menos empírico. Los experimentos desarrollados buscaron entender el comportamiento analítico de los electrodos teniendo en consideración los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles.

La respuesta electroquímica de un biosensor amperométrico depende en esencia de mantener a la enzima activa una vez que se la ha inmovilizado en el soporte polimérico. La eficiencia de la interacción enzima – sustrato obedece no sólo a la actividad de la enzima sino también a la óptima disponibilidad del analito. Por ello es muy importante tener en cuenta los factores estructurales de la matriz y del medio que actúan sobre la enzima, el

sustrato y el mediador enzimático, ya que todos ellos repercutirán en la respuesta analítica del sensor.

La facilidad de un sustrato para incorporarse a un polímero depende de la permeabilidad que presente esa matriz frente a ese sustrato (coeficiente de partición), de la difusión a través del polímero, y de su capacidad para salir de él. Los procesos difusionales son complejos y tienen lugar en las regiones ocupadas por agua delimitadas por el polímero<sup>39,127</sup>. Las regiones acuosas pueden no estar bien definidas en sistemas relativamente amorfos donde coexisten las cadenas poliméricas rodeadas de solución, o bien gozar de cierta estructura como la formación de canales dentro del polímero. En ambos casos la difusión de un dado sustrato se verá más o menos afectada dependiendo del tipo de sustrato y del grado en que estén dispuestas estas regiones en la matriz. Por otro lado, es necesario también tener en cuenta el efecto que los grupos cargados de la matriz puedan ocasionar en la retención del soluto y/o del mediador enzimático.

#### V.4.1 Biosensor de GOX

El comportamiento de los electrodos enzimáticos para glucosa, en los que la enzima GOX se inmoviliza en una matriz constituida por una mezcla de mucina y albúmina entrecruzada con glutaraldehído se desarrolló en la Sección V.1. Cuando se utilizó una matriz muc 100 para la inmovilización de la enzima se observó baja sensibilidad, pero amplio intervalo lineal de la respuesta. La adición de albúmina incrementó la sensibilidad notablemente. Si bien el tiempo de respuesta aumentó, la estabilidad del sensor se incrementó marcadamente. El electrodo preparado con una proporción de 30% de albúmina y entrecruzado con glutaraldehído 3% fue considerado el óptimo al combinar alta sensibilidad, sobresaliente estabilidad, muy aceptable tiempo de respuesta, excelente comportamiento lineal y límite de detección. La Figura V-3 muestra que se encuentra una zona de máxima sensibilidad para los electrodos elaborados con al menos 30% de albúmina y 3% de entrecruzante. Por fuera de estos valores, la sensibilidad cae de manera abrupta. La ausencia de albúmina y la baja concentración de glutaraldehído, pueden considerarse

como sinónimos de bajo entrecruzamiento, y verse reflejados en el hecho de que la carga enzimática disminuya notablemente.

Si bien la densidad de entrecruzamiento del soporte polimérico interviene en la capacidad de hinchamiento de la matriz, y por consiguiente en la permeabilidad de los solutos, es también necesario tener en cuenta la influencia que tiene en estas variables el tipo de proteínas utilizadas para elaborar la matriz. La adición de un polímero altamente hidrofílico como la mucina incrementa la captación de agua más allá de su poca capacidad de formar redes entrelazadas y da lugar a estructuras más abiertas y menos definidas. Las matrices se entrecruzan más cuando se aumenta el porcentaje de albúmina y la concentración de glutaraldehído. El aumento del entrecruzamiento traería aparejado un aumento en la porosidad, lo que favorecería la difusión de los solutos en este tipo de estructuras. Este fenómeno se ilustra en la **Figura V-40**, donde se muestra el comportamiento de  $D$  en función del índice de hinchamiento. A partir de estos resultados es posible decir que el coeficiente de difusión disminuye de un modo casi lineal con la cantidad de mucina en la matriz.

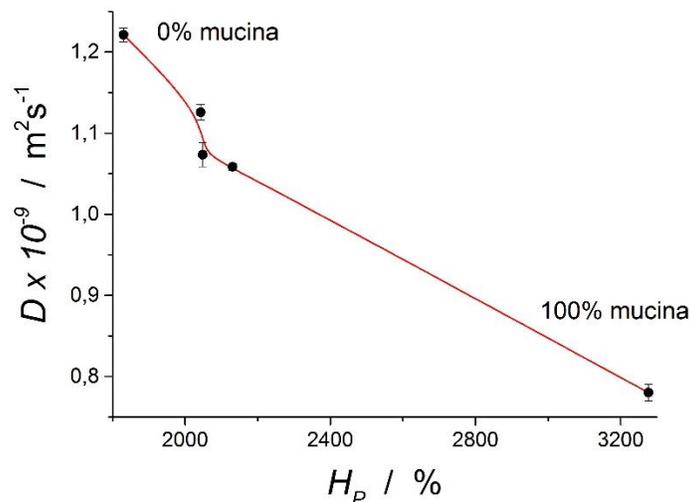


Figura V-40: Relación entre coeficiente de difusión ( $D$ ) de catecol y el porcentaje hinchamiento ( $H_p$ ) para matrices muc/alb entrecruzadas con 5% de glutaraldehído. Se trabajó con las siguientes matrices: muc/alb 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 y 100/0.

El estudio reológico de los hidrogeles también informa sobre la densidad de entrecruzamiento. Experimentalmente se determinó que el módulo elástico ( $G'$ ) aumenta cuando la matriz se prepara con mayor porcentaje de albúmina. Esta información, junto a

la aportada mediante los ensayos de hinchamiento, permite inferir que las matrices estudiadas forman redes poliméricas más compactas, y que la presencia de albúmina y su mayor tendencia a entrecruzarse es la responsable del aumento del módulo elástico y de la disminución del hinchamiento.

Los valores de los coeficientes de partición y de difusión del catecol son mayores al aumentar el porcentaje de albúmina en el soporte. Esto significa que el analito no sólo se incorpora mejor a la matriz, sino que también difunde con mayor facilidad. Entonces, la disponibilidad del sustrato se verá favorecida cuando el hidrogel tenga menor cantidad porcentual de mucina. Los fenómenos difusionales no dependen solamente de las características estructurales del hidrogel, sino que también se ven muy influenciados por la carga eléctrica del soluto y de la matriz. El catecol utilizado en los experimentos de difusión tiene carga neutra, al igual que la glucosa, mientras que la matriz se comporta como un polielectrolito aniónico. Es posible pensar entonces que en este caso las diferencias de carga no serían un factor de gran influencia, sino que las características estructurales son las que facilitarían el movimiento del analito a través del soporte enzimático.

En la Figura V-41 se resume lo discutido anteriormente. En esta figura, las matrices fueron construidas mezclando distintos porcentajes en masa de mucina y albúmina entrecruzadas con el agregado de glutaraldehído diluido al 5%. Los máximos valores de sensibilidad fueron encontrados cuando las matrices presentan un comportamiento más rígido, y concuerdan con los valores máximos encontrados para la partición del soluto y el coeficiente de difusión. Experimentalmente se observa que la actividad enzimática tiende a maximizarse para aquellas matrices con menor índice de hinchamiento. En consecuencia, los sensores construidos con este tipo de matrices son los que tienen mayor sensibilidad. La incorporación de una excesiva cantidad de agua a la matriz podría tensionar la estructura molecular de la enzima y eventualmente llegar a desnaturalizarla. Otra posibilidad es que la enzima no se entrecruce en la matriz y se elimine cuando el sensor se expone a la solución. En ambos casos se afectaría la sensibilidad del biosensor. Todas estas

razones son consistentes con la elección de la matriz más apropiada para la construcción del sensor de glucosa.

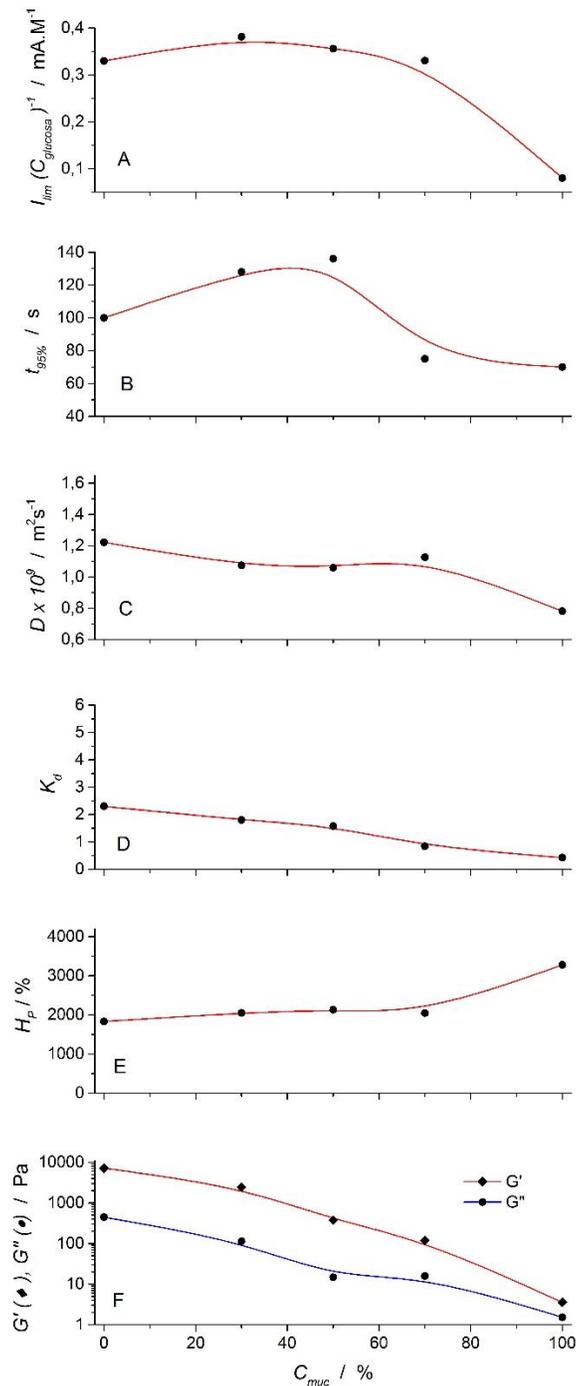


Figura V-41: Efecto de la composición de la matriz polimérica en (A) la sensibilidad ( $I_{lim} C_{glucosa}^{-1}$ ), (B) el tiempo de respuesta ( $t_{95\%}$ ), (C) el coeficiente de difusión del catecol, (D) la partición de catecol ( $K_d$ ), (E) el porcentaje de hinchamiento de la matriz ( $H_p$ ) y (F) las propiedades reológicas de la mezcla polimérica ( $G'$  y  $G''$ ). En todos los casos, se utiliza como entrecruzante glutaraldehído 5% y 0,27 UE de GOX.

