

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



**DESARROLLO DE ELECTRODOS COMPÓSITOS
ENZIMÁTICOS PARA LA DETECCIÓN Y
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Beatriz Serra Fernández**

Bajo la dirección de los Doctores:
José Manuel Pingarrón Carrazón
Ángel Julio Reviejo García

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1846-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DESARROLLO DE ELECTRODOS COMPÓSITOS
ENZIMÁTICOS PARA LA DETECCIÓN Y
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

**Directores: José Manuel Pingarrón Carrazón
Ángel Julio Reviejo García**



BEATRIZ SERRA FERNÁNDEZ

MADRID, 2002



Universidad Complutense
Facultad de Ciencias Químicas
Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29

**JOSÉ MANUEL PINGARRÓN CARRAZÓN, CATEDRÁTICO Y
DIRECTOR DE ESTE DEPARTAMENTO,**

HACE CONSTAR:

Que el trabajo titulado "*Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos*", ha sido realizado en este Departamento por Dña. Beatriz Serra Fernández bajo mi dirección y la del Dr. Ángel Julio Reviejo García, Profesor Titular de dicho departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, abril 2002

Fdo. José M. Pingarrón Carrazón

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que, de una forma u otra, han hecho posible la realización de esta Tesis.

En primer lugar, a quienes la han dirigido, el Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón y el Dr. Ángel Julio Reviejo García, por su dedicación y apoyo constantes, y por su preocupación tanto en lo científico como en lo humano.

A todos los compañeros y miembros del Grupo de Electroanálisis, quienes han contribuido a hacer agradable la labor diaria, y tantas veces me han prestado su ayuda. A Silvia y Beatriz por su colaboración.

En especial, deseo agradecer a Nuria todo el tiempo compartido en el laboratorio, que tanto me ha enseñado y aportado.

A Miriam, Raúl, Rocío, Ruth, Íñigo, Ana, y Mariluz, por su apoyo, compañía y amistad.

Finalmente a mi familia y a Mario. Esta Tesis no se habría terminado sin ellos.

A la memoria de Alfredo, mi padre

ÍNDICE

I. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

II. INTRODUCCIÓN

II.1. Generalidades sobre compuestos fenólicos

II.1.1. Propiedades físicas y químicas

II.1.2. Procedencia, utilidad y distribución en el medio ambiente de los compuestos fenólicos

II.1.3. Mecanismos de actuación y efectos tóxicos

II.1.4. Legislación sobre compuestos fenólicos

II.1.5. Revisión bibliográfica de métodos para la determinación de compuestos fenólicos

II.2. Biosensores

II.2.1. Enzimas selectivas de compuestos fenólicos

II.2.1.1. Tirosinasa

II.2.1.2. Peroxidasa

II.2.1.3. Lacasa

II.2.2. Enzimas en medios orgánicos y en micelas inversas

II.2.3. Electrodo compósito

II.2.4. Biosensores amperométricos para la determinación de compuestos fenólicos: revisión bibliográfica

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Instrumentación

III.1.1. Aparatos

III.1.2. Electrodo y células de trabajo

III.2. Reactivos

III.3. Procedimiento experimental

III.3.1. Preparación de disoluciones

III.3.2. Preparación de los electrodos compósitos

III.3.2.1. Preparación de los electrodos compósitos de grafito-Teflón

III.3.2.2. Preparación de los electrodos compósitos de grafito-EPD

III.3.2.3. Preparación de los electrodos compósitos de RVC-resina epoxi

III.3.2.3.1. Pretratamiento del RVC

III.3.2.3.2. Preparación de los electrodos de RVC-resina epoxi

III.3.2.4. Preparación de los electrodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa

III.3.2.5. Preparación de los electrodos compósitos de grafito-EPD-tirosinasa

III.3.2.6. Preparación de los electrodos compósitos de RVC-resina epoxi-tirosinasa

III.3.2.7. Preparación de los electrodos de grafito-Teflón-peroxidasa

III.3.2.8. Preparación de los electrodos de grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa

III.3.2.9. Preparación de los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa-peroxidasa

III.3.2.10. Preparación de los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa

III.3.3. Regeneración de la superficie de los electrodos

III.3.4. Activación de los electrodos de grafito-Teflón-Tyr en micelas inversas

III.3.5. Obtención de los amperogramas en discontinuo

III.3.6. Obtención de los fiagramas

III.3.7. Medida de la resistividad de las pastillas compósitas de grafito-Teflón y grafito-EPD

III.3.8. Cálculo del área activa de los electrodos compósitos de tirosinasa

III.3.9. Obtención de los voltamperogramas cíclicos

III.3.10. Obtención de microfotografías de barrido electrónico de las superficies de los electrodos compósitos

III.3.11. Cálculo de los coeficientes de capacitancia de los electrodos de grafito-Teflón (70%), grafito-EPD (5%), RVC-resina epoxi y carbono vitrificado

III.3.12. Estudio de la influencia de la velocidad de rotación del electrodo sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario del catecol

III.3.13. Cálculo de la actividad enzimática en la superficie de los biosensores compósitos de tirosinasa

III.3.14. Empleo de electrodos compósitos para el análisis de muestras en continuo

III.3.15. Análisis de muestras de aguas procedentes de una refinera de petróleo mediante el método oficial colorimétrico de la 4-aminoantipirina

- III.3.16. Pretratamiento de las muestras de aguas procedentes de refinería para el análisis mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas
- III.3.17. Análisis del contenido fenólico mediante CG-EM

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Características estructurales de los electrodos compósitos de grafito-Teflón, grafito-EPD y RVC-resina epoxi

- IV.1.1. Umbral de percolación de los electrodos compósitos de grafito-Teflón y grafito-polímero de etilén-propilén-dieno (EPD)
- IV.1.2. Área activa aparente de los electrodos compósitos
- IV.1.3. Voltamperogramas cíclicos
- IV.1.4. Caracterización superficial de los electrodos mediante micrografía de barrido electrónico
- IV.1.5. Corriente fondo obtenida con los electrodos compósitos

IV.2. Biosensores amperométricos compósitos de tirosinasa en medio acuoso

- IV.2.1. Optimización de las variables experimentales
 - IV.2.1.1. Optimización de la composición de las matrices electródicas
 - IV.2.1.1.1. Electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa
 - IV.2.1.1.2. Electrodo de grafito-polímero de etilén/propilén/ dieno-tirosinasa
 - IV.2.1.1.3. Electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa
 - IV.2.1.2. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario
 - IV.2.1.3. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario
- IV.2.2. Estabilidad de los biosensores compósitos de tirosinasa
 - IV.2.2.1. Repetibilidad de las medidas sucesivas sin regeneración de la superficie electródica
 - IV.2.2.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica por pulido
 - IV.2.2.3. Tiempo de vida útil de los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa, grafito-EPD-tirosinasa y RVC-resina epoxi-tirosinasa
 - IV.2.2.4. Reproducibilidad de las medidas realizadas con diferentes electrodos
 - IV.2.2.5. Efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre
- IV.2.3. Causas de la variabilidad de las respuestas de los electrodos compósitos de tirosinasa
- IV.2.4. Cálculo de la actividad enzimática de los electrodos compósitos de tirosinasa
- IV.2.5. Reciclado electródico/enzimático de o-difenoles
- IV.2.6. Cálculo de las constantes cinéticas de la reacción enzimática
- IV.2.7. Etapa limitante de la velocidad de reacción
- IV.2.8. Curvas de calibrado y características analíticas
- IV.2.9. Sensibilidad de los electrodos compósitos de tirosinasa para los distintos compuestos fenólicos estudiados
- IV.2.10. Protocolo para el aseguramiento de la calidad de los biosensores
- IV.2.11. Electrodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa, grafito-EPD-tirosinasa y RVC-resina epoxi-tirosinasa como detectores amperométricos en sistemas en flujo
 - IV.2.11.1. Optimización de las variables experimentales
 - IV.2.11.1.1. Caudal de la disolución portadora
 - IV.2.11.1.2. Optimización del volumen de inyección
 - IV.2.11.2. Repetibilidad de las señales amperométricas
 - IV.2.11.3. Tiempo de vida útil de los electrodos compósitos de tirosinasa para la monitorización mediante inyección en flujo de compuestos fenólicos
 - IV.2.11.4. Curvas de calibrado y características analíticas

IV.3. Electrodo compuesto de grafito-Teflón-tirosinasa utilizando como medio de trabajo micelas inversas

- IV.3.1. Efecto de la composición de la micela inversa sobre la respuesta del biosensor de tirosinasa
 - IV.3.1.1. Naturaleza del disolvente orgánico
 - IV.3.1.2. Efecto de la naturaleza del agente emulsificante y del contenido de fase acuosa dispersa en la micela inversa
- IV.3.2. Influencia de las diferentes variables experimentales sobre la respuesta amperométrica del electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa
 - IV.3.2.1. Optimización de la composición de la micela inversa
 - IV.3.2.2. Efecto del potencial aplicado
- IV.3.3. Estabilidad del electrodo compuesto de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas
 - IV.3.3.1. Repetibilidad de las medidas amperométricas sin regeneración de la superficie electródica

- IV.3.3.2. Reproducibilidad de las medidas amperométricas después de regenerar la superficie electrodo por pulido
- IV.3.3.3. Vida útil de un electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa
- IV.3.3.4. Reproducibilidad en la fabricación de diferentes electrodos
- IV.3.3.5. Efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla compósita
- IV.3.4. Cálculo de las constantes cinéticas de la reacción enzimática
- IV.3.5. Curvas de calibrado y características analíticas
- IV.4. Electrodos compósitos de grafito-Teflón-peroxidasa**
 - IV.4.1. Optimización de variables experimentales
 - IV.4.1.1. Influencia de la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución de trabajo
 - IV.4.1.2. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en estado estacionario
 - IV.4.1.3. Efecto del potencial aplicado
 - IV.4.2. Estabilidad del electrodo compósito de grafito-Teflón-HRP
 - IV.4.2.1. Repetibilidad de las medidas
 - IV.4.2.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electrodo por pulido
 - IV.4.2.3. Tiempo de vida útil de un biosensor
 - IV.4.2.4. Reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos
 - IV.4.2.5. Efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre
 - IV.4.3. Cálculo de las constantes cinéticas
 - IV.4.4. Curvas de calibrado y características analíticas
 - IV.4.5. Influencia de la velocidad de reacción sobre la reproducibilidad de la señal amperométrica
 - IV.4.6. Comparación de la sensibilidad obtenida con el biosensor de peroxidasa para los diferentes compuestos fenólicos
 - IV.4.7. Electrodos de grafito-Teflón-peroxidasa como detectores en sistemas de inyección en flujo
 - IV.4.7.1. Optimización de las variables experimentales
 - IV.4.7.1.1. Efecto del caudal de la disolución portadora
 - IV.4.7.1.2. Optimización de la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución portadora
 - IV.4.7.2. Repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas
 - IV.4.7.3. Curvas de calibrado y características analíticas
 - IV.4.7.4. Tiempo necesario para recuperar la línea base del pico FIA
- IV.5. Electrodos compósitos de grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa**
 - IV.5.1. Optimización de variables experimentales
 - IV.5.1.1. Influencia de la concentración de glucosa en disolución sobre la intensidad de corriente en estado estacionario
 - IV.5.1.2. Influencia del pH
 - IV.5.1.3. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario
 - IV.5.2. Estabilidad del electrodo compósito de grafito-Teflón-GOD-HRP
 - IV.5.2.1. Repetibilidad de las medidas
 - IV.5.2.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie del electrodo por pulido
 - IV.5.2.3. Vida útil de un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP
 - IV.5.2.4. Reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos
 - IV.5.3. Curvas de calibrado y características analíticas
 - IV.5.4. Electrodos de grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa como detectores en sistemas de inyección en flujo
 - IV.5.4.1. Optimización de las variables experimentales
 - IV.5.4.1.1. Influencia del caudal
 - IV.5.4.1.2. Optimización de la concentración de glucosa en la disolución portadora
 - IV.5.4.2. Repetibilidad de las señales amperométricas
 - IV.5.4.3. Estabilidad del electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP en flujo continuo
 - IV.5.4.4. Curvas de calibrado y características analíticas
 - IV.5.4.5. Tiempo necesario para la desaparición del pico FIA
- IV.6. Electrodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa**
 - IV.6.1. Electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa-peroxidasa
 - IV.6.2. Electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa
 - IV.6.2.1. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario

- IV.6.2.2. Estabilidad del electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP
 - IV.6.2.2.1. Repetibilidad de las medias
 - IV.6.2.2.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica
 - IV.6.2.2.3. Estabilidad del electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP con el tiempo
 - IV.6.2.2.4. Reproducibilidad de las medidas efectuadas con diferentes electrodos
- IV.6.3. Electrodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa como detectores amperométricos en sistemas en flujo
 - IV.6.3.1. Optimización de variables experimentales
 - IV.6.3.1.1. Influencia del caudal
 - IV.6.3.1.2. Influencia de la concentración de glucosa en la disolución portadora
 - IV.6.3.2. Repetibilidad de los picos FIA
 - IV.6.3.3. Curvas de calibrado y características analíticas
- IV.7. Electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa y grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa en paralelo
 - IV.7.1. Repetibilidad de las señales analíticas
 - IV.7.2. Curvas de calibrado y características analíticas
- IV.8. Aplicación de los biosensores desarrollados al análisis de muestras reales
 - IV.8.1. Elección del material adsorbente para la eliminación en línea de los compuestos fenólicos contenidos en la muestra
 - IV.8.2. Evaluación del contenido en compuestos fenólicos en muestras sintéticas de agua de grifo
 - IV.8.3. Determinación del contenido total de fenoles en aguas de desecho de una refinería de petróleo

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

ANEXO I: Tablas de las señales de referencia para los gráficos de control de los electrodos compósitos de tirosinasa en medio acuoso.
ANEXO II: Cromatogramas y espectros de masas obtenidos en el análisis de las muestras.

I. Objetivo y plan de trabajo

El objetivo de esta Tesis es el diseño, desarrollo, optimización y caracterización de biosensores amperométricos enzimáticos para la detección in situ y en tiempo real de compuestos fenólicos, contaminantes medioambientales generados en una gran variedad de actividades industriales.

Puesto que el fundamento de la respuesta de un biosensor está basado en el biorreconocimiento de dichas especies y su posterior transducción en señal analítica, se ha realizado un estudio profundo de ambas etapas. Para ello, se han utilizado distintos materiales enzimáticos y electroódicos en cada una de ellas.

Como transductores amperométricos se planificó el diseño y desarrollo de tres materiales compósitos distintos, ya que este tipo de electrodos posee unas características excelentes para la construcción de biosensores amperométricos. Los materiales ensayados fueron grafito-Teflón, grafito-polímero de etilen/propilen/dieno, y carbono vítreo reticulado-resina epoxy. En primer lugar se examinó su morfología y comportamiento electroquímico, para, posteriormente, proceder a la inmovilización de la enzima tirosinasa en el seno de las tres matrices electroódicas compósitas. Se obtuvieron, de esta manera, tres tipos de biosensores, cuya capacidad para la detección de fenoles en medio acuoso se ha comparado en términos de sensibilidad, límites de detección, estabilidad y reproducibilidad, tanto en sistemas en discontinuo como mediante análisis por inyección en flujo.

Se estimó la cantidad de enzima inmovilizada en cada electrodo, realizándose un estudio de la cinética de la reacción enzimática en cada uno de los materiales electroódicos, con objeto de poder determinar cuál es la etapa limitante de la velocidad global de la respuesta de los biosensores, y evaluar cómo afecta cada matriz a dicha reacción.

Por otra parte, la posibilidad de empleo de los sistemas enzimáticos en disolventes orgánicos, cuyos efectos sobre la proteína de la enzima pueden ser beneficiosos en algunos aspectos, nos llevó a estudiar el comportamiento del biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa en un medio de trabajo constituido por micelas inversas, que pueden considerarse como medios de solubilización universales tanto para analitos hidrofílicos como hidrofóbicos. La comparación de la respuesta de este biosensor en este medio y en medio acuoso permite evaluar la influencia del entorno de trabajo en la actividad enzimática.

Otro objetivo que se planteó en esta Tesis fue el diseño y desarrollo de un nuevo tipo de biosensor compuesto de peroxidasa capaz de detectar fenoles manteniendo un exceso de peróxido de hidrógeno en disolución, y aprovechando que los compuestos fenólicos son sustancias que pueden actuar como donadoras de electrones en el ciclo de la peroxidasa para la reducción del peróxido de hidrógeno. De este modo, se procedió a fabricar y optimizar un electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa, y a caracterizar su capacidad para la detección y determinación de compuestos fenólicos, tanto en discontinuo como en flujo.

Un diseño posterior de biosensor fue el compuesto por grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa. La hipótesis de trabajo fue proceder a la detección de fenoles en un medio con exceso de glucosa. De esta forma, el peróxido de hidrógeno necesario para producir la señal analítica es generado in situ, lo que resuelve los problemas de inestabilidad de las disoluciones de peróxido de hidrógeno y minimiza el efecto nocivo que grandes concentraciones de este compuesto tienen sobre la peroxidasa.

Finalmente, y con objeto de acoplar la capacidad catalítica de la tirosinasa con la del sistema glucosa oxidasa-peroxidasa, se procedió a inmovilizar las tres enzimas en una misma matriz electrodica de grafito-Teflón, con el fin de desarrollar un biosensor con capacidad para detectar un mayor número de fenoles.

Por otro lado, se evaluó la posibilidad de utilizar detección dual con los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa y grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa.

El plan de trabajo para todos los biosensores compósitos desarrollados incluyó la evaluación de aspectos como el tiempo de vida útil de los electrodos, la reproducibilidad en las medidas obtenidas con distintos biosensores fabricados del mismo modo y el establecimiento de las características analíticas para distintos compuestos fenólicos.

Finalmente, un último objetivo fue aplicar los biosensores desarrollados al análisis de diferentes muestras de aguas, con la pretensión de proporcionar un índice de fenoles, que permita conocer de una forma rápida y fiable si la muestra contiene compuestos fenólicos por encima de un valor establecido en la legislación y, de este modo, posibilitar la toma de decisiones oportunas en el menor tiempo posible.

Las muestras con un alto contenido en compuestos fenólicos se analizaron con sistemas en discontinuo, mientras que se empleó la metodología propia del análisis por inyección en flujo para las muestras con bajas concentraciones de fenoles. En este último caso, dependiendo de la naturaleza de la muestra, las diferencias de conductividad entre ésta y el portador pueden producir problemas en la medida amperométrica. Estos inconvenientes se evitaron introduciendo un cartucho adsorbente capaz de retener fenoles en el sistema FIA antes de la válvula de inyección. La hipótesis de trabajo fue que al separar los compuestos fenólicos de la muestra ésta pudiera utilizarse como portador en el sistema en flujo. Esta metodología, además de permitir utilizar la disolución portadora óptima para cualquier muestra, posibilita la utilización del cartucho como sistema de preconcentración de los fenoles.

Las muestras ensayadas fueron, en primer lugar, agua de grifo enriquecida con cantidades variables de diferentes compuestos fenólicos con el objeto de comprobar la fiabilidad de los métodos desarrollados antes de su aplicación a muestras más complejas procedentes de efluentes industriales. Seguidamente, se procedió a analizar muestras procedentes de aguas de vertido de una refinería de petróleo, tomadas en diferentes puntos de la línea de tratamiento de estas aguas antes de su descarga al medio ambiente.

II. Introducción

II.1. Generalidades sobre compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos aromáticos que se caracterizan por tener uno o varios grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático. Por lo general, se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol.

En este apartado se pretende proporcionar una visión general del papel que juega esta familia de compuestos en diversas actividades industriales, lo que conlleva la problemática ambiental derivada de su descarga en el medio. Se comentarán los efectos tóxicos de los fenoles sobre los organismos vivos y se reseñará la legislación nacional e internacional en la que se recogen los niveles máximos permitidos en aguas. Asimismo se revisarán los métodos de análisis recogidos en la bibliografía.

II.1.1. Propiedades físicas y químicas

La determinación de propiedades físico-químicas de los compuestos fenólicos, tales como su solubilidad en agua, los valores de pK_a , el coeficiente de reparto n-octanol/agua ($\log P$) y su densidad relativa, ha sido la base sobre la que se ha edificado el conocimiento de los factores moleculares que gobiernan su distribución medioambiental. Estos datos son también esenciales para la interpretación de los mecanismos de las reacciones orgánicas y para los estudios concernientes a la relación estructura-actividad aplicables a Farmacología y Toxicología. En la Tabla 1 se recogen algunas constantes físico-químicas características, así como la estructura de los fenoles que serán objeto de nuestro estudio.

Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, pero con puntos de ebullición bastante elevados debido a su facilidad para formar enlaces de hidrógeno. Son incoloros, salvo que presenten algún grupo capaz de dotarles de coloración, como por ejemplo el grupo $-NO_2$. No obstante, se oxidan con facilidad, por lo que a menudo se les encuentra coloreados, a menos que estén cuidadosamente purificados. La oxidación de los fenoles depende del grado de exposición a la luz y al aire y de la presencia de impurezas metálicas. El transcurso de la oxidación es complejo e influye en gran medida su propia estructura, aunque la mayoría de ellos dan lugar a derivados de difenilo o a quinonas que son las responsables del color.

La mayor parte de los fenoles, fundamentalmente los más sustituidos, son poco solubles en agua y su solubilidad se ve drásticamente disminuida cuando aumenta la fuerza iónica del medio.

En cuanto a sus propiedades químicas, los fenoles son compuestos de carácter ligeramente ácido, propiedad que los distingue de los alcoholes. Esta diferencia entre los alcoholes y los fenoles se debe a la estabilidad del ión fenóxido por deslocalización de la carga en el anillo aromático. La mayoría de los fenoles son menos ácidos que el agua, lo que permite que los hidróxidos alcalinos en disolución acuosa reaccionen con ellos para formar sales o iones fenóxidos, mientras que los ácidos minerales los transforman de nuevo en fenoles. En general, la constante de acidez de los fenoles está comprendida entre 10^{-5} y 10^{-10} , presentando, por tanto, una acidez considerablemente menor que la de los ácidos carboxílicos (K_a alrededor de 10^{-5}).

La presencia de sustituyentes donadores de electrones (activantes) en el anillo aromático hace disminuir la acidez del fenol al dificultar la deslocalización de la carga en el anillo. Por ello, los metilfenoles tienen valores de pK_a más elevados, mientras que la presencia de sustituyentes aceptores de electrones (desactivantes), como el $-\text{NO}_2$ y el $-\text{Cl}$, hace aumentar la acidez del fenol considerablemente. El efecto es más acusado cuando los sustituyentes se encuentran en la posición orto- o para- con respecto al grupo hidroxilo, debido a la conjugación de esas posiciones con dicho grupo.

Tabla 1. Constantes físico-químicas de los compuestos fenólicos

Compuesto	Estructura	P.F., °C	P.E., °C	pK _a	Solubilidad en agua, % (w/w) 25°	log K _{ow}
Fenol		43	181.7	10.0	6.6	1.46
Catecol		105	245.5		66.7	
2-clorofenol		9	175	8.48	<0.1	2.17
3-clorofenol		33	214	9.02	0.26	2.49
4-clorofenol		43	220	9.37	2.71	2.42
2,4-diclorofenol		45	210	7.85	PS	3.12
2,4,6-triclorofenol		70	246	6.00	PS	3.38
2,3,5,6-tetraclorofenol				5.44		
Pentaclorofenol		191	310	5.26	20-25 ppm	5.01
4-cloro-2-metilfenol		46	223	9.12		
4-cloro-3-metilfenol		67	235	9.55	0.4	3.10
2-metilfenol		30.9	191	10.26	S	1.95
3-metilfenol		11.5	202	10.00	PS	2.00
4-metilfenol		35	202	10.26	PS	1.93
2,3-dimetilfenol		75	218	10.50	PS	
2,4-dimetilfenol		27	210	10.58	PS	2.42
2,6-dimetilfenol				10.69	PS	
3,4-dimetilfenol		67	227	10.36	PS	
3,5-dimetilfenol		65	222	10.19	PS	

II.1.2. Procedencia, utilidad y distribución en el medio ambiente de los compuestos fenólicos

La presencia de fenoles en el medio ambiente es consecuencia tanto de acciones naturales como del aporte antropogénico, fundamentalmente, de carácter industrial. Desde el punto de vista de la contaminación, es de sumo interés la presencia de estos compuestos en aguas y sedimentos, por lo que es necesario prestar interés al origen, migración y distribución de los fenoles en los distintos tipos de efluentes acuosos. Antes de tratar con más detalle este tema, es interesante señalar la presencia de fenoles en otras partes de la naturaleza. Así, por ejemplo, el ácido o-hidroxibenzóico (ácido salicílico), del que se deriva la aspirina, puede obtenerse de la corteza de sauce. El timol, anetol, eugenol e isoeugenol son responsables de los olores del tomillo, el anís, el clavo y la nuez moscada, respectivamente. Algunos tienen efectos fisiológicos y así, se ha comprobado que los constituyentes irritantes de la hiedra contienen el sistema del 1,2-dihidroxibenceno (catecol) sustituido en posición meta- con una cadena larga de un grado de insaturación variable. El salicilato de metilo se halla en el aceite de *Guatheria odorata*. La tirosina, un aminoácido fenólico, se encuentra en los centros activos de algunas enzimas, y su oxidación provocada por la tirosinasa produce melanina. En general, se encuentran numerosos compuestos fenólicos en plantas cuyas funciones biológicas se deben principalmente a su actividad antioxidante, su capacidad de unir especies con oxígeno activo y especies electrófilas, la capacidad de inhibir la nitrosación y de quelatar iones metálicos, su potencial autooxidación, y su capacidad de modular ciertas actividades enzimáticas en las células.

FENOLÉS EN AGUAS NATURALES

En la Tabla 2 se muestra un esquema simplificado y altamente condensado que enumera los productos de descomposición de las sustancias biológicas, e incluye una lista abreviada de los compuestos orgánicos encontrados e identificados en aguas naturales.

Puede observarse cómo los compuestos fenólicos son productos intermedios de degradación de sustancias proteicas, y cómo, a su vez, son degradados para formar otro tipo de compuestos.

Tabla 2. Proceso de descomposición de la sustancia biológicas

Sustancias biológicas	Productos intermedios de descomposición	Productos intermedios y finales encontrados típicamente en aguas naturales
Proteínas Polipéptidos	$\text{RCH}(\text{N}(\text{H}_2))\text{COOH}$ (aminoácidos)	NH_4^+ , CO_2 , HS , CH_4 , HPO_4^{2-} , péptidos, aminoácidos, urea, FENOLÉS , indol, ácidos grasos, mercaptanos.
Polinucleótidos, nucleótidos	Bases de purina y pirimidina	
Lípidos Grasas Ceras Aceites	$\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + \text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$ Ácidos grasos glicerol	CO_2 , CH_4 , ácidos alifáticos, acético, láctico, cítrico, glicólico, málico, palmítico, esteárico, oléico, carbohidratos e hidrocarburos.

Carbohidratos				
Celulosa	} $C_x(H_2O)_y$ →	} Monosacáridos oligosacáridos	} Hexosas Pentosas Glucosamina	} HPO_4^{2-} , CO_2 , C_2H_4 , glucosa, fructosa, galactosaarabinosa, ribosa, xilosa
Almidón				
Hemicelulosa	} $(C_2H_2O)_x$ →	} alcoholes aromáticos insaturados	} ácidos polihidroxicarboxílicos	
Lignina				
Porfirinas y pigmentos de plantas				Fitano, priatano, carotenoides, isoprenoide, alcoholes, cetonas, ácidos, porfirinas
Clorofila				
Hemina				
Carotenos y xantofilos	Clorin	feofitin	hidrocarburos	
Sustancias complejas formadas a partir de intermediarios, ej.:				
FENÓLES + quinonas + amino compuestos		Melaninas, melanoidina, "gelbstoffe"		
Amino compuestos + productos de ruptura de carbohidratos		Ácidos húmicos, fúlvicos →		

La cantidad de derivados hidroxilados expulsados diariamente por el organismo humano (transformación de triptófano en indoxilo y procesos de desintoxicación) se evalúa de 200 a 300 mg. Estos fenoles evolucionan con bastante rapidez bajo la acción bacteriana, por lo que, cuando se encuentran estos niveles en el medio ambiente en ausencia de toda contaminación industrial, se pone de manifiesto una contaminación fecal reciente.

La concentración media de fenoles en aguas naturales no contaminadas es de $2 \mu g L^{-1}$, aunque este valor varía mucho de un tipo de agua a otro.

FENÓLES DE PROCEDENCIA INDUSTRIAL EN AGUAS

La mayoría de los compuestos fenólicos que se pueden encontrar en aguas residuales son de origen industrial. Son utilizados en industrias de cuero y textiles, coquerías, refineras de petróleo, destilerías de alquitrán, síntesis y formulación de pesticidas, fábricas de pasta de papel, plantas de tratamiento de maderas, fábricas de colorantes, etc. En la Tabla 3 se muestran los principales usos y orígenes industriales de estos compuestos (Buijema et. al, 1979).

Por ejemplo, el fenol y sus derivados más simples se utilizan principalmente en la fabricación de polímeros sintéticos y plásticos entre los que se encuentran la baquelita y polímeros similares. Algunos fenoles se utilizan como plaguicidas por su acción herbicida, fungicida e insecticida, lo que provoca su difusión en el medio ambiente a través de las actividades agrícolas (Primo Yufera y Carrascon Dorrien, 1980) y su entrada en la cadena alimenticia.

Antiguamente los fenoles se empleaban como germicidas medicinales y sanitarios, pero su uso se ha eliminado debido a su carácter irritante, que puede llegar a producir necrosis si el contacto es prolongado. Dado su carácter bactericida, se emplean en formulaciones de productos de limpieza y en dentífricos.

La aplicación de ciertos fenoles para la obtención de medicamentos es bien conocida; así, el ácido salicílico es el precursor de la aspirina, y el catecol se emplea en la fabricación de guayacol y adrenalina. Igualmente, los fenoles son

productos de partida de ciertos ésteres que se emplean en perfumería, como el anisol y el fenetol. Otros se usan para la obtención de sabores, como la vainillina y el anetol, que son de origen natural, o los ésteres alifáticos del 2-amino-4-nitrofenol, que posee un gran poder edulcorante.

Otros fenoles, como el ácido pícrico y el diazonitrofenol, presentan propiedades detonantes, y son de utilidad en ciertos explosivos. La hidroquinona (1,4-dihidroxi-benceno), el pirogalol (1,2,3-trihidroxi-benceno), el 4-aminofenol y sus derivados se emplean en fotografía como reveladores por oxidarse muy fácilmente.

Los cresoles butilados son antioxidantes del caucho y estabilizadores para grasas no comestibles y aceites aislantes, mientras que el 2,4,6-triclorofenol se usa en la fabricación de agentes de control de lodos en torres de enfriamiento y en la fabricación de papel. El pentaclorofenol es utilizado en procesos de blanqueado, el etoxilato de nonilfenol se usa en las fábricas de papel, el bisfenol A se utiliza para la manufactura de materiales plásticos duraderos, empaquetamientos de cocina, empastes dentales, y recubrimientos del interior de latas de comidas y bebidas.

Las industrias mencionadas que utilizan fenoles, y algunas otras, originan fenoles como residuos de su actividad. Las industrias petroquímicas y de transformación del carbón descargan fenol, metilfenoles y en general alquifenoles. Las fábricas de papel y pulpa descargan, a un nivel detectable, metoxifenoles, dihidroxi-fenoles y p-hidroxivainillil- y siringilfenoles que se producen también en la degradación de la materia natural. Todos estos fenoles pueden dar lugar a sus correspondientes derivados clorados en el proceso de blanqueado de la pasta. Las industrias colorantes pueden descargar fenol, nitrofenoles y dinitrofenoles además de fenoles polinucleares.

El empleo de Cl_2 para evitar el crecimiento de algas y otros microorganismos en las aguas de refrigeración de las centrales eléctricas hace que se encuentren fenoles clorados, que, aunque en concentraciones bajas, suponen grandes cantidades liberadas al medio ambiente debido al volumen de aguas tratadas.

Tabla 3. Síntesis y usos industriales de los fenoles

TIPO DE FENOL	ESTRUCTURA	ORIGEN	USOS
Fenol		Cumeno, benceno	Resinas fenólicas, bisfenol A, alquifenoles, caprolactama
Cresoles		Petróleo o brea	Resinas fenólicas, tricresilfosfato, desinfectantes, antioxidantes, limpiadores metálicos, flotación de minerales, disolvente de esmaltes
			

Clorofenoles	Fenol, clorobenceno, nitrobenceno	Biocidas e intermedios para biocidas, preservación de madera
Alquilfenoles	Fenol	Antioxidantes, gasolina, aceite, grasas, plásticos
Polihidroxi-bencenos (pirogalol, ácido gálico)	Ácido trinitrobenzóico	Pigmentos, medicinas, fotografía, colorantes
Pirocatecol	Resinas naturales, ligninas	Antioxidantes, colorantes
Resorcinol	Halofenoles, ácido bencenodisulfónico, ácido fenosulfónico, benceno	Antioxidantes, colorantes, antisépticos, medicamentos, explosivos
Hidroquinona	Anilina	Fotografía, antioxidantes, medicamentos
nitrofenoles	Fenol, nitroclorobenceno, benceno	Tintes, intermediarios de síntesis, explosivos

Una vez en el medio ambiente los fenoles sufren una dispersión que depende de sus propiedades físico-químicas. Así, se ha comprobado que la lipofilia de los clorofenoles influye en su dispersión (Xie et al., 1986), la cual viene determinada por procesos de dilución y adsorción. También la filtración en aguas subterráneas depende de la lipofilia (Schaffner et al., 1987). Un estudio de Hutchins y col (1985) demuestra que los fenoles no se fijan totalmente en el terreno cuando se filtran aguas residuales, por lo que sufren procesos de migración. También se ha comprobado que los compuestos más halogenados son más persistentes que los menos halogenados (Kulovaara et al., 1987), y que la volatilidad del 2-clorofenol (que determina su bajo nivel de detección olfativa $-2\mu\text{g L}^{-1}$) favorece su dispersión a través de la atmósfera.

De todos los estudios llevados a cabo sobre la presencia de fenoles en el medio ambiente realizados en los últimos años, se ha podido comprobar la presencia de compuestos fenólicos en diferentes tipos de aguas: subterráneas (Goerlitz et al. 1985), de río (Wegman y Van der Broek, 1983), de mar (Xie et al., 1986), potable (Ventura y Rivera, 1986), de manantial (Frank et al., 1987), e incluso en precipitaciones de lluvia y nieve (Mazurek y Simoneit, 1986). Asimismo, se han localizado fenoles en la orina de trabajadores de fábricas en las que se emplean estos compuestos (Dahms y Metzner, 1979), en el aire (Leuenberger et al., 1985) y en sedimentos junto a diversos efluentes (Watanabe et al., 1985).

La descarga al medio ambiente puede dar lugar a la entrada de fenoles en la cadena alimenticia, y así, se ha encontrado pentaclorofenol, tetraclorofenol y otros compuestos orgánicos halogenados en mejillones (Folke y Birklund, 1986). Los peces pueden metabolizar pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,4,6-tetraclorofenol en el hígado, excretándolos como glucurónidos (Oikari y Anas, 1985). Los fenoles volátiles pueden ser concentrados por los organismos, habiéndose comprobado

que los peces adquieren olor con concentraciones ambientales menores que el límite de detección olfativo. El pentaclorofenol se ha encontrado también en aves, corroborando así su condición de contaminante global (Paasivirta et al., 1985). Esta bioconcentración y persistencia hace a éste y a otros fenoles peligrosos para el medio ambiente y para el hombre.

II.1.3. Mecanismos de actuación y efectos tóxicos

La toxicidad de los compuestos fenólicos es conocida desde antiguo. Esta toxicidad aumenta en los derivados sustituidos (Merck, 1983). Buikema y col. (1979) clasifican a los fenoles como inhibidores metabólicos no específicos. El pentaclorofenol, al igual que otros fenoles, ejerce una inhibición de enzimas o sistemas de enzimas, probablemente por unión a proteínas mitocondriales. Sin embargo, la mayoría de los efectos se centran en la reducción de la síntesis de ATP (adenosin trifosfato) y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, aunque no afectan la fosforilación de otros sustratos. Estos mecanismos afectan a una gran variedad de organismos de distintas formas, por lo cual los fenoles muestran distintos grados de toxicidad.

Por otro lado, esta actividad desacoplante es diferente según la estructura del fenol. Parece estar asociada a la capacidad del hidroxilo fenólico de disociarse al pH de la membrana mitocondrial y actuar como grupo protonóforo, por lo cual, dado que los sustituyentes influyen en el valor del pK_a , modificarán dicha actividad desacoplante. Los efectos de distintos fenoles sobre distintos organismos se resumen en la Tabla 4.

La toxicidad de los fenoles varía con la posición y el número de sustituyentes en el núcleo aromático. La toxicidad es mayor para los sustituyentes halogenados, siendo los yodofenoles y bromofenoles más tóxicos que los clorofenoles. En cuanto a la posición relativa, la toxicidad sigue el orden $p- > m- > o-$. También se produce un aumento de capacidad tóxica con el número y el volumen de los sustituyentes (Buikema et al, 1979). Por otro lado, Schultz y Riggín (1985) atribuyen un mayor carácter tóxico a los sustituyentes aceptores de electrones frente a los donadores. También se ha comprobado que el aumento de la toxicidad de los clorofenoles con el número de sustituyentes $-Cl$ está relacionado con la difícil biodegradación de estos compuestos, y ésta, a su vez, con el aumento de la lipofilia (Banerjee et al., 1984). Además de este factor debe tenerse en cuenta el bloqueo de las enzimas debido al mayor tamaño molecular (Beltrame et al., 1985). Schultz y Riggín (1985) encontraron, asimismo, una correlación entre la toxicidad de los fenoles y el coeficiente de partición n -octanol/agua, K_{ow} , que es una medida de la lipofilia.

La bioconcentración de los fenoles es un factor importante que contribuye a su toxicidad. Debido a la relación con la lipofilia se encuentra que el pentaclorofenol, que es el más lipófilo entre los policlorofenoles, es el que más se bioconcentra.

Tabla 4. Efectos de distintos fenoles sobre distintos organismos (Alarcón de Pablo, 1989).

COMPUESTO	ORGANISMO	EFEECTO
nitro y clorofenoles	aerobios	Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa
clorofenoles	cebollas	Aberraciones en los cromosomas
pentaclorofenol	planta	Interferencia en la fijación del N ₂ por reducción acetilénica
nitrofenoles	árboles	Disminución de los bosques
2,4,6-triclorofenol	animales	Carcinogénesis
fenol	perca	Inhibición de la glándula adrenal. Disminución de la tiroxina en sangre
pentaclorofenol	peces	Incremento del colágeno y disminución de hidroxiprolina. Empobrecimiento de las aptitudes vitales
2,4-diclorofenol	ratón	Acción sobre hormonas y aminotransferasas de alanina y aspartato
fenol	ratón	Teratogenia
fenol	hombre	Cambios de estructura y función en la placenta. Cambios en cromátidas de linfocitos T. Anestesia local. Degeneración del nervio
pentaclorofenol/fenol, 2,4,5-triclorofenol	hombre	Teratogenia y fetotoxicidad. Oncogenia y fetotoxicidad

II.1.4. Legislación sobre compuestos fenólicos

El empleo de fenoles en las diversas actividades industriales y agrícolas descritas en el apartado II.1.2 ha hecho necesario su control debido a su posible toxicidad que incide sobre la salud humana. El gran número de fenoles potencialmente presentes obliga a una selección previa de especies representativas, de forma que su presencia o ausencia suministre información del conjunto. En este sentido, la agencia de protección medioambiental norteamericana (EPA 8041, 1995) ha seleccionado 21 fenoles contaminantes prioritarios en función de su frecuencia de aparición, toxicidad y persistencia (Tabla 5). Asimismo, en la Resolución del Consejo de la Unión Europea (CEE, 1983) se aprobó la lista de 129 sustancias que deben ser controladas en los vertidos. En esa lista se incluyen 9 compuestos fenólicos que también se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Compuestos fenólicos clasificados por la US EPA como contaminantes prioritarios y fenoles incluidos en la lista de las 129 sustancias aprobada por el Consejo de la UE (CEE, 1983).

fenol	US EPA
2-metilfenol	US EPA
3-metilfenol	US EPA
4-metilfenol	US EPA
2-clorofenol	US EPA EC
3-clorofenol	EC
4-clorofenol	EC
2,4-diclorofenol	US EPA EC
2,6-diclorofenol	US EPA
2,4,5-triclorofenol	US EPA EC
2,4,6-triclorofenol	US EPA EC
2,3,4,5-tetraclorofenol	US EPA
2,3,4,6-tetraclorofenol	US EPA
2,3,5,6-tetraclorofenol	US EPA
pentaclorofenol	US EPA EC
2,4-dimetilfenol	US EPA
4-cloro-3-metilfenol	US EPA EC
2-amino-4-clorofenol	EC
2-nitrofenol	US EPA
4-nitrofenol	US EPA
2,4-dinitrofenol	US EPA
Dinoseb (DNMP)	US EPA
4,6-dinitro-2-metilfenol	US EPA
2-ciclohexil-4,6-dinitrofenol	US EPA

La adhesión de España a la Comunidad Europea hizo necesario armonizar la legislación a las disposiciones comunitarias en cuanto a la reglamentación de calidad de las aguas. Estas disposiciones se resumen en la Tabla 6. La normativa española (RD 1138/1990 del 4 de septiembre, BOE 226, de 20.09.1990) recoge prácticamente los mismos parámetros y límites que los establecidos por la CEE.

Tabla 6. Disposiciones comunitarias sobre el contenido en compuestos fenólicos en distintos tipos de aguas*.

DIRECTIVA	TIPO DE AGUAS	NIVEL MÁXIMO PERMITIDO
75/440/CEE del Consejo, de 16.06.1975 (última modificación: véase DO L 327 22.12.2000 p.1)	Aguas continentales superficiales utilizadas o destinadas a ser utilizadas en la producción de agua potable después de la aplicación de los tratamientos apropiados. Las aguas superficiales se dividen en 3 grupos de valores límites según los procesos de tratamiento tipo necesarios: A1: Tratamiento físico simple y desinfección A2: Tratamiento físico normal, tratamiento químico y desinfección A3: Tratamientos físico y químico intensivos, afino y desinfección	A1: $1 \mu\text{g L}^{-1}$ $\cong 10^8 \text{ mol L}^{-1}$ A2: $5-10 \mu\text{g L}^{-1}$ $\cong (0.5-1) \times 10^7 \text{ mol L}^{-1}$ A3: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ $\cong 10^6 \text{ mol L}^{-1}$
76/160/CEE del Consejo, de 08.12.1975	Aguas de baño, con excepción de las aguas destinadas a usos terapéuticos y de las aguas de piscina	Ausencia de olor específico
76/464/CEE del Consejo, de 04.05.1976 (última modificación: véase DO L 327)	Aguas de vertido: aguas interiores superficiales,	Señala los fenoles como sustancias que deben ser controladas. El nivel máximo debe

22.12.2000 p.1)	aguas interiores del litoral, aguas marinas territoriales y aguas subterráneas	ser establecido en las normas que fije cada estado miembro u organismo competente ($2 \text{ mg } \text{L}^{-1}$) **
80/778/CEE del Consejo, de 15.06.1980 (última modificación: véase DO L 330 05.12.1998 p.32)	Agua para el consumo humano	$0.5 \text{ } \mu\text{g } \text{L}^{-1}$ $\cong 0.5 \times 10^{-8} \text{ mol } \text{L}^{-1}$ (excluidos los fenoles naturales que no reaccionan con el cloro)

* Expresado como concentración de fenol.

** Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, ley 10/1993, de 26 de octubre.

En las aguas de vertido, el Consejo sólo ha establecido límite para algunas sustancias (Directiva 86/280/CEE, de 12.06.1986), debiendo cada organismo, a través de las normas de emisión expedidas, fijar los valores límite. La Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Regional de la Comunidad de Madrid ha fijado en su legislación sobre vertidos industriales un valor máximo instantáneo de $2 \text{ mg } \text{L}^{-1}$ ($\cong 2 \times 10^{-5} \text{ mol } \text{L}^{-1}$) de fenoles totales en dichos vertidos (Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento en la Comunidad de Madrid).

El hecho de que la legislación de los países fijen diferentes límites se debe al efecto económico negativo que se produce sobre la industria al regular una sustancia, pues, cuanto más bajos sean los niveles permitidos, más cara será la depuración de los residuos industriales, lo que encarecerá los costes de producción (Navarro Villoslada, 1997).

El método oficial de referencia en la Comunidad Europea para el análisis de aguas, y por consiguiente en España, es el espectrofotométrico que utiliza 4-aminoantipirina (4-AAP) para formar un complejo coloreado con los compuestos fenólicos, con precisión del 30%, exactitud del 50% y límite de detección de $0.5 \text{ } \mu\text{g/L}$ (Directiva 79/869/CEE), siendo igualmente oficial en EE.UU. (APHA, 1985) y en las normas internacionales (ISO, 1990). No obstante, estas normas y la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (US EPA) (EPA 604, 1984) también prevén la utilización de la cromatografía de gases con detección de captura electrónica o ionización de llama (ISO, 1992). En el caso de la determinación general de contaminantes prioritarios incluidos los fenoles, la US EPA recomienda la cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (EPA 625, 1984).

II.1.5. Revisión bibliográfica de métodos para la determinación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se han determinado tradicionalmente mediante métodos colorimétricos, ya que dichos compuestos son capaces de sufrir una gran variedad de reacciones utilizables para su detección espectrofotométrica (Rodier, 1990). Las más comunes son las de copulación o condensación que producen colorantes fácilmente analizables en el espectro del visible. En estos métodos, el fenol se emplea como patrón y el resultado obtenido corresponde a la concentración mínima de compuestos fenólicos presentes en la muestra, ya que los sustituyentes del grupo bencénico tienen cierta tendencia a disminuir la reacción coloreada. Es difícil que los fenoles sustituidos en para- reaccionen bien, por tener impedida la posición más activa

tanto para las condensaciones como para las copulaciones. Por otra parte, los fenoles muy desactivados, como nitrofenoles o clorofenoles muy sustituidos tampoco darán reacciones, así como tampoco se darán las que necesiten una molécula de características reductoras (Box, 1983). Son métodos directos, y el límite de detección se encuentra en el rango de mg L^{-1} . Cuando se extrae el colorante formado con un disolvente orgánico pueden obtenerse límites de detección de $\mu\text{g L}^{-1}$.

El método colorimétrico de la 4-aminoantipirina, con destilación previa y extracción, requiere largos tiempos de análisis, pero es muy sensible y es particularmente útil para contenidos inferiores a 1 mg/L . Este método permite la determinación de fenol y de sus derivados sustituidos en orto- y meta-, pero no la de los derivados sustituidos en para-. Es un método estandarizado de análisis, y está incluido en el compendio "Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater" (APHA, 1981). Bartos y Pesez (1984) han realizado una revisión de los métodos espectrofotométricos para el análisis de fenoles.