El tiempo de respuesta tiende a disminuir en aquellas matrices menos entrecruzadas y con mayor índice de hinchamiento. Sin embargo, este comportamiento no se correlaciona con los valores de partición y coeficiente de difusión. En principio debe considerarse que estos hidrogeles, principalmente constituidos por mucina no sólo tienen un entrecruzamiento más lábil, sino que presentarían una estructura más amorfa que se comporta como un mucus que puede introducirse en los poros de la membrana de policarbonato. De este modo, disminuye el espesor efectivo del sensor y es menor la distancia que debe recorrer el sustrato hasta alcanzar la enzima, haciendo que la respuesta alcance el valor de corriente límite con mayor rapidez.

#### V.4.2 Biosensor de LAC

El desempeño de los biosensores de catecol que se obtienen a partir de la inmovilización de LAC en un soporte constituido por la mezcla de mucina, quitosán y glutaraldehído se desarrolló en la Sección V.2. La incorporación de mucina en la mezcla dio lugar a sensores con baja sensibilidad. Del mismo modo, el intervalo lineal de la respuesta cae a medida que la cantidad de mucina aumenta. Por el contrario, los biosensores compuestos principal o únicamente por quitosán mostraron mayor sensibilidad y linealidad, mientras que el tiempo de respuesta se mantuvo relativamente constante. Teniendo en cuenta estos parámetros analíticos, se consideró que un sensor de catecol construido a partir de una matriz quit 100, entrecruzada con glutaraldehído 5%, es el que presentaría un funcionamiento óptimo. También es posible arribar a esta conclusión luego de observar los datos experimentales que se muestran en las Figura V-23 y Figura V-24. El uso de quitosán asegura alto grado de entrecruzamiento debido a la densidad de grupos amino en esta macromolécula, por lo que la enzima se inmoviliza en el hidrogel formado. La incorporación de mucina hace que el entrecruzamiento sea menor, dando como resultado indirecto una menor cantidad de enzima activa en el interior. En este sentido, es importante recordar que existe una incompatibilidad entre estas macromoléculas a pesar de que presentan cargas opuestas. Esta dificultad en el mezclado daría lugar a la formación de zonas donde la enzima sólo estaría rodeada por mucina y otros sectores donde la

enzima quedaría rodeada principalmente por quitosán. En el primer caso la enzima no podría entrecruzarse con la matriz, mientras que en el otro sí.

Al igual que en el caso de la mezcla con albúmina, el sistema mucina – quitosán absorbe gran cantidad de agua. Por un lado, la incorporación de mucina, polímero altamente hidrofílico y con baja capacidad para la formación de entrecruzamientos, da como resultado matrices con redes más abiertas. Por otro lado, el uso de mayor cantidad de glutaraldehído y de quitosán hace que descienda notablemente la cantidad de agua incorporado, sin dejar de ser un soporte altamente hidrofílico. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra cómo cambia el valor de  $D$  de catecol en función del hinchamiento de matrices preparadas con distintos porcentajes en peso de mucina y quitosán. Como puede observarse, el valor de  $D$  disminuye a medida que se incrementa  $H_p$ , por lo que podría pensarse que aquellas matrices más entrecruzadas y que tienen menor posibilidad de hincharse, formarían estructuras más porosas en las que los solutos podrían difundir con mayor facilidad.

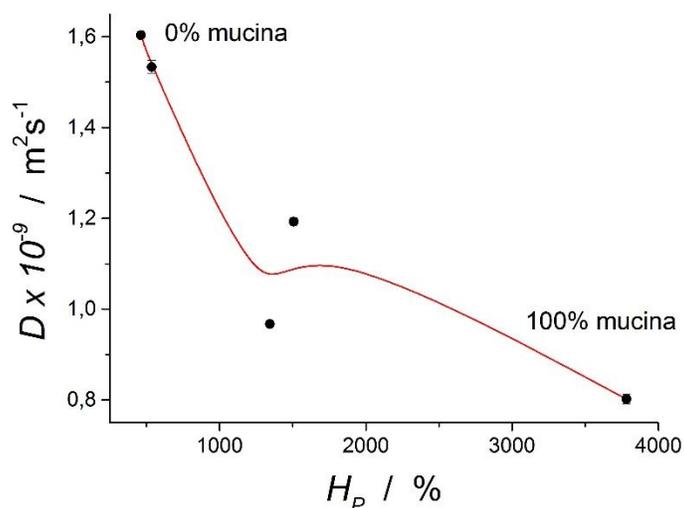


Figura V-42: Relación entre coeficiente de difusión ( $D$ ) y el porcentaje hinchamiento ( $H_p$ ) para matrices muc/quit entrecruzadas con 5% de glutaraldehído. Se trabajó con las siguientes matrices muc/quit: 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 y 100/0.

El grado de entrecruzamiento también se pone en evidencia a partir de los estudios reológicos. Estos ensayos permitieron determinar que el aumento del módulo elástico en las matrices se debe a la mayor incorporación de quitosán en el hidrogel, así

como a la mayor utilización de entrecruzante. Esto refuerza lo observado en los ensayos de hinchamiento y permite afirmar que las matrices con quitosán forman redes poliméricas más compactas.

El aumento en la proporción de quitosán da como resultado un incremento en los coeficientes de partición y de difusión. De esta forma, el analito se incorpora mejor en la matriz y puede difundir más fácilmente a través de ella. Esto significa que la disponibilidad de sustrato será mejor cuanto mayor porcentaje en peso de quitosán se utilice en la elaboración del hidrogel que se usa como soporte. La difusión de los solutos puede verse afectada por la carga eléctrica relativa entre el soluto y el soporte. En este caso, al pH de trabajo el catecol no tiene carga neta, mientras que la matriz se comporta como una mezcla de polielectrolitos catiónicos y aniónicos debido a la presencia de cargas positivas del quitosán y a las cargas negativas de la mucina. El aumento en la cantidad de quitosán en la matriz favorece a la partición y a la difusión del sustrato.

Estos resultados se resumen en la Figura V-43, donde se observa simultáneamente el desempeño analítico de los biosensores en conjunto con algunas de las propiedades fisicoquímicas de matrices con distinta proporción de mucina y quitosán, entrecruzadas en todos los casos con glutaraldehído al 5%. La máxima sensibilidad, coeficiente de difusión y partición del soluto se alcanzan cuando las matrices se comportan de manera más rígida. Así también, la máxima actividad enzimática se alcanza cuando el hinchamiento es menor. Esto podría sugerir que un elevado hinchamiento de la matriz podría afectar la actividad catalítica ya que cuando la enzima se encuentra entrecruzada podría tensionarse debido al hinchamiento de las redes poliméricas de soporte. Como puede verse, la velocidad de difusión del sustrato también se ve favorecida cuando se trabaja con matrices más rígidas, lo que contribuye también notablemente a la respuesta enzimática y por consiguiente a la respuesta analítica.

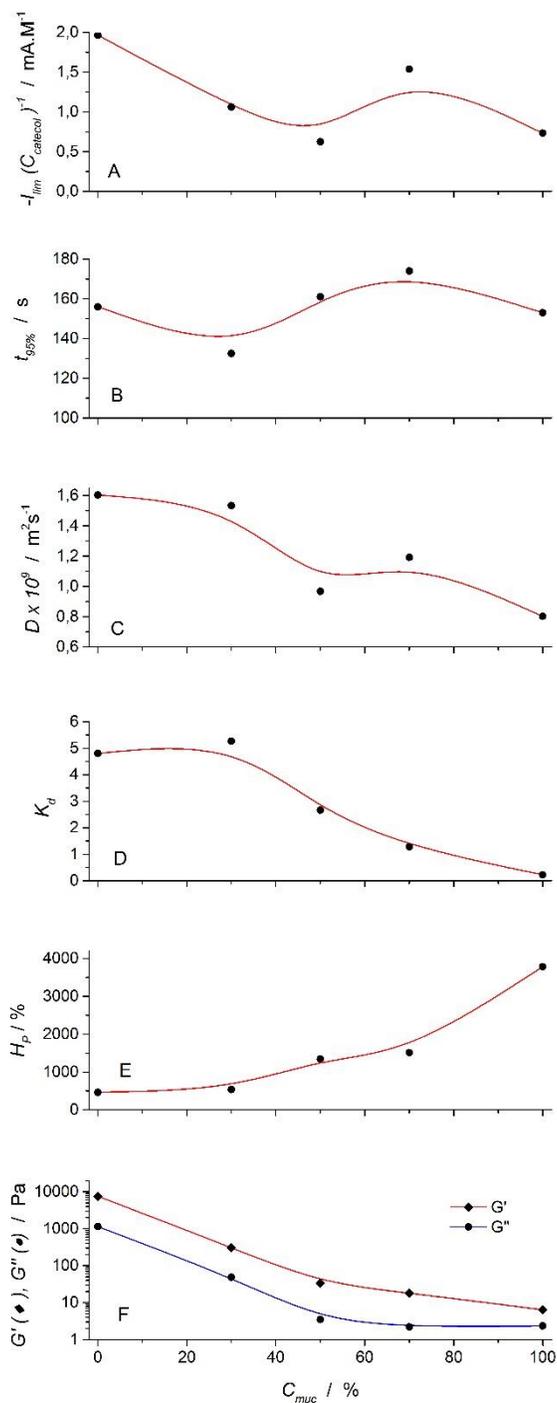


Figura V-43: Efecto de la composición de la matriz polimérica en (A) la sensibilidad ( $-I_{lim} C_{catecol}^{-1}$ ), (B) el tiempo de respuesta ( $t_{95\%}$ ), (C) el coeficiente de difusión del catecol, (D) la partición de catecol ( $K_d$ ), (E) el porcentaje de hinchamiento de la matriz ( $H_p$ ) y (F) las propiedades reológicas de la mezcla polimérica ( $G'$  y  $G''$ ). En todos los casos, se utiliza como entrecruzante glutaraldehído 5% y 5,33 UE de LAC.

El tiempo de respuesta de los sensores no parece alterarse en gran medida por los parámetros fisicoquímicos de las distintas matrices y los valores oscilan dentro de

márgenes relativamente estrechos. La velocidad de la respuesta depende de la facilidad que tiene el producto de la reacción enzimática en alcanzar la superficie electroactiva. Es posible entonces que el comportamiento difusional de las quinonas generadas en la catálisis sea algo distinto al determinado para el catecol por lo que no sería posible relacionarlas. Sin embargo, como se muestra en la Figura V-23, los tiempos de respuesta en general logran disminuirse cuando se utilizan menores concentraciones de glutaraldehído y esto significaría que las matrices están menos entrecruzadas. Por lo tanto debería considerarse que si bien la matriz con quitosán proporciona porosidades por donde pueden difundir las especies como el sustrato y el mediador de la reacción enzimática, el grado de entrecruzamiento que proporciona el glutaraldehído puede llegar a disminuir el tamaño de estos poros y limitar la difusión dentro de la matriz.

## V.5 Sensores de glucosa, catecol, lactato y oxalato

El análisis de diversos biosensores tipo sándwich, preparados mediante el mismo método que en este trabajo, permite entender cómo influyen las propiedades fisicoquímicas de las matrices soporte sobre la respuesta electroquímica. A partir de los diferentes resultados aportados, queda claro que la composición de la matriz afecta la sensibilidad alcanzada por el biosensor. Este hecho se debe no sólo a las diferencias estructurales de la matriz que modifican la eficiencia en la inmovilización de la enzima, sino que la composición también influye sobre la forma en que los analitos de cada biosensor se incorporan en el soporte construido.

En la Figura V-44 se muestra la sensibilidad normalizada de biosensores construidos inmovilizando LAC, GOX, lactato oxidasa (LOX) y oxalato oxidasa (OOX) en una matriz compuesta por distintas proporciones en peso de mucina y quitosán, entrecruzados con 5% de glutaraldehído. Los datos experimentales correspondientes al sensor de LOX fueron extraídos de la tesis de M. Romero<sup>128</sup>, mientras que los de GOX y OOX pertenecen a la tesis de T. Benavidez<sup>129</sup>. Es importante aclarar que la respuesta

analítica de los sensores de GOX y LOX se determina a pH 7, mientras que la respuesta del sensor de OOX a pH 2,8 y la de LAC a pH 5.

Los biosensores de glucosa y catecol, muestran la máxima sensibilidad cuando la matriz se constituye sólo por quitosán y glutaraldehído. A medida que aumenta la proporción en peso de mucina, la sensibilidad cae rápidamente, llegando a menos del 5% del valor máximo cuando las enzimas se inmovilizan en matrices compuestas únicamente por mucina y glutaraldehído. Los sensores de oxalato y lactato, en cambio, presentan un comportamiento algo diferente. En el caso de LOX, el máximo de sensibilidad se encuentra cuando se utiliza muc/quit 30/70. En una matriz compuesta únicamente de quitosán, la sensibilidad baja casi un 50%, lo mismo que frente iguales proporciones de muc y quit. Mayores porcentajes de muc hacen que la respuesta disminuya rápidamente, alcanzando un valor menor al 1% de la máxima en una matriz muc 100. Para el sensor de OOX, a medida que aumenta la proporción de mucina se incrementa la sensibilidad alcanzada hasta llegar al máximo cuando la matriz se forma por 70% de muc y 30% de quit. Luego de este punto, mayores concentraciones de muc hacen que la respuesta disminuya hasta alcanzar un mínimo del 20% de la respuesta máxima, correspondiente a una matriz 100% de mucina.

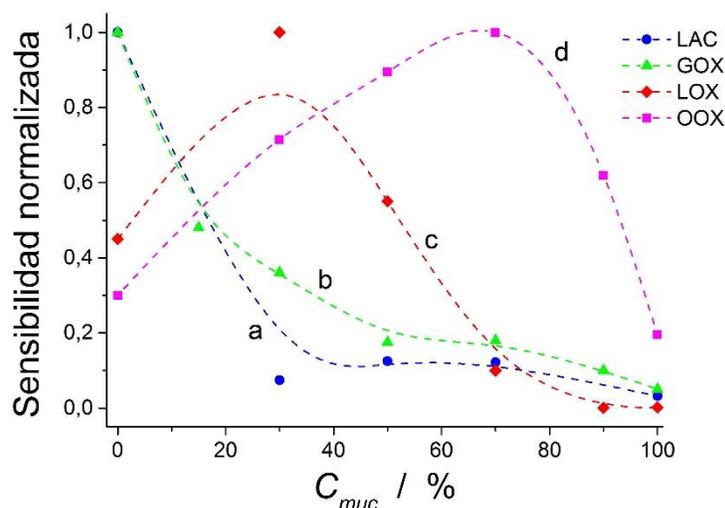


Figura V-44: Sensibilidad normalizada de sensores de (a) catecol, (b) glucosa, (c) lactato y (d) oxalato en función de la relación en peso de mucina/quitosán ( $C_{muc}$ ). Todos los biosensores se preparan entrecruzando la matriz con 5% de glutaraldehído. Los datos de glucosa y oxalato fueron extraídos de la tesis doctoral de T. Benavidez<sup>29</sup> y los de lactato de la tesis doctoral de M. Romero<sup>28</sup>.

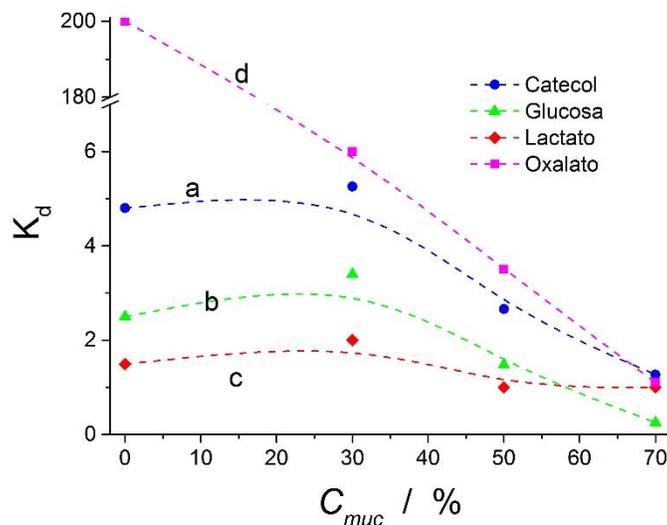


Figura V-45: Coeficientes de partición de (a) catecol, (b) glucosa, (c) lactato y (d) oxalato en función de la relación en peso de mucina/quitosán ( $C_{muc}$ ) que se utiliza para la preparación de la matriz, entrecruzándola con 5% de glutaraldehído. Los datos de glucosa y oxalato fueron extraídos de la tesis doctoral de T. Benavidez<sup>129</sup> y los de lactato de la tesis doctoral de M. Romero<sup>128</sup>.

El coeficiente de partición aporta información sobre las relaciones entre los diferentes sustratos y la matriz polimérica. En la Figura V-45 se analiza cómo varía este parámetro para distintos solutos en matrices compuestas por mucina y quitosán a diferentes valores de pH. En este caso, las mediciones de partición de glucosa<sup>129</sup> y lactato<sup>128</sup> se llevaron a cabo a pH 7, las de oxalato<sup>129</sup> a pH 2,8 mientras que las de catecol fueron hechas a pH 5. El catecol y la glucosa presentan un comportamiento similar en matrices a pH 5 y pH 7, respectivamente. Ambas curvas tienen tendencias similares, indicando que los solutos se distribuyen con mayor preferencia en las matrices que están formadas por 100% y 70% de quitosán. El coeficiente de partición disminuye principalmente cuando el porcentaje de mucina supera el 50%, indicando que aumenta la preferencia del sustrato por permanecer en la fase líquida del sistema matriz – electrolito soporte. Tanto la glucosa como el catecol son analitos neutros al pH de trabajo, pero no sucede lo mismo con la matriz con la cual interactúan. A pH 7, el quitosán prácticamente no presenta carga neta, mientras que a pH 5 y 2,8 es un polielectrolito con carga positiva. Por el lado de la mucina, la presencia en su estructura de ácido siálico le otorga una leve carga negativa a los distintos valores de pH estudiados. Para simplificar esta comparación entre cargas y estructuras de matrices y sustratos en este punto conviene considerar que la mucina no

tiene carga neta. El lactato y el oxalato son analitos que a pH de trabajo presentan carga negativa. El oxalato a pH 2,8 presenta carga negativa, mientras que el quitosán tiene carga positiva. Esta oposición de cargas hace que se observe un elevado valor de coeficiente de partición cuando la matriz presenta sólo quitosán. A medida que aumenta la fracción de mucina, disminuye el carácter electropositivo del soporte sucediendo lo mismo con el valor de  $K_d$ . La atracción entre el analito y la matriz disminuye, alcanzando un  $K_d$  de valor cercano a la unidad para un 70% de mucina. Con respecto al lactato, su coeficiente de partición en la matriz es prácticamente constante cuanto mayor es el porcentaje de quitosán en la matriz. Tanto el quitosán como la mucina no presentan una carga significativa a pH 7 por lo que el mayor coeficiente de partición de lactato en quitosán se debería a propiedades estructurales de este polímero frente a las de la mucina. Estas propiedades del quitosán son las que favorecerían la incorporación de glucosa y catecol con respecto a las matrices con mucina.