Otros métodos más modernos para determinación de fenoles son los que utilizan las técnicas cromatográficas y bioquímicas. La cromatografía de gases en conjunción con varios detectores ha sido extensamente utilizada en los últimos años. Actualmente es la técnica elegida en los métodos oficiales US-EPA. Tiene la ventaja de su alta sensibilidad y selectividad, así como de la existencia de librerías de espectros de masas, lo que permite el análisis de muestras desconocidas (Muino et al., 1991). Sin embargo, se requiere derivatización previa al análisis. De entre los agentes derivatizantes, el más usado es el bromuro de pentafluorobenzoilo, y es el usado por la metodología US-EPA (método 604), conjuntamente con un detector FID o ECD, obteniéndose unos límites de detección para los compuestos fenólicos incluidos en las listas US-EPA de $0.1\text{-}13 \mu\text{g/L}$ y de $0.5\text{-}2.2 \mu\text{g/L}$, respectivamente. El método 625 US-EPA utiliza un espectrómetro de masas como detector. Sin embargo, en estos últimos años se ha señalado que estos métodos pueden llevar a error como consecuencia de problemas en el proceso de derivatización, por lo que la US-EPA ha elaborado un nuevo protocolo (método 8041) que recomienda la derivatización con diazometano, aunque éste último posee un peligro potencial al ser explosivo y carcinogénico.

Para alcanzar los límites de detección que se han señalado empleando las técnicas mencionadas y las que se comentarán a continuación, es necesaria una preconcentración de los fenoles que contiene la muestra. Para ello se utilizan técnicas como la extracción líquido-líquido (LLE), empleando como disolvente cloroformo-dietiléter, cloroformo, diclorometano, o n-butilacetato, la extracción en fase sólida (SPE) sobre gel de sílice modificada, resinas poliméricas, intercambiadores iónicos y sobre carbono grafitizado, y la extracción con fluidos supercríticos (SFE), así como la destilación por arrastre de vapor con y sin extracción. El empleo de LLE es laborioso, requiere mucho tiempo y una gran cantidad de disolventes caros y la mayoría tóxicos. La SPE ofrece ventajas tales como un menor tiempo de análisis, un coste inferior y menores volúmenes de disolventes orgánicos. Una variedad de adsorbentes como carbono negro grafitizado, Chromosorb 102, resinas de intercambio iónico, C_{18} y columnas de sílice con ciclohexilo se ha utilizado en SPE "off-line". Los métodos de SPE "on-line" se han desarrollado empleando C_{18} , PS-DVB (poli(estireno-divinilbenceno)) o precolumnas de resinas

intercambiadoras de aniones y también discos de extracción con membrana C_{18} . Entre los distintos adsorbentes, el PS-DVB presenta mayor retención y selectividad para los compuestos aromáticos que el C_{18} unido a la sílice, y es muy adecuado para la preconcentración de compuestos fenólicos. Finalmente la microextracción en fase sólida (SPME) está siendo ampliamente utilizada en la actualidad (Puig y Barceló, 1996a).

La no necesidad de derivatización y la posibilidad de acoplamiento "on-line" con extracción sólido-líquido, hacen de la cromatografía de líquidos con columnas C_8 y C_{18} la técnica de separación aplicada más comúnmente al análisis de compuestos fenólicos. El detector más usado en estos casos es el ultravioleta (León González et al., 2000). Son recomendables los detectores de diodo array, puesto que es posible utilizar las librerías de espectros para confirmar la presencia de los compuestos, a pesar de que la sensibilidad con ellos es algo menor. Con un sistema de cromatografía de líquidos acoplado a un detector UV, es posible obtener unos límites de detección menores de $0.7 \mu\text{g/L}$ y de $0.25 \mu\text{g/L}$, dependiendo de que la extracción se realice "on-line" (Puig y Barceló, 1996b) u "off-line" (Castillo et al., 1997).

La obtención de límites de detección muy bajos, del orden de ng/L para la mayoría de los compuestos, además de la posibilidad de utilizar volúmenes muy pequeños de muestra, es posible mediante el empleo de detección electroquímica en un sistema de HPLC (Galcerán y Jáuregui, 1995; Arundell et al., 2000). A pesar de ofrecer varias ventajas, la detección electroquímica tiene como contrapartida una respuesta inestable, debido a la necesidad de limpieza del electrodo. La aplicación de potenciales elevados, necesarios para conseguir la oxidación de los fenoles, aumenta el ruido de fondo y posibilita la oxidación de otros componentes de la matriz. La detección amperométrica de impulsos proporciona una mayor estabilidad de la señal, pero sigue siendo necesaria la limpieza del electrodo de trabajo. Por estas razones, la detección electroquímica es una alternativa muy buena cuando se analizan muestras con matrices no demasiado complejas.

El uso de detectores array coulombimétricos en HPLC, en los que se oxida el 100% del analito debido a la alta porosidad del electrodo, combinados con extracción sólido-líquido, proporciona límites de detección comprendidos entre $0.03 \mu\text{g/L}$ y $0.38 \mu\text{g/L}$ (Achilli et al., 1995). Sin embargo estos dispositivos son costosos, por lo que su utilización no está muy extendida. Dispositivos menos sofisticados, compuestos solamente por dos electrodos de trabajo, uno para limpiar la muestra utilizando un potencial aplicado bajo, y el otro para realizar el análisis, proporcionan límites de detección de $0.034 \mu\text{g/L}$ (Rennie y Mitchell, 1987). No es posible su utilización para "multi-screening" puesto que no puede aplicarse gradiente de elución con ellos.

Varios autores han descrito métodos basados detección fluorescente directa (Ruiter et al., 1988) o indirecta (Lamprecht y Huber, 1994) tras la separación por HPLC. Aunque los límites de detección que se consiguen son buenos, por debajo del nivel de ng/L , es necesario formar derivados con dansilo, por lo que la técnica no resulta tan atractiva, debido a la toxicidad de estos derivados.

La utilización del detector de masas acoplado a la cromatografía de líquidos ha sido posible gracias al desarrollo de diversas interfases. La interfase de termospray (TSP) proporciona una buena respuesta para la mayoría de los compuestos (límites de detección comprendidos entre 0.4-2 ng) aunque algunos fenoles no pueden desprotonarse y por tanto no son detectados (Puig y Barceló, 1995). Las interfases de presión atmosférica (API) tienen como principales ventajas su gran sensibilidad (especialmente cuando se utiliza la ionización química a presión atmosférica), su robustez y su facilidad de uso. Además es posible obtener información estructural (Puig et al., 1996). Con este detector acoplado a una columna de cromatografía de líquidos se consiguen unos límites de detección de 0.15-9 µg/L (Di Corcia et al., 1993). La interfase de spray de iones requiere normalmente la adición postcolumna de un regulador de pH para generar iones, por lo que esta técnica no resulta muy atractiva (Aguilar et al., 1993). En general, todas las interfases de presión atmosférica requieren la limpieza del cono de muestra, lo que conduce a valores de reproducibilidad no muy buenos.

En los últimos años se han desarrollado aplicaciones para la determinación de fenoles mediante la técnica de electroforesis capilar, debido a su rapidez, alta resolución y adecuación al análisis de compuestos polares e iónicos y de otros más apolares. La mayor desventaja que presenta esta técnica es su limitada capacidad de carga, que es del orden de unos pocos nL. En la mayoría de los casos se utiliza en conjunción con un detector ultravioleta, obteniéndose límites de detección comprendidos entre 0.3 y 1 µg/L. (Gaitonde y Pathak, 1994). Estos límites de detección pueden mejorarse si se utiliza detección electroquímica (Martínez et al., 1996) o fluorimétrica (Praus y Donbek, 1993; Ong et al., 1990).

Debido al creciente interés por desarrollar métodos de campo efectivos y rápidos capaces de detectar "in situ" los analitos objeto de estudio en muestras medioambientales, se ha producido un gran auge en las últimas décadas en el desarrollo de técnicas basadas en principios bioquímicos. En esta área, destacan los inmunoensayos y los biosensores, que presentan la ventaja de la alta especificidad del reconocimiento biológico de los analitos de interés en muestras complejas. Ambos proporcionan respuestas en tiempo real, y por tanto evitan problemas de manipulación de la muestra y permiten realizar la medida "in situ".

El único inmunoensayo disponible comercialmente para fenoles es específico para pentaclorofenol. Proporciona resultados comparables a los obtenidos con los métodos cromatográficos en agua y en suelo, con un límite de detección de 60 ng/L (Hottenstein et al., 1995), siendo un buen método para "pre-screening" puesto que no da falsos negativos. También se han desarrollado inmunoensayos para 4-nitrofenol y 2,4-dinitrofenol (Li et al., 1991), éste último con un límite de detección de 7 µg/L.

Los biosensores son más rápidos y más fácilmente automatizables que los inmunoensayos, sin embargo, casi siempre presentan problemas de estabilidad y de sensibilidad a los niveles medioambientales. En el apartado II.2.4 se hará una revisión más profunda de los biosensores encontrados en la bibliografía para la detección de compuestos fenólicos.

11.2. Biosensores

La necesidad de hacer frente a los problemas analíticos que se presentan actualmente en el control medioambiental requiere el uso de técnicas rápidas y fiables que permitan la detección “in situ” de los contaminantes, y por tanto posibilite la adopción de las medidas necesarias para la resolución del problema que plantea dicha contaminación. Esta necesidad en el control medio ambiental, al igual que ocurre en otros campos como la medicina, la tecnología de alimentos o la industria, ha impulsado el desarrollo en los últimos años de los sensores químicos en general y de los biosensores en particular.

Un biosensor es un dispositivo analítico integrado que combina una parte biológicamente sensible con un transductor, de forma que la reacción de **reconocimiento molecular** que tiene lugar en la primera se traduce en señal eléctrica u óptica en el segundo, señal que se procesa electrónicamente y que es proporcional a la concentración de la sustancia que se quiere determinar (analito) (Turner et al., 1986). Los dos constituyentes forman una unidad funcional (Figura 1) cuya selectividad viene dada por la parte biológicamente activa y la sensibilidad se consigue mediante un mecanismo de transducción adecuado.

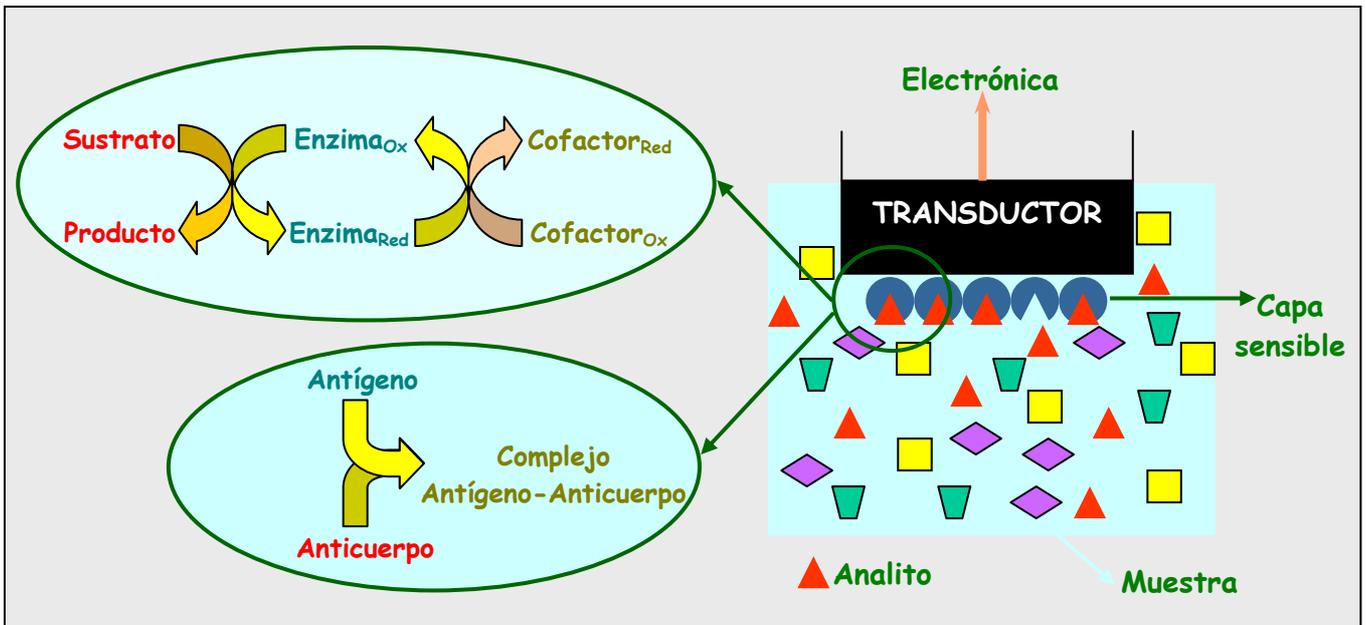


Figura 1. Esquema de un dispositivo sensor con el material biológico inmovilizado.

Los biosensores proporcionan, por tanto, una **integración temporal**, que permite realizar un proceso de medida química directa, y así obtener una señal continua y reversible, además de una **integración espacial**, lo que favorece la miniaturización. En la Figura 2 se representa esquemáticamente el funcionamiento de un biosensor.

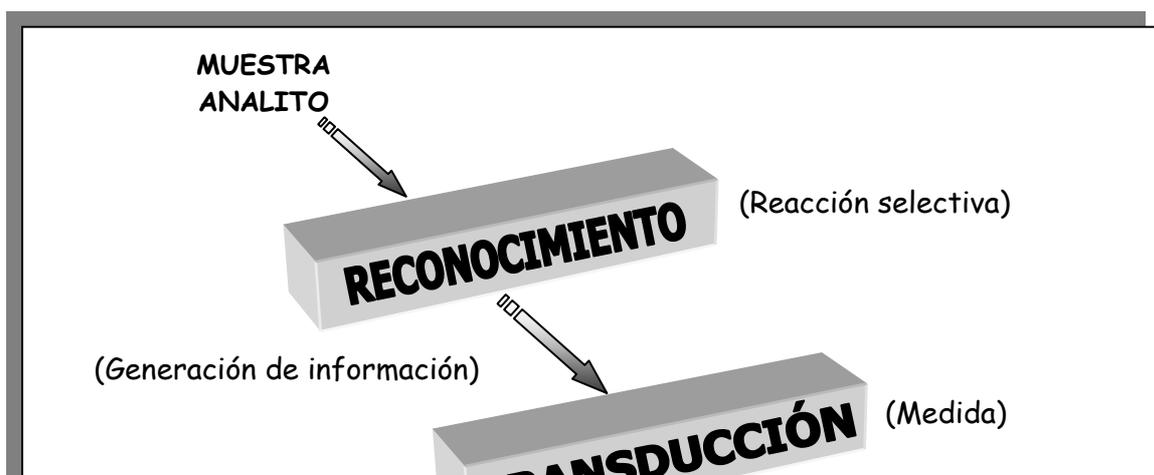


Figura 2. Esquema del funcionamiento de un biosensor.

Las ventajas de un biosensor son, entre otras, la alta selectividad y sensibilidad de la medida, la facilidad de manejo y el bajo coste, permitiendo su utilización por personal no especializado, rapidez en el análisis, posibilidad de miniaturización, la posibilidad de evitar etapas del método analítico tan tediosas como la toma y el tratamiento de la muestra, no siendo necesario, en general, la separación del analito y la adición de reactivos, y la posibilidad de una medición continua, in situ, remota, distribuida, multidimensional, y en condiciones de trabajo difíciles para otras técnicas. En general, suponen una **simplificación del método analítico**.

En 1956 el principio del papel litmus para la medida del pH fue adoptado para simplificar la determinación enzimática de glucosa. Por impregnación del papel de filtro con enzimas específicas de glucosa se crearon las primeras "tiras de test enzimático". Este dispositivo puede considerarse como el predecesor de los biosensores ópticos, y al mismo tiempo, el inicio de la llamada "química seca" (Scheller et al., 1997). En los años sesenta, Clark y Lyons (1962) propusieron la inmovilización de una capa enzimática sobre detectores eléctricos construyendo de esta forma el primer biosensor para la detección de glucosa. El primer biosensor comercial se desarrolló también para la determinación de glucosa por la compañía ΈχαTech™, Medisense Inc., EE.UU., en 1987 (Lechuga y Calle, 1995). En la actualidad, la mayoría de los biosensores comercializados se basan en reacciones enzimáticas y antígeno-anticuerpo para aplicaciones clínicas específicas para glucosa, alcohol, metanol, lactato, colesterol, aminoácidos, urea, xantina, hipoxantina, colina, acetilcolina, ácido úrico, oxálico, lactosa, sucrosa, galactosa, dextrosa, almidón, sustancias inmunoquímicas, y también para contaminación microbiana y DBO, entre otras.

La parte sensible del biosensor se obtiene de la naturaleza, donde hay todo un conjunto de principios biológicos que permiten reacciones específicas con casi todas las sustancias de interés analítico, principios que se han ido perfeccionando a lo largo de la evolución biológica. Los biosensores, se pueden clasificar, en general, en dos grandes grupos en función de la naturaleza del proceso biológico de reconocimiento: biosensores catalíticos, cuyos sistemas biológicos pueden ser enzimas, tejidos o microorganismos; y biosensores de afinidad, entre los que se encuentran los inmunosensores y los basados en quimiorreceptores y macromoléculas protéicas (ácidos nucleicos, carbohidratos, ADN, ARN).

Los elementos de reconocimiento biológico cubren prácticamente todos los analitos relevantes. Como un primer paso para el diseño de procesos bioanalíticos, se debe escoger uno de los elementos de biorreconocimiento para el analito o analitos de

interés. Esta selección, sin embargo, está supeditada al tamaño y la concentración del analito (Figura 3). Idealmente, los sistemas de reconocimiento biológico deberían unirse tan solo a una molécula en particular. No obstante raramente se cumple esta situación ideal y, en general, el sistema de reconocimiento biológico actúa sobre un conjunto de moléculas similares en mayor o menor extensión.

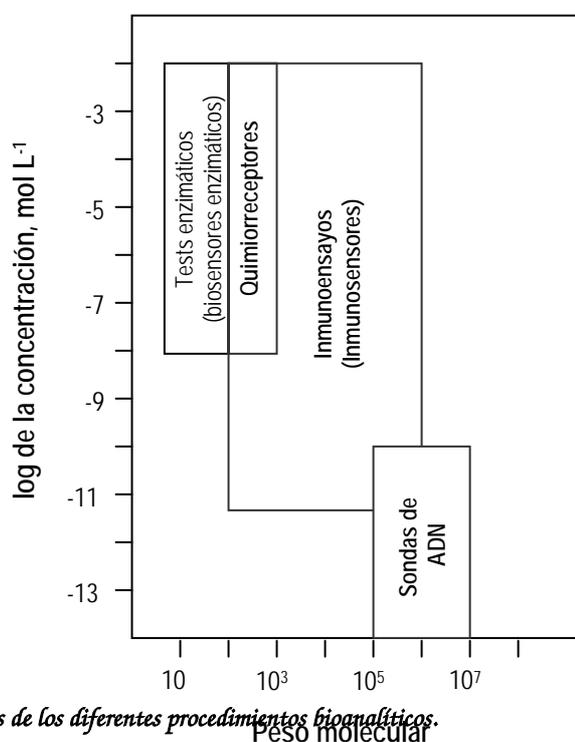


Figura 3. Características específicas de los diferentes procedimientos bioanalíticos.

Además de estos materiales de reconocimiento molecular tomados de la naturaleza, hoy en día se están empleando polímeros impresos molecularmente (MIPs). Éstos pueden sintetizarse formando una red de polímero alrededor de una molécula molde. De esta forma se crean estructuras complementarias al analito que pueden servir como materiales de reconocimiento sintéticos.

Por lo que respecta a los biosensores catalíticos, los más utilizados, sin duda alguna, son los biosensores enzimáticos. Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas en los seres vivos. En estas reacciones la molécula transformada se denomina sustrato y usualmente implica el empleo de otro reactivo llamado cofactor, para generar los correspondientes productos. Aproximadamente se han caracterizado 2000 enzimas diferentes, y se ha comercializado un gran número de ellas. Con estas enzimas, ha sido posible detectar más de 100 analitos diferentes (Lechuga y Calle, 1995). Las enzimas pueden clasificarse fundamentalmente en seis grupos, de los cuales, los más importantes con fines analíticos son los correspondientes a las oxidorreductasas, las hidrolasas y algunas liasas (Langone y Van Vanakis, 1982). El carácter catalítico hace que en su reacción con el sustrato se regeneren a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor. Esta característica hace que, en principio, sea posible una monitorización continua y reversible, lo que no siempre ocurre con otro tipo de material biológico, como es el caso de los anticuerpos. La reacción catalítica enzimática es

eficiente y además extremadamente selectiva, por lo que se combinan los factores de reconocimiento particular y de amplificación necesarios para la mayoría de las aplicaciones analíticas de los biosensores.

Si la reacción enzimática involucra un solo sustrato, puede formularse en general como:



Para una concentración fija de enzima, la velocidad de reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{[E_0] V_{m\acute{a}x}}{K_M + [S]} \quad \text{Ecuaci3n 1}$$

donde $V_{m\acute{a}x}$ es la m\acute{a}xima velocidad de reacci3n y K_M es la constante de Michaelis, que corresponde a la concentraci3n de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad m\acute{a}xima. En la Figura 4 se muestra la dependencia t\acute{i}pica de la velocidad de reacci3n enzim\acute{a}tica con la concentraci3n de sustrato, se\~{n}al\`{a}ndose los valores de los par\`{a}metros K_M y $V_{m\acute{a}x}$ y las zonas donde la se\~{n}al obtenida es \acute{u}til para la determinaci3n del sustrato y para la determinaci3n de la actividad enzim\acute{a}tica. Desde el punto de vista anal\`{i}tico, a medida que se tiene una constante de Michaelis m\`{a}s elevada la sensibilidad del m\`{e}todo disminuye, pero aumenta el intervalo de linealidad.

Es posible desarrollar biosensores enzim\`{a}ticos donde se empleen dos o m\`{a}s enzimas, fundamentalmente con los siguientes objetivos: aumento de la sensibilidad del m\`{e}todo utilizando una segunda enzima que regenere el analito; que la segunda enzima act\`{u}e catal\`{i}ticamente sobre alguno de los productos de la reacci3n enzim\`{a}tica principal con el fin de obtener un nuevo producto que se detecte con mayor facilidad; por \acute{u}ltimo, puede ocurrir que alguno de los productos de la reacci3n enzim\`{a}tica principal act\`{u}e sobre la actividad enzim\`{a}tica inhibi\`{e}ndola, o bien existan otros inhibidores en disoluci3n, o incluso que haya sustratos interferentes, en estos casos, la segunda enzima puede catalizar una reacci3n de dichas sustancias interferentes de modo que la reacci3n enzim\`{a}tica con el sustrato de inter\`{e}s no se vea afectada.



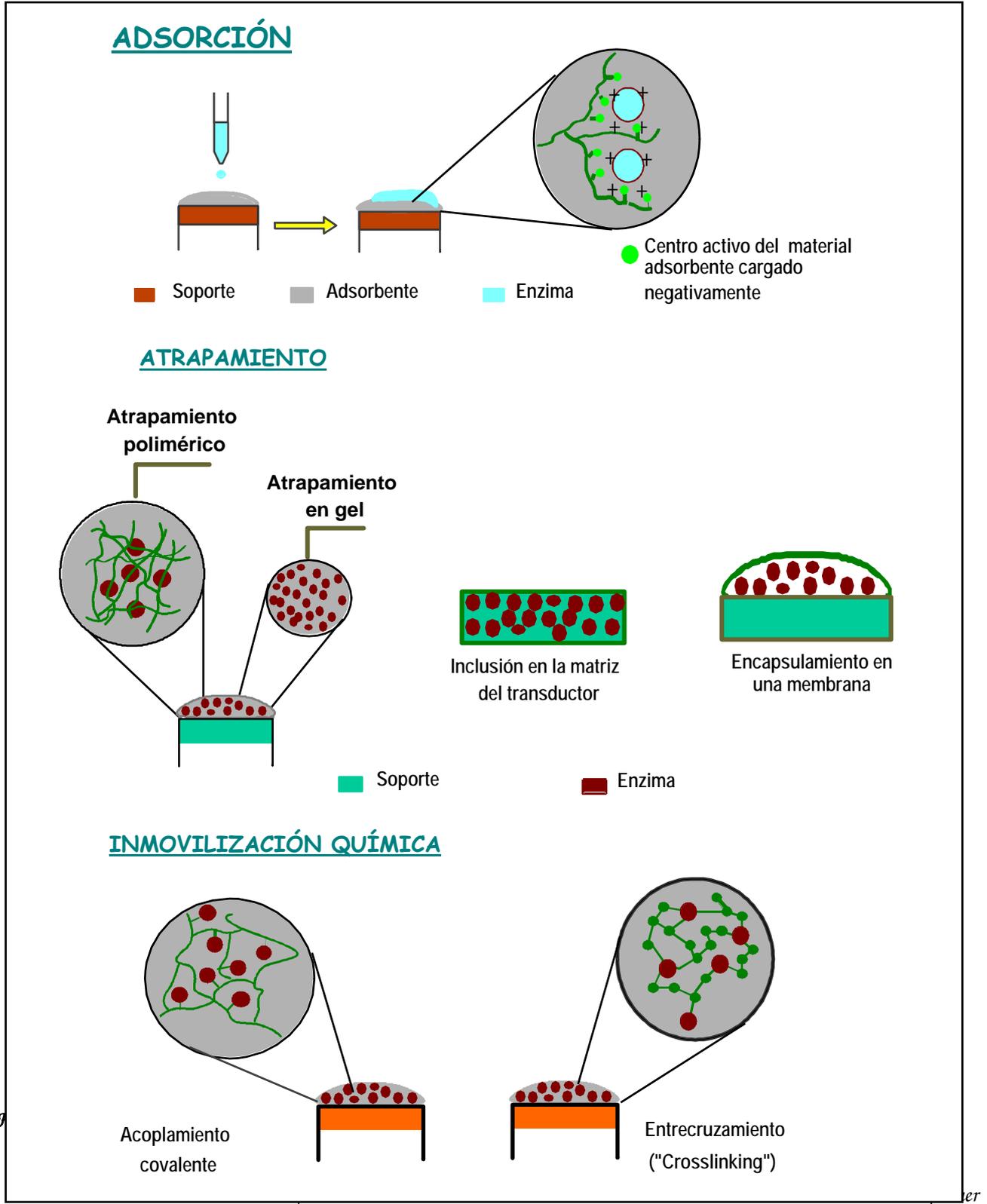
Figura 4. Dependencia de la velocidad de la reacción enzimática frente a la concentración de sustrato.

El buen funcionamiento de un biosensor depende, en gran medida, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. Es necesario favorecer un íntimo contacto entre el biorreceptor y el transductor, manteniendo inalterable en lo posible la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento. La inmovilización de la proteína, particularmente de las enzimas, conlleva una serie de ventajas para su posterior aplicación en Química Analítica: (I) en muchos casos la enzima es estabilizada; (II) el material inmovilizado puede ser fácilmente separado de la muestra y reutilizado en posteriores análisis; y (III) la actividad altamente constante y estable de la biomolécula hace que la enzima sea parte integrante del instrumento analítico (Scheller et al., 1997).

En la Figura 5 aparecen esquematizados los tipos de inmovilización que se suelen emplear para fabricar biosensores. La inmovilización puede realizarse mediante métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, mediante el acoplamiento covalente o por entrecruzamiento o crosslinking. Dentro de cada uno de estos métodos existen numerosas variantes, por lo que sólo se dará una visión general de cada uno de ellos. Además, es posible utilizar combinaciones de diferentes métodos de inmovilización.

El método de inmovilización más sencillo es la adsorción de las biomoléculas sobre materiales adsorbentes que sean insolubles en el medio de ensayo. Este tipo de inmovilización se basa en uniones de tipo no covalente, como fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals, entre los lugares activos del adsorbente y las moléculas biológicas. El procedimiento de adsorción consiste en poner en contacto las moléculas de enzima con el material adsorbente durante el tiempo suficiente para que se produzcan las interacciones. Los adsorbentes más utilizados son resinas de intercambio iónico, gel de sílice, arcillas, alúmina, vidrio poroso y materiales cerámicos. La ventaja de este método es su sencillez, aunque tiene como contrapartida que es un proceso reversible, por lo que cambios de pH, fuerza iónica o de temperatura en el medio pueden provocar la desorción de la biomolécula. Este tipo de inmovilización es especialmente interesante cuando la enzima es insoluble en el medio de trabajo. En este caso, la biomolécula puede adsorberse directamente sobre el transductor, sin necesidad de emplear ningún material adsorbente.

Otro método físico de inmovilización es el denominado por atrapamiento, que puede llevarse a cabo de tres formas diferentes: por inclusión dentro de una matriz de polímero altamente entrecruzado o en un gel; por inclusión en la matriz del transductor; o por separación de la biomolécula del seno de la disolución mediante encapsulamiento en una membrana semipermeable.



método mencionado, el procedimiento general de inmovilización consiste en disolver el material enzimático en la disolución de

polímero, colocar una alícuota sobre la superficie del transductor y permitir evaporar el disolvente, de forma que la enzima queda atrapada entre las cadenas poliméricas. Otro procedimiento de atrapamiento en matriz polimérica consiste en preparar una disolución de enzima y monómero. Se sumerge un electrodo en la disolución y se lleva a cabo una electropolimerización sobre la superficie electródica, formándose una capa de polímero sobre dicha superficie en la que queda atrapada la biomolécula. Este método es muy apropiado para la construcción de biosensores electroquímicos.

El segundo método de atrapamiento, la inclusión de la enzima en la matriz del transductor, se usa principalmente en la fabricación de electrodos compósitos. El procedimiento más sencillo consiste en preparar una mezcla de enzima y grafito en polvo a la que se agrega un aglutinante. Se homogeniza la mezcla y se coloca en un molde con un contacto eléctrico. Con este procedimiento se obtienen biosensores con un depósito tridimensional de enzima, que permite la renovación de la superficie del biosensor mediante un simple pulido.

La inmovilización por encapsulamiento consiste en atrapar la enzima sobre la superficie del transductor con una membrana de diálisis o una película polimérica. Con este tipo de inmovilización se observa una disminución en la velocidad de la reacción enzimática, y por tanto, de la señal analítica, debido a que los analitos tienen que difundir a través de la membrana o de la película. Estos dispositivos tienen la ventaja de aumentar la selectividad, ya que permiten una restricción en el paso de sustancias a través de la barrera membranosa.

Los métodos químicos de inmovilización pueden llevarse a cabo por acoplamiento o uniones covalentes entre la enzima y centros activados de polímeros, o por el entrecruzamiento intermolecular a dichos centros activados, presentando de este modo una fuerte fijación al polímero. En el acoplamiento covalente la inmovilización se lleva a cabo haciendo reaccionar la enzima con un polímero insoluble en agua que posea centros activos, o bien por copolimerización con un monómero. La reacción debe involucrar grupos funcionales de la biomolécula que no sean esenciales para su actividad biológica.

Los métodos basados en el entrecruzamiento intramolecular se llevan a cabo entre enzimas y polímeros con grupos bi y multifuncionales (glutaraldehído, derivados de bis-iscianato, etc), por copolimerización con otra proteína inerte o por adsorción de las biomoléculas en un adsorbente, realizándose después el entrecruzamiento.

Las propiedades de la enzima pueden verse alteradas con la inmovilización, pudiendo el mismo método afectar de forma diferente a distintas enzimas. Los cambios producidos se deben a alteraciones conformacionales de la enzima como consecuencia del proceso de inmovilización, y/o a la presencia y naturaleza del soporte, por lo que, los parámetros intrínsecos de la cinética de la enzima se ven también afectados, según el esquema de la Figura 6:

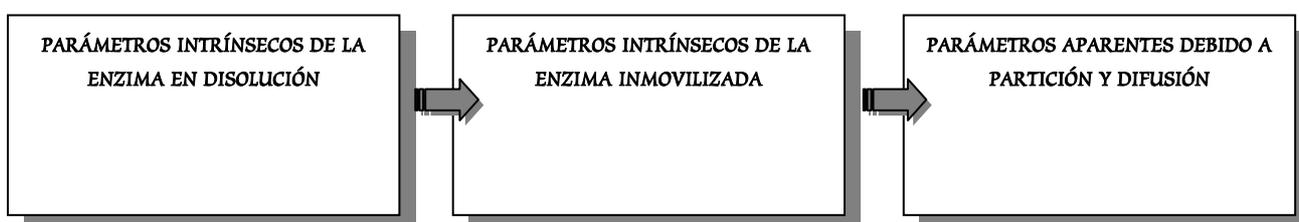


Figura 6. Relación entre los parámetros cinéticos de la enzima en distintas circunstancias.

Cuando los parámetros cinéticos de una enzima inmovilizada son calculados experimentalmente se ven afectados por los equilibrios de partición de las moléculas entre la fase continua y el entorno de la enzima, y por la difusión de los sustratos en la fase continua (Chaplin y Bucke, 1990).

Las interacciones hidrofóbicas pueden causar la partición de las moléculas entre la fase continua y el microdominio de la enzima inmovilizada. Las interacciones hidrofóbicas reducen la constante dieléctrica del microdominio, provocando una modificación en las constantes de acidez de los grupos ácido-base de la enzima, los sustratos, los productos y los reguladores del pH. Esto puede afectar a la constante de Michaelis K_M de la enzima inmovilizada.

Si la superficie donde está inmovilizada la enzima es predominantemente hidrofóbica, las moléculas hidrofóbicas tenderán a permanecer en el microdominio y las moléculas hidrofílicas en la solución continua. Estos cambios de concentración local de las moléculas afectan a los parámetros cinéticos. Cuando el sustrato y el soporte son hidrofóbicos la K_M disminuye. Si el soporte es hidrofóbico y el sustrato hidrofílico la K_M permanece igual (Chaplin y Bucke, 1990). Asimismo, pueden tener lugar interacciones electrostáticas entre el soporte y el analito que influyan de la misma manera en los parámetros cinéticos.

A pesar de presentar innumerables ventajas, los biosensores enzimáticos tienen algunos problemas, como son la poca estabilidad temporal de algunas enzimas, la dificultad de su inmovilización, la escasa actividad específica en determinados casos, y la necesidad de emplear a veces un cofactor o reactivo auxiliar.

Para el desarrollo de un dispositivo que funcione correctamente, resulta crucial el comportamiento químico de las interfaces entre medio de análisis y la capa de reconocimiento molecular (interfase externa), y entre la biocapa y el transductor (interfase interna). Por tanto, además de la elección de un material biológico y de un método de inmovilización adecuados, es importante escoger un sistema de transducción óptimo.

Los factores que influyen en la elección del transductor son: facilidad de fabricación, miniaturización, estabilidad y resistencia. Además, si deben ser implantables, hay que tener en cuenta la toxicidad de los materiales y su resistencia a la biodegradación.

Con respecto al transductor empleado, los biosensores se pueden clasificar en: electroquímicos (amperométricos, potenciométricos, conductimétricos), ópticos (absorbancia, reflectancia, fluorescencia, bioluminiscencia, onda evanescente, resonancia de plasmón superficial), calorimétricos y de masa (piezoeléctrico), entre otros.

De todos los transductores empleados, los basados en principios electroquímicos han dominado claramente el mercado y la investigación en biosensores (Lechuga y Calle, 1995), en general, debido a que poseen una serie de ventajas, como son:

- a) Las medidas electroquímicas pueden ser realizadas en volúmenes pequeños, incluso del orden de nanolitros, con relativa facilidad, lo que es consecuencia de la naturaleza interfacial de la medida electroquímica. Esto hace que estos dispositivos sean especialmente apropiados para la monitorización "in vivo".
- b) La señal obtenida es, obviamente, eléctrica, y por tanto es factible la transducción directa de la velocidad de reacción en la señal de lectura.
- c) Los límites de detección que se obtienen normalmente, entre 10^9 y 10^6 mol L^{-1} , son adecuados para la detección de muchos analitos interesantes.
- d) Y, por último, la relativa simplicidad y bajo coste de la instrumentación analítica permiten una fácil disponibilidad.

No obstante, los sensores electroquímicos tienen dos graves inconvenientes:

- a) Como es conocido, las técnicas electroanalíticas poseen una baja selectividad en comparación con otras técnicas analíticas, si bien este inconveniente se minimiza drásticamente al utilizar un sistema de reconocimiento biológico que posea una alta especificidad para ciertos analitos.
- b) La necesidad de utilizar un electrodo de referencia que mantenga el potencial durante el transcurso de la medida puede ser problemático, sobre todo cuando se monitoriza una medida durante un largo período de tiempo.

Los transductores electroquímicos más utilizados son los potenciométricos y los amperométricos, aunque también se han utilizado biosensores conductimétricos. Los dispositivos amperométricos proporcionan respuestas más rápidas que los potenciométricos, y poseen mayor selectividad e intervalo de actividad más amplio.

En los últimos años se han desarrollado transistores de efecto de campo (FET), que son transductores potenciométricos fabricados con la tecnología microelectrónica de los semiconductores (Turner et al., 1986, Hanazato et al., 1989).

II.2.1. Enzimas selectivas de compuestos fenólicos

Las enzimas que catalizan la oxidación de los compuestos fenólicos (tirosinasa, lacasa y peroxidasa) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y son de importancia fundamental para aquellos organismos que producen compuestos polifenólicos, como melaninas (Prota, 1995). Además, la oxidación de fenoles está implicada en procesos de cicatrización, defensa inmunológica (Götz y Boman, 1985), esclerotización de la cutícula de los artrópodos (Peter, 1993), y en la biosíntesis de muchos metabolitos secundarios, como alcaloides, ligninas y taninos. El estudio de estas enzimas en los últimos años ha abierto unas posibilidades inesperadas en sus aplicaciones técnicas para la determinación de compuestos fenólicos de importancia medioambiental mediante la construcción de biosensores.

La especificidad de la tirosinasa está limitada a compuestos monofenólicos y catecoles con una posición orto del anillo aromático libre o bien ocupada por un grupo -OH (Scheller et al, 1997), mientras que la peroxidasa es una enzima menos selectiva capaz de reaccionar con un mayor número de compuestos fenólicos. Por otro lado, la lacasa tiene una reactividad más limitada que la peroxidasa, aunque el mecanismo de reacción entre la enzima y los compuestos fenólicos no está claramente determinado. En la revisión bibliográfica (Apartado II.2.4) se presenta una relación de electrodos enzimáticos para la determinación de fenoles basados en la inmovilización de los tres tipos de enzimas mencionados.

II.2.1.1. Tirosinasa

La enzima tirosinasa es una fenol oxidasa que contiene cobre y que cataliza la oxidación de los monofenoles y los catecoles a o-quinonas. Está ampliamente distribuida en la naturaleza, y se ha encontrado en bacterias, hongos, plantas y animales. Actúa en la biosíntesis de los pigmentos de melanina en la piel de los invertebrados, en la esclerotización de las cutículas de los insectos, y en la biosíntesis de compuestos polifenólicos (la mayoría de los cuales poseen una actividad antibiótica) en plantas y microbios. Es claramente diferente de la tirosina hidroxilasa, la cual requiere tetrahidropteridina como cofactor.

La tirosinasa ha sido purificada a partir de una gran variedad de fuentes que incluyen champiñón, gusanos de seda y melanoma de ratón. El tamaño de las subunidades es similar, y sugiere la existencia de un Cu por subunidad de 32000 Da, pudiendo la unidad funcional catalítica ser un dímero, que implica dos cobres por sitio activo. Es posible que el cobre en el estado nativo de la enzima se encuentre como Cu⁺.

Mecanismo de la reacción enzimática catalizada por la tirosinasa:

*El mecanismo de la hidroxilación de monofenoles y oxidación de difenoles por la tirosinasa ha sido deducido en su mayor parte a partir de estudios estructurales de la tirosinasa de *Neurospora crassa*, además de análisis cinéticos de enzimas melanogénicas procedentes de vertebrados (Wilcox et al., 1985; Sánchez-Ferrer et al., 1995). Los resultados han llevado a suponer un mecanismo como el que aparece en la Figura 7.*

En el estado basal, la enzima está compuesta por un 2-30% de la forma "azul" oxi (E_{OXI}), y el resto por la forma incolora E_{MET} . La oxidación monofenólica es iniciada mediante la unión del sustrato a la forma E_{OXI} para dar, vía intermedio $E_{OXI}FEN(OL)$, la forma $E_{MET}CATECOL$. Esto deriva hacia una o-quinona y la forma E_{DEOXI} de la enzima. El ciclo catalítico de la oxidación de los monofenoles es completado por la unión de oxígeno.

La oxidación difenólica se inicia por la unión de un catecol a la forma E_{OXI} . Se forma el complejo $E_{OXI}CATECOL$ que se transforma en quinona y la forma enzimática E_{MET} la cual se une a una segunda molécula de catecol dando el producto $E_{MET}CATECOL$, que sufre las mismas transformaciones hacia E_{DEOXI} y E_{OXI} que en el caso de la oxidación de monofenoles.

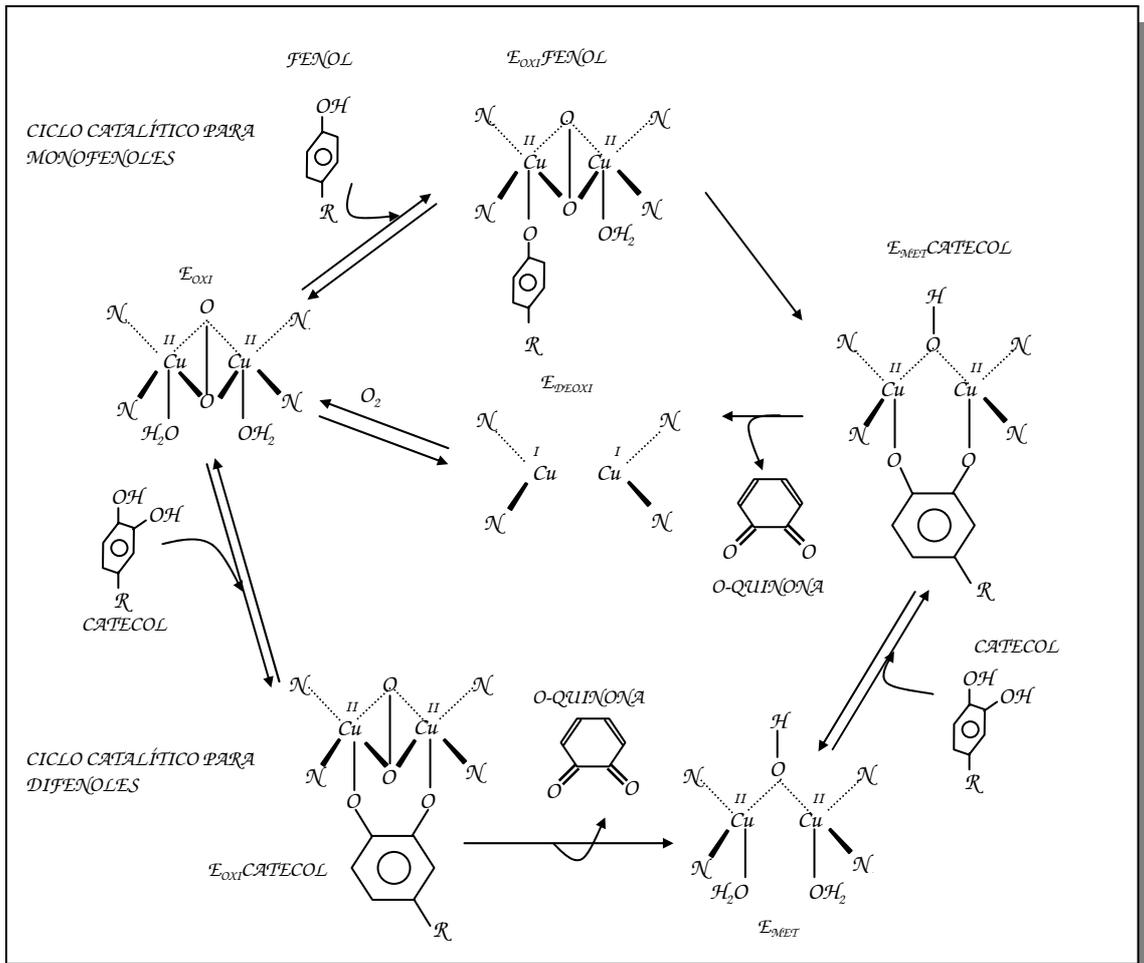


Figura 7. Esquema de las reacciones catalizadas por la tirosinasa (Wilcox et al., 1985; Sánchez Ferrer et al, 1995).

Especificidad de la tirosinasa:

Según la fuente de procedencia de la tirosinasa, la especificidad por los sustratos fenólicos puede variar. La tirosinasa de rábano oxida el fenol, la DOPA y una variedad de otros compuestos monofenólicos, incluyendo la L-tirosina y sus residuos en péptidos (Cori y Frieden, 1967; Ito et al., 1984). En general, puede decirse que la especificidad de las tirosinasas se reduce a los monofenoles con una posición orto libre y orto-difenoles.

Inhibidores de la tirosinasa:

Es conocido que la tirosinasa sufre una inhibición autocatalítica. Esta inhibición parece deberse a la unión covalente de un producto quinónico de reacción a la enzima (Wood y Ingraham, 1965), al ataque de un radical hidroxílico unido a un cobre generado por el complejo Cu(I)-peróxido (Coche-Guerente et al., 2001), o por la destrucción de un residuo de histidina durante los procesos de oxidación en la catálisis (Lerch, 1978, 1983).

Además, se conoce un número de inhibidores competitivos de la tirosinasa que se unen al centro activo de la enzima. Los más eficientes son los que poseen una función con un nitrógeno o un oxígeno en conjunción con otro oxígeno en una distancia 2.7-2.8 Å, que corresponde a la distancia de 3 Å de los átomos de cobre en el centro activo de la enzima. Algunos ejemplos son el ácido salicílicohidroxámico (Allan y Walker, 1988) y la tropolona (Kahn y Andrawsi, 1985).

II.2.1.2. Peroxidasa

Las peroxidases causan, con la participación del peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones, la oxidación monoeléctrica de un amplio espectro de sustratos. La mayoría de las peroxidases son glicoproteínas de 20-70 kD de peso molecular, y contienen un grupo férrico de protoporfirina IX como grupo prostético, denominado citocromo c (Figura 8). Se distribuyen de forma ubicua en la naturaleza y se nombran después de especificar su fuente (Scheller et al., 1997).

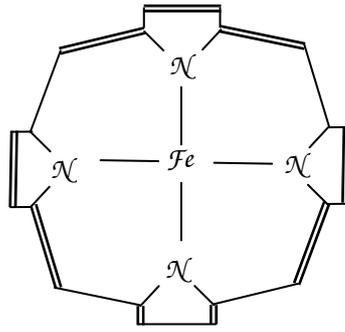


Figura 8. Estructura del grupo hemo de las peroxidadas.

Mecanismo de las reacciones catalizadas por la peroxidasa:

El mecanismo de las reacciones catalizadas por la peroxidasa ha sido ampliamente estudiado (Anni y Yonetani, 1992; Everse et al., 1991; Poulos et al., 1980; Ryan et al., 1994). La cinética de las reacciones catalizadas por el citocromo c, grupo hemo de las peroxidadas (también de la enzima *HRP*) se realiza mediante un mecanismo de doble desplazamiento o “ping-pong”, cuando se utilizan dos sustratos, según la secuencia de reacciones siguiente:

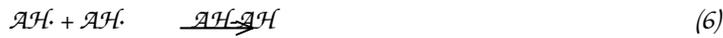


En un primer paso, el peróxido se une a un sitio libre del hierro (III) y es reducido a ROH en un proceso rápido en el que intervienen dos electrones, donde se forma el Compuesto I (Fe(IV)=O,P) como un intermedio primario estable de acuerdo con la reacción (Scheller et al., 1997).