El valor del coeficiente de partición indica la preferencia, según las condiciones, de un analito por una determinada fase en el sistema matriz polimérica – electrolito soporte. Sin embargo, si analizamos conjuntamente estos resultados con lo indicado en la Figura V-44, la mayor preferencia de un analito por una determinada matriz no siempre se traduce en mayor sensibilidad. El caso más evidente de este comportamiento se da para el sensor de OOX que, cuando se prepara la matriz con 100% de quitosán el valor del coeficiente de partición para el oxalato es máximo a pH 2,8, pero también presenta la menor sensibilidad si se usa quitosán como único componente de la matriz. Por el contrario, en el sensor de LAC la máxima preferencia del analito por la matriz coincide con las condiciones en que se incrementa la sensibilidad del sensor.

El coeficiente de difusión del catecol y del lactato, determinados en matrices compuestas por mezclas de mucina y albúmina en diferente proporción, se muestra en la Figura V-46. Todas las matrices fueron preparadas utilizando glutaraldehído al 5%. Los datos experimentales del lactato fueron extraídos de la tesis doctoral de M. Romero<sup>128</sup>. En este caso, se analiza cómo varía el coeficiente de difusión de dos analitos con diferente carga, cuando difunden a través de la misma matriz proteica, al mismo pH. La albúmina es

una proteína con punto isoeléctrico de 4,9 que, al pH del experimento presenta carga negativa. Como se explicó antes, la mucina es una gran glicoproteína que presenta en su estructura algunos grupos con ácido siálico que le otorgan una leve carga negativa, pero que considerando su relación masa/carga se puede considerar despreciable. Cuando se analiza la difusión del catecol, analito de carga neutra, se encuentra que el máximo de difusión se da cuando la matriz se forma únicamente por albúmina, no habiendo grandes diferencias en la difusión a medida que aumenta la proporción de mucina. El menor valor para  $D$  se observó para una matriz compuesta sólo por mucina, debido posiblemente a la estructura amorfa de esta glicoproteína.

El comportamiento del lactato, analito con carga negativa al pH de trabajo, es bastante diferente al mostrado por el catecol. Los valores de  $D$  son muy inferiores comparados con los del analito de carga neutra. Esto se debe a que todas las mezclas de mucina y albúmina forman un hidrogel con carga negativa, que repele la difusión del lactato a través de él. Cuando aumenta la proporción de mucina disminuye la carga neta negativa de la matriz, y el lactato puede difundir más rápido a través de ella.

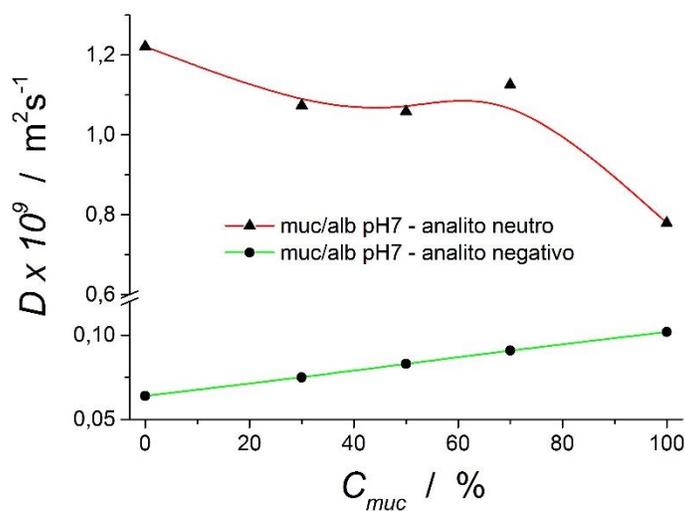


Figura V-46: Coeficientes de difusión de un analito con carga neutra (catecol) y de un analito con carga negativa (lactato) en función de la relación en peso de mucina/albumina ( $C_{muc}$ ) que se utiliza para preparar las matrices. Todas se entrecruzan utilizando 5% de glutaraldehído. Los datos correspondientes al lactato pertenecen a la tesis doctoral de M. Romero<sup>128</sup>.

El análisis de estos casos nos permite entender cuán importante es la elección de la matriz soporte para la construcción de un biosensor, ya que se debe tener en cuenta

simultáneamente la carga del sustrato enzimático y el pH óptimo para la enzima seleccionada. Analitos con carga opuesta a la matriz soporte tendrán una fuerte preferencia para ingresar en ella, pero sin asegurar un buen tiempo de respuesta del sensor ya que el analito se acumulará interactuando con la matriz. Por el contrario, aquellos sensores en los que el analito tiene la misma carga que la matriz, verán disminuida la difusión y el coeficiente de partición del sustrato enzimático, debido posiblemente a la repulsión electrostática entre ellos. Los analitos con carga neutra se ven menos influenciados por la carga de la matriz, ya que la difusión de ellos depende en mayor medida de las características estructurales que hacen que se facilite o se dificulte su paso a través de la mezcla proteica. En la Tabla V-1 se resumen las características analíticas de los biosensores tipo sándwich de GOX, LAC, LOX y OOX.

Tabla V-1: Comparación de los biosensores tipo sándwich elaborados en este trabajo y en trabajos anteriores. Referencias: (\*1) Único valor evaluado de la variable. (\*2) Datos extraídos de la tesis de M. Romero. (\*3) Datos extraídos de la tesis de T. Benavidez. (NE) Datos experimentales no estudiados.

Enzima	Matriz (óptima)	pH	Carga de analito	Carga de matriz	% de glut	C <sub>enzima</sub> (UE)	LOD (µM)	IL (mM)	Reprodu cibilidad	Estabilidad (días)	t <sub>95%</sub> (s)	Sens. (mAcM <sup>-2</sup> M <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub>
GOX	muc/alb (3o/7o)	7	Neutra	Negativa	3%	1,34	3	0,003 a 4,7	<10%	>550	<100	3,2	1,8
	muc/quit (o/100)*3	7	Neutra	Neutra	5% *1	20 *1	NE	6	NE	NE	NE	0,021	2,5
LAC	muc/quit (o/100)	5	Neutra	Positiva	5%	5,33	0,2	0,001 a 0,14	5%	48	150	11,7	4,8
	muc/alb (7o/3o)	7	Negativa	Negativa	3%	0,2 *1	0,7 a 1,5	0,003	5%	27	90	10	1
LOX *2	muc/quit (3o/7o)	7	Negativa	Neutra	5% *1	0,1 *1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	2
	muc/quit (7o/3o)	2,8	Negativa	Positiva	5%	0,016 *1	100	0,3 a 1	NE	50	NE	0,29	<1
OOX *3	muc/quit (7o/3o)	2,8	Negativa	Positiva	5%	0,016 *1	100	0,3 a 1	NE	50	NE	0,29	<1

## CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de investigación se desarrollaron y caracterizaron dos sensores electroquímicos enzimáticos, utilizando diferentes polímeros naturales para preparar soportes con la premisa de optimizar la mezcla más apropiada para maximizar la respuesta analítica del biosensor.

Ambos biosensores se basan en la inmovilización de glucosa oxidasa y lacasa en una matriz polimérica de alto contenido acuoso. Para cada enzima se buscó una matriz proteica que sirva para atrapar y estabilizar la enzima activa. Cada matriz junto con su respectiva enzima se ubicó entre dos membranas de policarbonato formando un sistema similar a un sándwich que se depositó sobre la superficie del electrodo de trabajo. De este modo el electrodo de trabajo es el transductor electroquímico, mientras que el sándwich encierra al sensor enzimático. Una de las ventajas más importantes de trabajar con este tipo de sistema, y que quizás no es tan notoria a simple vista, fue la posibilidad de contar con una serie de biosensores específicos para diferentes analitos que utilicen el mismo arreglo experimental, lo que permitió que el sensor fuera muy fácilmente removible de la superficie del electrodo sin verse alterada su estructura ni su funcionamiento. Eso significa que con sólo un electrodo de trabajo conectado al mismo equipo se pudo trabajar con distintos sándwiches biosensores para cuantificar diferentes analitos. Como se mencionó en este trabajo de tesis, estos sándwiches pueden ser removidos de la superficie del electrodo y almacenados durante períodos de tiempo, que en este caso oscilaron entre meses y años. Más allá de las distancias que lo separan de un producto terminado, es posible imaginar cómo se prestaría a la comercialización un sensor que posea las dimensiones, la facilidad de manipulación y las ventajas de almacenamiento como los aquí presentados.

En el caso de la GOX, se obtuvo un sensor con excelentes características analíticas. El estado estacionario de la respuesta se obtuvo luego de  $(35 \pm 5)$  s, con un límite de detección de  $3 \mu\text{M}$  y una respuesta altamente lineal hasta  $3,5 \text{ mM}$  de glucosa. La

reproducibilidad fue muy satisfactoria y se sustenta en el cuidado de las condiciones experimentales durante el armado. Es remarcable el hecho de que el biosensor haya mantenido sus características analíticas durante más de un año, teniendo en cuenta que durante ese tiempo el sensor sufrió drásticos cambios en la temperatura ambiente, e incluso condiciones extremas de lavado (en ocasiones, luego de ser utilizado se lo enjuagó con agua ultra pura sin observar cambios en su respuesta). Esto se pudo lograr sin duda gracias a la robustez de la enzima y a las características de la matriz enzimática seleccionada que generó un microambiente en el que la biomolécula pudo mantenerse morfológicamente estable y catalíticamente activa.

Existen varias empresas en el mercado de la salud que comercializan tiras reactivas para el análisis de glucosa en paciente con diabetes. Sus dispositivos cumplen con la precisión, exactitud y confiabilidad requerida en ISO 15197:2003. La norma establece que el 95% de los resultados de glucosa debe estar dentro de  $\pm 15 \text{ mg.dL}^{-1}$  para muestras con una concentración de glucosa menor a  $75 \text{ mg.dL}^{-1}$ , y que el error debe estar dentro del 20% si la concentración de glucosa es igual o mayor a ese valor. Estas exigencias son cumplidas ampliamente por el sensor desarrollado en este trabajo. En la Tabla VI-1 se resumen algunos biosensores encontrados en bibliografía. Como se puede observar, la mayoría de estos biosensores ofrecen un excelente límite de detección y rango lineal. Además, su estabilidad es buena. Sin embargo, no está claro si pueden asegurar el mismo LOD o rango lineal después de una semana o un mes de montaje. Además, ni la reproducibilidad de sensor a sensor ni el rango lineal se analizan típicamente después de un mes de preparado el sensor.

El estudio de las respuestas electroquímicas conseguidas al variar la concentración de GOX en el sensor, junto con las técnicas y el modelo matemático del biosensor permitió desarrollar un método para estimar la cantidad de enzima activa en el sensor, más allá de la cantidad teórica que se usó en la etapa de inmovilización. Además, el modelo matemático permitió explicar la mejora en el tiempo de respuesta que se observa cuando el sensor fue sometido a varios ciclos de deshidratación y rehidratación.

Tabla VI-1: Comparación del desempeño analítico de diferentes sensores de glucosa. Referencias: (PANI). Polianilina. (NPs) Nanopartículas. (PMMA) Polimetilmetacrilato.

Composición del sensor	Método de inmovilización	IL (mM)	Estabilidad	Especie electroactiva	Referencia
GOX / PANI / NPs de Pd	Dopado electroquímico	0,005-10	95% luego de 30 días	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	130
GOX / quitosán / NPs de Pd	Dopado electroquímico	0,002-1	94% luego de 3 semanas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	131
GOX / PANI / poliisopreno	Atrapamiento	0,01-12	5 meses	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	132
GOX / NPs de Pt / NPs de sílica	Entrecruzamiento	0,001-26	90% luego de un mes	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	133
GOX / PANI / poliacrilonitrilo	Atrapamiento	0,002-12	100 días	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	134
GOX / PMMA / NPs de alb	Entrecruzamiento	0,2-9,1	1 mes	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	135
GOX / Nanotubos de carbono / quit / alb / ferroceno	Entrecruzamiento	0,01-30	99% luego de 30 días	Ferroceno	136
GOX / citocromo C / NPs de Au / PANI	Inmovilización de GOX vía Nafion	0,01-3,2	92% luego de 30 días	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	137
GOX / quit / NPs de Au	Atrapamiento físico	0,012-3	91% luego de 4 semanas	Ferroceno	138
GOX / NPs de Au	Entrecruzamiento	0,008-1	87% luego de 10 semanas	Oxígeno	139
GOX / Nanotubos de carbono / PANI / azul de prusia	Atrapamiento físico	1-11	90% luego de 30 días	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	140
GOX / muc / alb / policarbonato	Atrapamiento físico, entrecruzamiento	0,005-3	Cercano al 100% luego de un año	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Este trabajo

La remarcable estabilidad del sensor permitió que, al ser expuesto a una matriz muy compleja tal como el suero sanguíneo, su funcionamiento no se haya visto alterado cientos de días después del contacto. El biosensor mostró un excelente desempeño en la cuantificación de glucosa en suero, obteniéndose resultados similares a los encontrados con el método espectrofotométrico estándar de hexoquinasa utilizado el laboratorio bioquímico. Esto, sumado a la posibilidad de medir glucosa con precisión en un amplio intervalo de concentraciones, hace que sea posible pensar en la aplicabilidad mediata del sensor. Sin embargo, no se han realizado cuantificaciones en matrices de otra naturaleza

que la sanguínea. La determinación de glucosa en jugos de frutas, por ejemplo, sería de interés para evaluar el desempeño cuando se presentan simultáneamente azúcares de distintos tipos.

En cuanto a la cuantificación de catecol, el sensor de LAC también evidenció un desempeño altamente satisfactorio. Específicamente, el comportamiento lineal de la respuesta implica tres órdenes de magnitud de concentración, desde 0,2  $\mu\text{M}$  hasta más de 100  $\mu\text{M}$  de catecol. Un comportamiento de este tipo no se alcanza usualmente en otros sensores reportados en bibliografía, como puede observarse en la Tabla VI-2. El estado estacionario se alcanza luego de (160 $\pm$ 10) s, con excelente reproducibilidad sensor a sensor. Si bien la robustez de la lacasa no es comparable con la GOX, se optimizó un soporte polimérico en el que se maximizó su actividad con ciertos grados de libertad en cuanto a la composición.

Tabla VI-2: Comparación del desempeño analítico de diferentes sensores de lacasa.

Composición del sensor	Método de inmovilización	IL ( $\mu\text{M}$ )	Estabilidad	Especie electroactiva	Referencia
LAC / Monocapa Au - Thiol	Entrecruzamiento	1-400	1 mes	Quinona	141
LAC / Nafion	Atrapamiento	~0-7	87%, 1 mes	Quinona	142
LAC / Celulosa	Enlace covalente	100-1000	-	Oxígeno	49
LAC / Nanotubos de carbono / quit	Atrapamiento	1,2-30	99% luego de 15 días	Quinona	57
LAC / Polyvinil alcohol	Atrapamiento	0,5-130	60% luego de 1 año	Quinona	143
LAC / glutaraldehído	Enlace covalente	~0- 58	2 meses	Quinona	58
LAC / electrodo de grafito	Adsorción	1-20	-	Quinona	144
LAC / carbón mesoporoso / quit	Atrapamiento	0,67-15,75	95% luego de 30 días	Quinona	145
LAC / Nafion / Fibras de C, C-Cu	Atrapamiento	1-1130	96% luego de 22 días	Quinona	146
LAC / glutaraldehído	Enlace covalente	0,1-10	8 días	Quinona	147
LAC / pasta de carbón / quit	Atrapamiento	0,1-165	95% luego de 29 días	Quinona	148
LAC / quit / policarbonato	Atrapamiento físico, entrecruzamiento	0,2-140	80% luego de 48 días	Quinona	Este trabajo

El mantenimiento de la actividad enzimática en el tiempo fue aceptable, ya que la respuesta se conservó en un 80% de su magnitud inicial luego de casi 50 días. La velocidad de la respuesta mejoró con los ciclos de deshidratación – hidratación de la matriz, lo que refuerza la hipótesis de disminución efectiva del espesor del sensor. Es destacable también la recuperación que mostró un mismo sensor frente a cambios de pH del medio. Este hecho refuerza la aptitud de la matriz utilizada para alojar a la enzima, ya que las características biocatalíticas, geométricas y fisicoquímicas no se alteran luego de la exposición de la enzima a medios que en solución producirían su desnaturalización.

Cuando se evaluó la respuesta del sensor frente al aumento de la cantidad de enzima inmovilizada se observó un máximo de señal electroquímica para una concentración dada de lacasa. Este resultado es congruente con lo obtenido para GOX y de la misma forma es posible estimar la cantidad de enzima activa dentro del sensor. Este hecho sirve para demostrar que más enzima no siempre significa mayor respuesta electroquímica, como puede muchas veces puede pensarse. Es común encontrar trabajos que utilizan enzimas directamente en su máxima concentración comercial, o en cantidades sumamente elevadas, sin notar que superado un límite la respuesta no se altera, o lo hace en una proporción insignificante.

Si bien no se realizaron mediciones en muestras reales, los resultados obtenidos permiten predecir una buena respuesta en la cuantificación de catecol. La LAC es sensible a varios tipos de mono y difenoles, por lo que sería interesante evaluar el desempeño frente a otros analitos o mezclas de ellos. Por otro lado, un examen más exhaustivo en cuanto a la estabilidad en el tiempo y a la forma de almacenamiento sería deseable si se piensa en llevar el diseño experimental a un sensor que incremente sus probabilidades de aplicación comercial en el campo analítico.

Tanto para el sensor de glucosa como para el de catecol, se ha podido demostrar que la composición de la matriz proteica no sólo es responsable de la buena sensibilidad del sensor, sino que también asegura muy buena estabilidad para la enzima que se inmoviliza, mejorando notablemente la robustez en comparación con la enzima en solución. La utilización de membranas semipermeables asegura que no puedan ingresar

moléculas de gran tamaño, actuando como barrera protectora frente a agentes que puedan desnaturalizar las biomoléculas. Es probable también que el uso de glutaraldehído como entrecruzante juegue un papel importante en la estabilidad, debido a su acción antiséptica y bactericida.