En la mayoría de las peroxidadas, se toma un electrón del átomo de hierro y otro del macrociclo hemo (P), formando hierro (IV) y un radical porfirina (P•). Además, un átomo de oxígeno procedente del peróxido es transferido al hierro presente en el grupo hemo. En el siguiente paso, reacción (3), un sustrato AH₂ reduce el radical de porfirina del Compuesto I mientras que el hierro permanece en su estado oxidado (Fe(IV)=O,P). Este intermedio estable se suele denominar Compuesto II. Este Compuesto II a su vez reacciona con el sustrato reductor (AH₂) para regenerar la forma nativa de la peroxidasa, como se muestra en la reacción (4).

La formación del Compuesto I es rápida con una constante de velocidad de segundo orden aparente de entre 10^6 - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Barman, 1992). Además, la oxidación de los sustratos reductores por el Compuesto I es 10-100 veces más rápida que por el Compuesto II. Por tanto, en presencia de un exceso suficiente de peróxido con respecto a AH₂, la reacción global está controlada por

la concentración de $\mathcal{A}\mathcal{H}_2$, y la velocidad de la reacción está limitada por la constante de velocidad k_3 . El radical $\mathcal{A}\mathcal{H}\cdot$ del sustrato sufre una serie de reacciones no enzimáticas (5), (6) y (7).



En la Figura 9 se resumen el mecanismo de actuación de la peroxidasa.

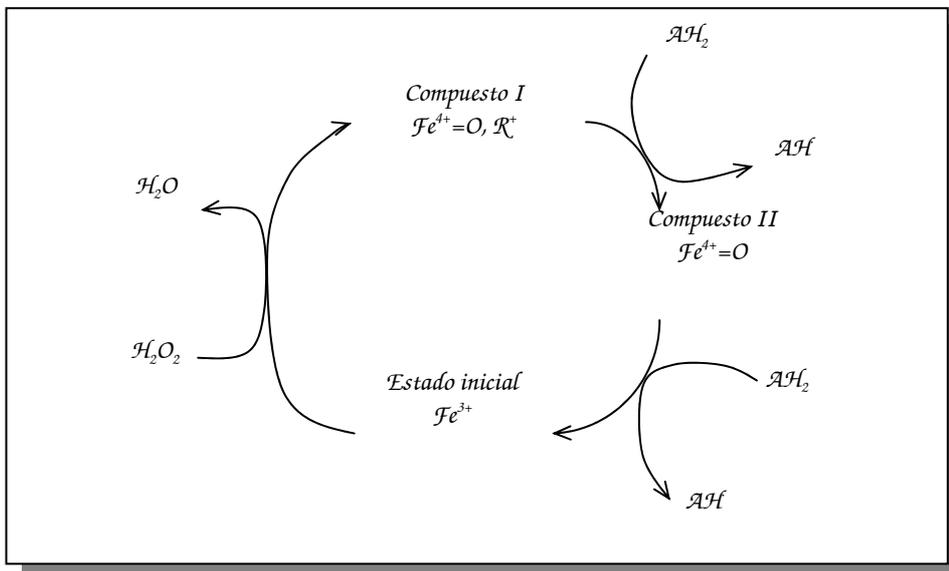


Figura 9. Ciclo catalítico de la peroxidasa.

Especificidad de la peroxidasa:

Los Compuestos I y II formados tras la oxidación de la peroxidasa por el peróxido de hidrógeno, pueden ser reducidos a la forma nativa de la enzima mediante fenoles (Dunford y Adeniran, 1986; Ruzgas et al., 1995), aminas aromáticas (Job y Dunford, 1976; Kulys et al., 1991), ferrocenos (Smith y Cass, 1990), complejos de amino rutenio (Frew et al., 1986) y tetraciano-p-quinodimetano (Kulys et al., 1980).

Inhibidores de la peroxidasa:

Se conocen unos pocos inhibidores de esta enzima. Entre ellos, se encuentran los iones sulfuro y el cianuro, que inhiben la reacción enzimática de forma reversible. Por otro lado, la acción de la peroxidasa es inhibida en presencia de iones metálicos bivalentes en el orden $\text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ (Zollner, 1993). La inactivación de la

peroxidasa durante la oxidación de fenoles se debe principalmente a la formación de polifenoles que se unen inespecíficamente a la enzima. Además, concentraciones altas de peróxido de hidrógeno pueden originar la formación de un complejo entre este el peróxido y el Compuesto I, provocando la inactivación enzimática (Anni y Yonetani, 1992).

II.2.1.3. Lacasa

Las lacasas, oxidasas "azules" que contienen cobre, encadenan cuatro procesos de oxidación monoelectrónica de los p-difenoles con cuatro reducciones monoelectrónicas del oxígeno molecular, produciéndose agua. Al igual que las tirosinasas, las lacasas son glicoproteínas con un contenido de carbohidratos que supone el 10-45 % del peso molecular total, que es de 55-90000 Da para lacasas procedentes de hongos, y de 110-140000 Da para enzimas de plantas.

Aunque se hayan ampliamente distribuidas en la naturaleza, aparentemente no se encuentran en organismos superiores. En las plantas, las lacasas están implicadas en la polimerización de monolignoles a ligninas.

Mecanismo de las reacciones enzimáticas catalizadas por la lacasa:

El mecanismo de la lacasa es menos conocido que los de la tirosinasa y la peroxidasa. La mayoría de las lacasas son proteínas de una sola cadena que contienen 3 ó 4 iones cobre.

Se ha propuesto un mecanismo para la lacasa en base a estudios de reducción de la lacasa de *Rus Vernicifera* por la hidroquinona y el ácido ascórbico (Andreasson y Reinhammar, 1979). Los electrones transferidos por el sustrato a uno de los cobres de la enzima son transportados al cobre donde se ha fijado el oxígeno formando un intermedio peróxido fuertemente unido, mientras que un tercer cobre facilita la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno de éste. Sin embargo, el mecanismo detallado de los pasos de transferencia de electrones del cobre unido al sustrato y la formación de los intermedios del oxígeno aún no están claros.

Especificidad de la lacasa:

La lacasa oxida una amplia variedad de fenoles y aminas aromáticas, como el guaiacol, el 4-metilcatecol, el α -naftol, la p-anisidina, la p-fenilendiamina, el 2,7-diaminofluoreno y la siringaldazina. Además, puede oxidar un número amplio de complejos orgánicos e inorgánicos de iones metálicos, como ferricianuro (Cenas y Kuly, 1988), ferroceno (Ghindilis et al., 1995) y citocromo c (Jin et al., 1996).

Inhibidores de la lacasa:

Azidas e iones de halógenos son inhibidores inespecíficos de las oxidasas de cobre. Sólo se conocen algunos específicos para la lacasa, como el ácido "kojic" y el ácido salicilhidroxamínico.

11.2.2. Enzimas en medios orgánicos y en micelas inversas

Hasta hace muy poco tiempo sólo se habían desarrollado biosensores para la detección de analitos capaces de solubilizarse en medio acuoso y de esta forma interactuar con la enzima, ya que el agua, convencionalmente, era utilizada como único disolvente para las reacciones enzimáticas, debido a la creencia de que otros disolventes podrían desnaturalizar el biocatalizador. Contrariamente a esta creencia, se ha comprobado recientemente que la biocatálisis puede funcionar en medios orgánicos y en sistemas organizados. La primera evidencia de que las enzimas retienen su actividad catalítica en disolventes orgánicos fue realizada por el grupo de Klibanov (Zaks y Klibanov, 1988), mientras que las ventajas que puede presentar estos medios para el desarrollo de biosensores se puso de manifiesto por los grupos de Turner (Hall et al., 1988; Saini et al., 1991) y Wang (1992).

Desde el punto de vista bioanalítico es necesario discutir los factores que influyen en la actividad de la enzima en un disolvente orgánico. Se acepta que, generalmente, las enzimas retienen actividad catalítica en ciertos disolventes orgánicos siempre y cuando exista una capa de hidratación que recubra la biomolécula. Además, se ha sugerido que la cantidad de agua que se requiere para mantener la actividad catalítica depende de cada enzima.

Por otro lado, un aspecto fundamental para dicha actividad catalítica es la selección de una fase orgánica compatible, es decir, que no reaccione fuertemente con la capa de hidratación indispensable. Así, se ha encontrado que los disolventes orgánicos suficientemente hidrofóbicos, inmiscibles con el agua, son normalmente más apropiados para la catálisis enzimática, debido a que así disminuye la posibilidad de interacción con el agua estrechamente asociada a la superficie de la enzima. La hidrofobicidad de un disolvente orgánico puede expresarse por el valor de $\log P$, donde P es el coeficiente de reparto del disolvente en el sistema bifásico octanol/agua. A medida que $\log P$ aumenta, la hidrofobicidad del disolvente orgánico también aumenta. Se ha sugerido que disolventes con $\log P < 2$ no son apropiados para la biocatálisis, puesto que distorsionan fuertemente la interacción biocatalizador-agua. Disolventes con valores de $\log P$ entre 2 y 4 tienen una débil interacción con los microalrededores de la enzima, afectando a su actividad de forma poco predecible. Por último, aquellos disolventes con $\log P > 4$ son biocompatibles. Esta tendencia, sin embargo, ha sido establecida con relativamente pocos sistemas y en algunos casos no se cumple. Así, ciertas enzimas muestran una actividad sorprendentemente alta en algunos disolventes orgánicos, lo cual es debido probablemente a que dichas enzimas retienen su capa de hidratación tan fuertemente que incluso los disolventes hidrofílicos no pueden arrancarla, o a que el reparto del sustrato hacia el centro activo de la enzima está lo suficientemente favorecido como para contrarrestar los otros efectos perjudiciales.

La utilización de biosensores en fase orgánica ofrece una serie de ventajas, de las cuales, sin duda, la más obvia es la posibilidad de determinar analitos escasamente solubles en agua, lo cual amplía la gama de especies que pueden detectarse con estos dispositivos. Por otro lado, la baja solubilidad de las especies que son electroactivas en medio acuoso da lugar a una

disminución de las interferencias por parte de especies iónicas hidrofílicas. Puede conseguirse, asimismo, una mejora de la estabilidad operacional del sensor y un esquema de inmovilización de la enzima muy simplificado.

Por lo que respecta a los electrodos enzimáticos, pueden destacarse fundamentalmente tres aspectos. Primero, estos biosensores pueden utilizarse para la detección específica de analitos hidrofóbicos escasamente solubles en agua, los cuales acceden al microentorno de la enzima a través de la fase orgánica. La enzima, a su vez, interacciona directa o indirectamente con la superficie del electrodo. Como ya se ha discutido, el microentorno de la enzima debe contener un nivel de hidratación suficiente que asegure la actividad óptima de la enzima. En segundo lugar, se ha demostrado que es posible utilizar mediadores en la fase orgánica, invirtiendo el concepto convencional de inmovilización de mediadores insolubles en agua por adsorción sobre los electrodos. Utilizando un mediador soluble en agua en una fase predominantemente orgánica, éste tendrá poca tendencia a desprenderse del electrodo en condiciones de bajo contenido de agua. Por último, debe destacarse la facilidad de inmovilización de la enzima sobre la superficie de un electrodo. De esta manera, es posible la adsorción directa de las enzimas sobre materiales de soportes inertes o directamente sobre los electrodos. Esta técnica, además de simple, es rápida, y se consiguen inmovilizar, normalmente, mayores cantidades de enzima que con las técnicas de inmovilización covalente. Sin embargo, la adsorción sufre cuando el contenido en agua del disolvente orgánico es elevado.

El primer trabajo de un biosensor en el que el biocatalizador estaba en contacto directo con la fase orgánica apareció en 1988, cuando Hall describió un electrodo enzimático amperométrico para la determinación de fenoles en cloroformo (Hall et al., 1988). Entre los analitos que se ha determinado con biosensores amperométricos enzimáticos en fase orgánica pueden citarse el colesterol (Hall y Turner, 1991) y algunos fenoles (Wang et al., 1992; Wang y Lin, 1993).

Los avances recientes en los biosensores en fase orgánica incluyen el uso de microelectrodos para minimizar la caída óhmica en medios apolares (Wang et al., 1991) y el desarrollo de detectores en flujo con biosensorización en fase orgánica de respuesta rápida (Wang y Lin, 1993). La reciente introducción de reactores enzimáticos con inmovilización no covalente en medios no acuosos (Brace et al., 1992) debe facilitar, asimismo, el desarrollo de sistemas analíticos en flujo para monitorizar caudales orgánicos. Las separaciones "on line" (por ejemplo, cromatografía de líquidos o extracción con disolventes) pueden también beneficiarse de estos detectores de flujo en fase orgánica. Finalmente, estos medios han demostrado también ser apropiados para la biosensorización de bajos niveles de inhibidores enzimáticos, tales como tiourea, ácido benzoico, dietilditiocarbamatos, sulfato de hidroxilamonio y mercaptoetanol (Wang et al., 1993).

Una alternativa al empleo de disolventes orgánicos como medio de trabajo para biosensores es la utilización de micelas inversas, también llamadas emulsiones agua/aceite. Las micelas inversas son sistemas de tres componentes formados por un disolvente orgánico, que constituye la fase continua, una fase acuosa dispersa, y un tensoactivo que actúa como agente emulsificante.

En la Figura 10 se representa la estructura de una micela inversa, donde puede observarse cómo las cabezas polares del tensioactivo están orientadas hacia el interior de la micela, atrapando una microgotícula de agua.

La catálisis por enzimas atrapadas en micelas inversas hidratadas, es decir, la enzimología micelar, se ha convertido en una nueva tendencia en la biología molecular, debido a su utilidad para la comprensión del funcionamiento de las enzimas en los sistemas lípidos naturales (Martinek et al., 1989).

Pueden hacerse tres consideraciones importantes en cuanto a las reacciones enzimáticas en micelas inversas:

- a) La reacción enzimática siempre tiene lugar en medio acuoso.
- b) Las propiedades catalíticas de la enzima permanecen inalteradas.
- c) El reparto del sustrato entre la fase acuosa y la fase orgánica puede ser descrito por una constante de reparto.

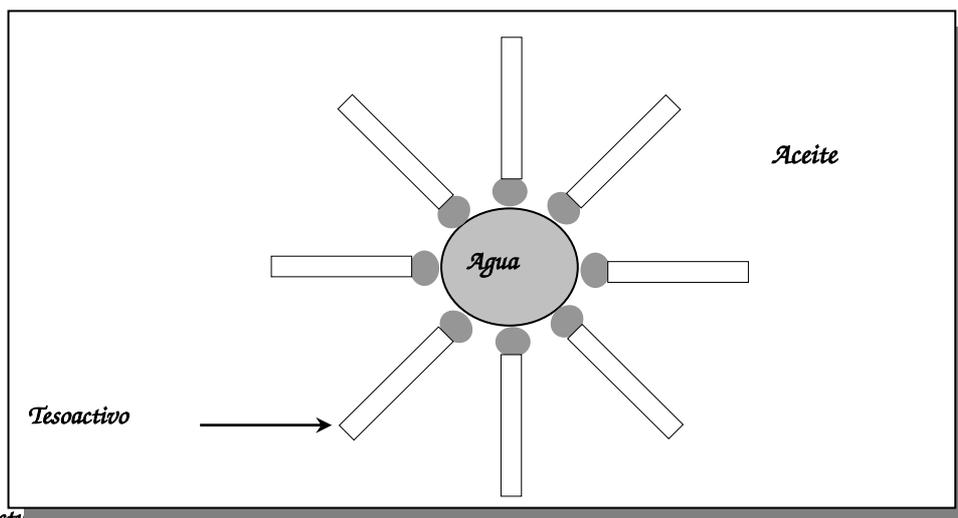


Figura 10. Estructura de una micela inversa.

Las ventajas más importantes que pueden esperarse de la utilización de micelas inversas como medios de trabajo para las reacciones enzimáticas son, en primer lugar, que en este tipo de sistemas es posible la solubilización de sustancias hidrofóbicas e hidrofílicas, por lo que se puede variar la naturaleza molecular de los sistemas objeto de investigación; es decir, la enzima puede interaccionar con sustancias solubles en agua y con sustancias escasamente solubles en medio acuoso, teniendo de este modo un medio universal para llevar a cabo reacciones enzimáticas. La segunda ventaja radica en el fácil control de la cantidad de agua necesaria para obtener el grado óptimo de hidratación de la enzima y, por tanto, de su actividad en disolventes no miscibles con el agua. Por último, y de la misma forma que ocurre en fase puramente orgánica, puede esperarse una relativa facilidad para la inmovilización de la enzima en la superficie del electrodo o en la matriz electródica si se trabaja en estos sistemas, en los que las enzimas son escasamente solubles.

II.2.3. Electroodos Compósitos

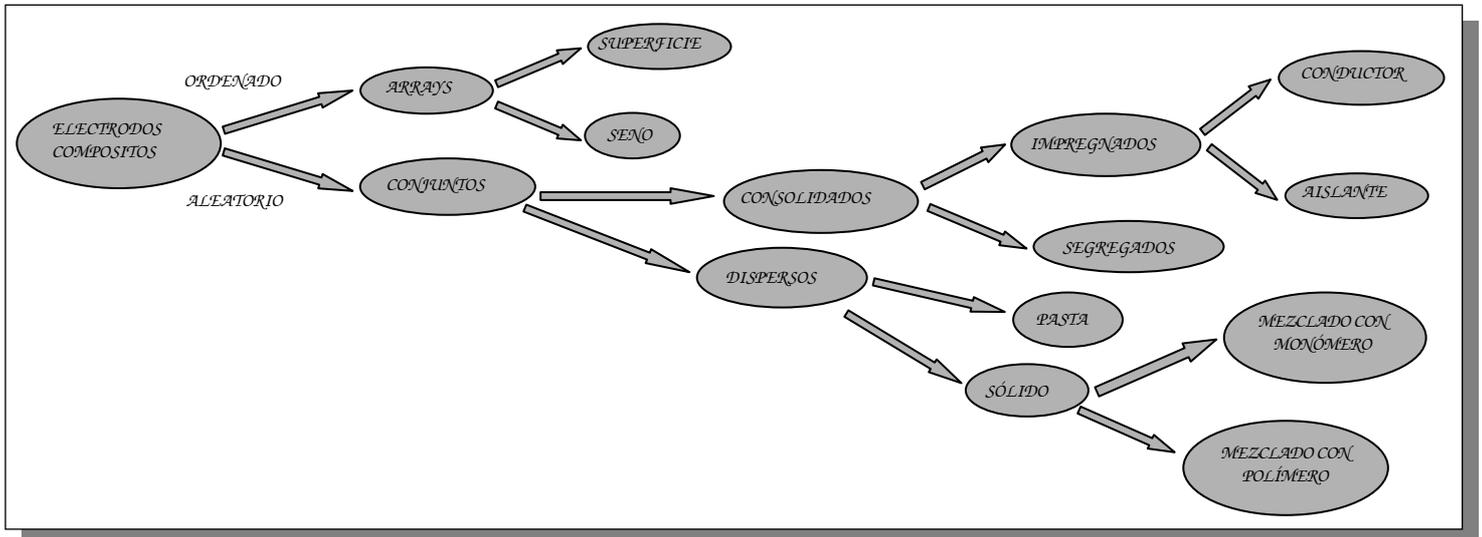
Ya se ha comentado anteriormente la importancia del transductor en un correcto diseño de un biosensor, y el esfuerzo realizado en los últimos años por conseguir una mejora de la sensibilidad, selectividad (o universalidad), conveniencia o economía a través del diseño apropiado de un transductor. En electroanálisis, este esfuerzo se ha realizado en la mejora de los electrodos de trabajo, en áreas como los microelectrodos, los electrodos modificados química o físicamente y materiales electroódicos compósitos.

Un electrodo compósito consiste en un material formado por al menos una fase conductora mezclada con al menos una fase aislante, siendo el caso típico el de un material formado por una sola fase conductora y una sola fase aislante (Tallman y Petersen, 1990).

Los electrodos compósitos ofrecen ventajas potenciales comparados con los electrodos tradicionales consistentes en una sola fase conductora, como son, por ejemplo, los de carbono vitrificado, de mercurio, platino u oro. Así, los electrodos compósitos pueden fabricarse con una gran flexibilidad en lo que se refiere a su forma y tamaño, permitiendo una fácil adaptación a una gran variedad de configuraciones electroódicas. Los electrodos compósitos de metales preciosos necesitan una menor cantidad de estos materiales y por tanto tienen un menor coste (por unidad de densidad de corriente) en comparación con su correspondiente conductor puro. Una de las ventajas más importantes de los electrodos compósitos es que presentan una mayor relación señal/ruido que los electrodos de conductor puro, lo que generalmente se traduce en una mejora de los límites de detección. Finalmente, quizás el aspecto más relevante de los electrodos compósitos es la versatilidad que proporcionan para incorporar sustancias en el seno del material que mejoren la sensibilidad y/o selectividad, de forma que la superficie de los electrodos pueda regenerarse sin pérdida de modificador.

Esta ventaja es utilizada para la fabricación de biosensores enzimáticos, procediendo a la inmovilización de la enzima en el seno de la matriz compósita, de manera que se obtiene un depósito tridimensional del biorreceptor. Así, puede regenerarse el biosensor por simple pulido de la superficie electroódica. Además, se tiene la posibilidad de incorporar a la matriz otros componentes, como pueden ser el mediador, el cofactor o incluso otra/s enzima/s para obtener electrodos multienzimáticos. Otra de las ventajas de la incorporación de la enzima dentro de la matriz electroódica es la rapidez de la respuesta debido a la eliminación de barreras membranosas para retener la enzima y la proximidad de la enzima y del mediador al material electroódico.

Es posible clasificar los electrodos compósitos basándose en la manera en la que el conductor y el aislante están distribuidos en el material. La Figura 11 ilustra un esquema de dicha clasificación.



La primera diferenciación se basa en una distribución ordenada de las zonas conductoras y aislantes (arrays) o al azar (conjuntos). Los electrodos compósitos distribuidos al azar pueden clasificarse a su vez en dispersos (cuando existe la misma probabilidad de encontrar una partícula en cualquier punto de la matriz), y consolidados (el conductor se encuentra distribuido de forma reticulada, existiendo regiones de conductor puro y aislante puro que no se mezclan entre sí).

Conductividad de los electrodos compósitos:

El mecanismo de conducción en los electrodos compósitos es diferente según sea la naturaleza del material. Los electrodos de array y los electrodos compósitos impregnados conducen a través de regiones continuas de material conductor puro más o menos homogéneas. Por otro lado, los electrodos compósitos dispersos y segregados conducen a través de regiones altamente heterogéneas discontinuas de conductor y aislante, proceso descrito mediante la “Teoría de Percolación” (Tallman y Petersen, 1990). Esta teoría sostiene la existencia de un camino abierto conductor que conecta dos extremos lejanos de un enrejado más o menos regular. A medida que la fracción de conductor en el seno de la matriz compósita (f) va aumentando desde cero, la conductividad del material aumenta gradualmente hasta que a un valor de $f=f_c$ (umbral de precolación o probabilidad crítica) la conductividad aumenta drásticamente varios órdenes de magnitud. A partir de esta fracción de conductor, hay una segunda región de incremento gradual de la conductividad a medida que aumenta f . Esta tendencia está representada en la Figura 12.

El umbral de percolación caracteriza la aparición de un camino abierto y por tanto un cluster infinito de extremos conectados que permite la conducción eléctrica a través del compuesto (Grimmet, 1989). Por debajo de la concentración del umbral de percolación, la conductividad del conjunto es parecida a la del polímero, mientras que por encima del umbral la conductividad del compuesto aumenta varios órdenes de magnitud aproximándose asintóticamente a la conductividad del conductor.

La respuesta eléctrica de un compuesto se ha explicado considerando el material como un conjunto de resistencias y condensadores, ya que el transporte electrónico por debajo del umbral es producido por "electron tunnelling" entre partículas individuales, y por encima por contacto directo entre partículas vecinas (Navarro Laboulais et al., 1994).

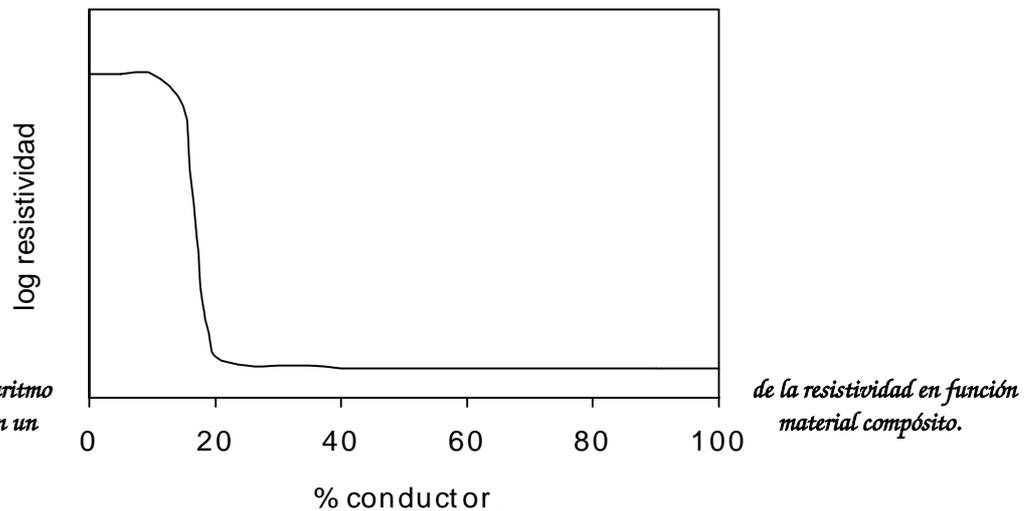


Figura 12. Variación del logaritmo del porcentaje de conductor en un

de la resistividad en función material compuesto.

Un material compuesto debe contener una fracción de conductor f un poco por encima del umbral de percolación para poseer una conductividad adecuada para su uso en electroanálisis. Esta composición crítica es significativamente menor para los electrodos segregados que para los dispersos, puesto que las partículas de conductor segregadas pueden conducir la corriente más fácilmente que las dispersas, que tienen mayor proporción de partículas aislantes a su alrededor. Para ambos tipos de materiales, la fracción de conductor (f) mayor que se puede utilizar está determinada generalmente por la estabilidad mecánica requerida para el material.

Las propiedades eléctricas y mecánicas dependen de la forma, el tamaño y distribución espacial del conductor. Típicamente, suele escogerse un diámetro de partícula del material aislante superior al del material conductor, siendo necesaria una menor cantidad de material conductor para alcanzar el umbral de percolación, puesto que se observa una tendencia a forzar a las partículas de conductor a agruparse en los intersticios de las partículas aislantes.

Consideraciones sobre la relación señal/ruido de los electrodos compósitos:

Si se considera un solo electrodo plano de geometría arbitraria rodeado por un plano aislante semiinfinito en una disolución quiescente, de modo que el único mecanismo de transporte de masa es la difusión, la dependencia a tiempos cortos de la corriente limitada por difusión es la que derivó Oldham (1981), y que se indica en la siguiente ecuación:

$$i = nFDC \left[\frac{A}{(\pi Dt)^{1/2}} + \frac{P}{2} + \dots \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

donde A y P son el área activa y el perímetro del electrodo respectivamente. Para los macroelectrodos de dimensiones milimétricas el término del perímetro es insignificante, pero, para los microelectrodos, sin embargo, la corriente puede mejorarse significativamente gracias al término del perímetro, por el llamado "efecto borde".

La ecuación puede ser aplicada a una colección de microelectrodos (un compuesto) si las capas de difusión no solapan entre ellas. La corriente total es, por tanto, la suma de las corrientes individuales de los sitios conductores del compuesto, y A y P se convierten en la suma de las áreas activas y los perímetros activos, respectivamente. A tiempos más largos, las capas de difusión de los sitios activos adyacentes solapan. Para un tiempo suficientemente largo, el solapamiento de las capas de difusión envuelve completamente la superficie del compuesto y el electrodo se comporta como si su superficie geométrica fuera activa. De la ecuación anterior se deduce que las geometrías de los sitios activos con mayor relación P/A deben producir las mayores densidades de corriente, al menos a tiempos cortos e intermedios. Para experimentos a escala mayor de tiempo, el espaciamiento entre los sitios activos debe ser mayor para minimizar el solapamiento de las capas de difusión. Estas consideraciones ponen de manifiesto la mejora de la corriente de un electrodo compuesto con respecto a un macroelectrodo de igual área activa.

Se ha demostrado que bajo las condiciones hidrodinámicas del FIA, los electrodos compósitos también producen una mejora de la corriente con respecto a los electrodos convencionales (Tallman y Petersen, 1990).

En lo que respecta a la corriente de fondo, la corriente de carga (y la mayoría de otras formas de corriente fondo) es proporcional al área activa del electrodo, por lo que un electrodo compuesto correctamente diseñado debe mostrar una mejora en la relación corriente faradaica/corriente de fondo, en comparación con su correspondiente conductor puro, y, por tanto, mejores límites de detección. No obstante, en ocasiones el ruido de fondo de los electrodos compósitos aumenta como consecuencia de pequeñas imperfecciones o huecos en las interfases entre el conductor y el aislante, que provocan un aumento del área interfacial y, por tanto, un incremento concomitante de la corriente de fondo.

En definitiva, puede generalizarse el hecho de que un electrodo compuesto es capaz de producir mayor corriente por unidad de área activa que el correspondiente macroelectrodo de conductor puro, tanto en disoluciones quiescentes como bajo condiciones hidrodinámicas.

Por otro lado, de todas estas consideraciones se deduce que cuanto mayor es la fracción del área geométrica cubierta por el conductor, menor es la relación S/R_c , aproximándose en el límite al caso del conductor puro. Es por esta razón que los electrodos compósitos consolidados, que poseen buena conductividad a bajo f (fracción de conductor en el material compuesto), proporcionan relaciones S/R mayores que los electrodos compósitos dispersos.

Materiales empleados para la fabricación de electrodos compósitos:

Para el desarrollo de este tipo de electrodos se ha empleado un gran número de materiales. En general, los materiales de carbón son fases conductoras ideales para compósitos usados como sensores amperométricos, ya que poseen una elevada inercia química y muestran un amplio intervalo de potenciales de trabajo accesible, así como una baja resistencia eléctrica y una estructura cristalina responsable de corrientes residuales bajas (Alegret, 1996; Céspedes et al., 1996). Los materiales aislantes pueden ser resinas epoxi, silicona, poliuretano, metacrilato, Teflón, etc. La matriz electródica más utilizada es la que está formada por pasta de carbono, en la que se utiliza grafito como material conductor y aceite mineral o parafina como material aislante o aglutinante (Wang et al., 1990). Este tipo de electrodos entra dentro de la clasificación antes expuesta como materiales dispersos. Otra forma muy extendida de fabricar los electrodos compósitos enzimáticos consiste en emplear una matriz rígida de grafito-resina epoxi (Wang y Varughese, 1990; Alegret, 1996; Albareda Sirvent et al., 2001). Por otro lado, Wang y col. (1993) demostraron la utilidad de los electrodos de grafito-Teflón como alternativa para la fabricación de electrodos compósitos enzimáticos. Los electrodos compósitos de grafito-polímero de etilen/propilen/dieno se han desarrollado en nuestro Grupo de investigación, y han demostrado poseer unas características adecuadas para su aplicación en la construcción de biosensores (Alonso et al., 1999). Wang y Derwald (1983) han desarrollado electrodos compósitos que emplean una matriz en la que el componente conductor no es grafito, sino un material poroso denominado carbono vítreo reticulado, siendo el material aislante una resina epoxi, para su aplicación como biosensores.

En las investigaciones que se describen en esta Memoria, se han desarrollado tres tipos de biosensores enzimáticos compósitos basados en tres tipos de matrices diferentes: grafito-Teflón, grafito-polímero de etilen/propilen/dieno (EPD), y carbono vítreo reticulado (RVC)-resina epoxi.

Los electrodos compósitos de grafito-Teflón se construyen mezclando cantidades conocidas de grafito y de Teflón en polvo, para posteriormente proceder a prensar mecánicamente en forma de pastilla la mezcla homogeneizada. En nuestro grupo de trabajo estos electrodos han sido ampliamente estudiados, y se ha llegado a la conclusión de que presentan excelentes características para su uso desde el punto de vista electroanalítico, pudiendo utilizarse en disolventes no acuosos (Ortiz et al.,

1997). Además, se ha demostrado la posibilidad del empleo de este tipo de electrodos compósitos como detectores en flujo, tanto en FIA (Fernández et al., 1995; Guzmán Vázquez de Prada et al., 2002;) como en HPLC (Fernández et al., 1996).

Por otro lado, también se ha demostrado (del Cerro et al., 1997; Serra et al., 1999; Peña et al., 2001; Cayuela et al., 1998; Domínguez et al., 2001) que es posible llevar a cabo una inmovilización de la enzima por simple atrapamiento físico en la matriz del electrodo de grafito-Teflón, obteniéndose biosensores reproducibles, sin necesidad de enlaces covalentes entre la enzima y el grafito. Este procedimiento implica grandes ventajas prácticas como son una fabricación mucho más sencilla y más rápida y una mayor retención de la actividad enzimática. El seno del electrodo de grafito-Teflón sirve de este modo como depósito tridimensional de enzima, de forma similar a los ya comentados de pasta de carbono y de grafito-resina epoxi.

Los electrodos de grafito-EPD se construyen disolviendo el polímero en ciclohexano y mezclando la disolución con el grafito en polvo. Una vez evaporado el disolvente, el polvo resultante se prensa en forma de pastilla. Este tipo de electrodos también ha resultado ser excelente para su aplicación en estudios electroquímicos (Alonso et al., 1999), así como en análisis en continuo (Salas Villanueva, 2000), habiéndose modificado su matriz con partículas metálicas y óxidos metálicos. En la Figura 13 se muestra la composición del polímero de etilen/propilen/dieno.

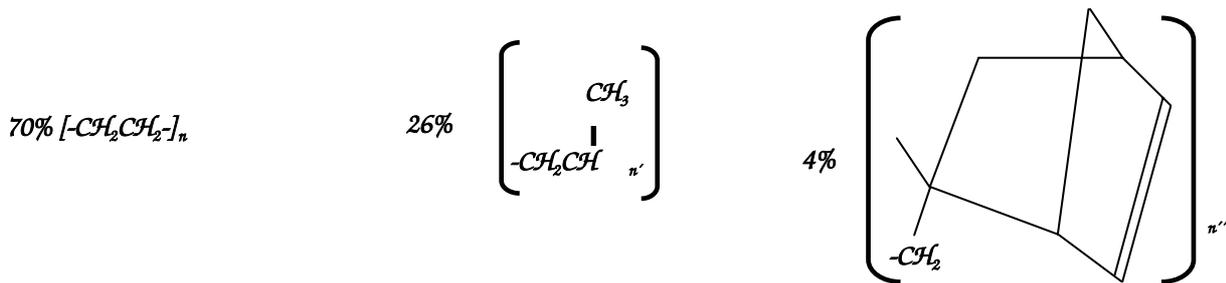


Figura 13. Poli(etilen-co-propilen-co-5-metilen-2-norborneno). Nombre comercial: polímero de etilen/propilen/dieno (EPD)

Los electrodos de RVC-epoxi se construyen rellenando los poros del material reticulado con una resina epoxi, permitiendo posteriormente el curado de ésta antes de su uso. Las resinas epoxi son una familia de polímeros ampliamente utilizados por sus excelentes propiedades químicas, su buena adhesión a otros materiales (que se debe a la polaridad de los grupos alifáticos hidroxilo y éter presentes en la cadena de la resina inicial) y sus características aislantes. El RVC es una forma relativamente impermeable de carbono, muy parecida al carbono vitrificado, que está formada por una estructura rígida tridimensional de panal de abeja. Las principales ventajas de este material en el campo de la electroquímica son su pequeña superficie microscópica comparada con el grafito poroso convencional, su matriz rígida, bajo coste en comparación con el carbono vitrificado, y su mayor versatilidad (Heineman y Kissinger, 1988). Combina las propiedades electroquímicas del carbono vitrificado no poroso con sus ventajas hidrodinámicas y estructurales. La estructura reticulada proporciona una relación área/volumen que permite una rápida conversión coulombimétrica sin un ensanchamiento significativo de la banda cuando se trabaja en FIA o HPLC (Curran y Tougas, 1984). El RVC necesita un pretratamiento para obtener resultados reproducibles, ya que posee grupos superficiales que pueden formar óxidos (Strohl y Curran, 1980). En nuestro grupo de

investigación se han desarrollado electrodos de PVC-resina epoxi en los que la enzima peroxidasa ha sido inmovilizada en el seno de la matriz compósita, proporcionando resultados excelentes para el análisis de peróxidos tanto en discontinuo como en FIA (Peña et al., 1999).

Los electrodos compósitos de grafito-Teflón, grafito-EPD y PVC-epoxi resultantes combinan las ventajas de la rapidez de respuesta, capacidad de renovación (por pulido) de su superficie, rigidez, facilidad de fabricación, posibilidad de inmovilizar otros componentes en la matriz, posibilidad de ser utilizados en disolventes no acuosos y economía.

II.2.4. Biosensores amperométricos para la determinación de compuestos fenólicos: revisión bibliográfica

Tal como se ha puesto de manifiesto anteriormente, el empleo de enzimas como materiales de reconocimiento y de electrodos amperométricos como sistemas de transducción para la fabricación de biosensores, proporciona numerosas ventajas desde un punto de vista analítico. Por esta razón, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo de investigación en el diseño de biosensores con estas características. En este apartado se pretende dar una visión general de los diferentes métodos desarrollados hasta la fecha basados en la utilización de biosensores enzimáticos amperométricos para la detección y determinación de fenoles.

En la Tabla 7 se resumen las características de los distintos biosensores electroquímicos para fenoles encontrados en la bibliografía. Se menciona el tipo de material electrodico empleado en su construcción, la/s enzima/s utilizada/s y su forma de inmovilización, el potencial de medida, el medio empleado, las características analíticas del método, así como el tiempo de vida de cada uno de los biosensores. También se recoge el tipo de muestra donde han sido aplicados y si se ha utilizado algún tipo de mediador. En esta Tabla se ha realizado una primera agrupación de los biosensores atendiendo al material enzimático empleado. De este modo, en primer lugar aparecen los electrodos amperométricos que emplean tirosinasa, siendo este grupo el más numeroso con diferencia. A continuación se recogen los que emplean peroxidasa, lacasa, y por último los basados en glucosa deshidrogenasa y glucosa oxidasa.

La mayoría de los biosensores desarrollados utilizan las enzimas específicas para fenoles mencionadas en el apartado II.2.2, es decir, tirosinasas, lacasas y peroxidasas, cuyo mecanismo de reacción con los compuestos fenólicos se ha descrito en dicho apartado. En general, se emplean enzimas purificadas para construir los biosensores, aunque en algunos casos se inmoviliza un tejido vegetal que las contiene (Eggins et al., 1997; Forzani et al., 1997; Wang y Lin, 1988; Moressi et al., 1999; Uchiyama et al., 1993; Munteanu et al., 1998). A pesar de que el mecanismo de actuación de cada una de estas enzimas es diferente, es posible ilustrar de una forma general la secuencia de reacciones que se producen en la detección de fenoles sobre electrodos modificados con dichas enzimas (Marko-Varga et al., 1995) tal y como se muestra en la Figura 14.

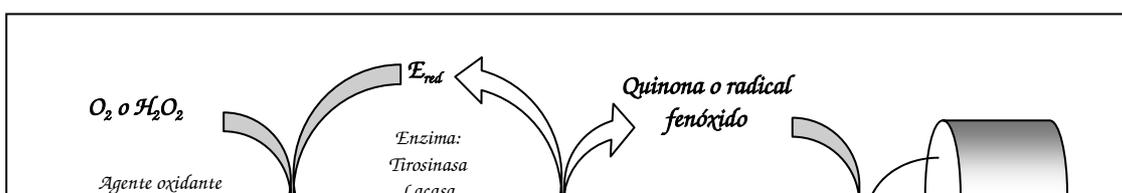


Figura 14. Mecanismo generalizado para la detección de compuestos fenólicos utilizando electrodos modificados con enzimas específicas para fenoles.

Las enzimas en la superficie de un electrodo son oxidadas por el oxígeno molecular (tirosinasa, lacasa) o el peróxido de hidrógeno (peroxidasa) y son reducidas posteriormente por los compuestos fenólicos, formándose quinonas (en el caso de la tirosinasa y la lacasa) o radicales fenóxido (en el caso de la peroxidasa). Estos productos generalmente son electroactivos y pueden ser reducidos nuevamente a sustrato fenólico sobre la superficie del electrodo cuando se aplica un potencial constante adecuado. Esta corriente de reducción es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en la disolución. De esta forma, se genera un reciclado electroquímico-enzimático de sustrato que produce una amplificación de la señal, y por tanto, una mayor sensibilidad del biosensor.

El potencial constante necesario para reducir los productos de las reacciones enzimáticas debe estar incluido en un intervalo óptimo entre -0.2 y 0.0 V vs. SCE (Csöregi et al., 1993; Gorton et al., 1992). En esta región, la corriente de fondo cambia de signo, lo que supone bajo ruido y corrientes pequeñas, y por tanto, pueden obtenerse menores límites de detección. Además, en esta ventana de potencial se minimiza enormemente el riesgo de que se produzcan reacciones electroquímicas interferentes. Por ejemplo, en el caso concreto de muestras de aguas medioambientales, hay presentes cantidades variables de compuestos electroquímicamente activos, como las sustancias húmicas, por lo que hay que tener especial cuidado cuando se emplean potenciales fuera de esta región óptima (Marko-Varga et al., 1995).

Otra posibilidad para monitorizar los compuestos fenólicos consiste en la detección del consumo de oxígeno o de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, este método presenta varias desventajas en comparación con la reducción electroquímica de las quinonas o de los radicales fenóxido. Es un hecho bien conocido que tanto las quinonas como los radicales tienden a formar polímeros que se adsorben sobre la superficie del electrodo, de modo que, si estos productos no son reducidos electroquímicamente, dicha polimerización ocurre en mayor extensión y, consecuentemente, se produce mayor ensuciamiento del electrodo. Además, en este caso no se produce reciclado del sustrato enzimático, por lo que no hay amplificación de la señal, obteniéndose, por tanto, peores límites de detección. Por otra parte, es necesario aplicar un potencial bastante negativo para llevar a cabo la monitorización del oxígeno.

De las referencias citadas en la Tabla 7, la mayoría de ellas se refieren a métodos basados en la reducción electrodrónica de los productos enzimáticos, y sólo algunas de ellas se basan en la monitorización del consumo de oxígeno empleando un electrodo de oxígeno tipo Clark y tirosinasa (Uchiyama et al., 1993; Hasebe et al., 1993; Uchiyama et al., 1995; Hasebe et al., 1995; Campanella et al., 1994; Streffer et al., 1998), o lacasa (Ghindilis et al., 1995) como sistemas de reconocimiento, aplicando un potencial constante de -0.6 ó -0.7 V vs. Ag/AgCl.

En la Tabla 7 se recogen también métodos de determinación de fenoles en los que se emplean enzimas diferentes de las ya mencionadas, como son la glucosa deshidrogenasa (GDH) (Wollenberger y Neumann, 1997) y la glucosa oxidasa (GOD) (Saby et al., 1997; Saby y Luong, 1998), que no son específicas para los compuestos fenólicos. El fundamento del reconocimiento biológico de los fenoles con estas enzimas consiste en la actuación de los productos oxidados de los compuestos fenólicos como mediadores en la reacción de la enzima con la glucosa, según se indica en la Figura 15.

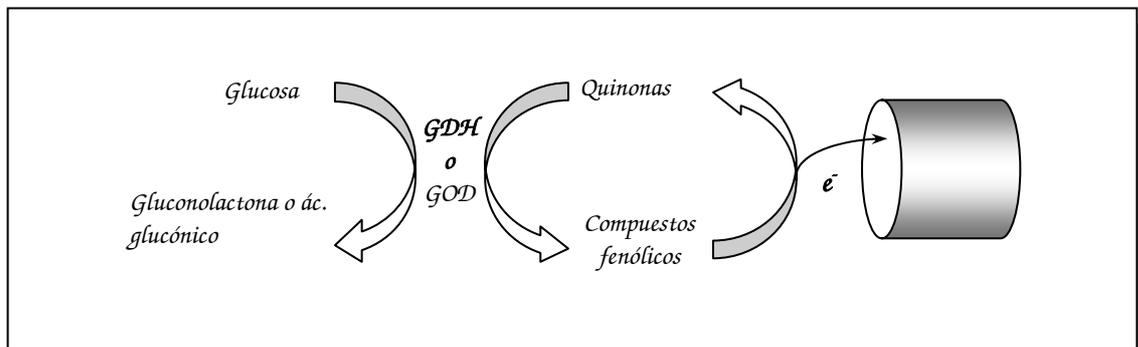


Figura 15. Fundamento de la detección de compuestos fenólicos empleando glucosa deshidrogenasa o glucosa oxidasa inmovilizada en un electrodo amperométrico.

En estos casos, los compuestos fenólicos son oxidados directamente sobre la superficie del electrodo a un potencial de $+0.5$ V ó $+0.45$ V vs. Ag/AgCl, y sus productos de oxidación regeneran el estado inicial de la enzima, reduciéndose de nuevo a compuesto fenólico. Por tanto, en estos casos también se produce una amplificación de la señal, aunque no puede hablarse rigurosamente de biosensores, puesto que no se produce un reconocimiento molecular específico previo a la transducción amperométrica. Este diseño tiene el grave inconveniente del elevado potencial que se requiere para llevar a cabo las medidas, lo que da lugar a un aumento de las interferencias por parte de las especies electroactivas.

En algunos trabajos (Saby et al., 1997; Saby y Luong, 1998), se realiza una oxidación química previa de los fenoles utilizando sulfato de cerio o bis(trifluoroacetoxi)iodobenceno como agentes oxidantes, o cloroperoxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno. En otros trabajos, la glucosa deshidrogenasa se inmoviliza conjuntamente con tirosinasa (Streffer et al., 1998; Bier et al., 1996) o con lacasa (Ghindilis et al., 1995), de modo que los compuestos fenólicos reaccionan en primera instancia con la tirosinasa o la lacasa y las quinonas formadas reaccionan con la glucosa deshidrogenasa reducida por la glucosa. Estas reacciones son monitorizadas mediante el consumo de oxígeno empleando un electrodo de Clark (Figura 16).

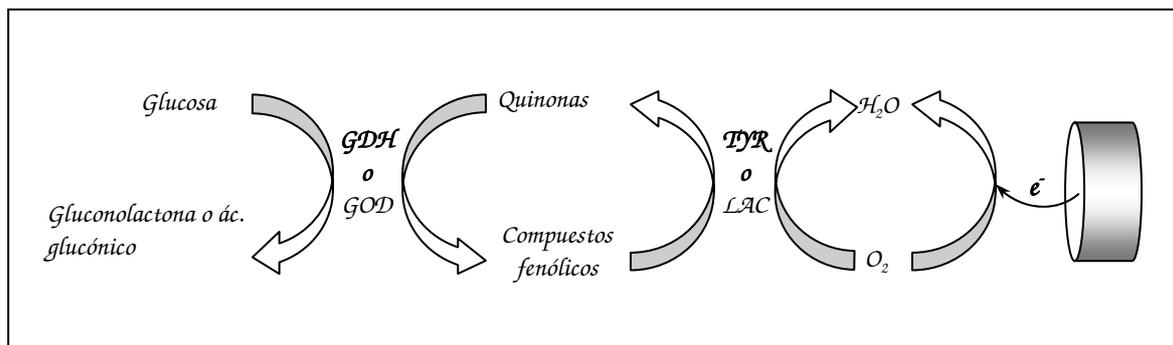


Figura 16. Esquema de reacciones producidas en la detección de fenoles empleando un electrodo de oxígeno y lacasa o tirosinasa y glucosa deshidrogenasa. Las reacciones enzimáticas producen una disminución de oxígeno, por lo que la corriente de reducción de oxígeno monitorizada por el electrodo disminuye.