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las distintas matrices poliméricas que se utilizan para el desarrollo de los biosensores de GOX y LAC resulta de vital importancia para conocer el papel que desarrolla cada componente de la matriz desde un aspecto distinto al puramente analítico. Poder relacionar características físicas y químicas del soporte polimérico con la magnitud y velocidad de la respuesta enzimática ayuda a entender cuáles son las condiciones de inmovilización que resultan en sensores con mejor desempeño. Esto constituye quizás uno de los aportes más valiosos de este trabajo. Se logró evaluar la disponibilidad del sustrato a través del estudio de partición, permeabilidad y difusión de los analitos, obteniéndose resultados coherentes con las respuestas electroquímicas. Además, los resultados de hinchamiento y reología permitieron estudiar el microambiente enzimático relacionándolo con la actividad de las biomoléculas. Como consecuencia del conjunto de todos los experimentos realizados, se pudo explicar el comportamiento analítico de sensores enzimáticos amperométricos para glucosa y catecol en función de las propiedades fisicoquímicas de los soportes enzimáticos.

La evaluación en conjunto con los resultados obtenidos en trabajos previos permitió mejorar notablemente el conocimiento de los sistemas tipo sándwich. Las distintas combinaciones cubiertas de enzimas, sustratos, proteínas de anclaje, acidez del medio, especie electroactiva, entre otros, hacen que sea posible predecir cómo debe construirse un soporte enzimático cuando se quiere utilizar una determinada enzima para la cuantificación de un analito en particular y obtener un sensor con el desempeño analítico deseado.

## Bibliografía

1. Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci.* 1962;102(1):29-45. doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
2. Guilbault GG, Kramer DN, Cannon Jr PL. Electrical Determination of Organophosphorous Compounds. *Anal Chem.* 1962;34(11):1437-1439.
3. Guilbault GG, Montalvo Jr JG. Urea-specific enzyme electrode. *J Am Chem Soc.* 1969;91(8):2164-2165.
4. Di Gleria K, Green MJ, Hill HAO, McNeil CJ. Homogeneous ferrocene-mediated amperometric immunoassay. *Anal Chem.* 1986;58(6):1203-1205.
5. Sadana A, Sadana N. *Handbook of Biosensors and Biosensor Kinetics.* First. Oxford: Elsevier Science; 2011. <https://books.google.com.ar/books?id=l1m-ANmjahQC>.
6. Turner APF. Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev.* 2013;42(8):3184-3196. doi:10.1039/C3CS35528D.
7. Kissinger PT. Biosensors - A perspective. *Biosens Bioelectron.* 2005;20(12):2512-2516. doi:10.1016/j.bios.2004.10.004.
8. Colombo L, Garay F. A robust and practically free of charge intermittent use glucose biosensor. *Sensors Actuators B Chem.* 2017;256:751-759. doi: 10.1016/j.snb.2017.10.010.
9. Colombo L, Baruzzi AM, Garay FS. Analysis and optimization of a hydrogel matrix for the development of a sandwich-type glucose biosensor. *Sensors Actuators, B Chem.* 2015;211:125-130. doi:10.1016/j.snb.2015.01.063.
10. Romero MR, Garay F, Baruzzi AM. Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes. *Sensors Actuators, B Chem.* 2008;131(2):590-595. doi:10.1016/j.snb.2007.12.044.
11. Galant AL, Kaufman RC, Wilson JD. Glucose: Detection and analysis. *Food Chem.* 2015;188:149-160. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.071.
12. Rodríguez-Delgado MM, Alemán-Nava GS, Rodríguez-Delgado JM, et al. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2015;74:21-45. doi:10.1016/j.trac.2015.05.008.
13. Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17(9):505-512. doi:10.1016/j.tifs.2006.04.004.
14. D.de beer, E. Joubert WC. G and MM. P 045.pdf. *JEnolVitic.* 2002;23(2).
15. Karim F, Fakhruddin ANM. Recent advances in the development of biosensor for phenol: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2012;11(3):261-274. doi:10.1007/s11157-012-9268-9.
16. Pingarrón Carrazón JM, Sánchez Batanero P. *Química Electroanalítica: Fundamentos Y Aplicaciones.* Síntesis; 1999. <https://books.google.com.ar/books?id=mBGMAAAACAAJ>.
17. Hulanicki A, Glab S, Ingman F. Chemical sensors: definitions and classification. *Pure Appl*

- Chem.* 1991;63(9):1247-1250. doi:10.1351/pac199163091247.
18. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron.* 2001;16(1-2):121-131. doi:10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
  19. Newman JD, Setford SJ. Enzymatic biosensors. *Mol Biotech.* 2006;32(3):249-268. doi:10.1385/MB:32:3:249.
  20. Justino CIL, Freitas AC, Pereira R, Duarte AC, Rocha Santos TAP. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2015;68:2-17. doi:10.1016/j.trac.2015.03.006.
  21. D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry. *Clin Chim Acta.* 2003;334(1-2):41-69. doi:10.1016/S0009-8981(03)00241-9.
  22. Bisswanger H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods.* Wiley; 2008. <https://books.google.com.ar/books?id=6DiEL3mGlzGC>.
  23. Wang J. Electrochemical glucose biosensors. *Electrochem Sensors, Biosens their Biomed Appl.* 2008:57-69. doi:10.1016/B978-012373738-0.50005-2.
  24. Castillo J, Gáspár S, Leth S, et al. Biosensors for life quality - Design, development and applications. *Sensors Actuators, B Chem.* 2004;102(2):179-194. doi:10.1016/j.snb.2004.04.084.
  25. Chen C, Xie Q, Yang D, et al. Recent advances in electrochemical glucose biosensors. *RSC Adv.* 2013;3(14):4473-4491. doi:10.1039/c2ra22351a.
  26. Tischer W, Wedekind F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Biocatal - From Discov to Appl.* 1999;200:95-126. doi:10.1007/3-540-68116-7\_4.
  27. Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: An update. *J Chem Biol.* 2013;6(4):185-205. doi:10.1007/s12154-013-0102-9.
  28. Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* 2007;349(8-9):1289-1307. doi:10.1002/adsc.200700082.
  29. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv.* 2013;31(8):1808-1825. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.013.
  30. Rajesh, Bisht V, Takashima W, Kaneto K. An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease onto an electrochemically prepared copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Biomaterials.* 2005;26(17):3683-3690. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.024.
  31. Kang X, Mai Z, Zou X, Cai P, Mo J. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold-platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes. *Anal Biochem.* 2007;369(1):71-79. doi:10.1016/j.ab.2007.07.005.
  32. Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett.* 2009;31(11):1639-1650. doi:10.1007/s10529-009-0076-4.
  33. Beatriz Brena, Paula González-Pombo FB-V. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: *Immobilization of Enzymes and Cells.* Vol 1. ; 2013:15-31. doi:10.1007/978-1-62703-

34. Meanst GE, Feeney RE. Chemical Modifications of Proteins: History and Applications. *Bioconjugate Chem.* 1990;1:2-12. doi:10.1021/bc00001a001.
35. Koch-Schmidt AC, Mosbach K. Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 1. Thermal stability of nicotinamide adenine dinucleotide dependent dehydrogenases. *Biochemistry.* 1977;16(1):2101-2105. doi:10.1021/bio0629a008.
36. Koch-Schmidt AC, Mosbach K. Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 2. Specific activity and thermal stability of enzymes bound weakly and strongly to Sepharose CL 4B. *Biochemistry.* 1977;16(10):2105-2109. doi:10.1021/bio0629a009.
37. Capra RH, Baruzzi AM, Quinzani LM, Strumia MC. Rheological, dielectric and diffusion analysis of mucin/carbopol matrices used in amperometric biosensors. *Sensors Actuators, B Chem.* 2007;124(2):466-476. doi:10.1016/j.snb.2007.01.022.
38. Benavidez TE, Baruzzi AM. Comparative behavior of glucose oxidase and oxalate oxidase immobilized in mucin/chitosan hydrogels for biosensors applications. *Polymer (Guildf).* 2012;53(2):438-444. doi:10.1016/j.polymer.2011.12.014.
39. da Silva RMP, Caridade SG, San Román J, Mano JF, Reis RL. Transport of small anionic and neutral solutes through Chitosan membranes: Dependence on cross-linking and chelation of divalent cations. *Biomacromolecules.* 2008;9(8):2132-2138. doi:10.1021/bm8001649.
40. Amsden B. Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. *Macromolecules.* 1998;31(23):8382-8395. doi:10.1021/mag980765f.
41. Peppas NA, Wright SL. Drug diffusion and binding in ionizable interpenetrating networks from poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid). *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;46(1):15-29. doi:10.1016/S0939-6411(97)00113-6.
42. Guilbault GG, Lubrano GJ. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal Chim Acta.* 1973;64(3):439-455. doi:10.1016/S0003-2670(01)82476-4.
43. Wang J. Glucose biosensors: 40 Years of advances and challenges. *Electroanalysis.* 2001;13(12):983-988. doi:10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::AID-ELAN983>3.0.CO;2-#.
44. Shichiri M, Yamasaki Y, Kawamori R, Hakui N, Abe H. WEARABLE ARTIFICIAL ENDOCRINE PANCREAS WITH NEEDLE-TYPE GLUCOSE SENSOR. *Lancet.* 1982;320(8308):1129-1131. doi:10.1016/S0140-6736(82)92788-X.
45. Cass AEG, Davis G, Francis GD, et al. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal Chem.* 1984;56(4):667-671. doi:10.1021/ac00268a018.
46. Degani Y, Heller A. Direct Electrical Communication between Chemically Modified Enzymes and Metal Electrodes. 2. Methods for Bonding Electron-Transfer Relays to Glucose Oxidase and D-Amino-Acid Oxidase. *J Am Chem Soc.* 1987;110(16):2615-2620. doi:066/4.
47. Macholán L, Schánel L. Enzyme electrode with immobilized polyphenol oxidase for determination of phenolic substrates. *Collect Czechoslov Chem Commun.* 1977;42(12):3667. cccc.uochb.cas.cz/42/12/3667.