También se han inmovilizado conjuntamente en un mismo biosensor lacasa y tirosinasa (Naropolov et al., 1995; Marko-Varga et al., 1995) y tirosinasa y peroxidasa (Cosnier y Popescu, 1996), monitorizándose en estos casos la respuesta conjunta de ambos sistemas enzimáticos con los compuestos fenólicos, ya que estos sistemas funcionan independientemente y sus reacciones se producen simultáneamente.

El medio de aplicación de estos biosensores suele ser acuoso, aunque también se han utilizado medios orgánicos, como cloroformo, donde se disuelve una sal de tetrabutilamonio para conseguir la conductividad necesaria para poder realizar las medidas amperométricas (Cosnier et al., 1998; Deng y Dong, 1995; Guo y Dong, 1997; Deng y Dong, 1996; Wang et al., 1992; Deng y Dong, 1997). El medio acuoso empleado en la mayoría de los casos consiste en regulador fosfato, a un valor de pH que oscila entre 5.0 y 7.4, excepto para un electrodo con GOD (Saby et al., 1997), que emplea una sal de tartrato a pH 3.5. En algunos de los casos (Narváez et al., 1996; Rogers et al., 1999; Ducey y Meyerhoff, 1998; Odeyoju et al., 1996; Ruzgas et al., 1995), el medio acuoso está modificado por un porcentaje de metanol o acetonitrilo en un 5, 25, ó 50% en volumen, para poder utilizar el biosensor como detector en un sistema de HPLC (Rogers et al., 1999; Odeyoju et al., 1996).

En el caso de los biosensores que emplean peroxidasa, glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa, es necesario añadir peróxido de hidrógeno o glucosa al medio de medida, ya que son reactivos imprescindibles para que tenga lugar la detección de los compuestos fenólicos. Debido a la inestabilidad de las disoluciones de peróxido de hidrógeno, en algunos sensores de peroxidasa se utiliza glucosa en el medio, el cual se hace pasar a través de un reactor que contiene glucosa oxidasa para generar in situ el peróxido necesario (Munteanu et al., 1998; Lindgren et al., 1997).

En los biosensores que emplean un electrodo de oxígeno para la monitorización de los compuestos fenólicos suele añadirse ácido L-ascórbico al medio de medida, ya que este ácido es capaz de reducir químicamente las quinonas formadas, regenerando así el sustrato fenólico y provocando una amplificación de la señal.

Por lo que se refiere al material electródico utilizado para la transducción amperométrica, puede observarse en la Tabla 7 como se han empleado numerosas configuraciones diferentes. Los electrodos más utilizados son los de pasta de carbono y, en segundo lugar, los de carbono vitrificado. El grafito pirolítico también se ha empleado ampliamente (Narváez et al., 1996; Connor et al., 1989; Nistor et al., 1999; Ortega et al., 1994; Parellada et al., 1998; Deng y Dong, 1996; Wang et al., 1992; Deng y Dong, 1997; Munteanu et al., 1998; Lindgren et al., 1997; Gegeshidze et al., 1999; Ruzgas et al., 1995; Yaropolov et al., 1995), así como otros electrodos compósitos basados en grafito, además de los de pasta de carbono, como son los de grafito-resina epoxi (Onnerfjord et al., 1995; Wang et al., 1994; Lutz y Domínguez, 1996), grafito-Teflón (Puig et al., 1996), grafito-Nafión (Kaisheva et al., 1997), o los basados en la tecnología de impresión (screen printing) (Schmidt, 1998; Wang y Chen, 1995; Kotte et al., 1995). Asimismo, se han llevado a cabo aplicaciones utilizando carbono vítreo reticulado (Peña et al., 2001a; Xie et al., 1997).

Aunque los electrodos de carbono son los más frecuentes, por las ventajas mencionadas en el apartado II.2.3, también se encuentran en la bibliografía trabajos con electrodos de oro y de platino, con distintas configuraciones, como microelectrodos (Kranz et al., 1998) o arrays de microelectrodos (Zhang et al., 2001).

La inmovilización de la enzima o las enzimas en los electrodos de carbono vitrificado suele llevarse a cabo por encapsulamiento con una membrana de tipo sol-gel (Liu et al., 2000), de polietilenimida (He et al., 1999), o de diálisis (Saby et al., 1997), por atrapamiento en matriz polimérica depositada en la superficie del electrodo (membrana de polivinilalcohol y polivinilpiridina (Zhang et al., 1999), de poli(1-vilimidazol) (Adeyoju et al., 1996), de polímero Eastman AQ (Iwuoha et al., 1995)), o por atrapamiento en una membrana polimerizada in situ aplicando un potencial a dicho electrodo a partir de pirrol anfifílico (Besomes et al., 1997; Cosnier et al., 1999; Besomes et al., 1995; Cosnier y Popescu, 1996; Cosnier et al., 1998), por atrapamiento empleando un hidrogel (Deng et al., 1996; Daigle y Leech, 1997; Deng y Dong, 1995; Guo y Dong, 1997), o por unión covalente con carbodiimida (Narváez et al., 1996; Everett y Rechnitz, 1998).

En determinados casos, se emplean conjuntamente dos métodos de inmovilización, por ejemplo, unión covalente con glutaraldehído en la superficie del electrodo y posterior encapsulamiento con una membrana de diálisis (Saby y Luong, 1998), o unión covalente a un hidrogel que posteriormente es depositado sobre la superficie del electrodo (Daigle y Leech, 1997).

En los biosensores de pasta de carbono y en los basados en electrodos compósitos, el método de inmovilización empleado en general es el de atrapamiento en la matriz, si bien en algunos trabajos la inmovilización se realiza en la superficie del electrodo con una capa fina de sol-gel (Li et al., 1998). En otras ocasiones, la enzima se atrapa en la matriz compósita después de haberse mezclado con otras partículas (ej. Zeolitas) (Marko Varga et al., 1996), o después de haber quedado atrapada en gel de sílice con óxido de titanio (Rosatto et al., 1999).

En los electrodos de grafito sólido las inmobilizaciones se llevan a cabo empleando métodos similares a los que se utilizan con el carbono vitrificado (unión covalente a la superficie (Narváez et al., 1996; Parellada et al., 1998), encapsulamiento con película Eastman AQ o de Nafion (Nistor et al., 1999), o atrapamiento en una capa de hidrogel (Deng y Dong, 1996; Deng y Dong, 1997)). Sin embargo, con los electrodos de grafito sólido son más frecuentes las inmobilizaciones enzimáticas por adsorción (Wang et al., 1992; Lindgren et al., 1997; Ruzgas et al., 1995; Yáropolov et al., 1995), ya que éstas se ven favorecidas sobre la superficie de estos electrodos debido a su morfología rugosa.

La inmobilización de las enzimas en los electrodos de oxígeno suele realizarse colocando la enzima sobre la superficie de la membrana permeable al gas del electrodo de oxígeno y atrapándola con una membrana de diálisis (Uchiyama et al., 1993; Campanella et al., 1994) u otro tipo de membranas (Ghindilis et al., 1995; Streffer et al., 1998), o bien inmobilizando previamente la enzima en un gel que posteriormente se deposita en la membrana del electrodo (Hasebe et al., 1995).

La inmobilización sobre electrodos metálicos como platino u oro suele llevarse a cabo mediante la unión covalente a grupos que contienen azufre y que se adsorben fuertemente en la superficie electródica (Ducey y Meyerhoff, 1998).

La mayoría de los biosensores desarrollados están basados en la transducción directa de la reacción enzimática, ya que se monitoriza directamente la oxidación o reducción electródica de uno de los reactivos o productos. Sin embargo, algunos métodos utilizan una sustancia mediadora, cuya oxidación o reducción sobre el electrodo sirve para monitorizar la concentración de los fenoles en disolución. La finalidad de este mediador es la de acelerar la transferencia de electrones, lo que permite, en general, obtener respuestas más rápidas y mejores límites de detección. En ciertos casos, el empleo de un mediador puede servir para aplicar un potencial de medida más adecuado, aunque en el caso de los fenoles, la monitorización directa permite el empleo de potenciales óptimos, como ya se ha comentado.

Los mediadores empleados para electrodos de tirosinasa han sido, entre otros, polímeros de osmio, azure, 1,2-naftoquinona-4-sulfonato, ferrocianuro, ferroceno, ftalocianina de cobalto (II), ftalocianina de cobre (II), metilfenazonio, partículas de rutenio, de oro y de paladio, y polímero de osmio para un electrodo de peroxidasa.

Aunque según algunos autores (Parellada et al., 1998) el empleo de mediador mejora las características analíticas del biosensor, a la hora de la aplicación a muestras reales estos autores han optado por el empleo del biosensor sin mediador, puesto que la presencia de éste disminuye en gran medida la selectividad del sistema y aumenta la corriente de fondo. Por otro lado, Li et al. (1998) compararon las características analíticas de sensores de pasta de carbono y tirosinasa con distintos mediadores y sin mediador, llegando a la conclusión de que el biosensor sin mediador proporcionaba mejores resultados.

Las características analíticas de los biosensores descritos en la bibliografía son comparables en términos de límites de detección, comprendidos entre 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol L^{-1} para fenol y catecol, y algo más elevados para otros sustratos, aunque en

la mayoría de los métodos desarrollados sólo se estudia su respuesta frente a dos o tres compuestos fenólicos, y otros sólo presentan respuesta a un número reducido de fenoles.

Hay algunos biosensores que presentan límites de detección especialmente buenos, como ocurre en el caso del electrodo de carbono vitrificado con tirosinasa inmovilizada en un sol-gel de óxido de aluminio (Liu et al., 2000), para el que se ha reportado un límite de detección para fenol de 2×10^{-10} mol L^{-1} , si bien no se ha estudiado su respuesta con otros sustratos fenólicos. Un límite de detección similar para el fenol presenta un electrodo de tirosinasa construido según la tecnología "screen printing" y con el mediador metilfenazonio (Kotte et al., 1995), si bien, este biosensor tampoco se ha utilizado con otros fenoles y no presenta una buena estabilidad con el tiempo. Se ha reportado un límite de detección de 1×10^{-10} mol L^{-1} para p-aminofenol con un electrodo de Clark bienzimático de lacasa y glucosa deshidrogenasa (Ghindilis et al., 1995), con un tiempo de vida de 4 días.

En general, y aunque la estabilidad de los biosensores es un aspecto que no ha sido estudiado en profundidad, el tiempo de vida útil es bastante reducido. Los dispositivos que más vida operacional poseen suelen durar entre 14 y 20 días (Ducey Meyerhoff, 1998; Wang et al., 1994). Los tiempos de almacenamiento tampoco son demasiado largos, excepto para el electrodo de tirosinasa inmovilizada sobre carbono vitrificado con un polímero de polipirrol anfifílico (Cosnier et al., 1999), que puede ser almacenado durante 1 año sin pérdida de actividad.

A pesar del gran número de sensores enzimáticos amperométricos existentes para compuestos fenólicos, sólo una mínima parte de ellos ha sido utilizada en aplicaciones con muestras reales. La mayoría de estas muestras son medioambientales, como efluentes acuosos, aguas de río y de bebida, y aguas industriales y de desecho. También se han aplicado al análisis de suelos. Otras muestras analizadas han sido filtros de cigarrillos, aceite de oliva y cervezas.

Kaisheva et al. han desarrollado un sensor para el análisis de fenoles en muestras gaseosas (Kaisheva et al., 1997), que, aunque no ha sido aplicado a muestras reales, resulta interesante, ya que es el único sensor enzimático amperométrico desarrollado para la detección de fenoles en gases. El sensor posee una capa húmeda de enzima soportada por una membrana permeable al gas.

También merece la pena destacar el sensor desarrollado por Wang y Cheng (1995) para el análisis remoto de fenoles, consistente en una célula amperométrica conectada a un detector a través de un cable de 50 pies de longitud.

La escasa aplicación de los sensores amperométricos desarrollados parece deberse a la dificultad de llevar a cabo medidas en matrices complejas, en las cuales los límites de detección de los métodos pueden aumentar considerablemente, se producen numerosas interferencias, la estabilidad de las enzimas disminuye y la pasivación electrodo es mucho más acusada. Hasta el momento, tan sólo se han desarrollado prototipos de laboratorio para la monitorización de fenoles, siendo aún necesario superar numerosas dificultades para poder fabricar sensores cuya aplicación a medidas de campo sea fiable.

Abreviaturas Tabla 7:

TYR: tirosinasa

POD: peroxidasa

HRP: peroxidasa de rábano

LAC: lacasa

GDH: glucosa deshidrogenasa

GOD: glucosa oxidasa

TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: enzima atrapada en un copolímero de poli(vinil alcohol) y 4-vinilpiridina depositado en la superficie del electrodo	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M, pH 7.0	---	Hasta 1.44×10^{-4} M catecol Hasta 1.04×10^{-4} M fenol Hasta 6.4×10^{-5} M p-cresol	1.2×10^{-7} M catecol 7.7×10^{-8} M fenol 2.4×10^{-8} M p-cresol	50% respuesta inicial después de 3 semanas	<20s	Zhang et al., 1999a
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: atrapamiento en película de polipirrol anfifílico modificado con nanopartículas de laponita	---	-0.17 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.5	---		$159 \text{ mA cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$ fenol $893 \text{ mA cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$ catecol	74% respuesta inicial después de 4 días 50% respuesta inicial después de 20 días	30s	Besomes et al., 1997
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: con membrana sol-gel de Al_2O_3 cargada positivamente	---			---		2×10^{-10} M fenol	70% respuesta inicial después de 3 meses	4s (95%)	Liu et al., 2000
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: atrapamiento en polímero de pirrol anfifílico polimerizado sobre el electrodo	---			Efluente acuoso	Hasta 1×10^{-5} M fenol	1×10^{-8} M fenol	Almacenado durante 1 año sin pérdida de actividad		Cosnier et al., 1999
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: enzima atrapada en hidrogel de polivinilalcohol y polihidroxiceulosa	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.9	---	1×10^{-7} - 1×10^{-4} M catecol	2×10^{-8} M catecol	100% de respuesta inicial tras 3 meses de almacenamiento		Deng et al., 1996
TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: en capa electropolimerizada sobre la superficie del electrodo a partir de monómero anfifílico de pirrol	---	-0.2 vs. SCE	Acuoso (pH 6.5)	---		4×10^{-7} M 3,4-diclorofenol INHIBIDORES: 2×10^{-6} M cloroisopropilfenil-carbamato 2×10^{-6} M 3-cloroanilina 4×10^{-6} M atrazina 2×10^{-8} M cianuro	> 1 semana		Besomes et al., 1995
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: enzima en	---	0.0 vs. Ag/AgCl		---		59.6 mA M^{-1} catecol 23.1 mA M^{-1} fenol			Wang et al., 2000

	<i>sol-gel</i>						39.4 mA M^{-1} <i>p-cresol</i>			
Grafito sólido	TYR Inmovilización: enlace covalente con carbohidratos	---	-0.1 <i>vs. Ag/AgCl</i>	Regulador fosfato 0.25 M, pH 6.0, 5% MeOH	---		$2.63 \text{ A cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$ fenol $4.77 \text{ A cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$ catecol (FIA)			Narváez et al., 1996
Grafito sólido	TYR Inmovilización: enzima mezclada con grasa de silicona y unida sobre la superficie del electrodo	---	-0.2 <i>vs. Ag/AgCl</i>	Regulador fosfato 0.05 M, pH 7.4	---		$6 \times 10^6 \text{ M}$ dopamina	12 días	5 s (95%)	Connor et al., 1989
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.05 <i>vs. Ag/AgCl</i>	Regulador fosfato 0.05 M, pH 7.4	---	Hasta $5 \times 10^5 \text{ M}$ catecol (FIA)	$6 \times 10^9 \text{ M}$ catecol (FIA)		2 min	Wang et al., 1997
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: atrapada en partículas de HY-zeolitas que se mezclan con pasta	---	-0.05 <i>vs. Ag/AgCl</i>	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.0	---					Marko-Varga et al., 1996
Pasta de carbono o Grafito sólido	TYR Inmovilización: atrapada en matriz o por película de Nafion o Estman AQ o adsorbida en superficie	---	-0.05 <i>vs. Ag/AgCl</i>	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.5	Aguas de desecho	$3 \times 10^8 - 1 \times 10^4 \text{ M}$ catecol	$1.5 \times 10^8 \text{ M}$ catecol	> 70 días de almacenamiento		Nistor et al., 1999

TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.2 <i>vs. SCE</i>	Regulador fosfato 0.1 M, pH 7.0	---	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^3 \text{ M}$ dopamina (FIA)	$5 \times 10^8 \text{ M}$ dopamina	100% de actividad inicial tras 12 h; 90% actividad inicial tras 24 h		Petit et al., 1995
Pasta de carbono con poliestilénimina como estabilizador	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	Crono-amperometría: salto de potencial a 0.0 V <i>vs. Ag/AgCl</i>	Regulador fosfato 0.05 M (pH 5.5)	---		$2 \times 10^7 \text{ M}$ cresol $3 \times 10^7 \text{ M}$ fenol	80% respuesta inicial después de 2 semanas	60s	Wang y Cheng, 1995
Pasta de carbono	TYR (tejido de pera, melocotón, champiñón, patata) Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	0.0 <i>vs. SCE</i>	Regulador McIlvaine (Na ₂ HPO ₄ y ác. nítrico), pH 6.75	---		$2.3 \times 10^6 \text{ M}$ dopamina	80 días (con tejido de champiñón) Menos duradero con los demás tejidos		Forzani et al., 1997
Pasta de carbono	TYR (tejido de plátano, patata y manzana) Inmovilización:	---	PPV	Regulador fosfato 0.05 M, pH 7.4	Cervezas	Hasta $1 \times 10^5 \text{ M}$ catecol	$2 \times 10^6 \text{ M}$ catecol	95% respuesta inicial tras 68 días de almacenamiento	40 s	Eggins et al., 1997

atrapamiento en matriz									miento		
Pasta de carbono	TYR (tejido de plátano) Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.05 M, pH 7.4	---	Hasta 9×10^{-5} M dopamina	1.3×10^{-6} M (FLA) dopamina		80% respuesta inicial tras 12 h de medida 80% respuesta inicial tras 30 días de almacena- miento	12 s (95%)	Wang y Lin, 1988
TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref	
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	0.0 vs. Ag/AgCl		---		3.5×10^{-8} M fenol			Ito et al., 2000	
Pasta de carbono	TYR (tejido) Inmovilización: atrapamiento en matriz	---			---	Hasta 2×10^{-4} M alternariol Hasta 1.8×10^{-4} M alternariol tionometiléter	1.9×10^{-5} M alternariol 2.4×10^{-5} M alternariol tionometiléter			Moressi et al., 1999	
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: atrapamiento en una matriz sol-gel	---	0.0 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato	---	$2-4 \times 10^{-7}$ – 2.6×10^{-5} M		50% respuesta inicial tras 2 semanas de almacena-miento en fosfato 4°C		Li et al., 1998	
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.05 vs. SCE	Regulador fosfato, pH 6.0	---	Hasta 2.5×10^{-6} M fenol	2×10^{-7} M fenol			Svitel y Miertus, 1998	
Pasta de carbono (como detector de HPLC)	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.2	Regulador fosfato 0.01 M, pH 7.4/acetoniitrilo (75/25)	suelos			72% respuesta inicial después de 24 h trabajando		Rogers et al., 1999	
Pasta de carbono o grafito sólido (detectores en cromatografía de líquidos)	TYR	---	-0.05							Ortega et al., 1994	

TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Pasta de carbono (como detector de HPLC)	TyR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---					0.037 mg L ⁻¹ fenol 0.032 mg L ⁻¹ catecol			Szczynska y Trojanowicz, 2000
Pasta de carbono	TyR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.1 vs.	Regulador fosfato 0.05 M	---	Para inhibidores de la tirosinasa: hidrazina				Wang y Cheng, 1995
Grafito-resina epoxi	TyR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.1 vs. Ag/AgCl		---	Hasta 2x10 ⁻⁴ M catecol Hasta 3x10 ⁻⁴ M fenol	4x10 ⁻⁸ M catecol 1x10 ⁻⁶ M fenol			Onnerfjord et al., 1995
Grafito-resina epoxi	TyR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.05 M, pH 6.7	---	Hasta 3.6x10 ⁻⁵ M fenol	1x10 ⁻⁶ M fenol	10-20 días	25 s (FLA)	Wang et al., 1994
Grafito-Teflón	TyR Inmovilización: atrapamiento en matriz	---	-0.05 vs. SCE	Regulador fosfato 0.1 M, pH 7.0	---	2x10 ⁻⁷ - 2.5x10 ⁻⁵ M catecol	0.47 A M ⁻¹ catecol		20-30 s	Puig et al., 1996
Compósito de grafito + Nafión 117 (sensor para gases)	TyR Inmovilización: enzima y Nafión con una capa de portador soportados con una membrana	---	0.0 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M + 0.1 M KCl + 1x10 ⁻³ M NAD ⁺	---	1x10 ⁻⁶ - 1x10 ⁻³ M p-cresol 1x10 ⁻⁵ - 1x10 ⁻² M 4-clorofenol 5x10 ⁻⁷ - 1x10 ⁻⁴ M fenol		20 días		Kaisheva et al., 1997
Carbono vítreo reticulado	TyR Inmovilización: covalente con carbodiimida	---	-0.15 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.05 M, pH 6.5	---					Peña et al., 2001
TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Carbono vítreo reticulado Sensor híbrido: ampero-métrico y termométrico	TyR Inmovilización: sobre la superficie de carbono se deposita una capa de polipirrol, y en ella la enzima es adsorbida	---	-0.05 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.05 M, pH 6.5 + 0.1 M KCl	---	1.25x10 ⁻⁵ - 2.5x10 ⁻⁴ M catecol				Xie et al, 1997

Oro microporoso	TYR Inmovilización: covalente en una capa de ácido tióctico y poli-lisina	---	-0.05 vs Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.25 M, pH 6.0 con 5% (v/v) de acetonitrilo	---		5×10^{-7} M catecol 3.4×10^{-6} M fenol (FIA)	14 días de uso	70 s	Ducey y Meyerhoff, 1998
Platino	TYR Inmovilización: enzima atrapada en una multimembrana selectiva sobre la superficie del electrodo	---				FIA				Trojanowicz et al., 1999
Disco de platino (50 μ m)	TYR Inmovilización: sobre una capa de poli-omega-carboxialquilpirrol se inmoviliza covalentemente tionina y sobre ella se sitúa una capa de pirrol con enzima atrapada	---								Kranz et al., 1998
Grafito (screen-printed) + Ag (electrodo de referencia) Fabricados en grupos de 30	TYR Inmovilización: enzima atrapada sobre el grafito con una película Eastman AQ	---	Crono-amperometría y amperometría		Aguas	Hasta 1-2 mg L ⁻¹ catecol	<= 3.5 μ g L ⁻¹			Schmidt, 1998

TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Carbono (screen-printed)	TYR Inmovilización: la enzima mezclada con el carbon es impresa sobre el soporte de cerámica	---	Crono-amperometría y amperometría		Agua de suelo y de bebida		1×10^{-7} M			Wang y Cheng, 1995
Carbono vitrificado (como detector de HPLC)	TYR Inmovilización: enzima atrapada sobre la superficie con un polímero de osmio basado en poli(1-vinilimidazol)	osmio	-0.2 vs. SCE	Regulador fosfato 0.025 M, pH 6.5/MeOH (1+1 v/v)	Filtros de cigarrillo		4.2×10^{-8} M 4-aminofenol 5.8×10^{-8} M fenol 4×10^{-9} M 4-metilfenol 1.3×10^{-8} M 4-clorofenol	78% respuesta inicial después de 10 h		Adeyoju et al., 1996
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: encapsulamiento con polietilenimida	Azure + polímero de diacian-diamida-formaldehído	-0.1 vs. SCE		Agua residual	2×10^{-8} - 9.6×10^{-5} M fenol			50s (95%)	He et al., 1999

Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: enlace covalente sobre la superficie del electrodo	1,2-naftoquinona-4-sulfonato	Crono-amperometría: salto de potencial a -0.15 V vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.05 M, pH $7.0 + 0.1$ M NaCl	---		Inhibidores de la tirosinasa: 5×10^{-6} M diazinona 7.5×10^{-8} M diclorvos			Everett y Rechnitz, 1998
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: enzima covalentemente unida al hidrogel redox depositado en la superficie del electrodo	Osmio (hidrogel de polímero redox de osmio)			---	Aplicado a inhibidores de la tirosinasa		75% actividad inicial después de 6 h		Daigle y Leech, 1997

TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Grafito sólido	TYR Inmovilización: covalente con carbodimida y poli(vinilpiridina) derivatizada con bromoetilamina	(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) ₂ (1,10-fenantrolin-5,6-diona) osmio	-0.09 vs. SCE	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.0	Agua residual (con el biosensor sin mediador)		6×10^{-9} M fenol	8 horas		Parellada et al., 1998
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	Osfendiona	-0.05 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.0	---		1×10^{-8} M fenol y catecol	5 horas	1 min (FIA)	Hedenmo et al., 1997
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	Ru (grafito dopado con rutenio)	0.0 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.05 M, pH 7.4	---		8×10^{-7} M fenol 3×10^{-6} M 3-clorofenol 2×10^{-6} M metoxifenol 6×10^{-7} M catecol		60 s	Wang et al., 1994
Pasta de carbono	TYR Inmovilización: enzima sobre la superficie del electrodo en una capa fina de sílica sol-gel	Ferroceno Ftalocianina de cobalto (II) Ftalocianina de cobre (II)	0.0 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.02 M, pH 6.5	---	Sin mediador: $2 \times 10^{-7} - 2.6 \times 10^{-5}$ M catecol $4 \times 10^{-7} - 2.0 \times 10^{-5}$ M fenol $4 \times 10^{-7} - 1.5 \times 10^{-5}$ M p-cresol $4 \times 10^{-7} - 2.6 \times 10^{-5}$ M m-cresol		50% respuesta inicial después de 15 días de almacenamiento en fosfato a 4°C		Li et al., 1998
Grafito-resina epoxi	TYR Inmovilización: atrapamiento en matriz	Oro y paladio	-0.1 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.0	---		$27.70 \mu\text{A cm}^{-2}$ catecol $4.90 \mu\text{A cm}^{-2}$ fenol (FIA)			Lutz y Domínguez, 1996

Screen-printed	TYR Inmovilización: en película adherida al electrodo formada por un hidrogel de poliuretano	Metilfenazo-nio (zeolita modificada con el metilfenazo-nio)	-0.2 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.12 M, pH 6.8	Aguas de desecho	5×10^{-8} – 1.4×10^{-5} M fenol	2.5×10^{-10} M fenol	< 20 días Almacenado: 80 días sin pérdida de actividad	3-4 min	Kotte et al., 1995
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: con membrana sol-gel de Al ₂ O ₃ cargada positivamente	Fe(CN) ₆ ⁴⁻			---		5×10^{-8} M	1 mes		Liu et al, 2000

TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Electrodo de oxígeno tipo Clark	TYR (tejido de patata) Inmovilización: tejido colocado sobre la membrana del electrodo y cubierto con membrana de diálisis	---	-0.7 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato, pH 7.0 + 0.01 M de ác. ascórbico	---	5×10^{-8} – 2×10^{-5} M catecol	5×10^{-8} M catecol		10 min	Uchiyama et al., 1993
Electrodo de oxígeno tipo Clark	TYR Inmovilización: enzima inmovilizada en un reactor	---	-0.7 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato, pH 6.5 + 1×10^{-3} M ác. ascórbico	---	5×10^{-9} – 5×10^{-5} M catecol	5×10^{-9} M catecol	El reactor retiene el 90% de su actividad inicial después de 20 días	> 5 min	Hasebe et al., 1993
Electrodo de oxígeno tipo Clark (como detector de HPLC)	TYR (en reactor) Inmovilización: sobre vidrio de poro controlado	---	-0.7 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.01 M + 5×10^{-3} M ácido ascórbico	---		5×10^{-9} M dopamina	1 mes (vida del reactor)		Uchiyama et al., 1995
Electrodo de oxígeno tipo Clark	TYR Inmovilización: atrapamiento en un gel de poliacrilamida colocado en la superficie de la membrana permeable al gas del electrodo	---		Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.5 + ác. ascórbico	---		INHIBIDOR: 7×10^{-8} M ácido kjíjico			Hasebe et al., 1995
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: atrapamiento en película de poli (pirrolactobiona-mida) polimerizada sobre el electrodo	---	-0.25 vs. SCE	Cloroformo deshidratado + 0.1M de perclorato de tetrabutil-amonio	---	Hasta 2×10^{-5} M catecol	1×10^{-7} M catecol $87 \text{ mA cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$	72% respuesta inicial tras 1 semana de almacenamiento	25 s	Cosnier et al., 1998

TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: atrapada en un hidrogel de polihidroxilcelulosa	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Cloroformo Clorobenceno + 0.1 M de perclorato de tetrabutilamonio	---	2×10^{-6} – 6×10^{-5} M catecol 5×10^{-6} – 1×10^{-4} M fenol 5×10^{-6} – 3×10^{-3} M p-cresol (cloroformo)	1×10^{-7} M catecol 5×10^{-7} M fenol 5×10^{-7} M p-cresol (cloroformo)	Almacenado durante 3 meses sin pérdida de actividad		Deng y Dong, 1995
Carbono vitrificado	TYR Inmovilización: enzima atrapada en organohidrogel de dimetilformamida en la superficie del electrodo	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Cloroformo + 0.1 M de perclorato de tetrabutilamonio	---		23.1 mA M ⁻¹ p-cresol			Guo y Dong, 1997
Carbono vitrificado o platino	TYR Inmovilización: con polímero Eastman AQ	---	v/s. SCE	Disolvente orgánico (acetonitrilo, propanol o THF)/H ₂ O con 0.1 M de sulfonato de tetrabutilamonio-p-tolueno	---	Hasta 1.1×10^{-4} M fenol (THF) Hasta 5.5×10^{-5} M fenol (propanol) Hasta 4×10^{-6} M fenol (acetonitrilo)				Iwuoha et al, 1995
Grafito sólido	TYR Inmovilización: en capa de hidrogel sobre la superficie del electrodo	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Cloroformo Clorobenceno 1,2-diclorobenceno+ 0.1M perclorato de tributilamonio	---	1×10^{-6} – 1.6×10^{-5} M ác. Benzoico 1×10^{-6} – 3.5×10^{-5} M tiourea 5×10^{-7} – 7×10^{-5} M 2-mercaptoetanol	5×10^{-8} M ác. Benzoico 5×10^{-7} M tiourea 1×10^{-7} M 2-mercaptoetanol	45 días		Deng y Dong, 1996
Grafito sólido	TYR Inmovilización: adsorción sobre el grafito	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Cloroformo + 0.1 M de bromuro de tetrabutilamonio saturado de regulador fosfato 0.05 M, pH 7.4	Aceite de oliva	Hasta 6×10^{-4} M fenol (FIA)	4×10^{-7} M fenol (FIA)		1 min	Wang et al., 1992
TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref

Grafito sólido	TYR Inmovilización: con capa de hidrogel sobre la superficie del electrodo	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Cloroformo Clorobenceno 1,2-diclorobenceno + 0.1 M perclorato de tetrabutilamonio	---	2×10^{-7} - 4×10^{-6} M catecol 2×10^{-6} - 1.4×10^{-4} M t-butilcatecol (cloroformo)				Deng y Dong, 1997
Array de micro-electrodos de platino	TYR Inmovilización: Enzima inmovilizada en una capa fina de dispersión coloidal atrapada sobre el electrodo con una membrana de diálisis	---	-0.1 vs. Ag/AgCl	Cloroformo Heptano Hexano Clorobenceno Tolueno Acuoso	---	Hasta 1×10^{-5} M fenol (discontinuo)	2.5×10^{-9} M fenol (discontinuo) acuoso 1.0×10^{-8} M fenol (FIA) acuoso 1×10^{-6} M fenol cloroformo 5×10^{-8} M fenol clorobenceno	7 días (FIA) acuoso 3 días (discont.) acuoso 5 h cloro-formo	< 10 min	Zhang et al., 2001
Carbono screen-printed	TYR	---		Hexano	---		$4 \mu\text{g L}^{-1}$ fenol (FIA)			Capannesi et al., 2000
Electrodo de oxígeno tipo Clark	TYR Inmovilización: atrapamiento con membrana de diálisis	---		n-hexano cloroformo	---	1.1×10^{-6} - 5.59×10^{-5} M fenol	3×10^{-7} M fenol			Campanella et al., 1994
Grafito sólido Situado en un sistema de flujo tras un reactor con GOD	POD (tejido de tabaco) Inmovilización: adsorción en la superficie del electrodo)	---	-0.05 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M, pH 7.0 + 1×10^{-4} M de glucosa	---		1×10^{-8} M p-aminofenol (FIA)			Munteanu et al., 1998
Grafito sólido Situado en un sistema de flujo tras un reactor con GOD	HRP Inmovilización: adsorción o unión covalente	---	-0.05 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M, pH 7.0 + 9×10^{-5} M de glucosa	---		4×10^{-7} M p-cresol (FIA)			Lindgren et al., 1997
Carbon black	HRP	---			---	5×10^{-7} - 5×10^{-6} M fenol	5×10^{-7} M fenol	Desechable		Gegeshidze et al., 1999
TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Grafito sólido y pasta de carbono	HRP Inmovilización: adsorbida sobre el grafito o atrapada en la matriz de pasta de carbono	---	-0.05 vs. SCE	Regulador fosfato 0.1 M, pH 7.0 con 5% MeOH + 1×10^{-5} M H_2O_2	Agua de río		5×10^{-7} M 2-amino-4-clorofenol 2×10^{-6} M 4-cloro-3-metilfenol 4×10^{-6} M p-cresol (FIA) (electrodo de grafito sólido)			Ruzgas et al., 1995

Pasta de carbono	<i>HRP</i> Inmovilización: enzima atrapada en gel de sílice modificado con óxido de titanio, y el gel atrapado en matriz	---	0.0 vs. SCE	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.8) + 2×10^{-5} M H_2O_2	---	$1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5}$ M fenol			3s (95%)	Rosatto et al., 1999
Carbono vitrificado	<i>HRP</i> Inmovilización: enzima en sol-gel sobre la superficie del electrodo	Polímero redox de osmio	0.0 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.01 M, pH 7.4	---		1.5×10^{-7} M m-aminofenol 6.5×10^{-7} M p-aminofenol 1.48×10^{-6} M 2-clorofenol 1.29×10^{-6} M 4-clorofenol 9.3×10^{-7} M p-cresol	50% respuesta inicial tras 3 días de almacenamiento a temperatura ambiente; 6 días almacenado a 4°C		Kane et al., 1998
Carbono vitrificado	<i>TYR</i> + <i>HRP</i> Inmovilización: enzimas atrapadas en una película de polipirrol sobre la superficie del electrodo	---	-0.2 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.5 + 5×10^{-4} M de H_2O_2	---	$2.4 \times 10^{-7} - 1.25 \times 10^{-4}$ M fenol	$22.8 \text{ mA cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$ fenol	4 semanas almacenado en seco a -18°C		Cosnier y Popescu, 1996
Grafito sólido	<i>TYR</i> + <i>LAC</i> Inmovilización: adsorción sobre el grafito	---	-0.05 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato 0.1 M + citrato, pH 5.0	---		2×10^{-6} M catecol (FIA)		60 s	Yaropolov et al., 1995

TIPO DE ELECTRODO	ENZIMA	MEDIADOR	E, V	MEDIO	TIPO DE MUESTRA	INTERVALO LINEAL	LÍMITE DE DETECCIÓN/ SENSIBILIDAD	TIEMPO DE VIDA	TIEMPO DE RESPUESTA	Ref
Electrodo de oxígeno tipo Clark	<i>LAC</i> + <i>GDH</i> Inmovilización: enzimas en membranas de polivinilalcohol	---		Regulador fosfato 0.1 M, pH 6.0 + 2.5×10^{-2} M de glucosa	---		1×10^{-10} M p-aminofenol	4 días	5 min	Ghindilis et al., 1995
Pasta de carbono	<i>GDH</i> Inmovilización: atrapamiento en matriz	Compuestos fenólicos	+0.5 vs. Ag/AgCl	Regulador fosfato Sørensen con 1×10^{-3} M de $CaCl_2$ y 0.015 M de glucosa	---	$5 \times 10^{-10} - 2 \times 10^{-7}$ M p-aminofenol	2×10^{-10} M p-aminofenol	50% respuesta inicial después de 10 días	90 s	Wollenberger y Neumann., 1997

Electrodo de oxígeno tipo Clark	<i>TR</i> + <i>GDH</i> Inmovilización: enzimas inmovilizadas en una película de polivinilalcohol	---	-0.6 vs. <i>Ag/AgCl</i>	Regulador fosfato 0.05 M, pH 6.5 + glucosa	---	Inhibidores de la tirosinasa: ácido benzoico y derivados de tiourea			3-5 min	Streffer et al., 1998
Carbono vitrificado	<i>TR</i> + <i>GDH</i>									Bier et al., 1996
Carbono vitrificado Oxidación homogénea previa con el bis(trifluoroacetoxi)iodo benceno	<i>GOD</i> Inmovilización: enzima atrapada sobre el electrodo con una membrana de diálisis	Las quinonas formadas a partir de la reacción de los clorofenoles	+0.45 vs. <i>Ag/AgCl</i>	Regulador tartrato 0.1 M, pH 3.5 + 0.04 M de glucosa	---	Hasta 2×10^{-8} M para todos los clorofenoles	4×10^{-9} M 2,3,5,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol		5 min	Saby et al., 1997
Carbono vitrificado Oxidación homogénea previa de clorofenoles con sulfato de cerio o con cloroperoxidasa	<i>GOD</i> Inmovilización: enlace covalente con glutaraldehído y encapsulación con membrana de diálisis	clorofenoles	+0.45 vs. <i>Ag/AgCl</i>	Regulador fosfato 0.1 M, pH 5.0 + 0.04 M de glucosa	---		0.037 M ^l 2,4,5-triclorofenol 0.22 M ^l 2,4,6-triclorofenol 0.255 M ^l 2,3,4,6-tetraclorofenol		100 (95%)	Saby y Luong, 1998

III. Parte experimental

III.1. Instrumentación

III.2. Reactivos

III.3. Procedimiento experimental

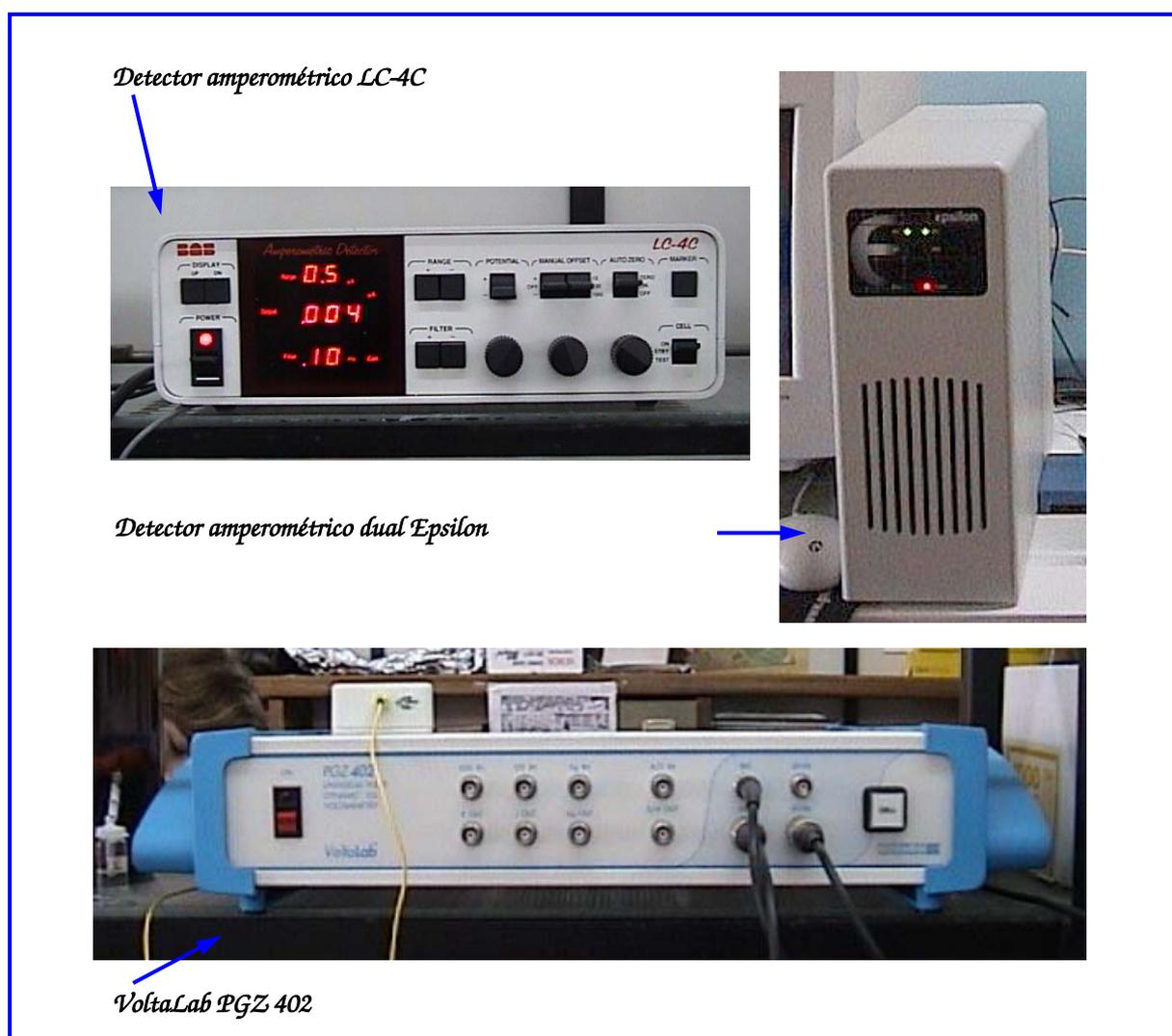
III.1. INSTRUMENTACIÓN

III.1.1. Aparatos

Todas las medidas amperométricas han sido realizadas con un detector amperométrico BAS LC-4C conectado a un registrador Linseis L6512, excepto las medidas con dos electrodos de trabajo dispuestos en paralelo, que se han llevado a cabo con un detector amperométrico dual Epsilon de BAS conectado a un ordenador equipado con el programa ChromGraph 2.0.01.

Las voltamperometrías cíclicas se han realizado con un sistema electroquímico Voltalab PGZ 402 de Radiometer Analytical S.A. conectado a un ordenador equipado con el programa VoltaMaster 2.0.

Figura 17. Equipos empleados para realizar las medidas electroquímicas.



El análisis por inyección en flujo se ha llevado a cabo utilizando un sistema constituido por una bomba peristáltica Gilson Minipuls 3 y una válvula Rheodine 5020 con volúmenes de inyección variables.

Otros aparatos utilizados han sido: agitador magnético Metrohm 728 Stirrer, pH-metro de precisión Metrohm E-510 calibrado de la forma usual con disoluciones reguladora de pH 4.00 y 7.00 a 25 ± 0.5 °C, baño de ultrasonidos P>Selecta Ultrasons, multímetro digital Micronta y prensa de infrarrojos de Carver. Los experimentos para calcular el área activa y para estudiar la influencia de la velocidad de rotación del electrodo sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario se han realizado con un electrodo rotatorio Metrohm 628-10.

III.1.2. Electrodo y células de trabajo

Los electrodos que se han utilizado son:

• Electrodos indicadores:

- Electrodos compósitos de grafito-Teflón, grafito-EPD y RVC-resina epoxi, preparados según se describe en el apartado III.3.2.
- Electrodos de grafito-Teflón (70%)-tirosinasa, grafito-EPD (1,2,5 y 7%)-tirosinasa y RVC-epoxi-tirosinasa preparados según se describe en el apartado III.3.2.
- Electrodos de grafito-Teflón (70%)-peroxidasa preparados según se describe en el apartado III.3.2.7.
- Electrodos de grafito-Teflón (70%)-glucosa oxidasa-peroxidasa preparados según se describe en el apartado III.3.2.8.
- Electrodos de grafito-Teflón (70%)-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa preparados según se describe en el apartado III.3.2.10.
- Electrodos de grafito-Teflón (70%)-tirosinasa-peroxidasa preparados según se describe en el apartado III.3.2.9.

• Electrodo de referencia:

Electrodo de Ag/AgCl/KCl (3M) BAS MF 2063.

• Electrodo auxiliar o contraelectrodo:

Electrodo de punta de platino.

Células electroquímicas:

- Célula electroquímica BAS modelo CV-2 para llevar a cabo las medidas en discontinuo.
- Célula electroquímica de tipo "wall-jet" de gran volumen para un solo electrodo indicador, diseñada y construida en nuestro Grupo de Investigación, para la realización de las medidas en flujo.

- Célula electroquímica de tipo "wall-jet" de gran volumen para dos electrodos indicadores, diseñada y construida en nuestro Grupo de Investigación, para la realización de las medidas en flujo (Figura 18).



Figura 18. Esquema de la célula de flujo tipo "wall-jet" para dos electrodos indicadores investigados.

de flujo tipo "wall-jet" para diseñada en el Grupo de

III.2. REACTIVOS

Para la preparación de los electrodos enzimáticos se ha utilizado:

- Tirosinasa EC 1.14.18.1 (procedente de champiñón) de actividad 3000 unidades por mg de sólido (Sigma) ó 6750 unidades mg^{-1} .
- Peroxidasa EC 1.11.1.7 (Type II de rábano) de actividad 240 unidades por mg sólido (Sigma).
- Glucosa oxidasa de actividad 210 unidades por mg sólido (Sigma).
- Grafito de pureza ultra "F" como material conductor (Carbone of America).
- Teflón (poly(tetrafluoroethylene)) (Aldrich).
- EPD (poli(etilen/propilen/5-metilen/2-norborneno) (Aldrich).
- Carbono Vítreo reticulado (RVC) 2x1-100 ppi (Energy Research & Generation Inc.).
- Resina epoxi [bisfenol-A y N(3-dimetilaminopropil)-1,3-propilendiamina] (Araldit).

Como sustratos se han empleado:

- Fenol (Sigma).
- Catecol (99%) (Sigma).

- 2-metilfenol (Scharlau).
- 3-metilfenol (Aldrich).
- 4-metilfenol (Scharlau).
- 2,4-dimetilfenol (Aldrich).
- 2,3-dimetilfenol (Aldrich).
- 3,4-dimetilfenol (Aldrich).
- 3,5-dimetilfenol (Aldrich).
- 2,6-dimetilfenol (Aldrich).
- 2-clorofenol (Acros).
- 3-clorofenol (Acros).
- 4-clorofenol (Aldrich).
- 2,4-diclorofenol (Sigma).
- 2,4,6-triclorofenol (Carlo Erba).
- 2,3,5,6-tetraclorofenol (Aldrich).
- pentaclorofenol (Aldrich).
- 4-cloro-2-metilfenol (Aldrich).
- 4-cloro-3-metilfenol (Aldrich).