48. Lee CW, Gray HB, Anson FC, Malmström BG. Catalysis of the reduction of dioxygen at graphite electrodes coated with fungal laccase A. *J Electroanal Chem.* 1984;172(1-2):289-300. doi:10.1016/0022-0728(84)80193-X.
49. Ghindilis AL, Gavrilova VP, Yaropolov AI. Laccase-based biosensor for determination of polyphenols: determination of catechols in tea. *Biosens Bioelectron.* 1992;7(2):127-131. doi:10.1016/0956-5663(92)90017-H.
50. Wang J, Lin Y, Eremenko A V., Ghindilis AL, Kurochkin IN. A Laccase Electrode for Organic-Phase Enzymatic Assays. *Anal Lett.* 1993;26(2):197-207. doi:10.1080/00032719308017378.
51. Yaropolov AI, Kharybin AN, Emnéus J, Marko-Varga G, Gorton L. Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilised laccase and tyrosinase. *Anal Chim Acta.* 1995;308(1-3):137-144. doi:10.1016/0003-2670(94)00404-A.
52. Simkus RA, Laurinavicius V, Boguslavsky L, et al. Laccase containing sol-gel based optical biosensors. *Anal Lett.* 1996;29(11):1907-1919. doi:10.1080/00032719608000797.
53. Lisdat F, Wollenberger U, Makower A, Hörtnagl H, Pfeiffer D, Scheller FW. Catecholamine detection using enzymatic amplification. *Biosens Bioelectron.* 1997;12(12):1199-1211. doi:10.1016/S0956-5663(97)00098-5.
54. Freire RS, Durán N, Kubota LT. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta.* 2001;54(4):681-686. doi:10.1016/S0039-9140(01)00318-6.
55. Barton SC, Kim HH, Binyamin G, Zhang Y, Heller A. Electroreduction of O<sub>2</sub> to water on the "wired" laccase cathode. *J Phys Chem B.* 2001;105(47):11917-11921. doi:10.1021/jp012488b.
56. Timur S, Pazarloğlu N, Pilloton R, Telefoncu A. Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. *Sensors Actuators, B Chem.* 2004;97(1):132-136. doi:10.1016/j.snb.2003.07.018.
57. Liu Y, Qu X, Guo H, Chen H, Liu B, Dong S. Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite. *Biosens Bioelectron.* 2006;21(12):2195-2201. doi:10.1016/j.bios.2005.11.014.
58. Quan D, Kim Y, Shin W. Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *J Electroanal Chem.* 2004;561(SUPPL. 1):181-189. doi:10.1016/j.jelechem.2003.08.003.
59. Quan D, Shin W. Amperometric detection of hydroquinone and homogentisic acid with laccase immobilized platinum electrode. *Bull Korean Chem Soc.* 2004;25(6):833-837.
60. Tan Y, Deng W, Ge B, Xie Q, Huang J, Yao S. Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film. *Biosens Bioelectron.* 2009;24(7):2225-2231. doi:10.1016/j.bios.2008.11.026.
61. Chawla S, Rawal R, Sharma S, Pundir CS. An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto nickel nanoparticles/carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline modified gold electrode for determination of phenolic content in fruit juices. *Biochem Eng J.* 2012;68:76-84. doi:10.1016/j.bej.2012.07.008.
62. Chang R. Enzyme Kinetics. *Phys Chem Biosci.* 2005;363-400. doi:10.1002/9780470940020.

63. Purich DL. *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control.*; 2010. doi:10.1016/B978-0-12-380924-7.10012-2.
64. Michaelis L, Menten ML. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z.* 1913;49(February):333-369. doi:10.1021/bi201284u.
65. Briggs GE. A Further Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem J.* 1925;19(6):1037-1038. doi:-.
66. Bankar SB, Bule M V., Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnol Adv.* 2009;27(4):489-501. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
67. Wilson R, Turner APF. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosens Bioelectron.* 1992;7(3):165-185. doi:10.1016/0956-5663(92)87013-F.
68. Hecht HJ, Schomburg D, Kalisz H, Schmid RD. The 3d Structure of Glucose-Oxidase from *Aspergillus-Niger* - Implications for the Use of God as a Biosensor Enzyme. *Biosens Bioelectron.* 1993;8(3-4):197-203. doi:10.1016/0956-5663(93)85033-K.
69. Kalisz HM, Hendle J, Schmid RD. Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;47(5):502-507. doi:10.1007/s002530050963.
70. Leskovac V, Trivić S, Wohlfahrt G, Kandrač J, Peričin D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(4):731-750. doi:10.1016/j.biocel.2004.10.014.
71. Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: A never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(3):369-385. doi:10.1007/s00018-009-0169-1.
72. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(2):215-242. doi:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x.
73. Lante A, Crapisi A, Krastanov A, Spettoli P. Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process Biochem.* 2000;36(1-2):51-58. doi:10.1016/S0032-9592(00)00180-1.
74. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(8):3357-3362. doi:10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000.
75. Crestini C, Argyropoulos DS. The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase. *Bioorganic Med Chem.* 1998;6(11):2161-2169. doi:10.1016/S0968-0896(98)00173-4.
76. Freire RS, Duran N, Kubota LT. Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of Kraft E1 paper mill effluent. *Anal Chim Acta.* 2002;463(2):229-238. doi:10.1016/S0003-2670(02)00417-8.
77. Freire RS, Duran N, Wang J, Kubota LT. Laccase-Based Screen Printed Electrode for Amperometric Detection of Phenolic Compounds. *Anal Lett.* 2002;35(1):29-38. doi:10.1081/AL-120002359.
78. Martinez-Ortiz J, Flores R, Vazquez-Duhalt R. Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell. *Biosens Bioelectron.* 2011;26(5):2626-2631.

doi:10.1016/j.bios.2010.11.022.

79. Yaropolov AI, Skorobogat'ko O V., Vartanov SS, Varfolomeyev SD. Laccase - Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem Biotechnol.* 1994;49(3):257-280. doi:10.1007/BF02783061.
80. Peter MG, Wollenberger U. Phenol-oxidizing enzymes: mechanisms and applications in biosensors. In: *Frontiers in Biosensorics I.* Springer; 1997:63-82.
81. Claus H. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron.* 2004;35(1-2):93-96. doi:10.1016/j.micron.2003.10.029.
82. Petersen LC, Degn H. Steady-state kinetics of laccase from *Rhus vernicifera*. *BBA - Enzymol.* 1978;526(1):85-92. doi:10.1016/0005-2744(78)90292-9.
83. Lowman AM, Peppas NA. Hydrogels. In: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery.* Vol 1. Wiley: New York; 1999:397-418.
84. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(1):27-46. doi:10.1016/S0939-6411(00)00090-4.
85. Langer RS, Peppas N a. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials.* 1981;2(4):201-214. doi:10.1016/0142-9612(81)90059-4.
86. Byrne ME, Park K, Peppas NA. Molecular imprinting within hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(1):149-161. doi:10.1016/S0169-409X(01)00246-0.
87. Peppas NA. Hydrogel. In: *An Introduction to Materials in Medicine.* ; 2012:35-42.
88. Barnes, Hutton, Walters. *An Introduction to Rheology.* Vol 3.; 1989. doi:10.1016/0377-0257(89)85015-3.
89. Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2006;11(2-3):164-170. doi:10.1016/j.cocis.2005.11.001.
90. Kočevar-Nared J, Kristl J, Šmid-Korbar J. Comparative rheological investigation of crude gastric mucin and natural gastric mucus. *Biomaterials.* 1997;18(9):677-681. doi:10.1016/S0142-9612(96)00180-9.
91. Svensson O, Arnebrant T. Mucin layers and multilayers - Physicochemical properties and applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2010;15(6):395-405. doi:10.1016/j.cocis.2010.05.015.
92. Edsman K, Hägerström H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57(1):3-22. doi:10.1211/0022357055227.
93. Capra RH, Strumia M, Vadgama PM, Baruzzi AM. Mucin/carbopol matrix to immobilize oxalate oxidase in a urine oxalate amperometric biosensor. *Anal Chim Acta.* 2005;530(1):49-54. doi:10.1016/j.aca.2004.08.037.
94. Benavidez TE, Capra RH, Alvarez CI, Baruzzi AM. Amperometric biosensor based on immobilization of oxalate oxidase in a mucin/chitosan matrix. *Electroanalysis.* 2009;21(7):837-843. doi:10.1002/elan.200804482.
95. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumins. *Adv Protein Chem.* 1994;45:153-203.

doi:10.1016/S0065-3233(08)60640-3.