Otros reactivos utilizados han sido:

Peróxido de hidrógeno (Sigma); glucosa anhidra (Aldrich); ácido clorhídrico (Panreac); hidróxido sódico (Panreac); carbonato sódico (Panreac); fosfato disódico anhidro (Panreac) y fosfato monosódico dihidratado (Merck); metanol (Panreac); ciclohexano (Panreac); n-hexano (Panreac); acetato de etilo (sds); cloroformo (sds); diclorometano (sds); dioctilsulfosuccinato (AOT) (Aldrich); Triton X-100 y X-305 (Serva); Hyamina 3500 (Serva); TBAF (tetrafluoroborato de tetrabutilamonio) (Aldrich); ferricianuro potásico (Sigma); 4-aminoantipirina (Aldrich); amoniaco concentrado (Normasolv).

Todos los reactivos utilizados han sido de calidad para análisis. El agua empleada en todos los casos ha sido obtenida mediante purificación en un sistema Milipore Milli-Ro.

III.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

III.3.1. Preparación de disoluciones

- Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.05 mol L^{-1} , pH 6.5:
Se prepara disolviendo las cantidades adecuadas de las sales disódica y monosódica, ajustando posteriormente el pH con HCl 3 mol L^{-1} .
- Micelas inversas:
Se preparan disolviendo la cantidad necesaria de AOT en acetato de etilo para conseguir la concentración deseada de agente emulsificante, y se añade el volumen necesario de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 para conseguir el porcentaje final en volumen seleccionado en cada caso. Se enrasa con acetato de etilo.
- Disoluciones patrón de los compuestos fenólicos:
Se obtienen disolviendo la cantidad necesaria del fenol correspondiente (fenol, catecol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 4-cloro-2-metilfenol) en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} o en metanol para el resto de los fenoles ensayados, para llegar a una concentración de 0.10 mol L^{-1} . Estas disoluciones se almacenan en frigorífico a 4°C. Las disoluciones más diluidas se prepararon diariamente por dilución con la disolución reguladora.
Las disoluciones patrón en micelas inversas se prepararon disolviendo las cantidades apropiadas de cada compuesto fenólico en la propia emulsión agua/aceite. Estas disoluciones se almacenan en frigorífico a 4°C. Las disoluciones más diluidas se prepararon diariamente por dilución con las propias micelas inversas.
Las disoluciones patrón en agua de grifo se prepararon diariamente disolviendo la cantidad necesaria de compuesto fenólico en el agua de grifo o en metanol, dependiendo de su solubilidad, para obtener una concentración de 0.10 mol L^{-1} . Las disoluciones más diluidas se prepararon diluyendo con el agua de grifo.
- Disolución patrón de peróxido de hidrógeno:
Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de peróxido de hidrógeno de concentración 30% (p/V) en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} a pH 6.5 (o en agua de grifo, según el caso) para llegar a una concentración de 0.2 mol L^{-1} . Esta disolución se prepara diariamente.
- Disolución patrón de glucosa:
Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de glucosa anhidra en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} a pH 6.5 (o en agua de grifo) para obtener una concentración de 0.5 mol L^{-1} . Esta disolución se prepara diariamente.
- Disolución de EPD al 1.0% en peso:
Preparada disolviendo 1.0 g de polímero en 100 mL de ciclohexano.

III.3.2. Preparación de los electrodos compósitos

III.3.2.1. Preparación de los electrodos compósitos de grafito-Teflón

Estos electrodos se preparan pesando la cantidad de necesaria de grafito y Teflón para conseguir los porcentajes de conductor y aislante deseados en pastillas de 1 g, mezclándose y homogeneizándose con la ayuda de una espátula plana. Esta mezcla se prensa en forma de pastillas utilizando una prensa de infrarrojo, aplicando una presión de 10000 Kg/cm² durante 10 minutos, obteniéndose una pastilla madre de 1.3 cm de diámetro. Se preparan después pastillas más pequeñas, de 3.0 mm de diámetro con ayuda de un troquel y se colocan en el extremo de un tubo de Teflón. El contacto eléctrico se establece a través de un tornillo de acero inoxidable con punta plana que es introducido por el otro extremo del tubo de Teflón (Figura 19).

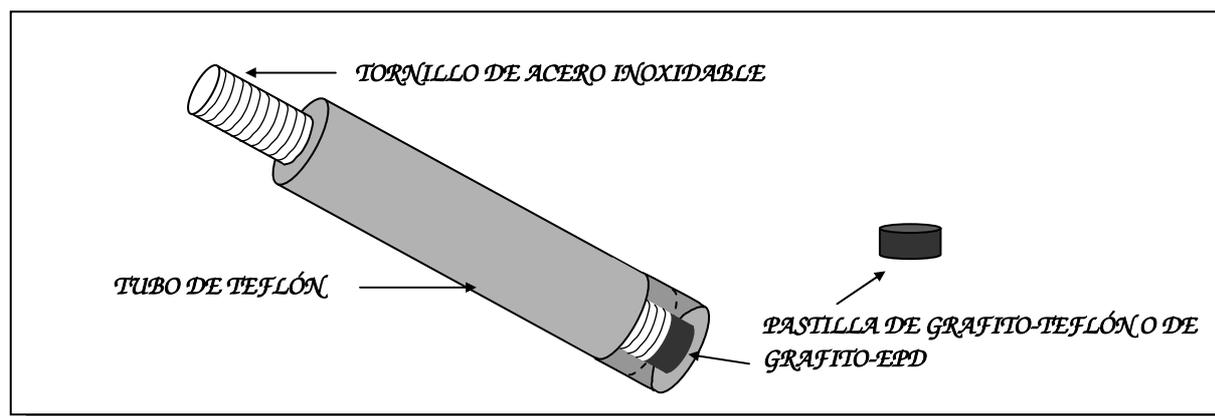


Figura 19. Esquema del electrodo de grafito-Teflón o grafito-EPD.

III.3.2.2. Preparación de electrodos compósitos de grafito-EPD

Se adiciona el volumen adecuado de disolución de EPD al 1.0% a la cantidad necesaria de grafito y se procede a la agitación manual de la mezcla en un mortero, hasta evaporación del disolvente. Una vez evaporado todo el ciclohexano, se procede a la compresión mecánica de la mezcla en forma de pastilla en la prensa de infrarrojo a 10000 Kg/cm², y se opera del mismo modo que el descrito para los electrodos de grafito-Teflón. El aspecto de los electrodos resultantes es el mismo que el de los de grafito-Teflón (Figura 19).

III.3.2.3. Preparación de electrodos compósitos de RVC-resina epoxi

III.3.2.3.1. Pretratamiento del RVC

Antes de preparar el electrodo compuesto, es necesario someter al carbono vítreo reticulado a un pretratamiento empleando el siguiente procedimiento (Peña et al., 1999):

Se cortan cilindros de RVC de 0.4 cm de diámetro y 0.6 cm de altura (correspondiente a la mitad de la altura de las planchas de RVC recibidas de la casa comercial). Para ello se utiliza un tubo de vidrio, que posteriormente se utilizará como soporte del material electródico, con un diámetro interno de 0.4 cm. A continuación, los cilindros de RVC se sumergen durante una hora en una disolución de HCl 6 mol L⁻¹. Posteriormente se decanta la disolución de HCl y los cilindros se lavan con agua

destilada hasta que las aguas de lavado tengan un pH alrededor de 5.0. Tras el lavado, se agitan mecánicamente en metanol durante 2 horas y posteriormente se dejan en estufa a 110°C durante toda la noche.

III.3.2.3.2. Preparación de los electrodos de RVC-resina epoxi

Tras el pretratamiento del material conductor, se procede al llenado de los poros del cilindro de RVC, que previamente se ha colocado en uno de los extremos del tubo de vidrio que se utiliza como soporte, mediante succión a vacío de la resina epoxi. Una vez que la resina alcanza la mitad de la altura del cilindro de RVC, se desconecta la bomba de vacío y se procede al curado de la resina durante 15 horas a temperatura ambiente. La parte de RVC que no contiene resina epoxi sirve para establecer el contacto eléctrico con el resto del electrodo a través de un hilo de cobre.

A continuación, la parte de resina epoxi que cubre la superficie inferior del cilindro de RVC se retira efectuando un corte transversal con un escalpelo hasta alcanzar la superficie con carbono, procediéndose al pulido de esta superficie con papel abrasivo de SiC durante 5 s. En la Figura 20 se muestra el esquema del electrodo de RVC-resina epoxi.

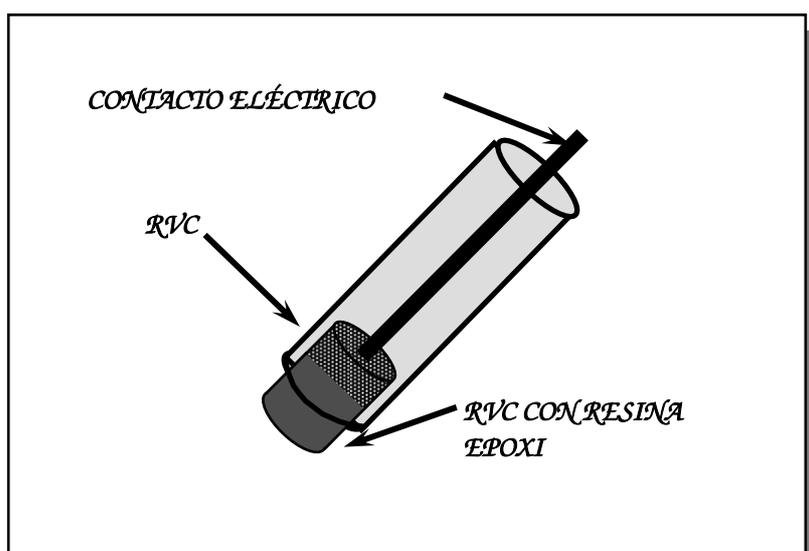


Figura 20. Esquema del electrodo de RVC-resina epoxi

electrodo de RVC-

III.3.2.4. Preparación de los electrodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa

La preparación de las pastillas de grafito-Teflón(70%)-tirosinasa se realizó según el siguiente procedimiento: se mezclan 0.150 g (ó 0.166 g) de grafito y 0.030g de tirosinasa de 3000 unidades mg^{-1} (ó 0.014g de tirosinasa de 6750 unidades mg^{-1}), ambas cantidades pesadas exactamente, mediante agitación mecánica en una suspensión de 0.4 mL de una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} a una temperatura de 4°C.

Seguidamente, se evapora el agua mediante el paso de una corriente de argón a través de la mezcla. A continuación, se procede a mezclar manualmente con 0.420 g de Teflón (pesados exactamente), y se procede a la compresión mecánica de la mezcla del mismo modo descrito para la fabricación de los electrodos sin enzima (apartado III.3.2.1). A partir de la pastilla madre, se preparan varias pastillas más pequeñas, de 3.0 mm de diámetro, procediéndose de forma análoga a la descrita en el apartado III.3.2.1.

III.3.2.5. Preparación de los electrodos compósitos de grafito-EPD-tirosinasa

La preparación de las pastillas de grafito-EPD(5%)-tirosinasa se llevó a cabo según el procedimiento siguiente: se pesan exactamente 0.540 g (ó 0.556g) de grafito y 0.030 g de tirosinasa de 3000 unidades mg^{-1} (ó 0.014g de tirosinasa de 6750 unidades mg^{-1}), y se mezclan vigorosamente, mediante agitación mecánica durante 2 horas en una suspensión de 0.7 mL de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} a una temperatura de 4°C .

Se evapora el agua por paso de una corriente de argón a través de la mezcla y se añaden 3.0 mL de la disolución de EPD al 1.0% en ciclohexano. La mezcla resultante se agita en un mortero hasta conseguir la evaporación completa del disolvente. A continuación se procede a la compresión mecánica de la mezcla en forma de pastillas en la prensa de infrarrojo a 10000 Kg/cm^2 , operándose del mismo modo que el descrito para el electrodo compósito de grafito-Teflón.

III.3.2.6. Preparación de los electrodos compósitos de RVC-resina epoxi-tirosinasa

La fabricación del electrodo se ha llevado a cabo según el siguiente procedimiento: el RVC, pretratado el día anterior según se ha descrito en el apartado III.3.2.3.1, se pone en contacto durante 30 minutos con 150 μL de una disolución de tampón fosfato 0.05 mol L^{-1} que contiene 3.0 mg de enzima de 3000 U mg^{-1} (ó 1.4 mg de enzima de 6750 U mg^{-1}). A continuación se procede a evaporar el agua por paso de una corriente de argón.

Tras la inmovilización de la enzima por adsorción directa, se procede a rellenar los poros de RVC con la resina epoxi, según el procedimiento descrito en el apartado III.3.2.3.2, y se permite el curado de la resina durante 15 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se opera de la misma manera que la indicada en dicho apartado.

III.3.2.7. Preparación de los electrodos de grafito-Teflón-peroxidasa

Las pastillas de 70% de Teflón con la enzima peroxidasa han sido fabricadas de la siguiente forma: se mezclan 0.285g de grafito con 0.015g de peroxidasa (pesados exactamente), y se agita mecánicamente en 0.4 mL de una suspensión de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 a 4°C durante 2 horas. A continuación se evapora el agua por paso de una corriente de argón. La pasta formada se mezcla manualmente con 0.70g de Teflón. Seguidamente se procede a la

compresión mecánica a 10000 Kg cm^{-2} para la obtención de las pastillas madre, y se sigue el mismo procedimiento descrito para los electrodos de grafito-Teflón (apartado III.3.2.1).

III.3.2.8. Preparación de los electrodos de grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa

Las pastillas de grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa se fabricaron con el siguiente procedimiento: se mezclan 0.270g de grafito con 0.015g de peroxidasa y 0.015g de glucosa oxidasa (pesados exactamente), y la mezcla se agita mecánicamente en 0.4 mL de una suspensión de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 a 4°C durante 2 horas. A continuación se evapora el agua por paso de corriente de argon, y la pasta formada se mezcla manualmente con 0.70g de Teflón. Seguidamente se procede a la compresión mecánica a 10000 Kg cm^{-2} para la obtención de las pastillas, y se opera de forma análoga al resto de los biosensores (apartado III.3.2.1).

III.3.2.9. Preparación de los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa-peroxidasa

La preparación de las pastillas de grafito-Teflón(70%)-tirosinasa-peroxidasa se realizó del siguiente modo: se mezclan 0.157 g de grafito, 0.009g de peroxidasa de 240 unidades mg^{-1} y 0.014g de tirosinasa de 6750 unidades mg^{-1} (cantidades pesadas exactamente) mediante agitación mecánica en una suspensión de 0.4 mL de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 a una temperatura de 4°C durante 2 horas.

Se procedió a evaporar el agua por paso de una corriente de argon y, a continuación, se mezcla manualmente con 0.420 g de teflón (pesados exactamente). Seguidamente se procede como se indica en el apartado III.3.2.1.

III.3.2.10. Preparación de los electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa

Se fabrica de la misma manera que el resto de pastillas de grafito-Teflón, pero en este caso, se mezclan inicialmente 0.148g de grafito, 0.009 g de peroxidasa, 0.009g de glucosa oxidasa, y 0.014g de tirosinasa en una suspensión de 0.4 mL de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5.

III.3.3. Regeneración de la superficie de los electrodos

La regeneración de la superficie de los electrodos se realiza, con todos los biosensores utilizados, cuando la señal amperométrica que se registra queda fuera de los límites del gráfico de control establecido. Dicha regeneración se lleva a cabo mediante pulido de la superficie electródica con papel abrasivo de SiC durante 5s.

III.3.4. Activación de los electrodos de grafito-Teflón-Tyr en micelas inversas

El electrodo enzimático compósito se activó diariamente, sumergiéndolo en una micela inversa agitada mecánicamente, preparada con acetato de etilo, un 5% de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} y AOT 0.1 mol L^{-1} , que contenía fenol $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, y manteniendo el electrodo a un potencial constante de -0.15 V durante 10 minutos.

III.3.5. Obtención de los amperogramas en discontinuo

Ya que los biosensores se almacenan en frigorífico a 4°C , excepto en el caso de los biosensores de grafito-EPD-tirosinasa para los que el almacenamiento es a temperatura ambiente, es necesario que se alcance la temperatura de trabajo deseada antes de llevar a cabo las medidas. Una vez alcanzada dicha temperatura, se sumerge el biosensor activado en la célula de medida que contiene 5.0 mL de la disolución fondo correspondiente, la cual está agitada mecánicamente a una velocidad constante. Se aplica el potencial deseado y se permite la estabilización de la corriente de fondo. A continuación, se añade con una micropipeta el volumen adecuado de la disolución patrón del compuesto a estudiar y se registra la corriente hasta que ésta alcanza el estado estacionario. En caso necesario, se continúan realizando adiciones de pequeños volúmenes constantes con la micropipeta hasta obtener todas las señales deseadas. Entre una y otra experiencia no es necesario realizar ningún tipo de tratamiento al biosensor.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos con los electrodos de tirosinasa, se efectúan adiciones sucesivas del mismo volumen de la disolución patrón del fenol correspondiente hasta no obtener una variación apreciable en la intensidad de corriente en el estado estacionario.

Cuando se realizan los experimentos para el cálculo de los parámetros cinéticos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP, se añade, en primer lugar, el volumen apropiado de la disolución patrón de peróxido de hidrógeno para obtener una concentración en la célula electroquímica de $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre 5.0 mL de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5. Se espera hasta obtener una línea base estable y, a continuación, se hacen adiciones sucesivas de un volumen apropiado de la disolución patrón de cada compuesto fenólico hasta que no se aprecie un aumento en la intensidad de corriente cuando se lleva a cabo una nueva adición del sustrato. Para el cálculo de los parámetros cinéticos para el peróxido de hidrógeno en presencia de cada uno de los compuestos fenólicos, se añade un volumen adecuado de disolución patrón del fenol correspondiente para obtener una concentración en la célula de medida de $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre 5.0 mL de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5. Seguidamente, se realizan adiciones sucesivas de un volumen adecuado de una disolución patrón de H_2O_2 hasta que no se aprecie un aumento de la señal analítica con la adición de peróxido. Entre cada experimento para el cálculo de los parámetros cinéticos fue necesario pulir la superficie del electrodo para recuperar la señal.

III.3.6. Obtención de los fiagramas

El electrodo enzimático empleado como electrodo indicador se coloca en la célula de flujo del tipo "wall-jet" de gran volumen. A través de la válvula de inyección, se inyecta la disolución de analito en la corriente portadora formada por regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} a pH 6.5, cuando se emplea como detector alguno de los electrodos de tirosinasa, y por regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} a pH 6.5 y $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 ó $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa cuando el electrodo utilizado es el de peroxidasa o el de glucosa oxidasa. En el caso de los sistemas que emplean electrodos de HRP o de GOD-HRP, la disolución de analito que se inyecta contiene la misma concentración de peróxido de hidrógeno o de glucosa, respectivamente, que la disolución portadora, con objeto de conseguir que la magnitud del pico FIA registrado se deba exclusivamente a la concentración de analito presente.

III.3.7. Medida de la resistividad de las pastillas compósitas de grafito-Teflón y grafito-EPD

La medida de la resistividad de las pastillas compósitas de grafito-Teflón con porcentajes de conductor comprendidos entre 0 y 60%, y de grafito-EPD con porcentajes de conductor entre 50 y 99%, se ha realizado con un multímetro digital Micronta. Además de la medida de resistividad de la pastilla completa, se llevaron a cabo asimismo medidas para las porciones cilíndricas de la pastilla madre que constituyen los diferentes electrodos.

III.3.8. Cálculo del área activa de los electrodos compósitos de tirosinasa

El cálculo del área activa de los electrodos desarrollados se realizó utilizando un electrodo rotatorio constituido por una pastilla de 3.0 mm de diámetro de cada una de las matrices compósitas, grafito-Teflón(70%), grafito-EPD(5%), y PVC-resina epoxy. Se registró, en cada caso, el amperograma obtenido a un potencial constante de -0.20 V tras añadir $50 \mu\text{L}$ de una disolución de ferricianuro 0.1 mol L^{-1} a la célula de medida que contiene 5.0 mL de disolución de regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} de pH 7.0 y KCl 0.1 mol L^{-1} para distintas velocidades de rotación del electrodo.

El cálculo del área activa de cada uno de los electrodos compósitos se realizó empleando la ecuación de Levich ($i_{\text{lim}} = 0.620nFA D^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} C_{\text{ferricianuro}}$). Así, representando la intensidad de corriente en el estado estacionario frente a la raíz cuadrada de la velocidad de rotación del electrodo se obtienen líneas rectas a partir de cuya pendiente puede calcularse el área activa, ya que el resto de los parámetros implicados son conocidos.

III.3.9. Obtención de los voltamperogramas cíclicos

Los voltamperogramas cíclicos obtenidos con los electrodos de grafito-Teflón(70%), grafito-EPD(5%) y RVC-resina epoxi se realizaron en una disolución conteniendo cloruro potásico 0.05 mol L^{-1} y ferricianuro potásico $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a una velocidad de barrido de potencial de 5 mV s^{-1} .

III.3.10. Obtención de microfotografías de barrido electrónico de las superficies de los electrodos compósitos

Las microfotografías de las superficies de los materiales compósitos desarrollados se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM 6400. El análisis atómico de dichas superficies se llevó a cabo con un espectrómetro de dispersión de energías de rayos X Oxford, modelo INCA, incorporado al microscopio electrónico.

III.3.11. Cálculo de los coeficientes de capacitancia de los electrodos de grafito-Teflón (70%), grafito-EPD (5%), RVC-resina epoxi y carbono vitrificado

El cálculo de los coeficientes de capacitancia de los distintos electrodos se realizó a partir del valor de las pendientes de las rectas obtenidas cuando se representa la densidad de corriente de fondo del electrodo medida a un potencial de 200 mV en función de la velocidad de barrido de potencial. Para obtener los valores de la densidad de corriente de fondo se realizaron barridos lineales de potencial a diferente velocidad en una disolución de trabajo de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5.

III.3.12. Estudio de la influencia de la velocidad de rotación del electrodo sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario del catecol

Para este estudio se registraron los amperogramas que se obtienen al añadir distintas concentraciones de catecol a la célula de medida, que contiene una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} a pH 6.5, aplicando un potencial constante de -0.15 V para distintas velocidades de rotación del electrodo.

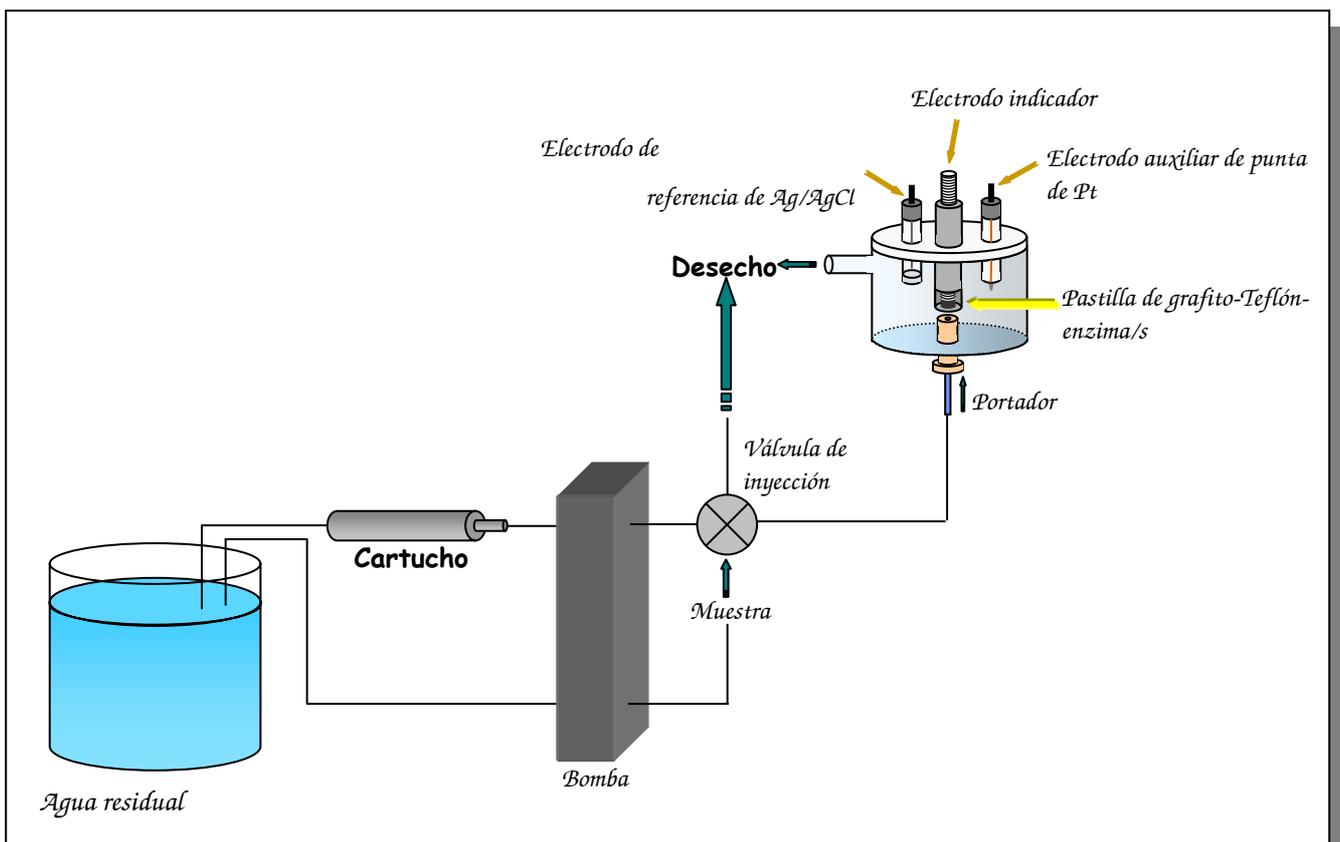
III.3.13. Cálculo de la actividad enzimática en las superficies de los biosensores compósitos de tirosinasa

La actividad de la tirosinasa en cada uno de los biosensores compósitos desarrollados se estimó según se detalla a continuación: en primer lugar se obtuvo una curva de calibrado midiendo el incremento de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm , producido en disoluciones agitadas de 3.0 mL de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, que contienen $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-tirosina, transcurridos 10 minutos desde la inyección de cantidades variables de unidades de tirosinasa. Seguidamente, se interpoló el valor de incremento de absorbancia obtenido tras sumergir cada uno de los electrodos de

tirosinasa (a circuito abierto) durante 10 minutos en disoluciones agitadas de 3.0 mL de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 que contienen $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-tirosina.

III.3.14. Empleo de electrodos compósitos para el análisis de muestras en continuo

Los biosensores enzimáticos desarrollados pueden utilizarse para la monitorización continua de fenoles utilizando el diseño experimental que se muestra en la Figura 21. En él se incluye una columna de material adsorbente capaz de retener los fenoles de la muestra de forma continua. Dicha columna precisa un acondicionamiento previo. Dicho acondicionamiento consiste en hacer pasar un pequeño volumen de metanol para su activación; seguidamente, se pasa otro pequeño volumen de agua destilada y finalmente, se hace circular la muestra. Con esta metodología se obtiene el portador ideal, ya que se elimina los fenoles presentes, obteniéndose una disolución que es en todo igual a la muestra excepto en el analito. De esta forma, una posterior inyección de muestra conteniendo fenoles sobre el portador proporcionará una respuesta amperométrica libre de interferencias.



III.3.15. Análisis de muestras de aguas procedentes de una refinería de petróleo mediante el método oficial colorimétrico de la 4-aminoantipirina

Estos análisis se han realizado siguiendo las especificaciones del método oficial, cuyo protocolo se describe en la norma española UNE 77-053-83 (mayo 1983).

III.3.16. Pretratamiento de las muestras de aguas procedentes de refinería para el análisis mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas

Se toman 250 mL de la muestra de agua procedente de refinería y se añade 1 gota de ácido ortofosfórico. Este volumen de muestra se pasa a través de un cartucho de 500 mg de C₁₈, que previamente se ha acondicionado con 6.0 mL de metanol y 3.0 mL de agua destilada. Los compuestos fenólicos retenidos en el cartucho son eluidos con 5+1 mL de diclorometano. Finalmente, la disolución obtenida se concentra hasta un volumen de 0.5 mL con corriente de Argon. Esta disolución es inyectada directamente en el cromatógrafo de gases.

III.3.17. Análisis del contenido fenólico mediante CG-EM

El análisis se ha llevado a cabo utilizando un espectrómetro de masas de cuadrupolo HP5989A acoplado a una columna de cromatografía de gases HP5890 Serie II (VA-5; 25 m x 0.52 mm x 0.25 µm). La identificación se ha realizando mediante el empleo de una librería Wily HP59943B.

IV. Resultados y discusión

IV.1. Características estructurales de los electrodos compósitos de grafito-Teflón, grafito-EPD y RVC-resina epoxi

El empleo de electrodos compósitos para la construcción de biosensores amperométricos se ha justificado a lo largo de la Introducción por el hecho de ofrecer una serie de ventajas, como son, entre otras, su versatilidad, la buena relación señal/ruido que ofrecen, su facilidad de construcción y su bajo coste. Estas ventajas están íntimamente relacionadas con la estructura microscópica de la superficie de estos materiales compósitos. Por lo tanto, antes de proceder al desarrollo de los biosensores enzimáticos para la determinación de compuestos fenólicos, se ha llevado a cabo una caracterización de las matrices compósitas empleadas, grafito-Teflón, grafito-EPD y RVC-resina epoxy, en las que posteriormente se van a inmovilizar las diferentes enzimas para la construcción de los biosensores. Con ello, se podrán explicar algunos de los resultados que posteriormente se obtengan y que estén relacionados con la estructura de la matriz electródica. Se han realizado, con estos objetivos, los estudios electroquímicos y de caracterización superficial que se detallan a continuación.

IV.1.1. Umbral de percolación de los electrodos compósitos de grafito-Teflón y grafito-polímero de etilen-propilen-dieno (EPD)

En el apartado II.2.3 de la Introducción se ha descrito el mecanismo de conducción de los electrodos compósitos, habiéndose puesto de manifiesto que en los electrodos compósitos arrays y en los impregnados la conducción se realiza a través de regiones continuas de material conductor puro, mientras que la conducción en los dispersos o segregados se produce mediante un mecanismo que es explicado por la Teoría de Percolación. Dicha teoría predice la existencia de un "umbral de percolación", es decir, de una fracción de conductor en la matriz a partir de la cual la conductividad del material compósito aumenta drásticamente. Puesto que el electrodo de RVC-resina epoxy está formado por la impregnación de un material conductor continuo (el RVC) por una resina, en este caso no es aplicable la Teoría de Percolación, y en esta matriz la corriente eléctrica circula a través del material conductor puro. Sin embargo, en los otros dos tipos de electrodos, el material compósito se fabrica mezclando las cantidades deseadas del material conductor en polvo con el material aislante, por lo que la conductividad del electrodo compósito dependerá de la fracción de conductor presente en la matriz. Por tanto, el parámetro "umbral de percolación" se ha calculado sólo para estos dos tipos de electrodos compósitos.

Para el cálculo de dicho parámetro, se han fabricado pastillas diferentes de grafito-Teflón y grafito-EPD, cuyo contenido en grafito varió entre 0 y 60% para los de Teflón, y entre 50 y 99% para los de EPD. El resto de composiciones para ambos materiales no se consideró debido a la imposibilidad de fabricar pastillas con una consistencia mecánica adecuada. La medida de la resistividad de las pastillas se ha llevado a cabo según se describe en el apartado III.3.7 de la Parte Experimental. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22.

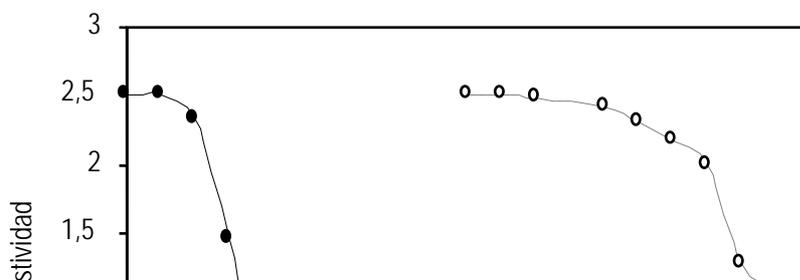


Figura 22. Logaritmo de la resistividad que presentan los electrodos compósitos de grafito-Teflón (●) y grafito-EPD (○) en función de la cantidad de grafito presente en el material.

Como puede observarse, el umbral de percolación, es decir, la cantidad de grafito a partir de la cual la conductividad aumenta drásticamente, se encuentra en un 10% para el electrodo de grafito-Teflón, mientras que está en un 80% en el caso de los electrodos de grafito-EPD. Esta diferencia tan grande en el valor del umbral de percolación para ambos materiales se debe a la influencia que ejerce el material aislante utilizado sobre el modo en que las partículas de grafito se distribuyen en la matriz. En el caso del Teflón, las partículas de aislante tienden a agregarse y fuerzan a las partículas de grafito a ocupar pequeñas regiones reticuladas, por lo que, a partir de una cantidad mínima de grafito, las zonas agregadas de conductor se interconectan y la conductividad a través del seno de la matriz aumenta rápidamente. Este tipo de material se denomina *compósito segregado*.

En el caso del EPD, las partículas de grafito se dispersan en la disolución de polímero en ciclohexano durante el proceso de fabricación, de modo que, cuando éste se evapora, las partículas de grafito quedan homogéneamente repartidas en el polímero de EPD, y por tanto, una partícula de conductor tiene la misma probabilidad de encontrarse en cualquier punto de la matriz. Por lo tanto, puede decirse que este tipo de material compósito es disperso, y, como ya se comentó en la Introducción, los compósitos dispersos proporcionan umbrales de percolación mayores que los segregados.

Por otra parte, se observó que la resistividad que presentan las fracciones de pastilla con las que se construyen los distintos electrodos es mayor que la medida para la pastilla madre correspondiente. Esta disminución de la conductividad cuando se reduce la porción de material compósito confirma la validez de la teoría de percolación para este tipo de matrices, ya que al reducir el tamaño del material, se reducen los caminos de conducción interconectados.

IV.1.2. Área activa aparente de los electrodos compósitos

El área activa de un electrodo compuesto no corresponde en principio al área geométrica, puesto que la superficie está compuesta por material aislante y material conductor. Dependiendo de la proporción y distribución de ambos materiales en la superficie, el área activa resultante será diferente.

El cálculo del área activa se ha llevado a cabo mediante amperometría con un electrodo rotatorio utilizando la ecuación de Levich, como se describe en el apartado III.3.8 de la Parte Experimental. Este procedimiento proporciona un valor del área activa aparente, ya que el efecto de caída óhmica producido por la resistencia del material compuesto hará que se produzca una ligera variación de la intensidad de corriente y por lo tanto que el valor de área obtenido no sea el real. Por otro lado, la escala de tiempo de este tipo de experimentos es larga, por lo que las capas de difusión de regiones conductoras suficientemente cercanas solaparán, y el área activa medida será la envolvente de todas ellas. Los resultados obtenidos fueron de $(2.0 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ para el electrodo de grafito(30%)-Teflón(70%), de $(7.0 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ para el electrodo de grafito(95%)-EPD(5%), y de $(5.0 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ para el electrodo de RVC-resina epoxi.

Teniendo en cuenta que el área geométrica de los electrodos es de aproximadamente $7.1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$, el valor del área activa obtenido para el electrodo de grafito-EPD corresponde al área geométrica total, por lo que se concluye que las capas de difusión de los sitios activos solapan, y envuelven por completo la superficie del compuesto. Esto no ocurre para los otros dos tipos de electrodos compósitos estudiados, siendo el área activa del electrodo que emplea RVC mucho menor que la que presentan los electrodos de grafito-Teflón.

Estos resultados concuerdan con las conclusiones alcanzadas en el apartado anterior, puesto que un compuesto segregado, con zonas de conductor puro y aislante puro, tendrá regiones de conductor lo suficientemente separadas unas de otras como para que sus capas de difusión no solapen, y el área activa obtenida en tal caso debe ser menor que el área geométrica. En el caso de un compuesto disperso, las partículas de conductor y aislante están homogéneamente distribuidas, y, teniendo en cuenta la fracción tan elevada de grafito en el electrodo de grafito-EPD, es evidente que las capas de difusión de los puntos conductores solapan. En los electrodos de RVC-resina epoxi, las zonas de carbono vítreo reticulado en la superficie compósita que se obtiene con la resina son sólo una pequeña fracción del área total.

IV.1.3. Voltamperogramas cíclicos

En la Figura 23 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos con cada uno de los tres electrodos compósitos sumergidos en una disolución de ferricianuro potásico $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y 0.05 mol L^{-1} en KCl, a una velocidad de barrido de potencial de 5 mV s^{-1} .

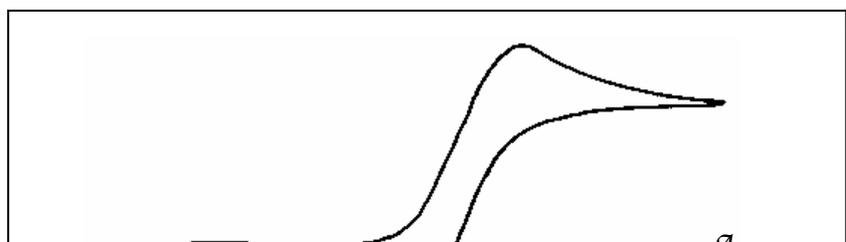


Figura 23. Voltamperogramas cíclicos obtenidos en una disolución de ferricianuro potásico $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y $\text{KCl } 0.05 \text{ mol L}^{-1}$, a una velocidad de barrido de potencial de 5 mV s^{-1} , sobre electrodos de: (A) grafito-Teflón (70%); (B) grafito-EPD (5%); y (C) RVC-resina epoxy.

En la Tabla 8 se recogen los valores de la intensidad de pico anódico y catódico, del potencial de pico catódico y de la diferencia de potencial entre el pico anódico y catódico. Puesto que el voltamperograma obtenido con el electrodo de RVC-resina epoxy es de tipo sigmoidal, en su caso se proporciona el potencial de onda media y la intensidad límite.

Tabla 8. Parámetros característicos de los voltamperogramas cíclicos obtenidos utilizando los electrodos compósitos de grafito-Teflón (70%), grafito-EPD (5%) y RVC-resina epoxy, en disoluciones de $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianuro potásico y 0.05 mol L^{-1} de KCl . Velocidad de barrido de potencial = 5 mV s^{-1} .

	$i_{p,c} (\mu\text{A})$	$i_{p,a} (\mu\text{A})$	$E_{p,c} (\text{mV})$	$\Delta E_p (\text{mV})$
GRAFITO-TEFLÓN	14.50	14.25	250	162
GRAFITO-EPD	16.50	16.75	290	132
	$i_{lim} (\mu\text{A})$		$E_{1/2} (\text{mV})$	
RVC-RESINA EPOXI	2.45		245	

El electrodo de grafito-EPD proporciona, como es lógico, mayores intensidades de pico, debido a que es el electrodo que presenta una mayor área activa. El sistema ferricianuro/ferrocianuro es más rápido sobre el electrodo de grafito-EPD que

sobre el de grafito-Teflón, como se deduce de la diferencia de los potenciales de pico anódico y catódico. Por lo que respecta al electrodo de RVC-resina epoxy, la señal sigmoidal observada indica un comportamiento de array de microelectrodos, como ya ha sido comentado por otros autores (Sleszynski y Osteryoung, 1984). Este comportamiento es debido a que las zonas conductoras del compuesto tienen dimensiones micrométricas y están separadas entre sí por una distancia suficiente para evitar que las capas de difusión solapen.

IV.1.4. Caracterización superficial de los electrodos mediante micrografía de barrido electrónico

Con el fin de corroborar las conclusiones alcanzadas en los apartados anteriores sobre la estructura de la superficie de las matrices compósitas, se obtuvieron imágenes superficiales utilizando la técnica de micrografía de barrido electrónico (apartado III.3.10 de la Parte Experimental). Las micrografías correspondientes se muestran en la Figura 24. Asimismo, se muestra una micrografía en la misma escala del carbono vítreo reticulado vacío, sin resina. Por otra parte, se obtuvieron los espectros atómicos que proporcionan los distintos tipos de materiales conductores y aislantes.

La Figura 24A muestra la superficie del electrodo de grafito-Teflón (70%), donde las zonas blancas corresponden al Teflón, mientras que las zonas oscuras son las de grafito. Estas zonas se encuentran claramente diferenciadas, apreciándose el carácter segregado del material, como sugieren los resultados obtenidos en los estudios del umbral de percolación y del área activa.

La Figura 24B corresponde al grafito-EPD (5%). En este caso no es posible distinguir zonas diferenciadas, y tampoco es posible encontrar espectros diferenciados según el material aislante o conductor, ya que el contenido atómico del material aislante está constituido sólo por carbono e hidrógeno. Sin embargo, el aspecto de la micrografía parece indicar que el grafito se encuentra repartido en toda el área del electrodo, lo que es de esperar dado el alto contenido de grafito en el compuesto.

En la Figura 24C se muestra la micrografía del carbono vítreo reticulado relleno con resina epoxy. Como ocurre con la matriz compósita de grafito-EPD, no es posible distinguir las zonas conductoras de las aislantes, porque la resina está constituida por átomos de C, H y O, y la estructura del RVC consiste principalmente en carbono con grupos funcionales que contienen oxígeno, como se observa en su espectro. La micrografía del RVC vacío, sin resina epoxy, se muestra en la Figura 24D. En ella, se han señalado las zonas de RVC que se encuentran en el plano superior, y que corresponderían a la superficie del electrodo si el RVC estuviera relleno. Por tanto, la superficie de este compuesto tiene zonas conductoras muy pequeñas (de aproximadamente 20 μm) separadas entre sí unos 200 o 300 μm , lo que confirma el hecho de que este material compuesto tenga un comportamiento electroquímico de un array de microelectrodos. Hay que hacer notar que la separación de las zonas

conductoras en el grafito-Teflón es mucho menor, por lo que el solapamiento de las capas de difusión de dichas zonas es mucho mayor que en el caso del de RVC-resina epoxy.

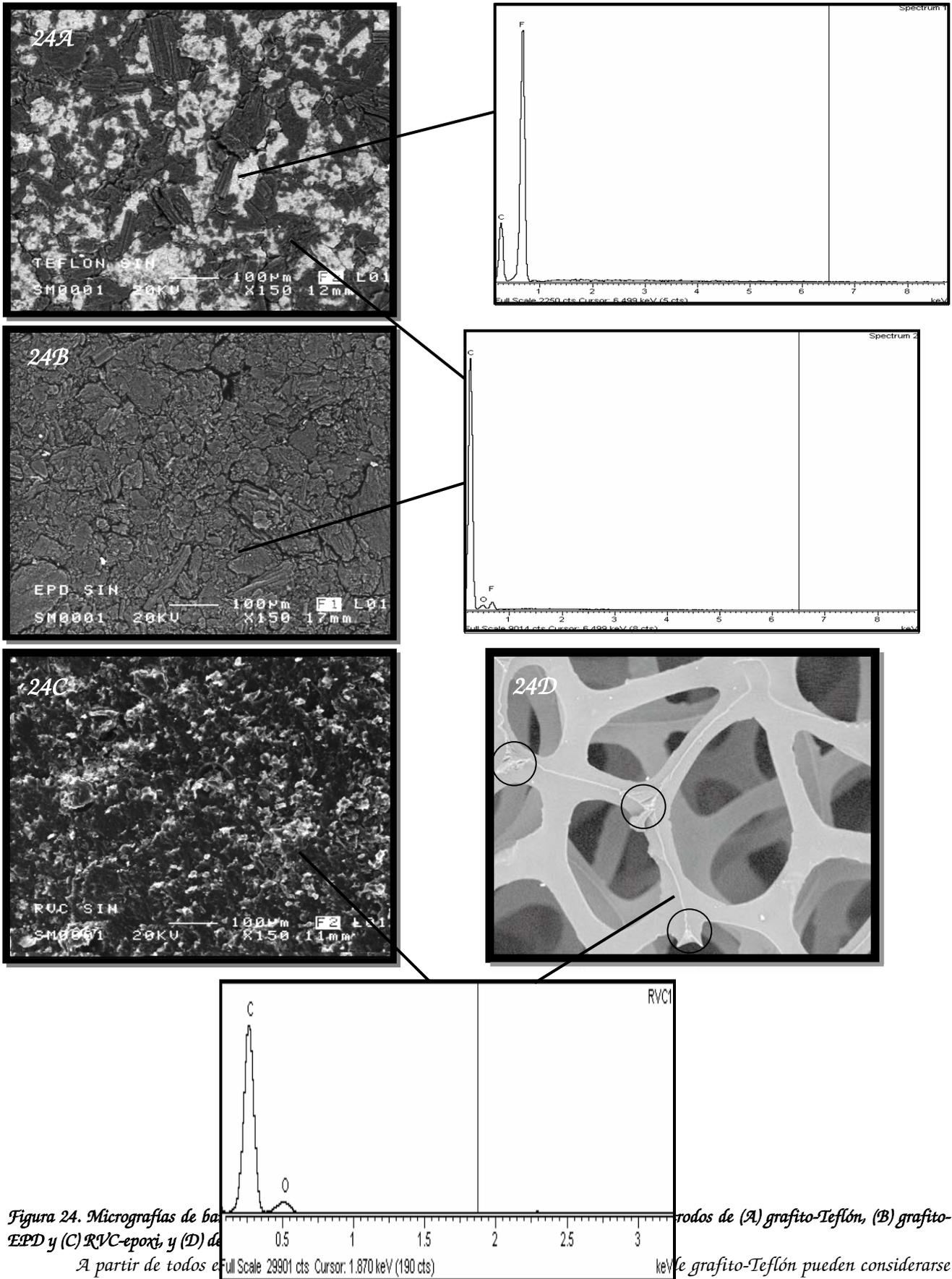


Figura 24. Micrografías de barrido electrónico de los electrodos de (A) grafito-Teflón, (B) grafito-EPD y (C) RVC-epoxi, y (D) de un detalle de (C). A partir de todos ellos se puede concluir que los electrodos de grafito-Teflón pueden considerarse como electrodos compósitos segregados, siendo sus principales características: (a) disposición del conductor y del aislante de forma aleatoria (conjuntos); (b) el conductor se extiende a través del compuesto de un modo reticulado, aleatorio, con regiones

de aislante puro y conductor puro que no están entremezcladas (consolidados); y (c) están formados por mezcla de un conductor en polvo con un aislante y moldeado por compresión de la mezcla (segregados).

Los electrodos de grafito-polímero de etilen/propilen/dieno son del tipo de electrodos dispersos: (a) disposición del conductor y del aislante de forma aleatoria (conjuntos); (b) el conductor tiene la misma probabilidad de encontrarse en cualquier punto de la superficie (disperso); y (c) están formados por mezcla de un conductor en polvo con un aislante y moldeado por compresión de la mezcla (sólido).

Los electrodos de RVC-resina epoxi se clasifican en el grupo de los electrodos compósitos impregnados, puesto que: (a) la disposición del conductor y el aislante desordenada (los poros del RVC se distribuyen irregularmente), por lo que se les considera conjuntos; (b) el conductor se extiende a través del compósito de un modo reticulado aleatorio, con partes de aislante puro y conductor puro no entremezcladas, al igual que los de grafito-Teflón (consolidados); y (c) se forman por la impregnación del material aislante a un conductor (impregnado).

IV.1.5. Corriente fondo obtenida con los electrodos compósitos

Una de las variables más importantes que se han de estudiar cuando se desarrollan nuevos materiales electródicos con fines analíticos es la corriente fondo, ya que su magnitud va a limitar la sensibilidad de los métodos desarrollados. La intensidad de corriente que mide el electrodo en ausencia de analito se debe a la corriente no faradaica producida por la existencia de la doble capa en la superficie del electrodo, así como a una corriente residual de tipo faradaico producida por la presencia de trazas de componentes que pueden oxidarse o reducirse sobre el electrodo al potencial de trabajo aplicado. La componente faradaica suele resultar despreciable en las condiciones usuales de trabajo, pero sin embargo, la corriente no faradaica o capacitiva puede llegar a ser comparable a la intensidad que proporciona el analito a bajos niveles de concentración. Esta corriente capacitiva se debe al hecho de que la interfase electrodo-disolución se comporta como un condensador, con una determinada capacidad de carga que depende del material electródico, de su área y de las imperfecciones de su superficie.

En la Figura 25 se representa la variación de la densidad de corriente de fondo en función del tiempo durante el que se aplica a los electrodos un potencial constante de -0.15 V . Los puntos representados en la Figura 25A corresponden a la primera medida realizada cada día cuando se alcanza una línea base estable, mientras que, en la Figura 25B se representan las densidades de corriente para cada uno de los electrodos estudiados en función del número de medidas realizadas dentro del mismo día.

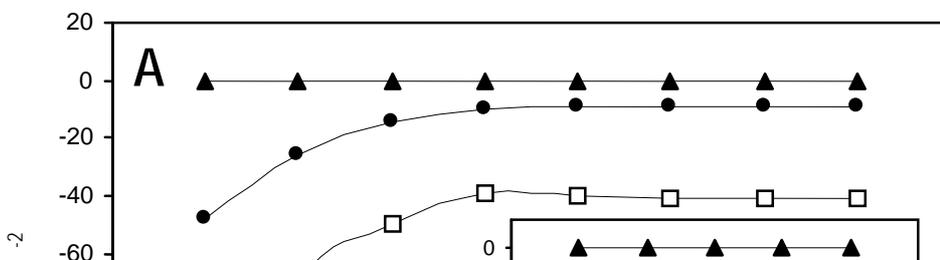


Figura 25. (A) Densidad de corriente de fondo obtenida cada día con los electrodos compósitos de (●) grafito-EPD, (□) grafito-Teflón, y (▲) RVC-resina epoxi medida en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 a un potencial de -0.15 V . (B) Densidad de corriente de fondo obtenida con cada electrodo en las medidas realizadas en un mismo día.

En primer lugar, puede observarse cómo la densidad de la corriente de fondo no es la misma para cada uno de los tres electrodos compósitos, lo que era de esperar, ya que cada material tiene su propio coeficiente de capacitancia, como se verá más adelante.

Por otro lado, se observa que la densidad de corriente de fondo para los electrodos de grafito-Teflón y de grafito-EPD disminuye a medida que aumenta el tiempo de aplicación del potencial, hasta alcanzar un valor constante. En el caso del electrodo de RVC-resina epoxi, la densidad de la corriente fondo permanece prácticamente constante durante todo el tiempo ensayado.

El comportamiento observado en los tres electrodos compósitos depende de la propia naturaleza de la matriz. Puesto que los electrodos de grafito-Teflón y grafito-EPD están constituidos por la aglutinación de grafito en polvo con el polímero, puede producirse una reestructuración del material a nivel microscópico, consistente en la reorganización de dipolos permanentes o inducidos del material aislante provocada por el campo eléctrico producido al aplicar el potencial. Una vez que se van orientando los dipolos, la intensidad de la corriente a través del compósito va disminuyendo hasta alcanzar un valor constante con el número de medidas y con los días. Por lo que respecta al electrodo de RVC-resina epoxi, la conducción se produce a través de una porción continua de conductor, por lo que, el material dieléctrico no interviene en dicho proceso. En el electrodo de RVC-resina epoxi, es posible que el campo eléctrico provoque una reorientación de las moléculas que forman la resina, pero ello no influye en la corriente que circula a través del RVC, mientras que en el grafito-Teflón y en el grafito-EPD sí parece hacerlo, poniendo de manifiesto la contribución del paso de corriente a través del material aislante (efecto túnel) en la conductividad total del electrodo (Navarro Laboulais et al., 1994).

Una vez alcanzado un valor de densidad de corriente de fondo estable, se observa que éste es mayor para el electrodo de grafito-Teflón que para el de grafito-EPD y éste, a su vez, mayor que para el de RVC-resina epoxy. Puesto que la corriente de fondo o capacitiva es función del coeficiente de capacitancia del material, se han calculado estos coeficientes para cada uno de los electrodos compósitos. El cálculo se ha llevado a cabo a partir de la pendiente de la representación de la densidad de corriente capacitiva en función de la velocidad de barrido de potencial (Figura 26) (Bard y Faulkner, 2001). La densidad de corriente se ha obtenido dividiendo el valor de la intensidad de corriente entre el área geométrica de los electrodos, en lugar de entre el área activa, debido a que toda la superficie del material es susceptible de cargarse y, por tanto, el coeficiente calculado corresponde al material compósito y no al conductor puro.

Puesto que el coeficiente de capacitancia depende del potencial, se ha calculado dicho coeficiente para un valor del potencial de 0.20 V en todos los casos, según se detalla en el apartado III.3.11 de la Parte Experimental. Con el objeto de obtener un valor de referencia, se ha calculado asimismo el coeficiente de capacitancia de un electrodo de carbono vitrificado de 3.0 mm de diámetro. En la Tabla 9 se recogen los valores de las pendientes de las rectas de la Figura 26. El valor del coeficiente de capacitancia obtenido para el electrodo de carbono vitrificado está dentro de los límites típicos para electrodos convencionales, que se encuentran entre 10 y 40 $\mu\text{F cm}^2$ (Bard y Faulkner, 2001), lo que indica que el método empleado para el cálculo de estos coeficientes es adecuado. El electrodo de RVC-resina epoxy presenta un valor por debajo del intervalo típico, mientras que el de grafito-EPD tiene un valor ligeramente superior. El bajo valor obtenido para el compósito de RVC-resina epoxy puede deberse a la pequeña porción de área conductora en la superficie del electrodo.

El alto valor de la capacitancia en el grafito-Teflón puede atribuirse a los huecos existentes en las interfases entre el grafito y el Teflón, y a la geometría de las zonas conductoras de la superficie, pero también puede deberse a la configuración del material electródico, que puede comportarse como un conjunto de conductores y aislantes en serie, es decir, de condensadores en serie, cuya capacidad de almacenar carga cuando se someten a un potencial eléctrico se encuentra en todo el seno del material y no sólo en su superficie (Navarro Laboulais et al., 1994).

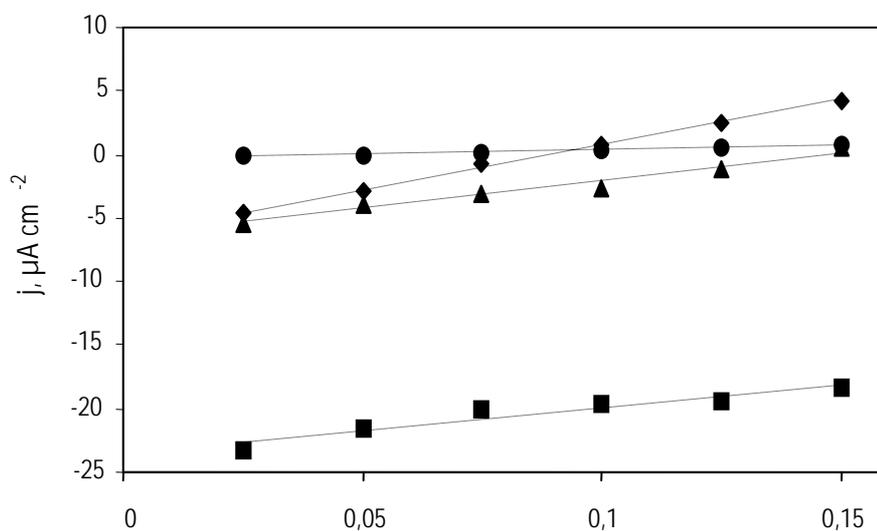


Figura 26. Dependencia de la densidad de corriente a 0.2 V con la velocidad de barrido de potencial para los electrodos compósitos de grafito-Teflón (70%) (◆), grafito-EPD (5%) (▲) y RVC-resina epoxi (●), así como para un electrodo de carbono vitrificado (■). Disolución de regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ de pH 6.5.

Tabla 9. Valores de los coeficiente de capacitancia obtenidos para los electrodos compósitos y para un electrodo de carbono vitrificado.

ELECTRODO	$C_{\phi} \mu F cm^{-2}$
Grafito-Teflón (70%)	70.8
Grafito-EPD (5%)	42.8
RVC-resina epoxi	8.4
Carbono vitrificado	36.8

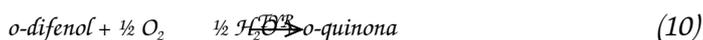
Finalmente, el hecho de poseer un coeficiente de capacitancia más alto, puede ser la causa del hábito del voltamperograma cíclico que presenta el electrodo de grafito-Teflón para el sistema ferricianuro-ferrocianuro (apartado IV.1.3), con una mayor separación entre los picos anódico y catódico, cuando se compara con el voltamperograma obtenido con el grafito-EPD.

***IV.2. Biosensores amperométricos compósitos de
tirosinasa en medio acuoso***

El objetivo de este capítulo es llevar a cabo una comparación de las capacidades de las tres matrices compósitas estudiadas, grafito-Teflón, grafito-EPD y RVC-resina epoxy, como materiales electródicos para la construcción de biosensores amperométricos de tirosinasa, utilizables para la detección y determinación de compuestos fenólicos.

La enzima ha sido inmovilizada en todos los casos por simple atrapamiento físico en la matriz electródica, de manera que no hay pérdidas de actividad enzimática como ocurre cuando se emplea una inmovilización de tipo covalente, y se facilita y simplifica el proceso de fabricación de los electrodos. Además, se obtendrán respuestas rápidas debido a la ausencia de barreras de difusión en forma de membranas.

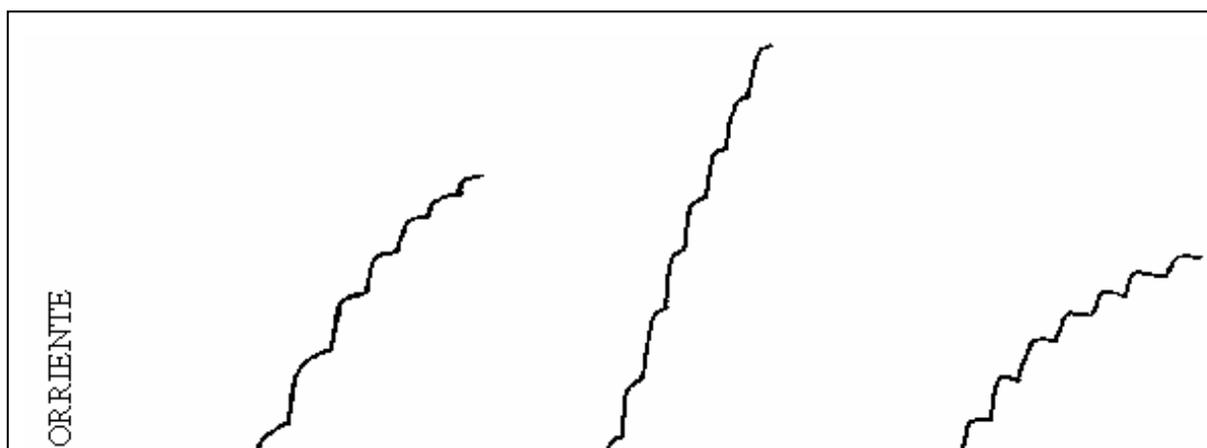
El fundamento de la biosensorización se basa en las siguientes reacciones catalizadas por la enzima tirosinasa:



La intensidad de la reducción electródica de la quinona correspondiente formada es proporcional a la concentración del compuesto fenólico en disolución, y puede, por tanto, utilizarse para monitorizar la reacción enzimática. La reducción de las quinonas produce el correspondiente o-difenol, el cual es también sustrato de la tirosinasa, por lo que existe un reciclado del analito que da lugar a una amplificación de la señal. Esto permite obtener una mayor sensibilidad y mejores límites de detección, como se verá más adelante.

En la Figura 27 se muestran los registros intensidad-tiempo obtenidos con los tres electrodos compósitos de tirosinasa para adiciones sucesivas de fenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, cuando se aplica un potencial constante de -0.15 V .

Como se puede apreciar, el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa es el que proporciona una respuesta más sensible, casi 3 veces mayor que la del electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa y más de 150 veces mayor que la obtenida con el electrodo de RVC-resina epoxy-tirosinasa.



Los tiempos de respuesta obtenidos con cada electrodo son comparables, si bien algo más lentos sobre el electrodo de RVC-resina epoxi-Tyr. De cualquier modo, la corriente en el estado estacionario se alcanza en todos los casos en menos de 180 segundos.

Por otra parte, la corriente de fondo que se observa con los biosensores de grafito-Teflón y de grafito-EPD es similar, mientras que es mucho menor con el electrodo de RVC-resina epoxi. Como consecuencia de estos hechos, la relación señal/ruido es comparable en los tres casos.

IV.2.1. Optimización de las variables experimentales

Las condiciones óptimas de trabajo para obtener las mejores señales analíticas con los tres biosensores desarrollados se han establecido mediante amperometría a potencial constante en disoluciones agitadas a velocidad controlada. Se evaluó, para ello, la influencia de diferentes variables experimentales (composición de la matriz electródica, pH y potencial aplicado) sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida empleando como sustrato fenol.

IV.2.1.1. Optimización de la composición de las matrices electródicas

IV.2.1.1.1. Electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa

La optimización del porcentaje del material aglutinante (Teflón) en este tipo de electrodos se llevó a cabo previamente en nuestro grupo de investigación (del Cerro et al., 1997). Así, los electrodos fabricados con un 70% de Teflón poseen una buena estabilidad mecánica y tienen una conductividad suficiente para que se obtengan respuestas amperométricas adecuadas.

Además, el cálculo del umbral de percolación que se ha realizado en el apartado IV.1.1, pone de manifiesto la buena conductividad del electrodo con este porcentaje de aglutinante.

Por otro lado, la influencia de la cantidad de tirosinasa inmovilizada en la matriz electródica se evaluó construyendo tres biosensores compósitos de grafito-Teflón (70%) con distintos contenidos de tirosinasa (7200, 36000 y 90000 unidades), y realizando las medidas amperométricas correspondientes con tres electrodos preparados a partir de cada pastilla. Los registros corriente-tiempo obtenidos en cada caso cuando se aplica un potencial constante de -0.15 V , al cual se conoce que puede monitorizarse la reducción de la quinona producida (Liu et al., 1994a), se muestran en la Figura 28.

La corriente en estado estacionario aumenta considerablemente con la cantidad de enzima en la matriz electródica. Además, dicha corriente se alcanza más rápidamente a medida que aumenta el contenido de tirosinasa, indicando que, como era de esperar, hay un mayor número de centros activos en la superficie del electrodo, y, por tanto, la concentración de o-quinona en la capa de difusión es mayor. En consecuencia, se escogió una carga de tirosinasa en la matriz electródica de 90000 unidades para estudios posteriores.

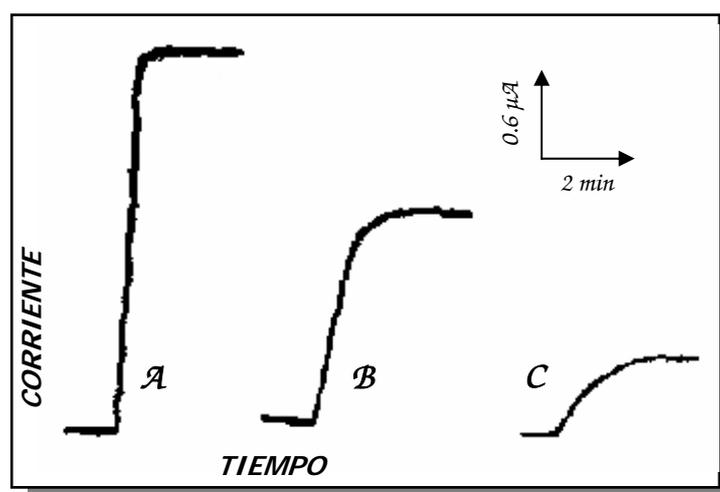


Figura 28. Registros intensidad de corriente-tiempo obtenidos con electrodos de grafito-Teflón en los que han sido inmovilizadas distintas cantidades de enzima: (A) 7200, (B) 36000 y (C) 90000 unidades; para fenol $1.0 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5). $E_{\text{ap}} = -0.15\text{ V}$.

IV.2.1.1.2. Electrodo de grafito-polímero de etilen/propilen/dieno-tirosinasa

Cuando se realizó el cálculo de umbral de percolación en este tipo de matrices electródicas, se puso de manifiesto que porcentajes superiores al 7-8% de aglutinante en la matriz de grafito-EPD daba lugar a una pobre conductividad. Por otra parte, las pastillas con cantidades de EPD menores de un 1% mostraban una pobre compacidad. Por lo tanto, se compararon las respuestas obtenidas con fenol $1.0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ como sustrato, con electrodos enzimáticos que contenían porcentajes de polímero comprendidos entre el 1 y el 7%. En Tabla 10 se recogen los resultados obtenidos. Como se puede observar, i_{ss} aumenta

a medida que el porcentaje de polímero disminuye. Sin embargo, la consistencia mecánica de los electrodos mejoraba notablemente con la cantidad de EPD presente. Considerando que no se apreciaban grandes diferencias en la corriente en estado estacionario entre un 2% y un 5% de EPD, se eligió finalmente este último para realizar los estudios posteriores.

Tabla 10. Corriente en estado estacionario (i_{ss}) obtenida con electrodos compósitos de grafito-EPD-tirosinasa construidos con diferentes porcentajes de EPD. Fenol 1.0×10^{-6} mol L^{-1} . pH 6.5. $E_{ap} = -0.15$ V.

% EPD (p/p)	i_{ss} μA
1	0.90 ± 0.07
2	0.75 ± 0.05
3	0.70 ± 0.02
5	0.68 ± 0.02
7	0.50 ± 0.03

Por lo que respecta a la cantidad de enzima incluida en la matriz electródica, se escogió la misma que para los electrodos de grafito-Teflón, es decir, 90000 unidades de tirosinasa, ya que con cantidades superiores de tirosinasa inmovilizada no mejoraban las respuestas amperométricas.

IV.2.1.1.3. Electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa

En este caso sólo se optimizó la cantidad de enzima inmovilizada en la matriz electródica, ya que el volumen de RVC (en forma de cilindro) es constante y la resina epoxi se utiliza únicamente para rellenar el volumen vacío del RVC. Para ello se construyeron tres biosensores diferentes con 4500, 9000 y 13500 unidades de enzima, respectivamente.

Se realizaron series de diez medidas amperométricas diferentes con cada electrodo sin regeneración de la superficie electródica para un nivel de concentración de fenol de 1.0×10^{-5} mol L^{-1} , en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH=6.5, aplicando un potencial constante de -0.15 V. Los valores medios de la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenidos con cada uno de los electrodos se recogen en la Tabla 11. Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación de 0.05.

TABLA 11. Intensidad de corriente en el estado estacionario para series de diez medidas de fenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} utilizando electrodos de RVC-resina epoxi-tirosinasa con diferentes cantidades de enzima inmovilizada. (pH=6.5; $E_{ap} = -0.15$ V).

UNIDADES DE TYR	i_{ss} μA
4500	0.020 ± 0.004
9000	0.040 ± 0.006
13500	0.045 ± 0.006

Como se puede observar, se produce un aumento de la señal muy marcado cuando el contenido de enzima pasa de 4500 a 9000 unidades, mientras que sólo se aprecia un ligero aumento de i_{ss} entre 9000 y 13500. Por otro lado, no se

observaron diferencias significativas en estabilidad entre ellos. Por consiguiente, se eligió una cantidad de enzima de 9000 unidades para construir el electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa en estudios posteriores.

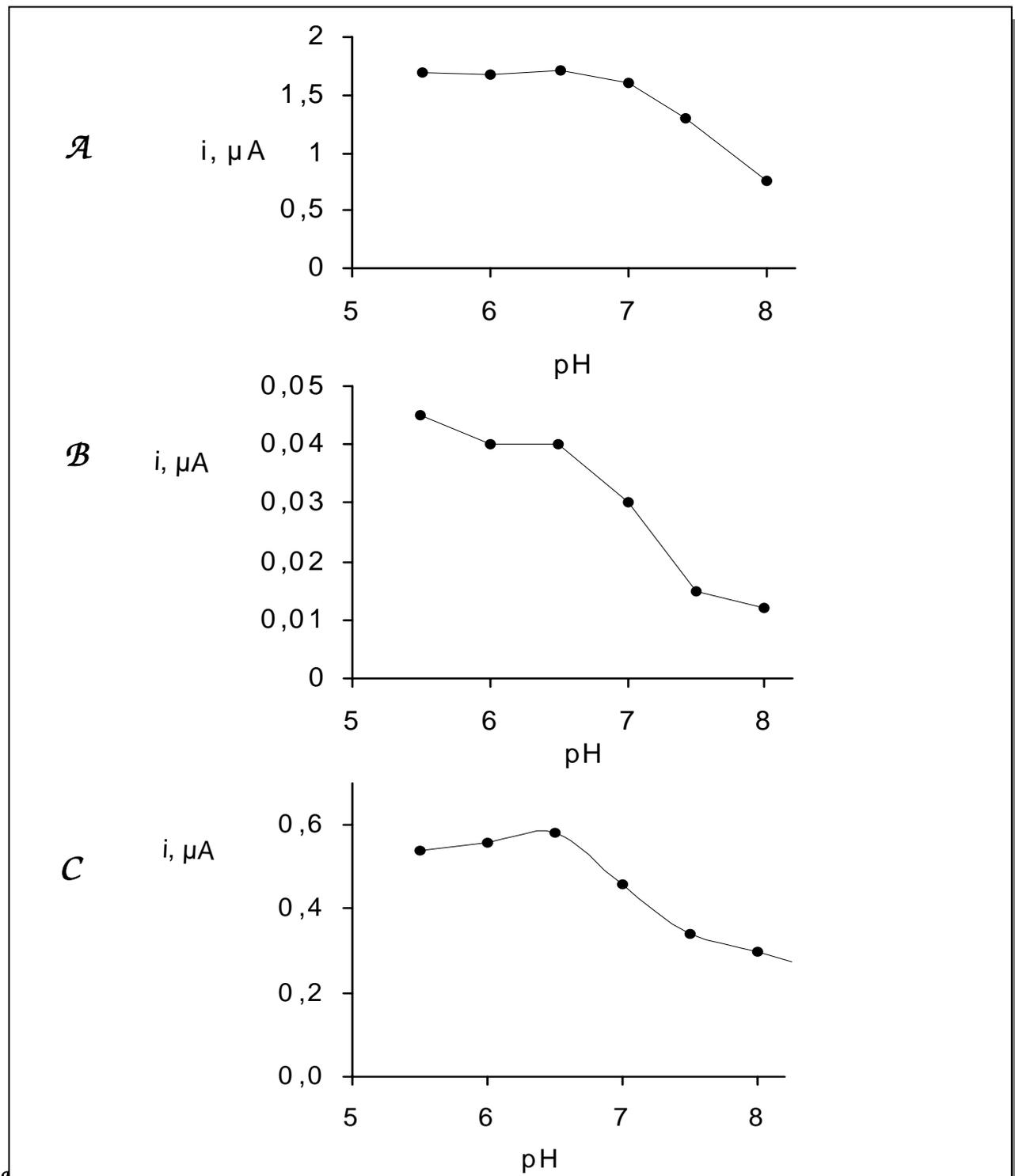
IV.2.1.2. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario

Se estudió la influencia del pH de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} sobre la intensidad de corriente en estado estacionario empleando fenol como sustrato, con cada una de las matrices electródicas.

Se evaluó dicha influencia en el intervalo de pH comprendido entre 5.5 y 8.0. Para los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa y de RVC-resina epoxi-tirosinasa, la concentración de fenol medida fue $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, mientras que con el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa dicha concentración fue $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, debido a que el límite superior del intervalo lineal del calibrado para este electrodo (véase el apartado IV.2.5) se encuentra a concentraciones menores que para los otros dos electrodos compósitos. En todos los casos se aplicó un potencial constante de -0.15 V . Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29.

Puede apreciarse cómo el hábito de la variación es similar en los tres casos, con una i_{ss} prácticamente constante entre pH 5.5 y pH 6.5, y una rápida disminución para pHs más básicos. En principio se pensó que esta disminución podría deberse a la dependencia de la reducción de las quinonas formadas con el pH, de modo que, a medida que éste se hace más básico el potencial de reducción de la quinona debe hacerse más reductor, ya que dicha reducción conlleva una transferencia de protones a la quinona. Sin embargo, cuando se estudió la dependencia de la i_{ss} para la reducción de quinona con el pH, a un potencial aplicado de -0.15 V , sobre un electrodo de grafito-Teflón (70%), se observaron respuestas de intensidad prácticamente constante en el intervalo de pH considerado (Figura 30). Esto permite concluir que no es la reducción electródica de la quinona la responsable de la disminución de la respuesta amperométrica de los biosensores a medida que el pH del medio aumenta.

Otra posibilidad es que la reacción enzimática esté menos favorecida a valores más altos de pH, ya que la especie fenólica que reacciona con la tirosinasa debe estar en forma neutra, no produciéndose señal apreciable cuando el fenol se encuentra como anión. Sin embargo, el pK_a del fenol (10.0) es demasiado alto como para poder considerar ésta la causa de la disminución de la señal que se observa.



tirosinasa, (B) RVC-epoxi-tirosinasa y (C) grafito-EPD-tirosinasa. Fenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} (A y B), 1.0×10^{-6} mol L^{-1} (C), en 5.0 mL de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} . $E_{ap} = -0.15$ V.

Por tanto, la única posibilidad que puede explicar el comportamiento de la respuesta obtenida con el pH, es que éste influya en la formación del complejo ES o en su ruptura. Así, puede suponerse que a valores de pH superiores a 6.5 se dificulta la formación o ruptura de este complejo. Por otro lado, el pH óptimo de la tirosinasa en disolución está alrededor de 6.5, según

se reporta en la bibliografía (Ortega et al., 1994), siendo éste, por tanto, el valor escogido para llevar a cabo los estudios posteriores con los tres biosensores compósitos de tirosinasa.

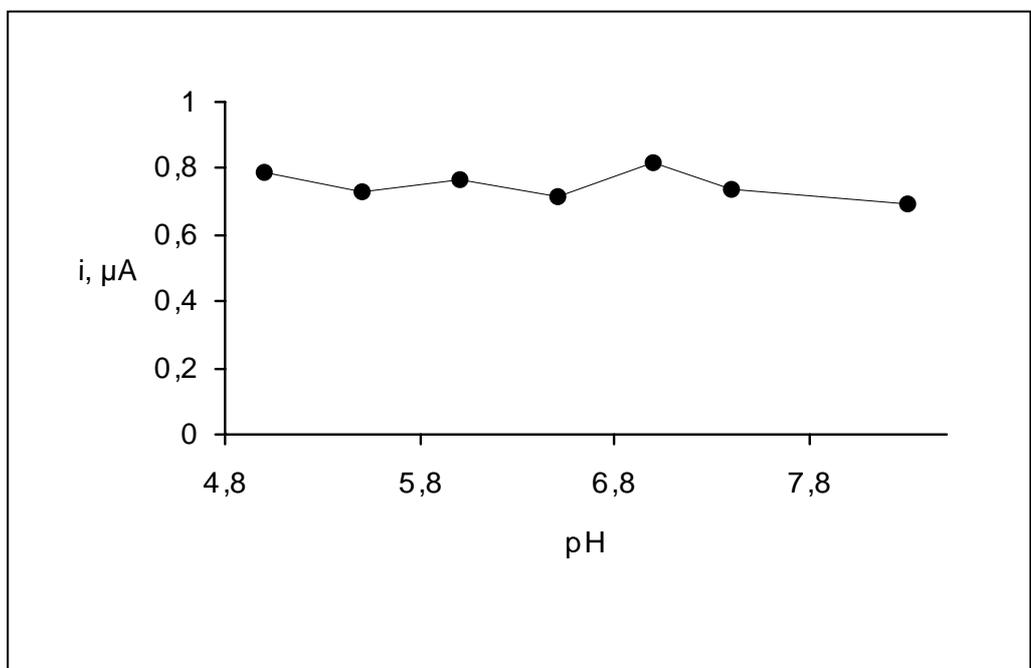


Figura 30. Influencia del pH de la disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida con un electrodo de grafito-Teflón (70%) de una disolución de quinona $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $E_{ap} = -0,15 \text{ V}$.

IV.2.1.3. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario

Esta influencia se evaluó empleando como sustrato 1.0×10^{-5} mol L^{-1} con los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa y de PVC-resina epoxi-tirosinasa, y 1.0×10^{-6} mol L^{-1} con el electrodo de grafito-EDP-tirosinasa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31.

Puede observarse un comportamiento similar para los tres electrodos compósitos. Se produce un rápido aumento de i_{ss} para potenciales más reductores de 0.10 V hasta -0.15 V, a partir del cual la intensidad de corriente en estado estacionario se mantiene prácticamente constante, excepto en el caso del electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa, para el que se observa una disminución de la señal analítica a potenciales menores de -0.15 V. Esta disminución puede deberse a la polimerización de la o-quinona producida en la reacción enzimática a estos potenciales (Liu et al., 1994).

Se ha escogido un potencial de -0.15 V, ya que éste es el valor menos negativo de la meseta de potencial obtenida. De este modo, el número de posibles interferentes susceptibles de reducirse sobre el electrodo puede minimizarse. Asimismo, se observó que tanto el ruido de fondo como el tiempo de estabilización de la línea base también aumentaban a medida que el potencial se hacía más negativo.

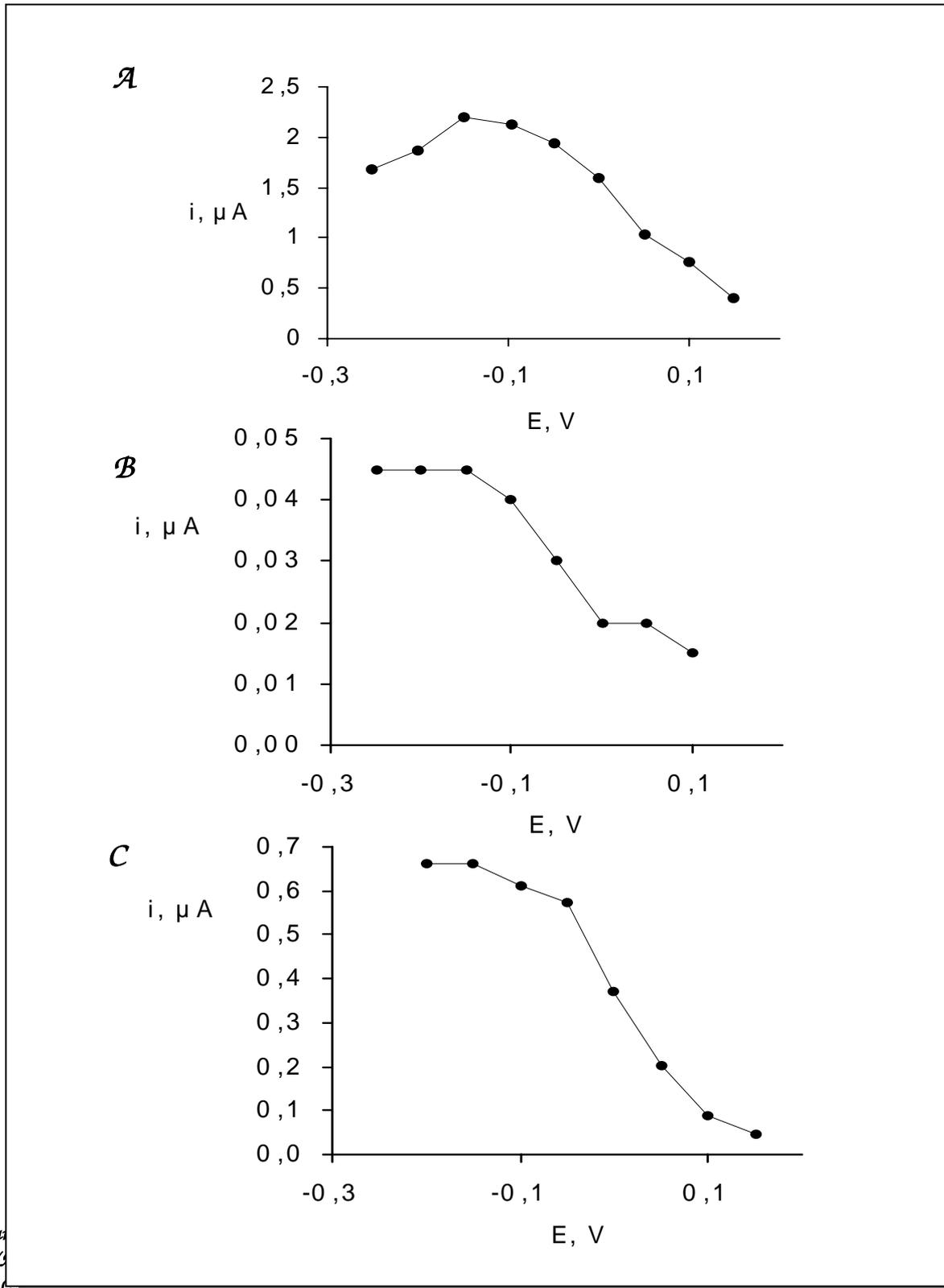


Figura de: (2 mol.L

pósitos .0x10⁶

IV.2.2. Estabilidad de los biosensores compósitos de tirosinasa

Uno de los aspectos más importantes a evaluar cuando se desarrolla un biosensor es su estabilidad, es decir, conocer cuánto tiempo y cuántas veces es posible utilizar un biosensor con una respuesta reproducible.

Dado que el medio de trabajo es acuoso, en el que la tirosinasa es soluble, podría pensarse en una pérdida de estabilidad de los electrodos debida a la solubilización de la enzima, ya que ésta se ha inmovilizado por simple atrapamiento físico en las tres matrices electródicas.

Los aspectos estudiados relacionados con la estabilidad de cada uno de los biosensores desarrollados son: repetibilidad de la señal para diferentes medidas sin pulir el electrodo, reproducibilidad de la señal amperométrica cuando se regenera la superficie del electrodo mediante pulido, reproducibilidad en la fabricación de los biosensores enzimáticos, tiempo de utilización del biosensor y efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre.

IV.2.2.1. Repetibilidad de medidas sucesivas sin regeneración de la superficie electródica

Se evaluó la repetibilidad de medidas sucesivas de la intensidad de corriente en estado estacionario obtenidas con los electrodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa y de RVC-resina epoxi-tirosinasa, para una concentración de fenol de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, y con el electrodo de grafito-EDP-tirosinasa para una concentración de fenol de $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Para ello se realizaron series de diez medidas sucesivas en disoluciones diferentes sin llevar a cabo ningún tipo de regeneración de la superficie electródica, a un potencial aplicado constante de -0.15 V .

En la Figura 32 se muestran los registros intensidad-tiempo obtenidos, y en la Tabla 12 se recogen los valores de i_{ss} con cada uno de los tres electrodos enzimáticos compósitos. Se muestran, además, los valores medios con su intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05, y los valores de la desviación estándar relativa.

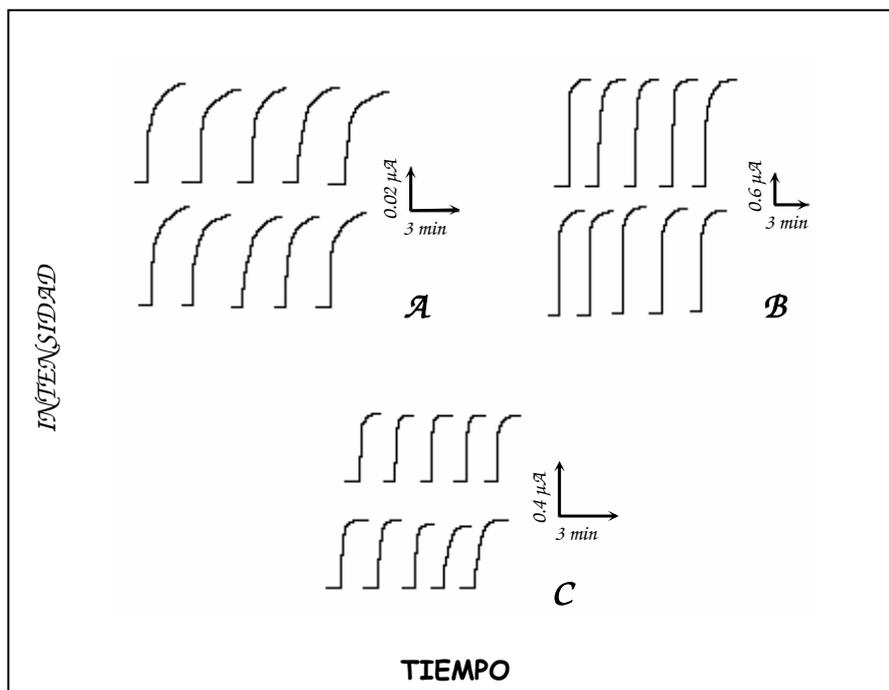


Figura 32. Registros intensidad-tiempo obtenidos en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 aplicando un potencial constante de -0.15V , con el electrodo de:

(A): grafito-Teflón-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

(B): RVC-resina epoxi-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

(C): grafito-EPD-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

El valor de la desviación estándar relativa, que no excede en ningún caso del 5.0%, indica que no hay diferencias significativas en las medidas obtenidas sin regeneración de la superficie del electrodo con cada uno de los electrodos compósitos. Por lo tanto, puede decirse que no existe pérdida aparente de actividad enzimática en este tipo de experimentos, lo que significa que la enzima no se solubiliza en el medio de trabajo.

El electrodo de grafito-EPD-tirosinasa permite obtener la mejor repetibilidad, aunque puede decirse que no hay grandes diferencias con el resto de biosensores compósitos.

En definitiva, puede decirse que los resultados obtenidos demuestran la buena repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas con los biosensores compósitos cuando no se regenera la superficie electrodo.

Tabla 12. Intensidad de corriente en el estado estacionario para medidas sucesivas realizadas sin regeneración de la superficie electrodo en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) aplicando un potencial constante de -0.15V , con cada uno de los electrodos desarrollados.

MEDIDA	$i, \mu\text{A}$			$\bar{i}, \mu\text{A}$			RSD, %		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1.66	0.64	0.044						
2	1.74	0.66	0.037						
3	1.84	0.66	0.038						
4	1.66	0.70	0.039						
5	1.82	0.66	0.040						
6	1.80	0.68	0.040	1.78 ± 0.05	0.66 ± 0.01	0.040 ± 0.001	4.0	2.8	5.0
7	1.82	0.64	0.040						
8	1.86	0.68	0.041						
9	1.80	0.66	0.039						
10	1.74	0.66	0.042						

1: Grafito-Teflón-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

2: Grafito-EPD-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

3: RVC-resina epoxi-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.2.2.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electrodo por pulido

Una de las ventajas más interesantes de los electrodos compósitos enzimáticos, es la posibilidad de obtener una nueva superficie electrodo, y por tanto un "nuevo" biosensor, mediante un simple pulido de dicha superficie. Por este motivo, uno de

los estudios que se deben realizar en la caracterización de este tipo de electrodos es la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas después de llevar a cabo la regeneración de la superficie electrodo mediante el rápido proceso de pulido descrito en el apartado III.3.3 de la Parte Experimental.

Este estudio se llevó a cabo realizando 3 medidas diferentes después de cada pulido, para una concentración de fenol en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para los electrodos de grafito-Teflón-Tyr y de RVC-resina epoxi-Tyr, y de $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para el de grafito-EPD-Tyr, aplicando un potencial constante de -0.15 V . Se realizaron un total de 10 pulidos con cada tipo de electrodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13, dándose el valor medio de cada serie de 3 medidas y la desviación estándar relativa para los 10 valores medios de la corriente de cada serie, después de pulir la superficie de cada electrodo. El intervalo de confianza está calculado para un nivel de significación de 0.05.

Tabla 13. Intensidad de corriente en el estado estacionario para las medidas realizadas previa regeneración de la superficie electrodo mediante pulido. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Nº de pulido	$i, \mu\text{A}$			$\bar{i}, \mu\text{A}$			RSD, %		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1.87	0.62	0.039						
2	1.71	0.59	0.040						
3	1.90	0.60	0.038						
4	1.87	0.61	0.041						
5	1.81	0.59	0.035	1.83 ± 0.06	0.61 ± 0.01	0.038 ± 0.002	4.4	2.4	5.6
6	1.83	0.62	0.036						
7	1.73	0.63	0.041						
8	1.94	0.62	0.036						
9	1.74	0.62	0.038						
10	1.91	0.63	0.039						

- 1: Grafito-Teflón-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.
- 2: Grafito-EPD-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.
- 3: RVC-resina epoxi-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A modo de ejemplo en la Figura 33 se muestran tres series de tres medidas para cada uno de los electrodos, habiéndose pulido la superficie electrodo antes de realizar cada una de las series.

Los valores de RSD obtenidos son en todos los casos menores del 6%, lo que indica que los tres electrodos compósitos de tirosinasa permiten obtener respuestas amperométricas reproducibles después de someterlos al proceso de regeneración de la superficie electrodo. Esto significa que la enzima está distribuida uniformemente en el seno de la matriz del electrodo en todos los casos. No obstante, de nuevo la RSD es menor para el biosensor de grafito-EPD, lo que puede atribuirse a las diferencias existentes en los procesos de fabricación. El hecho de que en el caso de las pastillas de grafito-EPD-tirosinasa el

material aglutinante (polímero de propileno-etileno-dieno) se disuelva en ciclohexano antes de mezclarlo con el grafito y la enzima, puede facilitar que la mezcla final resulte más homogénea que la de los otros dos electrodos. En el caso de los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa, el Teflón se añade sólido y se mezcla manualmente con el grafito modificado con la enzima, mientras que el electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa se construye sumergiendo el cilindro de RVC en una disolución de tirosinasa y evaporando posteriormente el disolvente, por lo que el reparto de enzima podría no ser tan homogéneo como en el caso de los biosensores de grafito-EPD.

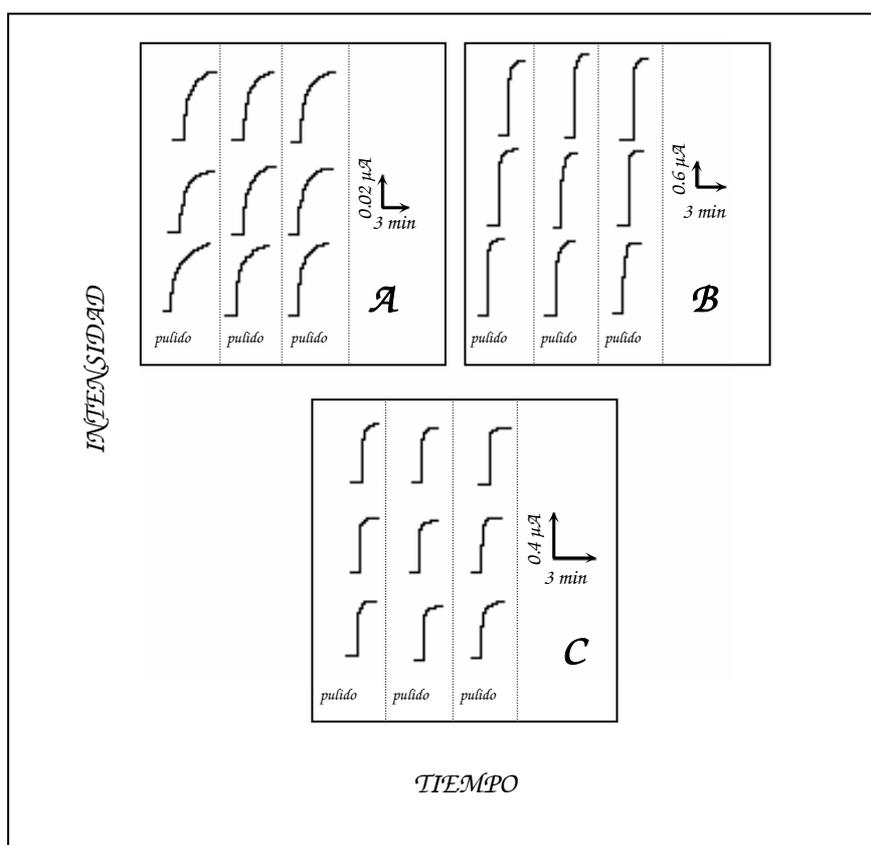


Figura 33. Registros intensidad-tiempo obtenidos en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} ($\text{pH } 6.5$), aplicando un potencial constante de -0.15 V y puliendo la superficie electrodica antes de realizar cada serie de tres medidas:

A: grafito-Teflón-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

B: RVC-resina epoxi-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

C: grafito-EPD-tirosinasa. Fenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.2.2.3. Tiempo de vida útil de los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa, grafito-EPD-tirosinasa y RVC-resina epoxi-tirosinasa

Según el tiempo de utilización continuada de un biosensor, es posible clasificarlos en dos categorías. La primera corresponde a biosensores de un solo uso, que se desechan tras realizar cada medida. El segundo tipo de biosensores se diseña para llevar a cabo varias medidas con el mismo dispositivo, es decir, son reutilizables. Los biosensores desarrollados en este trabajo pertenecen a este segundo tipo, y por ello es importante conocer cuánto tiempo puede funcionar el mismo biosensor

proporcionando señales reproducibles, tanto sin pulir la superficie electródica como puliéndola cuando la señal obtenida disminuía de modo significativo. Como es obvio, un mayor tiempo de vida útil del biosensor conlleva un ahorro de tiempo y costes.

En este apartado se comparan los tiempos de vida útil de un biosensor para los tres biomateriales compósitos. Para ello, se realizaron cada día tres medidas de disoluciones diferentes de fenol 1.0×10^{-5} mol l⁻¹ en el caso de los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa y de RVC-resina epoxi-tirosinasa y 1.0×10^{-6} mol l⁻¹ para el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa.

Con objeto de saber cuándo era necesario regenerar la superficie electródica por pulido debido a una disminución significativa de la señal amperométrica con respecto a las anteriores, se construyeron los correspondientes gráficos de control para cada uno de los electrodos. Como período base para la determinación del valor central y de los límites superior e inferior de control, se tomaron las medidas de las señales amperométricas obtenidas en el estudio de repetibilidad sin regeneración de la superficie electródica (apartado IV.2.2.1). Como valor central del gráfico de control se tomó el valor medio de dichas medidas y los límites superior e inferior se pusieron a $\chi+3s$ y $\chi-3s$, respectivamente. Los valores de estos parámetros están indicados en los correspondientes gráficos de control para cada uno de los biosensores compósitos (Figura 34). En todos los casos, cuando se observaba que un valor medio de las tres medidas realizadas cada quedaba por debajo del límite inferior de control, se procedió a la regeneración de la superficie del electrodo por pulido, de modo que la señal podía entonces reestablecerse dentro de los límites de control.