96. Fasano M, Curry S, Terreno E, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 2005;57(12):787-796. doi:10.1080/15216540500404093.
97. Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M, Ansen UKR, Giam T, Tagiri MO. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol & Pharm Bull*. 2002;25(6):695-704. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12081132>.
98. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 2005;41(6):1211-1219. doi:10.1002/hep.20720.
99. Patra S, Santhosh K, Pabbathi A, Samanta A. Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorescence correlation spectroscopy. *RSC Adv*. 2012;2(14):6079-6086. doi:10.1039/C2RA20633A.
100. Romero MR, Peralta D, Igarzabal CIA, Baruzzi AM, Strumia MC, Garay F. Supramolecular complex based on MWNTs/Boltorn H40 provides fast response to a Sandwich-type amperometric lactate biosensor. *Sensors Actuators B Chem*. 2017.
101. Ravi Kumar MN. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*. 2000;46(1):1-27. doi:10.1016/S1381-5148(00)00038-9.
102. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;57(1):19-34. doi:10.1016/S0939-6411(03)00161-9.
103. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006;31(7):603-632. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
104. Sashiwa H, Aiba SI. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog Polym Sci*. 2004;29(9):887-908. doi:10.1016/j.progpolymsci.2004.04.001.
105. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme Microb Technol*. 2004;35(2-3):126-139. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
106. Pedro AS, Cabral-Albuquerque E, Ferreira D, Sarmiento B. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydr Polym*. 2009;76(4):501-508. doi:10.1016/j.carbpol.2008.12.016.
107. Yu L, Dean K, Li L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Prog Polym Sci*. 2006;31(6):576-602. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.03.002.
108. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):83-99. doi:10.1016/j.addr.2009.07.019.
109. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*. 2001;22(8):763-768. doi:10.1016/S0142-9612(00)00236-2.
110. Silva CJS, Sousa F, Gübitz G, Cavaco-Paulo A. Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. *Food Technol Biotechnol*. 2004;42(1):51-56. doi:54.
111. Wade LG. *Organic Chemistry*. Pearson Prentice Hall; 2010. <https://books.google.com.ar/books?id=l2QvAQAAIAAJ>.

112. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd Edition*. John Wiley & Sons; 2000. <https://books.google.com.ar/books?id=hQocAAAAQBAJ>.
113. Cussler EL. *Fundamentals of Mass Transfer*. Vol Second.; 1997. doi:10.1017/CBO9780511805134.010.
114. Romero MR, Baruzzi AM, Garay F. Mathematical modeling and experimental results of a sandwich-type amperometric biosensor. *Sensors Actuators, B Chem*. 2012;162(1):284-291. doi:10.1016/j.snb.2011.12.079.
115. Romero MR, Baruzzi AM, Garay FS. How low does the oxygen concentration go within a sandwich-type amperometric biosensor? *Sensors Actuators, B Chem*. 2012;174:279-284. doi:10.1016/j.snb.2012.08.027.
116. Romero MR, Ahumada F, Garay F, Baruzzi AM. Amperometric biosensor for direct blood lactate detection. *Anal Chem*. 2010;82(13):5568-5572. doi:10.1021/ac1004426.
117. Hariharan D, Peppas NA. Swelling of ionic and neutral polymer networks in ionic solutions. *J Memb Sci*. 1993;78(1-2):1-12. doi:10.1016/0376-7388(93)85242-O.
118. Ricka J, Tanaka T. Swelling of ionic gels: quantitative performance of the Donnan theory. *Macromolecules*. 1984;17(12):2916-2921. doi:10.1021/ma00142a081.
119. Falk B, Garramone S, Shivkumar S. Diffusion coefficient of paracetamol in a chitosan hydrogel. *Mater Lett*. 2004;58(26):3261-3265. doi:10.1016/j.matlet.2004.05.072.
120. McNaught AD, Wilkinson A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*.; 2014. doi:http://dx.doi.org/10.1351/goldbook.l03352.
121. Ich. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. In: *International Conference on Harmonization*. Vol 1994. ; 2005:17. doi:http://www.ich.org/fileadmin/Public\_Web\_Site/ICH\_Products/Guidelines/Quality/Q2\_R1/Step4/Q2\_R1\_Guideline.pdf.
122. Vashist SK, Zheng D, Al-Rubeaan K, Luong JHT, Sheu FS. Technology behind commercial devices for blood glucose monitoring in diabetes management: A review. *Anal Chim Acta*. 2011;703(2):124-136. doi:10.1016/j.aca.2011.07.024.
123. Kudanga T, Nyanhongo GS, Guebitz GM, Burton S. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme Microb Technol*. 2011;48(3):195-208. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.11.007.
124. Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme Microb Technol*. 2002;31(7):907-931. doi:10.1016/S0141-0229(02)00214-4.
125. Diaconu M, Litescu SC, Radu GL. Laccase-MWCNT-chitosan biosensor-A new tool for total polyphenolic content evaluation from in vitro cultivated plants. *Sensors Actuators, B Chem*. 2010;145(2):800-806. doi:10.1016/j.snb.2010.01.064.
126. Garay FS. How low does the oxygen concentration go within a sandwich-type amperometric biosensor? Part 2: Theory for PPO biosensors. *Sensors Actuators, B Chem*. 2015;207:581-587. doi:10.1016/j.snb.2014.10.105.
127. Lin CC, Metters AT. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(12-13):1379-1408.

doi:10.1016/j.addr.2006.09.004.

128. Romero MR. Estudio químico y electroquímico de interacciones entre biomoléculas y sus aplicaciones en biosensores. 2011.
129. Benavidez TE. *Estudio Fisicoquímico de Hidrogeles Mucina/quitosán Para Inmovilización de Enzimas*. Córdoba: Facultad de Ciencias Químicas, UNC; 2010.
130. Pan X, Kan J, Yuan L. Polyaniline glucose oxidase biosensor prepared with template process. *Sensors Actuators B Chem.* 2004;102(2):325-330. doi:https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.090.
131. Zeng Q, Cheng J-S, Liu X-F, Bai H-T, Jiang J-H. Palladium nanoparticle/chitosan-grafted graphene nanocomposites for construction of a glucose biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2011;26(8):3456-3463. doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.01.024.
132. Xue H, Shen Z, Li Y. Polyaniline–polyisoprene composite film based glucose biosensor with high permselectivity. *Synth Met.* 2001;124(2):345-349. doi:https://doi.org/10.1016/S0379-6779(01)00381-2.
133. Li H, He J, Zhao Y, et al. Immobilization of glucose oxidase and platinum on mesoporous silica nanoparticles for the fabrication of glucose biosensor. *Electrochim Acta.* 2011;56(7):2960-2965. doi:https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.12.098.
134. Xue H, Shen Z, Li C. Improved selectivity and stability of glucose biosensor based on in situ electropolymerized polyaniline–polyacrylonitrile composite film. *Biosens Bioelectron.* 2005;20(11):2330-2334. doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.07.018.
135. He C, Liu J, Zhang Q, Wu C. A novel stable amperometric glucose biosensor based on the adsorption of glucose oxidase on poly(methyl methacrylate)–bovine serum albumin core–shell nanoparticles. *Sensors Actuators B Chem.* 2012;166-167:802-808. doi:https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.081.
136. Fatoni A, Numnuam A, Kanatharana P, Limbut W, Thammakhet C, Thavarungkul P. A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene. *Sensors Actuators, B Chem.* 2013;185:725-734. doi:10.1016/j.snb.2013.05.056.
137. Xiang C, Zou Y, Qiu S, Sun L, Xu F, Zhou H. Bionzymatic glucose biosensor based on direct electrochemistry of cytochrome c on gold nanoparticles/polyaniline nanospheres composite. *Talanta.* 2013;110:96-100. doi:https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.022.
138. Qiu J-D, Zhou W-M, Guo J, Wang R, Liang R-P. Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose. *Anal Biochem.* 2009;385(2):264-269. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.12.002.
139. Zheng B, Xie S, Qian L, Yuan H, Xiao D, Choi MMF. Gold nanoparticles-coated eggshell membrane with immobilized glucose oxidase for fabrication of glucose biosensor. *Sensors Actuators B Chem.* 2011;152(1):49-55. doi:https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.09.051.
140. Zou Y, Sun L-X, Xu F. Biosensor based on polyaniline–Prussian Blue/multi-walled carbon nanotubes hybrid composites. *Biosens Bioelectron.* 2007;22(11):2669-2674. doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.10.035.
141. Gupta G, Rajendran V, Atanassov P. Laccase Biosensor on Monolayer-Modified Gold

- Electrode. *Electroanalysis*. 15(20):1577-1583. doi:10.1002/elan.200302724.
142. Chen X, Li D, Li G, et al. Facile fabrication of gold nanoparticle on zein ultrafine fibers and their application for catechol biosensor. *Appl Surf Sci*. 2015;328:444-452. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.12.070>.
143. Ibarra-Escutia P, Gómez JJ, Calas-Blanchard C, Marty JL, Ramírez-Silva MT. Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions. *Talanta*. 2010;81(4):1636-1642. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.03.017>.
144. Jarosz-Wilkolazka A, Ruzgas T, Gorton L. Amperometric detection of mono- and diphenols at Cerrena unicolor laccase-modified graphite electrode: Correlation between sensitivity and substrate structure. *Talanta*. 2005;66(5):1219-1224. doi:10.1016/j.talanta.2005.01.026.
145. Xu X, Guo M, Lu P, Wang R. Development of amperometric laccase biosensor through immobilizing enzyme in copper-containing ordered mesoporous carbon (Cu-OMC)/chitosan matrix. *Mater Sci Eng C*. 2010;30(5):722-729. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.03.006>.
146. Fu J, Qiao H, Li D, Luo L, Chen K, Wei Q. Laccase Biosensor Based on Electrospun Copper/Carbon Composite Nanofibers for Catechol Detection. *Sensors*. 2014;14(2):3543-3556. doi:10.3390/s140203543.
147. Mena ML, Carralero V, González-Cortés A, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. Laccase Biosensor Based on N-Succinimidyl-3-Thiopropionate-Functionalized Gold Electrodes. *Electroanalysis*. 17(23):2147-2155. doi:10.1002/elan.200503345.
148. Pang Y, Zeng G, Tang L, Zhang Y, Li Z, Chen L. Laccase biosensor using magnetic multiwalled carbon nanotubes and chitosan/silica hybrid membrane modified magnetic carbon paste electrode. *J Cent South Univ Technol*. 2011;18(6):1849-1856. doi:10.1007/s11771-011-0913-1.