Para los tres electrodos diseñados, fue necesario pulir la superficie del electrodo al comienzo de cada jornada de trabajo para obtener una señal dentro de los límites del gráfico de control. Después de período inicial, se pudo seguir trabajando normalmente con el electrodo sin pérdida aparente de actividad enzimática durante toda la jornada de trabajo. Como se verá posteriormente, esta necesidad de pulir diariamente el biosensor antes de comenzar el trabajo, no concuerda con lo observado para el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas (apartado IV.3), donde el biosensor puede utilizarse durante varios días sin necesidad de regenerar la superficie del electrodo cada día. Este diferente comportamiento puede deberse a que, en el medio acuoso, los productos de la reacción enzimática y el propio fenol queden retenidos en los poros de la matriz electródica y produzcan la inactivación de la enzima o bien reacciones de polimerización que ensucian la superficie del electrodo durante el período de almacenamiento entre las jornadas de trabajo. Puesto que las micelas inversas es un medio predominantemente no acuoso, los productos de la reacción enzimática y el fenol se disuelven más fácilmente, minimizándose, de este modo, la posibilidad de inactivación de la enzima o del ensuciamiento superficial por polimerización.

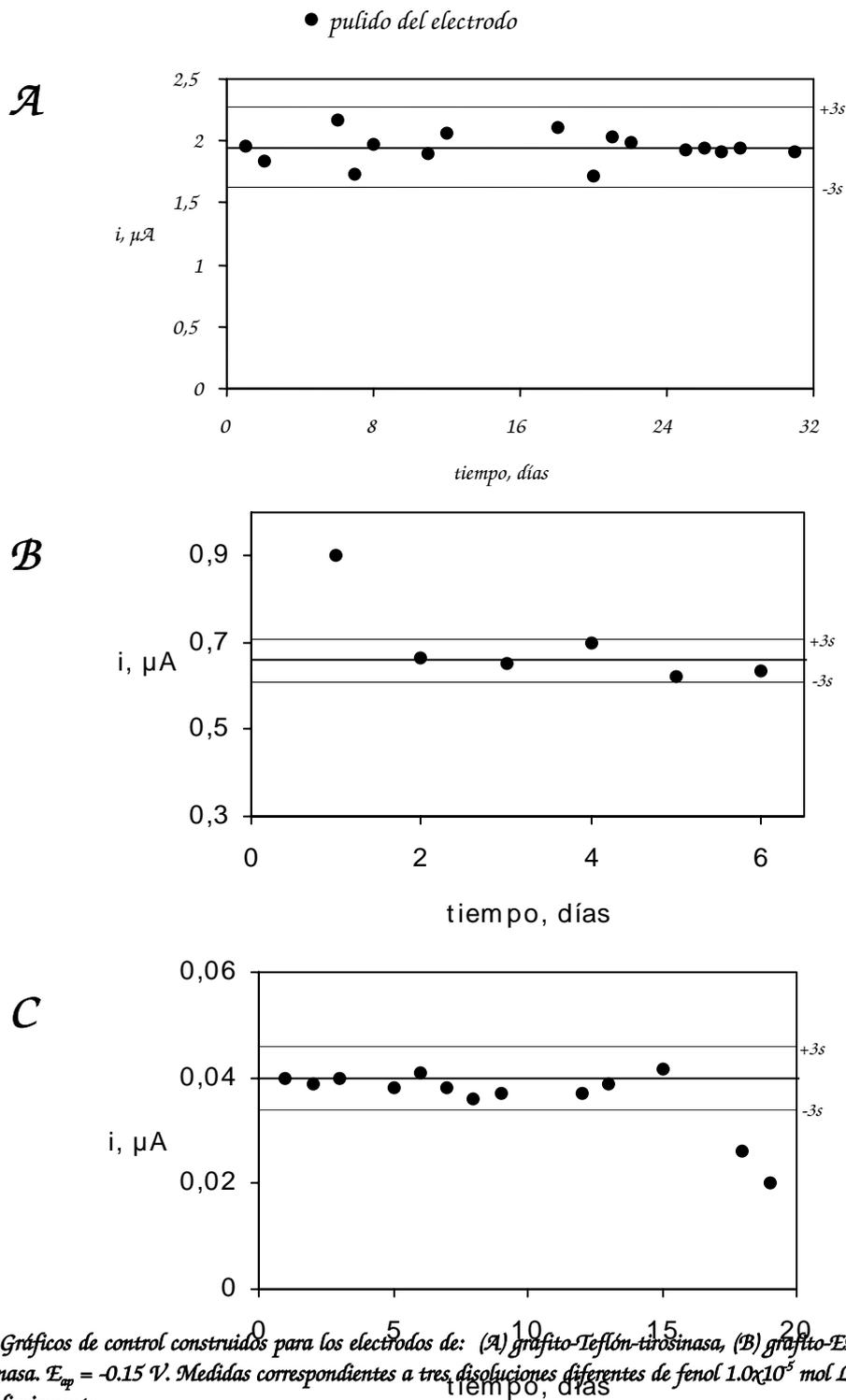


Figura 34. Gráficos de control construídos para los electrodos de: (A) grafito-Teflón-tirosinasa, (B) grafito-EPD-tirosinasa y (C) RVC-resina epoxi-tirosinasa. $E_{ap} = -0.15 V$. Medidas correspondientes a tres disoluciones diferentes de fenol $1.0 \times 10^{-5} mol L^{-1}$ (A y C) ó $1.0 \times 10^{-6} mol L^{-1}$ (B) efectuadas diariamente.

Como se puede ver en la Figura 34, el biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa proporciona valores medios de la señal amperométrica dentro de los límites de control durante 30 días. Transcurrido este tiempo, no se pudo recuperar la señal por pulido de la superficie electrodica, debido a que la repetición del proceso de pulido da lugar a que el electrodo acabe consumiéndose. Por ello, es más correcto hablar de días de trabajo en lugar de periodos de tiempo en los que se puede utilizar cada uno de los electrodos construídos. Así por ejemplo, un electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa construído a partir de

pastillas de aproximadamente 2 mm de espesor puede ser utilizado durante 15 días proporcionando una respuesta constante. Sin embargo, pastillas con un espesor mayor podrán ser utilizadas durante más días de trabajo, ya que pueden someterse a un número de pulidos mayor sin que el electrodo se consuma.

El gráfico de control para el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa muestra que este biosensor tiene un tiempo de vida operacional mucho más corto (5 días). Esto es debido a que en este caso es necesario pulir durante más tiempo (alrededor de 10s) para poder recuperar la señal. Este hecho se atribuyó a una mayor contaminación de la matriz electródica por los productos de la reacción enzimática.

Por lo que se refiere al electrodo de RVC-resina epoxy-tirosinasa, el tiempo de vida útil del electrodo viene determinado, en este caso, por una pérdida de la actividad enzimática, ya que transcurridos 17 días, no fue posible recuperar la respuesta amperométrica mediante pulido. Es posible que la actividad enzimática se vea alterada por la matriz electródica, como consecuencia de un proceso de maduración de la resina epoxy a lo largo de los días que podría provocar la desactivación de la enzima.

Por último, hay que señalar que en el gráfico de control del electrodo de grafito-EPD-Tyr (Figura 34B) se observa cómo el primer día de utilización la intensidad de corriente es considerablemente más elevada que la que se obtiene los días sucesivos y que, posteriormente, se mantiene constante. Por ello, las medidas que se realizan para el establecimiento del valor central y de los límites superior e inferior del gráfico de control corresponden al segundo día de empleo del electrodo. Este comportamiento puede atribuirse a una reestructuración del material compuesto a nivel microscópico al aplicar un potencial, lo que puede provocar una inactivación parcial de la enzima.

IV.2.2.4. Reproducibilidad de las medidas realizadas con diferentes electrodos

El hecho de que un biosensor pierda actividad con el tiempo o llegue a ser inutilizable después de una regeneración repetitiva de la superficie electródica hace necesario que el electrodo biocompuesto tenga que sustituirse por uno nuevo cuando las respuestas amperométricas no puedan ser recuperadas por pulido. Por consiguiente, la reproducibilidad de las respuestas analíticas obtenidas con diferentes electrodos construidos de igual manera para cada uno de los tipos de electrodo es un aspecto importante para evaluar la utilidad práctica real de los biosensores compósitos.

En el caso de los biosensores de grafito-Teflón-tirosinasa y de grafito-EPD-tirosinasa, la reproducibilidad se evaluó para cuatro electrodos diferentes, dos de los cuales se construyeron a partir de la misma pastilla madre, y los otros dos a partir de una pastilla madre diferente, mientras que en el caso de los electrodos de RVC-resina epoxy-tirosinasa, la reproducibilidad se evaluó a partir de las medidas obtenidas con seis electrodos diferentes. Los resultados se resumen en la Tabla 14.

La desviación estándar relativa para los valores medios de los 4 electrodos fue de 5.0 y 4.3% para los biosensores de grafito-Teflón y grafito-EPD, respectivamente, y de 5.6% para los 6 electrodos de RVC-resina epoxi. Estos resultados indican que los procedimientos de fabricación de los biosensores compósitos de tirosinasa son fiables en todos los casos, y permiten obtener respuestas amperométricas reproducibles con distintos electrodos construidos siguiendo el mismo procedimiento.

Tabla 14. Medidas de intensidad de corriente en el estado estacionario obtenidas con diferentes electrodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa, grafito-EPD-tirosinasa y RVC-resina epoxi-tirosinasa en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} , pH 6.5; concentración de fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para el electrodo de grafito-Teflón y RVC-resina epoxi y de $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para el de grafito-EPD; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Biosensor	Pastilla	Electrodo	$i, \mu\text{A}$	RSD, %	$\bar{i}, \mu\text{A}$	RSD, %
Grafito-Teflón-Tyr	1	1	1.76 ± 0.04	4.8	1.8 ± 0.1	5.0
		2	1.80 ± 0.08	5.6		
	2	1	1.83 ± 0.07	5.5		
		2	1.97 ± 0.07	4.8		
Grafito-EPD-Tyr	1	1	0.66 ± 0.01	2.8	0.69 ± 0.05	4.3
		2	0.68 ± 0.02	3.2		
	2	1	0.69 ± 0.02	3.8		
		2	0.73 ± 0.02	4.1		
RVC-resina epoxi-Tyr		1	0.039 ± 0.002	4.3	0.041 ± 0.002	5.6
		2	0.040 ± 0.003	5.8		
		3	0.044 ± 0.002	3.6		
		4	0.038 ± 0.003	6.0		
		5	0.043 ± 0.003	5.3		
		6	0.040 ± 0.002	5.0		

IV.2.2.5. Efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre

Por último, se comprobó si se producía pérdida de actividad enzimática de las pastillas madre tras un periodo largo de almacenamiento a 4°C y en seco.

En el caso de la pastilla de grafito-Teflón-tirosinasa, el último electrodo construido a partir de la misma pastilla se utilizó siete meses después de preparada ésta, obteniéndose señales amperométricas similares (y reproducibles) a las que se midieron con un electrodo usado inmediatamente después de fabricada la pastilla. Esto indica que no hay una pérdida apreciable de la actividad de la enzima inmovilizada en la matriz de grafito-Teflón en dicho período de tiempo.

Conclusiones análogas pueden deducirse del comportamiento de los electrodos fabricados a partir de una pastilla de grafito-EPD-tirosinasa después de cuatro meses de almacenamiento.

Como conclusión de todos estos estudios de estabilidad, puede decirse que se ha demostrado que los tres diseños de biosensores compósitos estudiados poseen una buena estabilidad y robustez. No obstante, debe destacarse la mayor reproducibilidad de las respuestas obtenidas con los electrodos de grafito y el polímero etilen/propilen/dieno en relación a los otros dos tipos de biosensores, así como el mayor tiempo de vida útil de los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa en comparación con el resto.

IV.2.3. Causas de la variabilidad de las respuestas de los electrodos compósitos de tirosinasa

Puesto que la finalidad última del desarrollo de estos biosensores es la posibilidad de su aplicación al análisis de muestras reales "in situ", con objeto de servir como dispositivos de alarma para posibles contaminaciones puntuales, estos electrodos enzimáticos deben ser adecuados para los análisis de rutina. Ello quiere decir que ha de establecerse de una manera sencilla y rápida si su respuesta analítica es adecuada o no. Evidentemente, el factor más importante a evaluar es la magnitud de la respuesta amperométrica, que es lo que se va a relacionar con la concentración del analito, aunque existen otros factores, como son la corriente de fondo o la reproducibilidad, que también influyen notablemente en las características operacionales del biosensor.

Es un hecho bien conocido que muchos de los detectores electroquímicos, modificados o no, muestran una falta de reproducibilidad con el tiempo, así como entre electrodos (Luque et al., 1999). En el apartado anterior ya se ha discutido la estabilidad de los biosensores desarrollados bajo diferentes factores considerados de forma individual, habiéndose obtenidos resultados que pueden calificarse de muy positivos en los tres casos. Sin embargo, y con objeto de detectar cuáles son las principales causas de la variabilidad en la respuesta de nuestros biosensores, se ha realizado un ANOVA multifactorial Tipo III, considerando todas las variables conjuntamente. Los factores que se han tenido en cuenta son: lote de enzima suministrado por la casa comercial (lote), pastilla madre a partir de la cual se construyen los diferentes electrodos (pastilla), electrodo con el que se obtienen las señales amperométricas (electrodo), día en el que se realizan los experimentos contado a partir del primer día de uso del electrodo (día), y número de medida realizada dentro de un mismo día (medida). El factor pastilla, como es lógico, no se considera cuando se trata de los electrodos de RVC-resina epoxi-Tyr.

Para aplicar el método ANOVA, se ha tomado como variable dependiente el valor de intensidad de corriente en el estado estacionario obtenido para todas las medidas de control realizadas con los tres electrodos de tirosinasa. Estos valores de intensidad se recogen en el anexo I. Puesto que todos los electrodos se han fabricado a partir de tres lotes de enzima diferentes suministrados por la casa comercial, se ha denominado lote 1 al primero recibido, lote 2 al segundo y lote 3 al tercero. De cada lote de enzima se han fabricado dos pastillas madre de grafito-Teflón-Tyr y dos de grafito-EPD-Tyr, a excepción del lote 2, con el cual sólo se fabricaron pastillas de grafito-Teflón. Asimismo, con cada lote se fabricaron varios electrodos de RVC-resina epoxi-Tyr. Por tanto, se ha designado como pastilla 1 a las primeras pastillas de cada tipo de biosensor fabricadas con cada lote. De la misma manera, se ha denominado electrodo 1 a todos los primeros electrodos construidos a partir de cada pastilla, electrodo 2 a los segundos, y así sucesivamente. Hay que destacar que no se ha excluido ningún dato de los obtenidos con todos los biosensores fabricados durante la realización de esta Tesis, a excepción de los que se midieron cuando ya no era posible recuperar la señal por pulido, es decir, cuando, según el gráfico de control, se consideraba que el electrodo ya no era operativo.

En las Tablas 15, 16 y 17 se recogen los resultados obtenidos con el ANOVA para los datos disponibles de los biosensores de grafito-Teflón-tirosinasa, grafito-EPD-tirosinasa y RVC-resina epoxi-tirosinasa, respectivamente.

Tabla 15. ANOVA multifactorial Tipo III aplicado a la respuesta amperométrica obtenida con un electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa para un nivel de concentración de fenol de $1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ en disolución de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5); $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Análisis de la Varianza para intensidad - Suma de cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Fcalc	p
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:lote	0,140517	2	0,0702584	3,70	0,0266
B:pastilla	0,0205168	1	0,0205168	1,08	0,2999
C:electrodo	0,169849	3	0,0566164	2,98	0,0327
D:dia	0,703092	18	0,0390606	2,06	0,0091
E:medida	0,146935	15	0,00979569	0,52	0,9296
RESIDUAL	3,37869	178	0,0189814		
TOTAL (CORREGIDO)	4,96292	217			

gl: grados de libertad; p: nivel de probabilidad.

Número de casos completos: 218

Tabla 16. ANOVA multifactorial Tipo III aplicado a la respuesta amperométrica obtenida con un electrodo de grafito-EPD-tirosinasa para un nivel de concentración de fenol de $1.0 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$ en disolución de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5); $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Análisis de la Varianza para intensidad - Suma de cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Fcalc	p
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:lote	0,199066	1	0,199066	32,74	0,0000
B:pastilla	0,0185793	1	0,0185793	3,06	0,0820
C:electrodo	0,0854803	7	0,0122115	2,01	0,0557
D:dia	6,85496	7	0,97928	161,05	0,0000
E:medida	0,0298135	9	0,00331261	0,54	0,8406
RESIDUAL	1,22831	202	0,00608073		
TOTAL (CORREGIDO)	9,16684	227			

gl: grados de libertad; p: nivel de probabilidad.

Número de casos completos: 228

Tabla 17. ANOVA multifactorial Tipo III aplicado a la respuesta amperométrica obtenida con un electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa para un nivel de concentración de fenol de $1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ en disolución de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5); $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Análisis de la Varianza para intensidad - Suma de cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Fcalc	p
A:lote	0,00119164	2	0,000595818	11,12	0,0000
B:electrodo	0,00755786	5	0,00151157	28,22	0,0000
C:dia	0,000468536	11	0,0000425942	0,80	0,6443
D:medida	0,000141405	16	0,00000883782	0,17	0,9999
RESIDUAL	0,00530252	99	0,0000535608		

TOTAL (CORREGIDO)	0,0149412	133
-------------------	-----------	-----

gl: grados de libertad; p: nivel de probabilidad.

Número de casos completos: 134

En la tabla ANOVA se descompone la variabilidad de la intensidad de corriente según las contribuciones de cada factor. Puesto que se ha escogido el Tipo III de suma de cuadrados, la contribución de cada factor se mide habiendo eliminado los efectos de los demás factores. Los criterios empleados para conocer si los factores tienen un efecto significativo, es decir, si influyen en la variabilidad de la señal de forma significativa son el criterio F de Fischer, mediante la comparación de la $F_{calculada}$ y la $F_{tabulada}$ para un nivel de significación de 0.05, y el criterio p , según el cual, los valores de p calculados menores de 0.05 tienen efecto estadísticamente significativo para un nivel de probabilidad del 95.0%.

De los valores de p y de F calculados puede deducirse que en los tres casos el factor número de medida no tiene efecto significativo sobre la intensidad de corriente obtenida. En la Figura 35 se muestran los valores medios de las respuestas amperométricas en función del número de medidas realizadas. Así, por ejemplo, la medida 1 significa la primera medida realizada cada día con todos los electrodos fabricados en esta Tesis. Se observa que el intervalo de confianza es cada vez más amplio como consecuencia de que la media está calculada con un número menor de datos cuando el número de medida es mayor, por lo que la incertidumbre aumenta. Esto ocurre porque aunque todos los días se realizaron algunas medidas de control, no todos los días se hicieron el mismo número (véase Anexo I). Con fines comparativos, se han incluido en la Figura 35, así como en el resto de las Figuras de este apartado, los límites de los gráficos de control construidos en el apartado IV.2.2.3.

El factor día, en cambio, tiene una influencia significativa en la variabilidad de la señal para los biosensores construidos con EPD y Teflón, como se deduce a partir de los valores calculados de p y de F . En la Figura 36 se muestran las respuestas en función del día con sus correspondientes intervalos de confianza. Como se puede observar, en el primer día de utilización de los electrodos de grafito-EPD-Tyr se obtiene una intensidad de corriente más elevada, comportamiento ya discutido en el apartado IV.2.2.3 y atribuido a la reestructuración microscópica del material que constituye la pastilla. A partir del segundo día de medida, la intensidad de las señales decrece muy lentamente, por lo que el efecto significativo del factor día en la variabilidad de la señal es debido a esta pérdida inicial de actividad enzimática.

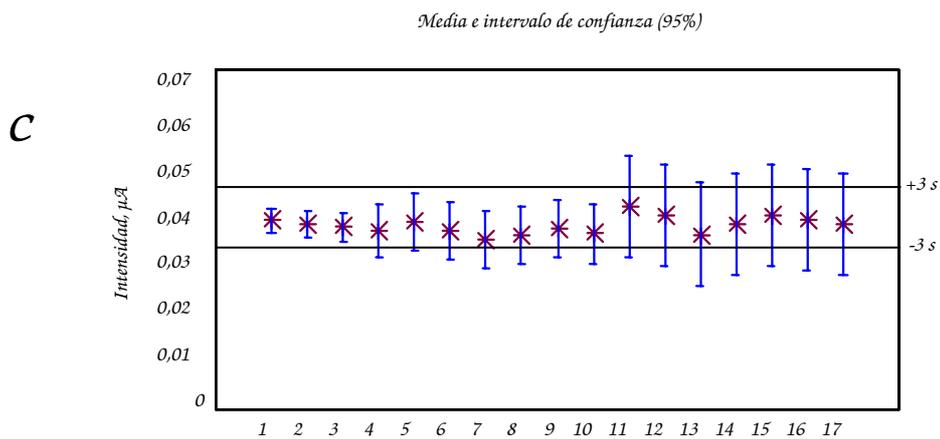
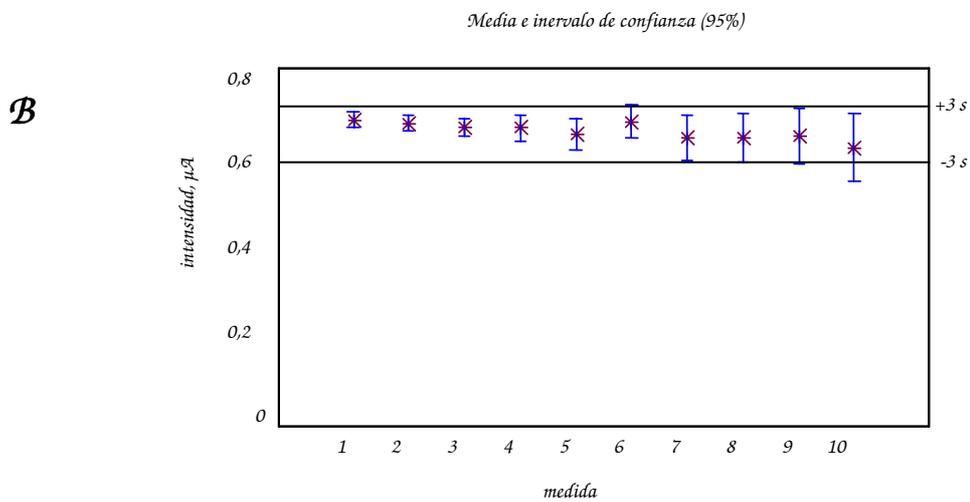
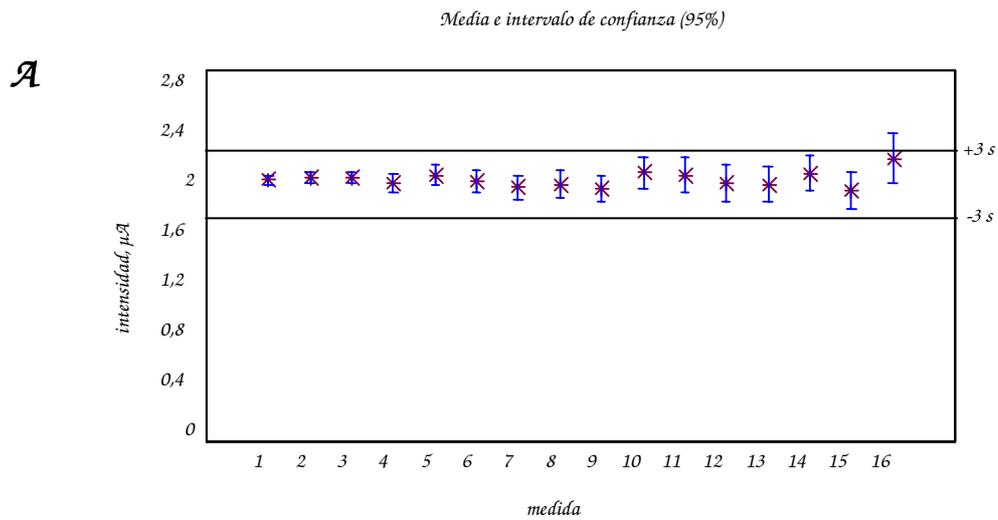


Figura 35. Media e intervalo de confianza de la respuesta amperométrica para medidas con los electrodos de (A): grafito-Teflón-Tyr; (B): grafito-EPD-Tyr; (C): RVC-resina epoxi-Tyr. Otros datos como en Tabla 16.

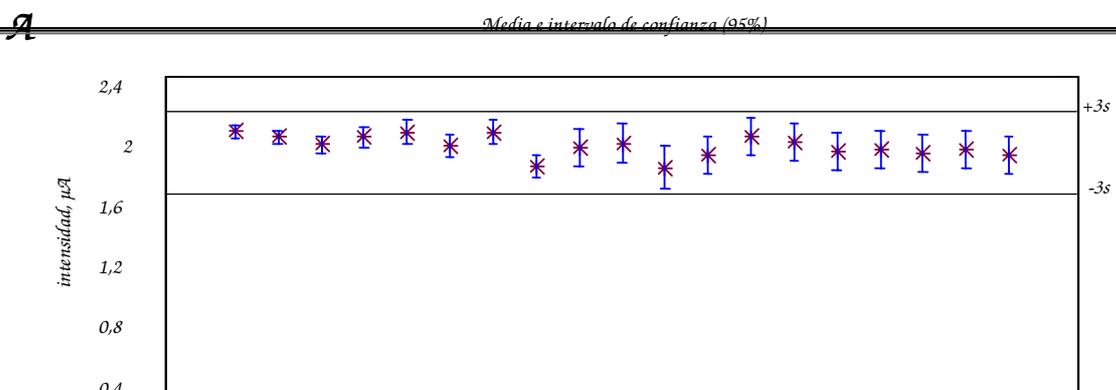


Figura 36. Media e intervalo de confianza de la respuesta amperométrica según los días de medida. (A): grafito-Teflón-Tyr; (B): grafito-EPD-Tyr; (C): RVC-resina epoxi-Tyr.

De los gráficos de la Figura 36, en los que se han incluido los límites superior e inferior de los gráficos de control para un solo electrodo, se puede deducir que la variación de la señal en función de los días de medida para todos los electrodos considerados conjuntamente se aproxima mucho a la variación que se obtuvo para un solo electrodo, ya que la respuesta amperométrica media de todos los electrodos está incluida dentro de los límites de control que se establecieron para un solo electrodo, a excepción del primer día en el caso del grafito-EPD-Tyr.

En la Figura 37 se muestra la variación de la respuesta de los biosensores en función del electrodo utilizado. Puesto que el primer electrodo fabricado a partir de cada pastilla (o de cada lote en el caso del RVC-resina epoxi-Tyr) es el denominado electrodo 1, el segundo es el 2, y así sucesivamente, se podrá verificar si a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento de la pastilla madre se produce una pérdida de la actividad enzimática y los electrodos proporcionan respuestas de menor intensidad. En las tablas ANOVA se observa que hay efecto significativo en la variabilidad de la señal según el electrodo utilizado para los biosensores de grafito-Teflón-Tyr y de RVC-resina epoxi-Tyr.

Dos de los electrodos de RVC-resina epoxi-Tyr fabricados fueron desechados puesto que la media de sus medidas del primer día fue mucho menor que el intervalo de confianza obtenido para el primer electrodo desarrollado. Estos dos electrodos no se incluyeron en el estudio de reproducibilidad entre electrodos del apartado IV.2.2.4.3, pero sí en el ANOVA. Estos resultados demuestran que el proceso de fabricación de los biosensores basados en el carbono vítreo reticulado es menos reproducible que el de los otros dos tipos de electrodos. Esto puede deberse al hecho de que en este caso, es necesario pesar una cantidad de enzima mucho menor que en los biosensores basados en grafito, y el error en la pesada se traduce en una mayor dispersión de las respuestas amperométricas de estos electrodos, y también a que cada electrodo se fabrica de manera individual mediante un proceso más complejo.

En ninguno de los tres casos se observa que la respuesta vaya disminuyendo a medida que el electrodo se toma de una pastilla almacenada durante más tiempo, por lo que efectivamente se demuestra que el método de almacenamiento es adecuado.

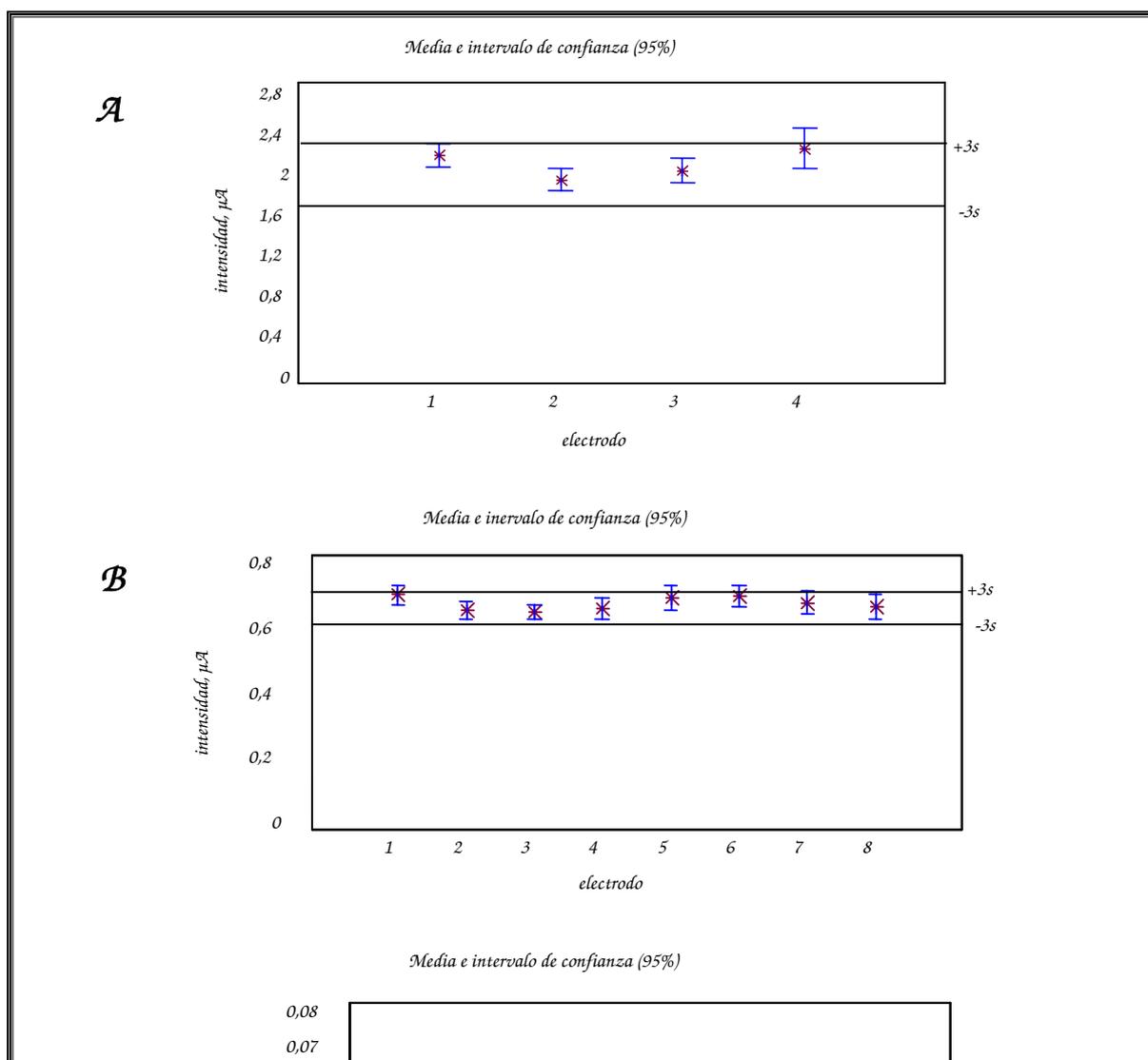


Figura 37. Media e intervalo de confianza de la respuesta amperométrica según el electrodo utilizado. (A): grafito-Teflón-Tyr; (B): grafito-EPD-Tyr; (C): RVC-resina epoxi-Tyr.

En la Figura 38 se muestra la media de las respuestas obtenidas con todos los electrodos fabricados a partir de la primera pastilla de cada lote y a partir de la segunda. Aunque los valores de p de las Tablas ANOVA indican que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con la primera pastilla y con la segunda de cada lote de enzima, en la Figura 38 se observa que la media de los resultados de la pastilla 2 es menor con ambos biosensores, lo cual parece indicar que aunque el bote comercial de enzima se conserve en el congelador, se va produciendo una disminución de la actividad enzimática con el tiempo.

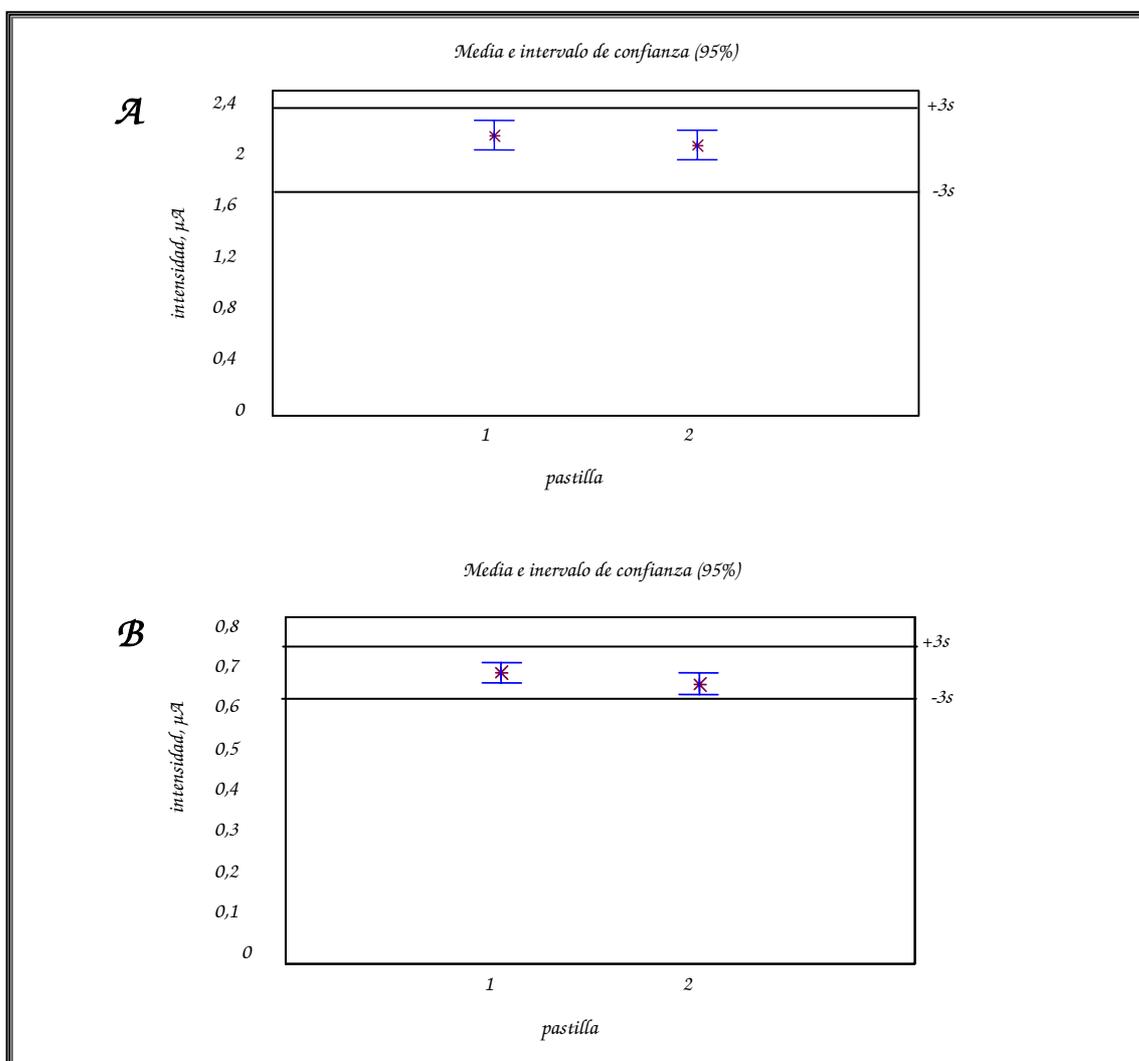
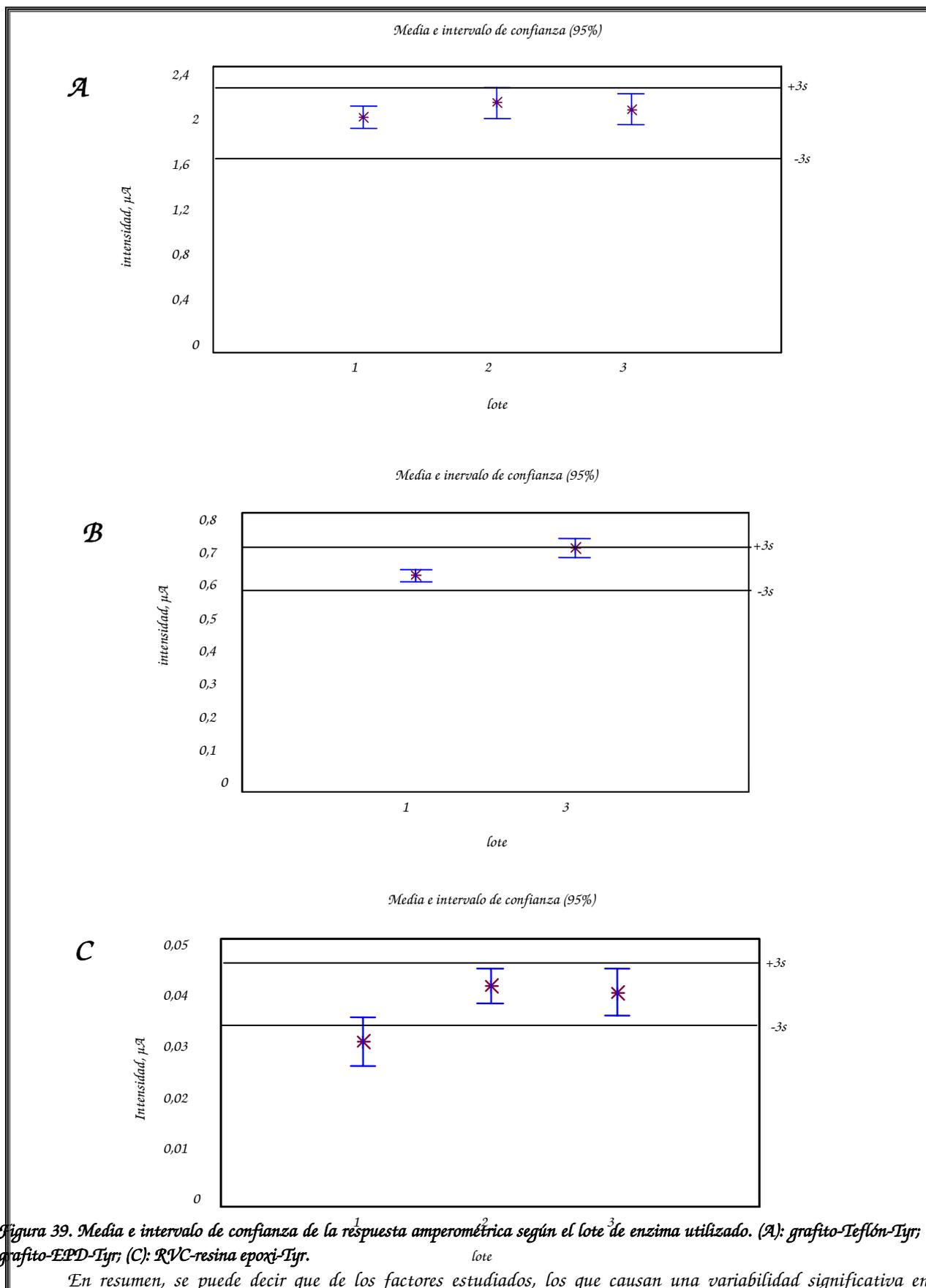


Figura 38. Media e intervalo de confianza de la respuesta amperométrica según la pastilla utilizada. (A): grafito-Teflón-Tyr; (B): grafito-EPD-Tyr.

Finalmente, en la Figura 39 se muestra la variación de la señal en función del lote de enzima utilizado para fabricar las pastillas o los electrodos. Los valores de p indican que el factor lote ejerce un efecto significativo sobre la respuesta amperométrica de los tres biosensores. Como se puede observar, no se fabricó ninguna pastilla de grafito-EPD-Tyr a partir del segundo lote de enzima, por lo que se carece de esos datos para comparar.

En los gráficos puede apreciarse que la respuesta del primer lote de enzima es siempre menor que en los otros dos casos. Hay que decir que el primer lote de enzima tenía una actividad por miligramo distinta del segundo y del tercero, como se indica en el apartado III.2 de la Parte Experimental. La actividad en el primer lote era de 3000 unidades por miligramo, mientras que la actividad de los lotes segundo y tercero es de 6750 unidades por miligramo. Puesto que para obtener el mismo número de unidades de enzima en la pastilla es necesario tomar un número de miligramos diferente en cada caso, esta diferencia en la fabricación puede ser la causa de la diferente respuesta de los biosensores fabricados a partir de los distintos lotes de enzima. Otra causa de la menor respuesta obtenida con el lote de enzima 1 puede ser que dicho lote hubiera permanecido un tiempo demasiado prolongado en almacén la casa comercial.



En resumen, se puede decir que de los factores estudiados, los que causan una variabilidad significativa en la respuesta amperométrica de los biosensores son principalmente el factor día, cuyo valor de F_{calc} es más elevado que el crítico en el caso del electrodo de grafito-Teflón-Tyr y más marcadamente en el de grafito-EPD-Tyr, el factor electrodo en el caso del

biosensor de grafito-Teflón-Tyr y de RVC-resina epoxi-Tyr, cuya reproducibilidad en el proceso de fabricación de este último es sensiblemente menor que la de los otros dos biosensores, y el factor lote de enzima, siendo los resultados obtenidos con el lote 1 sensiblemente menores que con los otros dos lotes, probablemente a consecuencia del cambio de actividad por miligramo.

INFLUENCIA DEL FACTOR ELECTRODO CONSIDERADO INDIVIDUALMENTE:

Puesto que el factor electrodo ha resultado influir significativamente en la variabilidad del método, y puesto que en este estudio se ha considerado como mismo electrodo a electrodos diferentes de cada una de las pastillas según el orden en que se ha tomado la porción de pastilla, es interesante estudiar cada electrodo por separado, por lo que se ha realizado un ANOVA de una vía para la variable electrodo. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 18, 19 y 20 y en la Figura 40.

Tabla 18. Análisis ANOVA de una vía para el factor electrodo. Biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media de cuadrados	F _{calc}	p
Entre grupos	1,5712	15	0,104747	6,24	0,0000
Dentro de cada grupo	3,39171	202	0,0167907		
Total (Corr.)	4,96292	217			

Tabla 19. Análisis ANOVA de una vía para el factor electrodo. Biosensor de grafito-EPD-tirosinasa

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F _{calc}	p
Entre grupos	0,312016	16	0,019501	4,06	0,0000
Dentro de cada grupo	0,730468	152	0,00480571		
Total (Corr.)	1,04248	168			

Tabla 20. Análisis ANOVA de una vía para el factor electrodo. Biosensor de RVC-resina epoxi-tirosinasa

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F _{calc}	p
Entre grupos	0,0126239	10	0,00126239	67,01	0,0000
Dentro de cada grupo	0,0023173	123	0,0000188399		
Total (Corr.)	0,0149412	133			

Por los valores de p de las tablas se deduce que existen diferencias significativas entre las respuestas que proporcionan los distintos electrodos en los tres tipos de biosensores de tirosinasa, siendo el valor de F_{calc} sensiblemente mayor para el biosensor de RVC-resina epoxi que para los otros dos casos.

En la Figura 40 están indicados, además, los límites superior e inferior de los gráficos de control obtenidos para un solo electrodo descrito en el apartado IV.2.2.3. Como puede verse, el valor medio de las medidas realizadas con algunos de los electrodos, en los biosensores de grafito-EPD-Tyr y de RVC-resina epoxi-Tyr, no está incluido dentro del gráfico de control del

primer electrodo estudiado, aunque en general la respuesta de los electrodos en los tres casos se encuentra limitada a una región de intensidad de corriente no muy amplia, a excepción de dos de los electrodos de RVC-resina epoxi-Tyr, cuya respuesta es sensiblemente menor que la del resto de los electrodos.

A pesar de que las variaciones en la respuesta amperométrica entre electrodos son mayores que las de las medidas realizadas con un mismo biosensor, la desviación estándar relativa de la respuesta entre electrodos es de 10.8% para todos los electrodos de grafito-Teflón-Tyr, 7.9% para todos los de grafito-EPD-Tyr, y 4.5% para los de RVC-resina epoxi-Tyr si no se consideran los electrodos 2 y 11, y de 42.9% si se consideran.

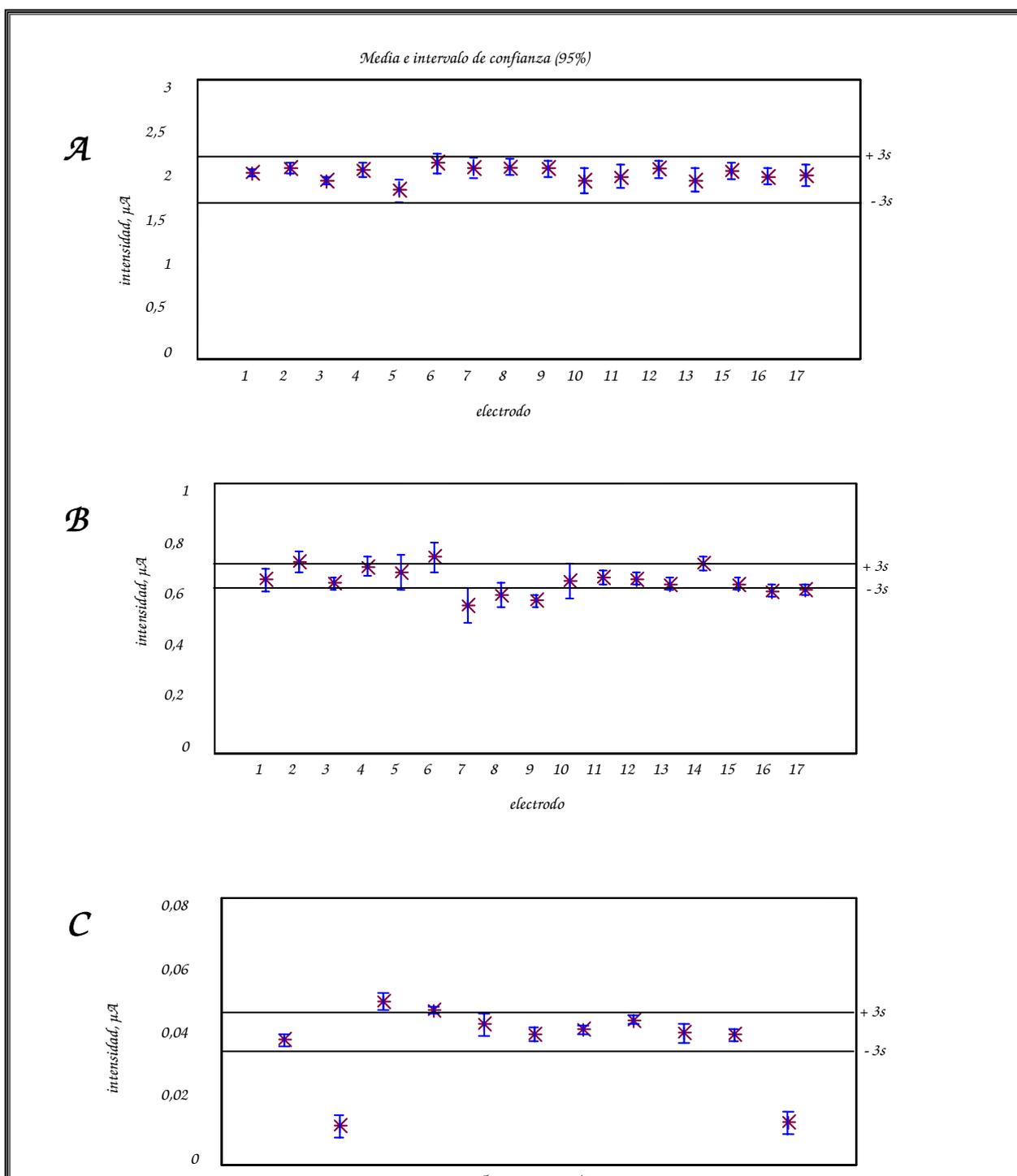


Figura 40. Valor medio e intervalo de confianza de las medidas realizadas con todos los electrodos de (A) grafito-Teflón-tirosiansa, (B) grafito-EPD-tirosiansa, y (C) RVC-resina epoxi-tirosinasa fabricados.

IV.2.4. Cálculo de la actividad enzimática de los electrodos compósitos de tirosinasa

La respuesta amperométrica de los biosensores compósitos de tirosinasa descritos en la presente Memoria depende de la cantidad de enzima inmovilizada en la superficie de cada electrodo. La actividad enzimática superficial se ha estimado midiendo el incremento de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, que se produce cuando se introduce cada uno de los electrodos durante 10 minutos en una disolución, agitada continuamente, de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) que contiene $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-tirosina. Los valores del incremento de la absorbancia obtenidos en cada caso se relacionan con la actividad enzimática mediante una curva de calibrado, en la que se representan dichos incrementos de absorbancia en función de la actividad enzimática que se obtiene utilizando disoluciones de L-tirosina que contienen cantidades conocidas de tirosinasa en disolución, según se describe en el apartado III.3.13 de la Parte Experimental.

En la Figura 41 se muestra la curva de calibrado, y en la Tabla 20 se recogen los valores de las unidades de enzima inmovilizada calculados para cada una de las superficies de los electrodos. Puesto que cuando se realizan las medidas los electrodos no están sometidos a ningún potencial eléctrico, el producto de reacción no es reducido posteriormente, por lo que en este caso no se produce reciclado del sustrato. Por lo tanto, la respuesta obtenida es directamente proporcional al número de unidades de enzima activa en la superficie del biosensor.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto un mayor contenido de centros activos en la superficie del electrodo de grafito-EPD, siendo el menor en la superficie del electrodo de RVC-resina epoxi. La diferencia en la actividad parece estar relacionada con la magnitud del área activa en la superficie electroódica (dato que se incluye en la Tabla 21 con fines comparativos), o con la cantidad de material conductor empleada en la fabricación de los biosensores, ya que la enzima queda adsorbida al grafito o al RVC.

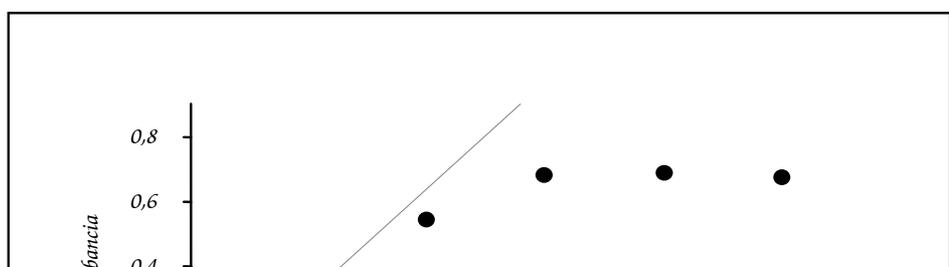


Figura 41. Variación de la absorbancia con las unidades de tirosinasa en disolución. La señal se registra a los 10 minutos de la adición de la enzima a 3.0 mL de una disolución agitada de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) que contiene L-tirosina $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda=280 \text{ nm}$.

Tabla 21. Valores obtenidos en el cálculo de las unidades de tirosinasa en la superficie de cada uno de los biosensores compósitos desarrollados.

ELECTRODO	UNIDADES DE TIROSINASA	ÁREA ACTIVA, cm^2
GRAFITO-TEFLÓN-TYR	10 ± 3	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^{-2}$
GRAFITO-EPD-TYR	21 ± 5	$(7.0 \pm 0.2) \times 10^{-2}$
RVC-RESINA EPOXI-TYR	3 ± 2	$(5.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$

La consecuencia directa de poseer un mayor número de unidades de enzima en la superficie del biosensor es poseer parámetros de velocidad máxima aparente mayores (según se deduce de la ecuación de Michaelis-Menten) y una mayor sensibilidad.

IV.2.5. Reciclado electrodoico/enzimático de o-difenoles

Los compuestos fenólicos producen o-quinonas en su reacción con la tirosinasa, que son reducidas a o-hidroquinonas (o-difenoles) electrodoicamente, empleándose esta reducción para monitorizar la reacción enzimática. Como es sabido, los sistemas quinona/hidroquinona son reversibles o cuasirreversibles desde el punto de vista electroquímico. Por tanto, los o-difenoles, que también son sustratos de la tirosinasa, generan a través de la reacción enzimática o-quinonas (Figura 14). De esta forma se produce un reciclado electrodoico/enzimático de las o-quinonas generadas en la catálisis de los fenoles por la tirosinasa, o un reciclado de sustrato en el caso de los o-difenoles. Este reciclado, lógicamente, será responsable de mayores intensidades de corriente en el estado estacionario.

En este apartado se va a estudiar la influencia de la matriz electrodoica sobre el reciclado electrodoico/enzimático que se produce en la detección amperométrica de los compuestos fenólicos empleando los biosensores compósitos de tirosinasa. Para ello se ha representado la densidad de corriente (eliminando así la contribución del factor de área activa) en función de la velocidad de rotación de cada uno de los electrodos estudiados y se ha comparado con la densidad de corriente teórica cuando no hay reciclado enzimático, deducida a partir de la ecuación de Levich y utilizando catecol como sustrato. Los registros $i-t$ se han realizado para una concentración de catecol 1.0×10^{-6} mol L^{-1} a un potencial constante de -0.15 V. Los resultados obtenidos, Figura 42, indican que, efectivamente, existe un proceso de reciclado de catecol entre la enzima y los electrodos compósitos, ya que para un electrodo de grafito-EPD-Tyr la densidad de corriente es 15.5 veces mayor (para una velocidad de rotación de 1500 rpm), para el electrodo de grafito-Teflón-Tyr 12.7 veces mayor, y para el de PVC-resina epoxi-Tyr 1.3 veces mayor que la densidad de corriente teórica sin reciclado enzimático.

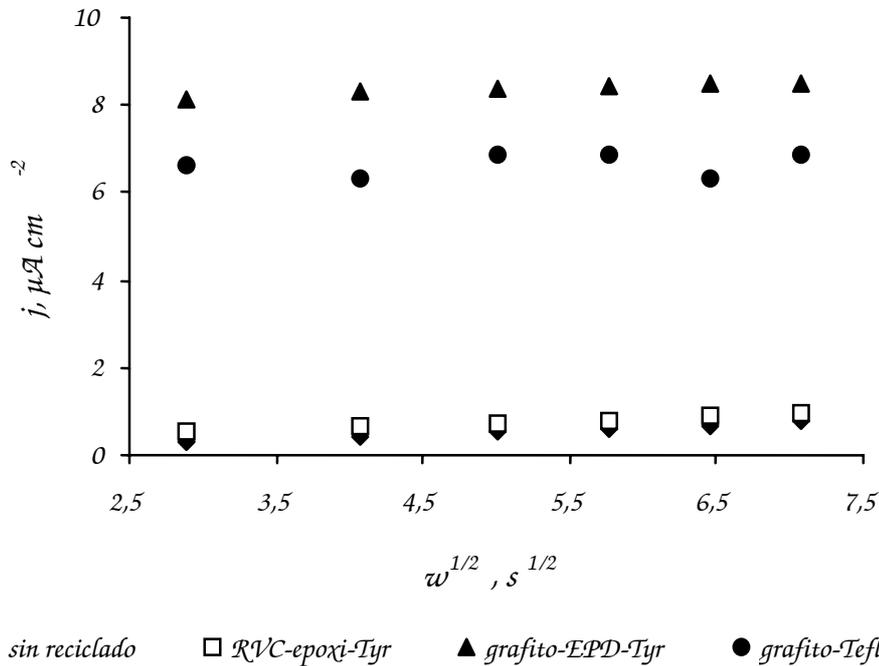


Figura 42. Variación de la densidad de corriente en el estado estacionario con la raíz cuadrada de la velocidad de rotación de cada electrodo compuesto enzimático para un nivel de concentración de catecol de $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Comparación con la variación de la densidad de corriente teórica con la velocidad de rotación del electrodo cuando no hay reciclado enzimático. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Esta diferencia en las densidades de corriente cuando se comparan los tres electrodos, indica que el reciclado del catecol va a depender de la matriz electródica empleada. El comportamiento observado concuerda con el hecho de que el electrodo de grafito-EPD-Tyr tiene más capacidad para producir la reacción enzimática, ya que posee un mayor número de centros activos en su superficie, y tiene también mayor capacidad para reducir las quinonas, al poseer una área activa mayor. Por lo tanto, puede decirse que es el electrodo que produce un mayor reciclado. Con el electrodo de RVC-resina epoxi-Tyr ocurre lo contrario, posee un número de unidades de enzima en su superficie menor y un área activa menor, por lo que el reciclado que se produce en la superficie electródica es el menor.

IV.2.6. Cálculo de las constantes cinéticas de la reacción enzimática

Un aspecto a tener en cuenta en el desarrollo de electrodos enzimáticos es el conocimiento de las variables cinéticas de la reacción enzimática que tiene lugar con diferentes sustratos, para, de este modo, conocer su sensibilidad, así como el intervalo lineal de respuesta con la concentración de sustrato, aspectos fundamentales desde el punto de vista analítico en el desarrollo de biosensores.

Empleando las condiciones experimentales optimizadas para el fenol, se han calculado las constantes cinéticas, $V_{máx,ap}$ (velocidad máxima aparente) y $K_{M,ap}$ (constante de Michaelis-Menten aparente), para los siguientes compuestos fenólicos: fenol; catecol; 4-clorofenol; 2-clorofenol; 4-cloro-3-metilfenol; 4-cloro-2-metilfenol; 2,4-dimetilfenol; 3,4-dimetilfenol; 2,3-dimetilfenol. Las diferentes constantes cinéticas se han calculado y comparado con los tres electrodos compósitos de tirosinasa. Este estudio se ha llevado a cabo según se detalla en el apartado III.3.5.

En las Figuras 43, 44 y 45 se representa la intensidad de corriente de las medidas en el estado estacionario en función de la concentración de sustrato obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa, de grafito-EPD-tirosinasa, y de RVC-resina epoxi-tirosinasa, respectivamente.

Como se puede observar, con cada electrodo y para todos los fenoles estudiados, se obtienen curvas típicas de los sistemas enzimáticos, en las que se aprecia un primer tramo lineal, útil desde el punto de vista analítico, que posteriormente se curva a concentraciones más elevadas como consecuencia de la saturación de la enzima.

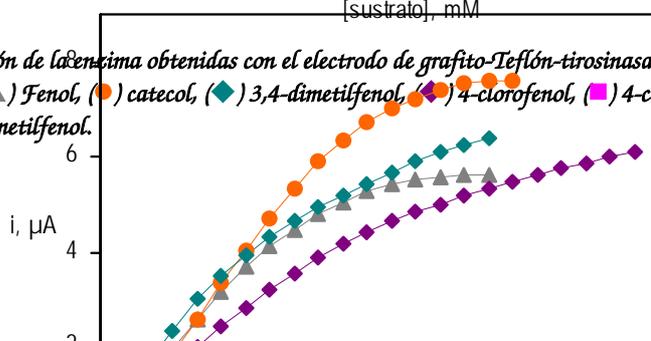
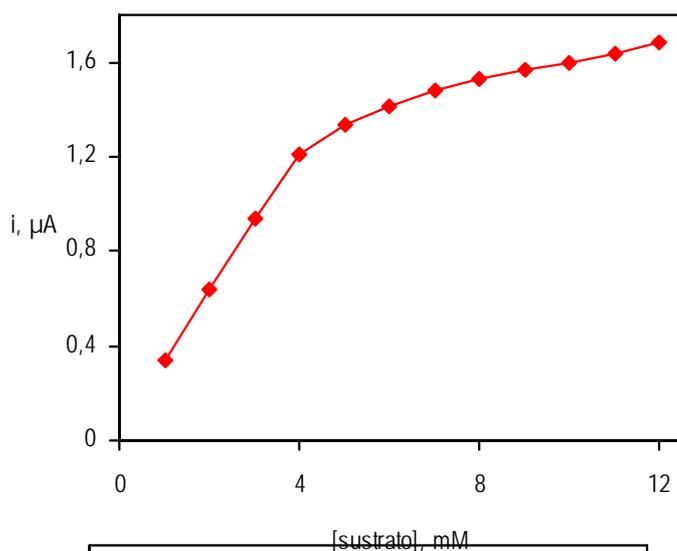
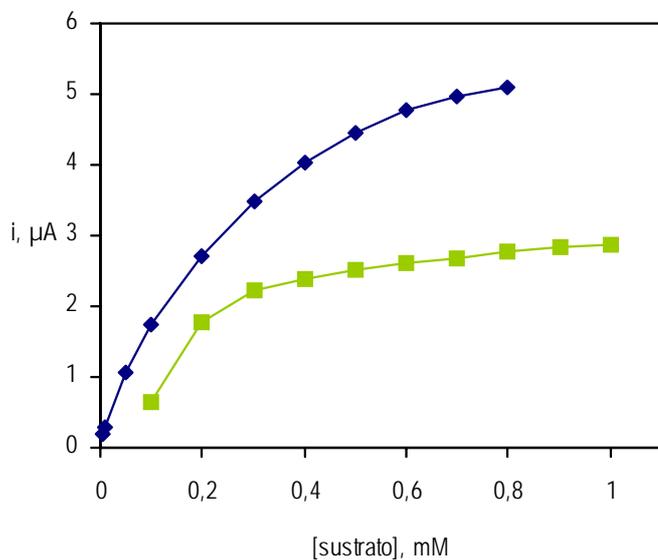
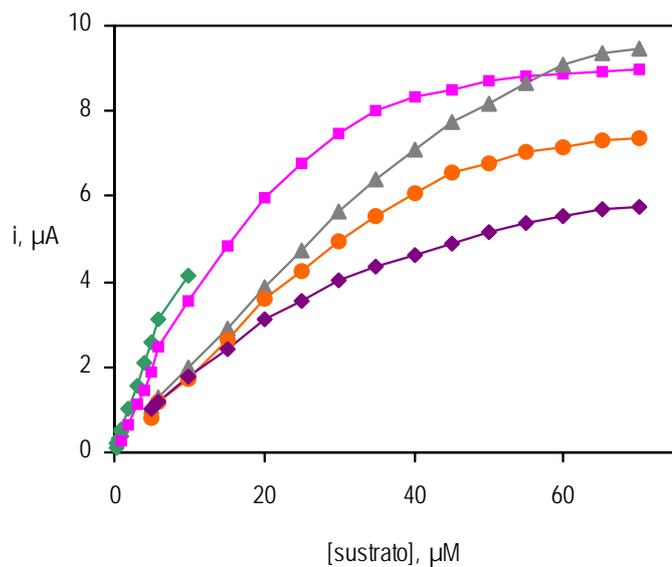
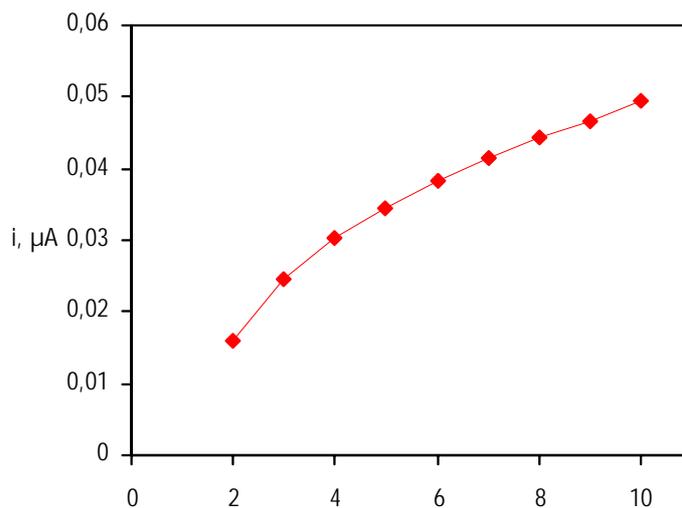
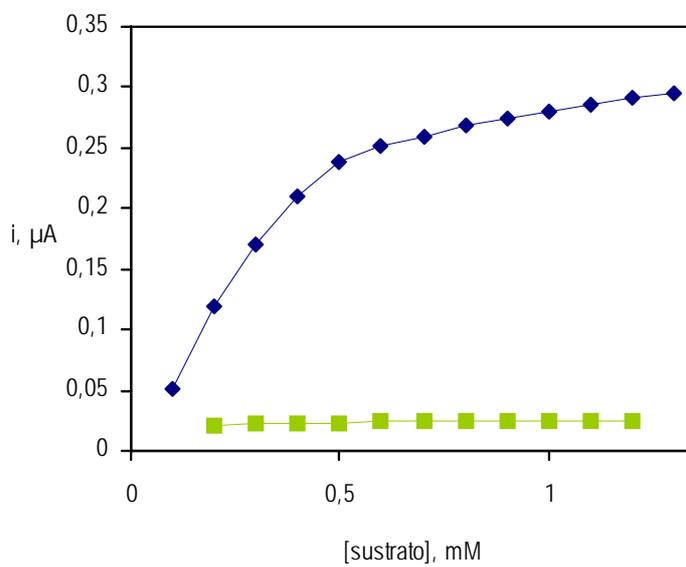
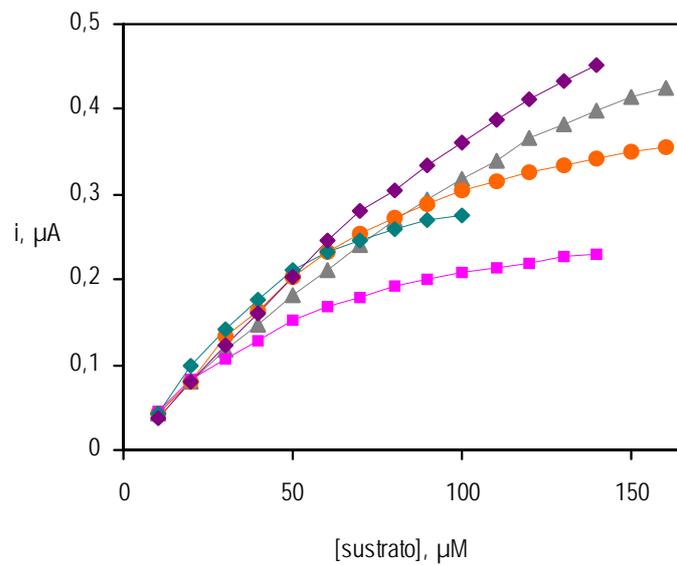


Figura 43. Curvas de saturación de la enzima obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en la disolución de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5. $E_{ap} = -0.15V$. (\blacktriangle) Fenol, (\bullet) catecol, (\blacklozenge) 3,4-dimetilfenol, (\blacklozenge) 4-clorofenol, (\blacksquare) 4-cloro-3-metilfenol, (\blacklozenge) 2,4-dimetilfenol, (\blacksquare) 4-cloro-2-metilfenol, (\blacklozenge) 2,3-dimetilfenol.



Antes de llevar a cabo el cálculo de los parámetros cinéticos se comprobó que las reacciones enzimáticas para los

Figura 45. Curvas de saturación de la enzima obtenidas con el electrodo de PVC-resina epoxi-sirinsinasi en la disolución de regulan fosfata 0,05 mol L⁻¹ de pH 6.5. $E_{ap} = -0.15V$. (▲) Fenol, (●) catecol, (◆) 3,4-dimetilfenol, (◆) 4-clorofenol, (■) 4-cloro-3-metilfenol, (◆) 2,4-dimetilfenol, (■) 4-cloro-2-metilfenol, (◆) 2,5-dimetilfenol. (Tomado de [1], 1994):

$$\log [(i_{\text{máx}}/i) - 1] = \log K_{\text{d},\text{ap}} - \chi \log [\text{sustrato}]$$

Ecuación 3

donde χ es el grado de desviación de la reacción enzimática de la cinética de Michaelis-Menten, de modo que cuanto más se desvíe dicho parámetro χ de la unidad menos se ajustará la reacción enzimática a una cinética de Michaelis-Menten.

Los gráficos de Hill, representaciones de $\log[(i_{\text{máx}}/i)-1]$ frente al logaritmo de la concentración de cada uno de los sustratos estudiados, se muestran en las Figuras 46, 47 y 48, para el electrodo de grafito-Teflón-Tyr, grafito-EPD-Tyr y RVC-resina epoxy-Tyr respectivamente. Los valores de χ (pendiente con el signo cambiado de los gráficos de Hill) obtenidos con los tres tipos de electrodos para los sustratos fenólicos estudiados se recogen en la Tabla 22. Como puede comprobarse, dichos valores son muy próximos a la unidad en todos los casos, lo que indica que la cinética de la reacción enzimática se ajusta a la cinética de Michaelis-Menten y que las diferencias entre las matrices compósitas no afectan a este comportamiento.

El cálculo de los parámetros cinéticos se ha realizado a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk correspondientes (Dixon y Webb, 1979), utilizando los datos de la intensidad de corriente medida en el estado estacionario, para sucesivas adiciones del volumen adecuado de la disolución patrón de cada uno de los fenoles estudiados hasta no obtener variación apreciable de la intensidad de corriente. Representando $1/i$ frente a $1/[\text{sustrato}]$ se obtiene en la intersección con el eje de ordenadas $1/V'_{\text{máx},\text{ap}}$ y el valor de $1/[\text{sustrato}] = -1/K_{\text{d},\text{ap}}$ sobre el eje de abscisas. En las Figuras 49, 50 y 51 se muestran las gráficas obtenidas, y los parámetros cinéticos calculados a partir de ellas se recogen en la Tabla 22.

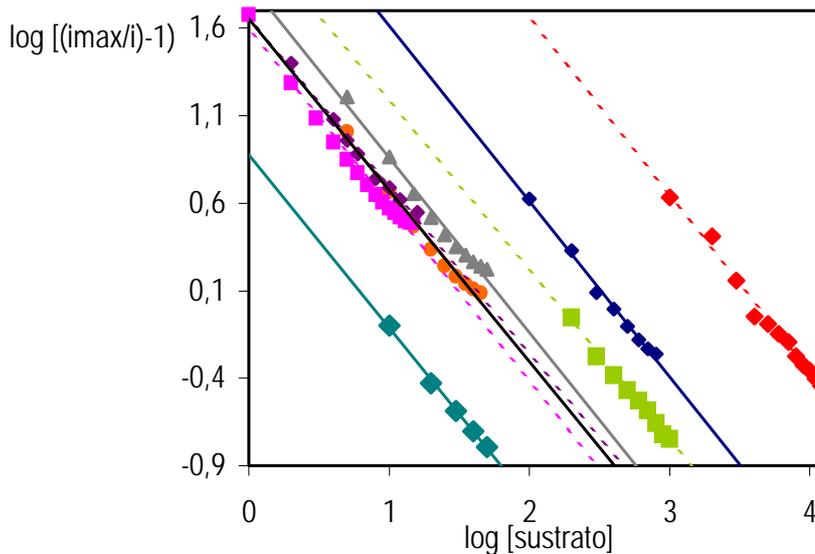


Figura 46. Gráficos de Hill obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa. (▲) Fenol, (●) catecol, (◆) 3,4-dimetilfenol, (◇) 4-clorofenol, (■) 4-cloro-3-metilfenol, (◆) 2,4-dimetilfenol, (■) 4-cloro-2-metilfenol, (◆) 2,3-dimetilfenol.

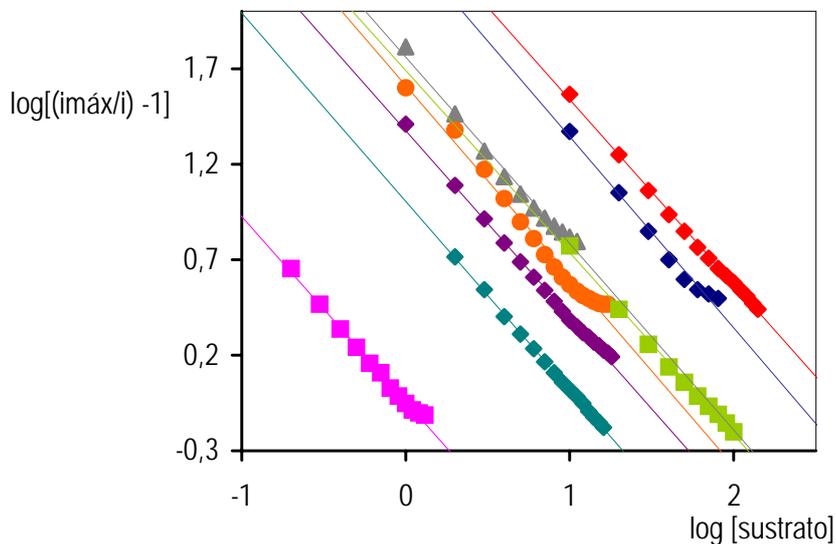


Figura 47. Gráficos de Hill obtenidos con el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa. (▲) Fenol, (●) catecol, (◆) 3,4-dimetilfenol, (◇) 4-clorofenol, (■) 4-cloro-3-metilfenol, (◆) 2,4-dimetilfenol, (■) 4-cloro-2-metilfenol, (◆) 2,3-dimetilfenol.

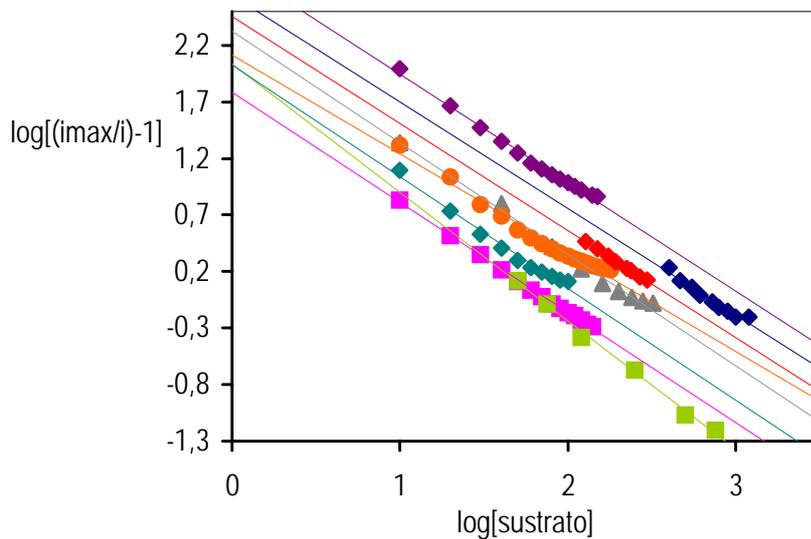
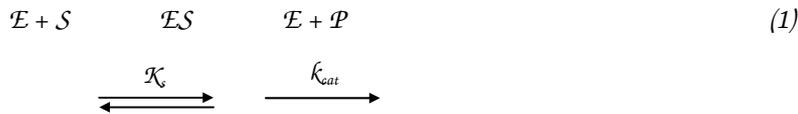


Figura 48. Gráficos de Hill obtenidos con el electrodo de RVC-epoxi-tirosinasa. (▲) Fenol, (●) catecol, (◆) 3,4-dimetilfenol, (◇) 4-clorofenol, (■) 4-cloro-3-metilfenol, (◆) 2,4-dimetilfenol, (■) 4-cloro-2-metilfenol, (◆) 2,3-dimetilfenol.

Para reacciones enzimáticas simples en las que la enzima reacciona con un solo sustrato, la velocidad de reacción en función de la concentración del sustrato sigue la curva típica de Michaelis-Menten. Estas reacciones están representadas por el siguiente mecanismo:



donde \mathcal{E} es la enzima, \mathcal{S} el sustrato, $\mathcal{E}\mathcal{S}$ el complejo enzima-sustrato, \mathcal{P} el producto de la reacción catalizada por la enzima, \mathcal{K}_s es la constante de disociación del complejo y k_{cat} es la constante de la conversión química del complejo $\mathcal{E}\mathcal{S}$ en $\mathcal{E} + \mathcal{P}$. En este tipo de reacciones, $\mathcal{K}_{M,ap}$ es proporcional a la constante de disociación del complejo, y por tanto, es un índice de la afinidad entre el sustrato y la enzima, mientras que la constante catalítica es directamente proporcional a la velocidad máxima aparente, por lo que, cuanto mayor sea ésta, mayor es la velocidad de conversión del complejo enzima-sustrato en los productos de la reacción (Frescht, 1980).

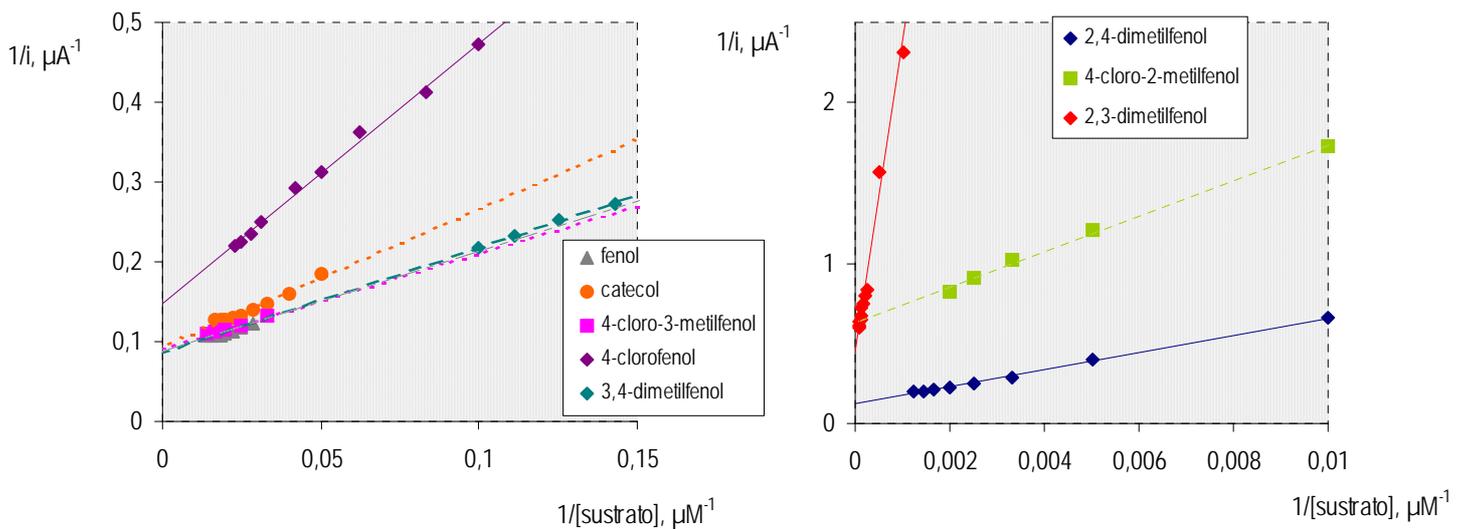


Figura 49. Representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas con el electrodo de grafito-Teftlón-tirosinasa. $E_{ap} = -0.15V$.

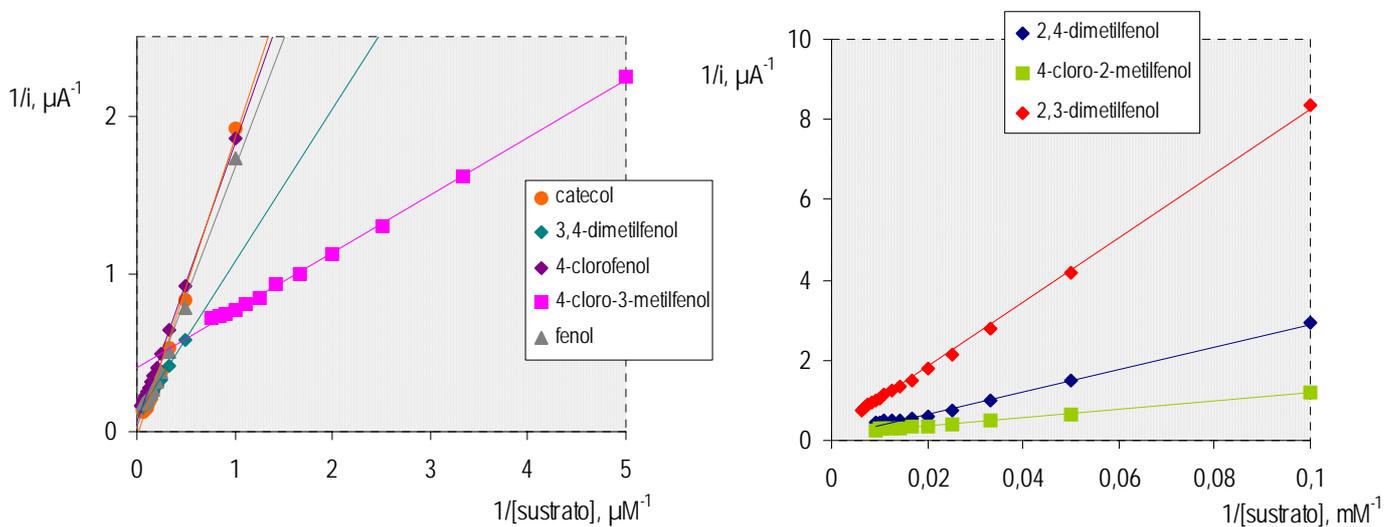


Figura 50. Representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas con el electrodo de grafito-EDP-tirosinasa. $E_{ap} = -0.15V$



Tabla 22. Parámetros cinéticos obtenidos con los electrodos de:

1: grafito-teflón-tirosinasa

2: grafito-EPD-tirosinasa

3: RVC-resina epoxi-tirosinasa

COMPUESTO	ELECTRODO	χ	$V_{max, ap}$ (μA)	$K_{dl, ap}$ ($M\chi 10^5$)
<i>Fenol</i>	1	0.999	24.4	7.76
	2	0.98	38.4	6.26
	3	0.98	0.98	24.0
<i>Catecol</i>	1	0.98	17.1	4.99
	2	0.997	29.9	5.63
	3	0.97	0.96	20.0
<i>3,4-dimetilfenol</i>	1	0.99	6.04	0.788
	2	0.99	10.7	1.04
	3	1.01	0.63	11.0
<i>4-cloro-3-metilfenol</i>	1	1.005	13.1	3.76
	2	0.97	2.44	0.089
	3	0.96	0.35	6.80
<i>4-clorofenol</i>	1	0.96	12.5	6.90
	2	0.97	14.4	2.53
	3	0.98	3.76	97.0
<i>4-cloro-2-metilfenol</i>	1	0.97	3.38	17.2
	2	0.95	5.79	5.80
	3	1.1	0.08	120
<i>2,4-dimetilfenol</i>	1	1.003	7.90	53.0

	2	1.002	8.29	22.9
	3	1.1	0.50	64.0
	1	1.01	2.29	435
2,3-dimetilfenol	2	0.97	4.51	36.1
	3	1.2	0.11	1122

Si se comparan los valores de las constantes aparentes de Michaelis para los compuestos fenólicos obtenidas con cada uno de los biosensores compósitos de tirosinasa, puede observarse que, en general, estos valores son menores para el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa y mayores para el electrodo de carbono vítreo reticulado-resina epoxi-tirosinasa. Esto indica que los intervalos de linealidad de los calibrados para los diferentes fenoles van a ser mayores para el electrodo compósito de RVC-resina epoxi-Tyr y menores para el de grafito-EPD-Tyr. Por lo que respecta a los valores de la velocidad máxima aparente, se observa que este parámetro es mayor para el biosensor basado en la matriz de grafito-EPD y menor para el construido con RVC y resina epoxi.

Estas tendencias en los valores cinéticos aparentes de los compuestos fenólicos con las distintas matrices electródicas, dependen principalmente de dos factores. Por un lado, dependen de la cantidad de enzima inmovilizada en la superficie electródica, la cual está relacionada con el área activa de los biosensores, puesto que en el proceso de fabricación de todos ellos la enzima se adsorbe en primer lugar de forma homogénea sobre la fase conductora del material compósito. Como se comentó en el apartado IV.2.5, un área activa electródica mayor implicará un área de material conductor más grande, y por tanto, una mayor cantidad de enzima en la superficie del electrodo. Este factor influirá principalmente en la $V'_{máx,ap}$, obteniéndose una velocidad máxima más grande cuando exista más cantidad de enzima en la superficie electródica (Fernández et al., 1995).

Por otro lado, suponiendo que la etapa limitante de la velocidad es en todos los casos la reacción enzimática, los valores de $K_{M,ap}$ dependerán del proceso de reciclado observado en las reacciones catalizadas por tirosinasa en la superficie de los electrodos. Este reciclado provoca un aumento mayor en la concentración de catecol en la capa de difusión cuando el área activa del electrodo es mayor, ya que la concentración enzimática es más alta. Por tanto, suponiendo que la oxidación del compuesto fenólico es más lenta que la electrorreducción de las correspondientes quinonas, se observará una saturación enzimática a concentraciones menores de sustrato, lo que implica menores valores de $K_{M,ap}$.

Cuando se comparan los valores de las constantes de Michaelis para los ocho compuestos fenólicos obtenidos con el mismo electrodo compósito, se observa, en todos los casos, que los fenoles que poseen una posición orto ocupada tienen una constante de Michaelis mayor. Esto implica que la constante de disociación del complejo es mayor, lo que indica que estos

compuestos tienen menor afinidad por la enzima, y proporcionan respuestas menores que los fenoles sustituidos en las posiciones para- y meta-.

Por lo que se refiere al valor de la velocidad máxima aparente de cada uno de los compuestos fenólicos obtenida con un mismo electrodo, se puede concluir que se obtienen los valores más altos de $V_{máx,ap}$ para valores de $K_{M,ap}$ intermedios, para los tres electrodos compósitos de tirosinasa ensayados.

IV.2.7. Etapa limitante de la velocidad de reacción

El tiempo de respuesta de los biosensores para los compuestos fenólicos viene determinado por la etapa limitante de la velocidad de todo el proceso global, que tiene lugar desde que se adiciona el sustrato fenólico hasta que se alcanza la intensidad de corriente en el estado estacionario. En este apartado se pretende identificar dicha etapa limitante y conocer si la matriz electroquímica influye sobre ese proceso.

Como se puso de manifiesto en los apartados II.2.1.1 y II.2.4, el mecanismo de hidroxilación de monofenoles y de oxidación de difenoles por la tirosinasa sobre la superficie de un electrodo puede describirse según el sistema de reacciones que se muestra en la Figura 52.

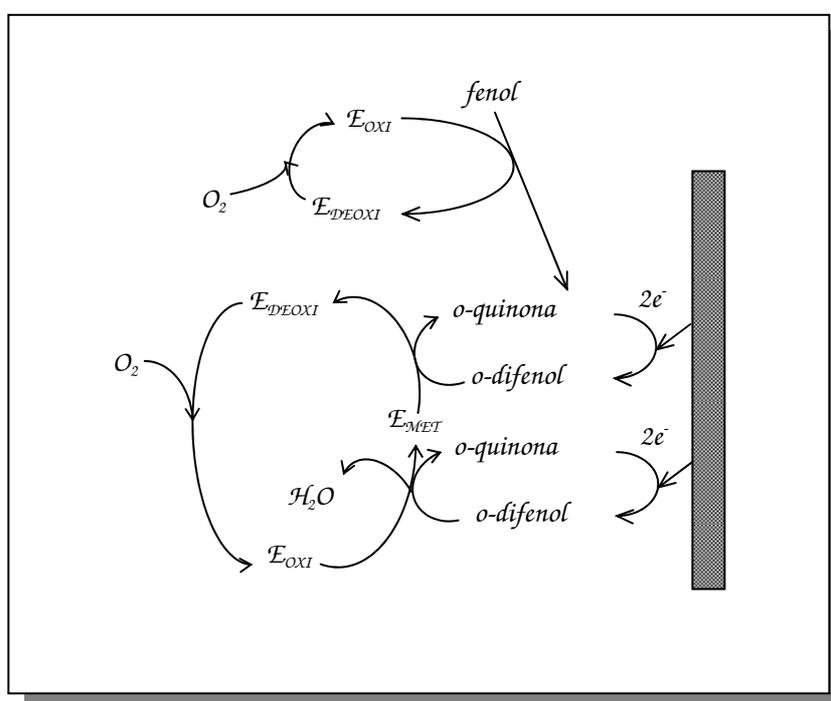


Figura 52. Ciclo catalítico de los compuestos fenólicos sobre un electrodo modificado con tirosinasa.

Con objeto de considerar sólo las etapas en las que interviene el catecol, se han realizado experiencias en las que se usa este compuesto fenólico como sustrato. En el ciclo catalítico participan dos moléculas de catecol para producir dos moléculas de o-quinona, que son reducidas electroquímicamente para obtener nuevamente catecol. De esta manera se produce el reciclado de catecol que proporciona señales mayores que las que cabría esperar teóricamente, como demostraron E. Burestedt y col. (1996), y como se ha demostrado en el apartado IV.2.6, donde se ha establecido que en los sistemas estudiados se produce también el reciclado para cada uno de los biosensores de tirosinasa desarrollados.

El mecanismo que se muestra en la Figura 52 para el catecol pone de manifiesto que la respuesta obtenida con el biosensor para este compuesto estará limitada por alguno de los pasos de reacción incluidos en el ciclo de la reacción enzimática, o por la difusión del sustrato desde el seno de la disolución a la superficie del electrodo, si bien se ha comprobado que este último proceso es lo suficientemente rápido como para no ser la etapa limitante. Los pasos de la reacción son la oxidación del catecol por la enzima, la reducción del oxígeno por E_{DEOXI} y la reducción electroquímica de la o-quinona.

La dependencia de la respuesta con la velocidad de rotación del electrodo puede permitir discernir cuál de los pasos es el que limita la velocidad de reacción (Burestedt et al., 1996). De esta manera, y considerando el problema de forma simplificada, si la reducción de la quinona es el paso limitante, la señal amperométrica que se obtiene debe disminuir a medida que aumenta la velocidad de rotación del electrodo, ya que la quinona formada en la interfase electrodo-disolución producida en la reacción enzimática será transportada más fácilmente hacia el seno de la disolución, disminuyendo, por tanto, la cantidad de moléculas de o-quinona susceptibles de ser reducidas en la superficie del electrodo. Por otro lado, cuando la etapa limitante de la velocidad depende de la cinética de la reacción enzimática, puede ocurrir que dicha etapa sea (a) la reducción enzimática de oxígeno, o (b) la oxidación enzimática de catecol. En el caso (a), al aumentar la velocidad de rotación del electrodo enzimático se produce un transporte de O_2 más eficiente desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo, y se observará un aumento de la señal amperométrica. Sin embargo, en el caso (b), y para concentraciones bajas de catecol, y saturación de la disolución con oxígeno, como es habitual, la respuesta amperométrica no variará apreciablemente con la velocidad de rotación del electrodo enzimático.

Con el fin de elucidar si existe alguna influencia de las matrices empleadas en la fabricación de los biosensores sobre el mecanismo del ciclo de la tirosinasa, es decir, si la matriz electródica influye sobre la etapa limitante de la velocidad de respuesta del electrodo, se procedió a estudiar la influencia de la velocidad de rotación de cada uno de los electrodos enzimáticos sobre la intensidad de corriente medida en el estado estacionario. Para ello, se registraron los amperogramas correspondientes a diferentes velocidades de rotación ($8.3 - 50 \text{ s}^{-1}$) a dos niveles de concentración de catecol diferentes (1.0×10^{-5} y $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). En el caso del electrodo de grafito-EPD-tirosinasa los niveles de catecol en la célula de medida fueron menores (1.0×10^{-6} y $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), con objeto de que las concentraciones empleadas estuviesen incluidas en el intervalo lineal (apartado IV.2.9).

En la Figura 53 se muestra la variación de la densidad de corriente en el estado estacionario con la raíz cuadrada de la velocidad de rotación de cada electrodo compuesto. Como se puede observar, tanto para el electrodo de grafito-Teflón-Tyr como para el de grafito-EPD-Tyr, la densidad de corriente en el estado estacionario puede considerarse como prácticamente independiente de la velocidad de rotación a los dos niveles de concentración de catecol ensayados, lo que sugiere que la etapa limitante del ciclo de la tirosinasa sobre dichos electrodos es la oxidación enzimática del catecol. Sin embargo, en el caso del electrodo de RVC-resina epoxi-Tyr se observa un aumento apreciable de la densidad de corriente con la velocidad de rotación,

lo que pone de manifiesto que la velocidad total del proceso está limitada, en este caso, por la reacción de reducción enzimática del oxígeno.

Las conclusiones alcanzadas para el catecol no tienen porqué ser extrapolables a todos los compuestos fenólicos que se han empleado como sustratos. En efecto, la velocidad de la reacción dependerá del sustrato considerado, ya que su estructura molecular hace que la afinidad enzima-sustrato sea diferente. De hecho, el tiempo que se tarda en alcanzar el estado estacionario es menor para el catecol que para el resto de compuestos estudiados. En la Tabla 23 se recogen dichos tiempos para cada uno de los tres biosensores de tirosinasa y para todos los compuestos fenólicos estudiados.

Esto significa que para los compuestos monofenólicos la etapa limitante del proceso es la oxidación enzimática de cada sustrato, ya que si no se debería obtener la misma velocidad observada para el catecol. La cinética de la reacción enzima-sustrato sigue la ecuación de Michaelis-Menten (Coche Guerente et al., 2001), como se ha demostrado con los gráficos de Hill. Por lo tanto, si la velocidad máxima fuera muy pequeña o la constante de Michaelis muy elevada, la velocidad de reacción debe ser baja y el tiempo que se requiere para alcanzar el estado estacionario será grande. En la Tabla 23 se han incluido también los valores de $V_{máx,ap}$ y de $K_{M,ap}$ pudiendo comprobarse que, tal y como se ha razonado, los compuestos con una velocidad máxima pequeña o una elevada constante de Michaelis muestran un tiempo de respuesta largo.

Por otro lado, se constató que la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida para cualquier monofenol disminuye al aumentar la velocidad de rotación del electrodo. Este hecho puede atribuirse a que, al aumentar dicha velocidad, el aporte del fenol hacia la superficie del electrodo es más eficiente, mientras que la concentración superficial del o-difenol formado por la electrorreducción de las quinonas, disminuye. Por lo tanto, suponiendo que dicho o-difenol reaccione más rápidamente que el precursor fenólico, debe observarse una menor intensidad de corriente.

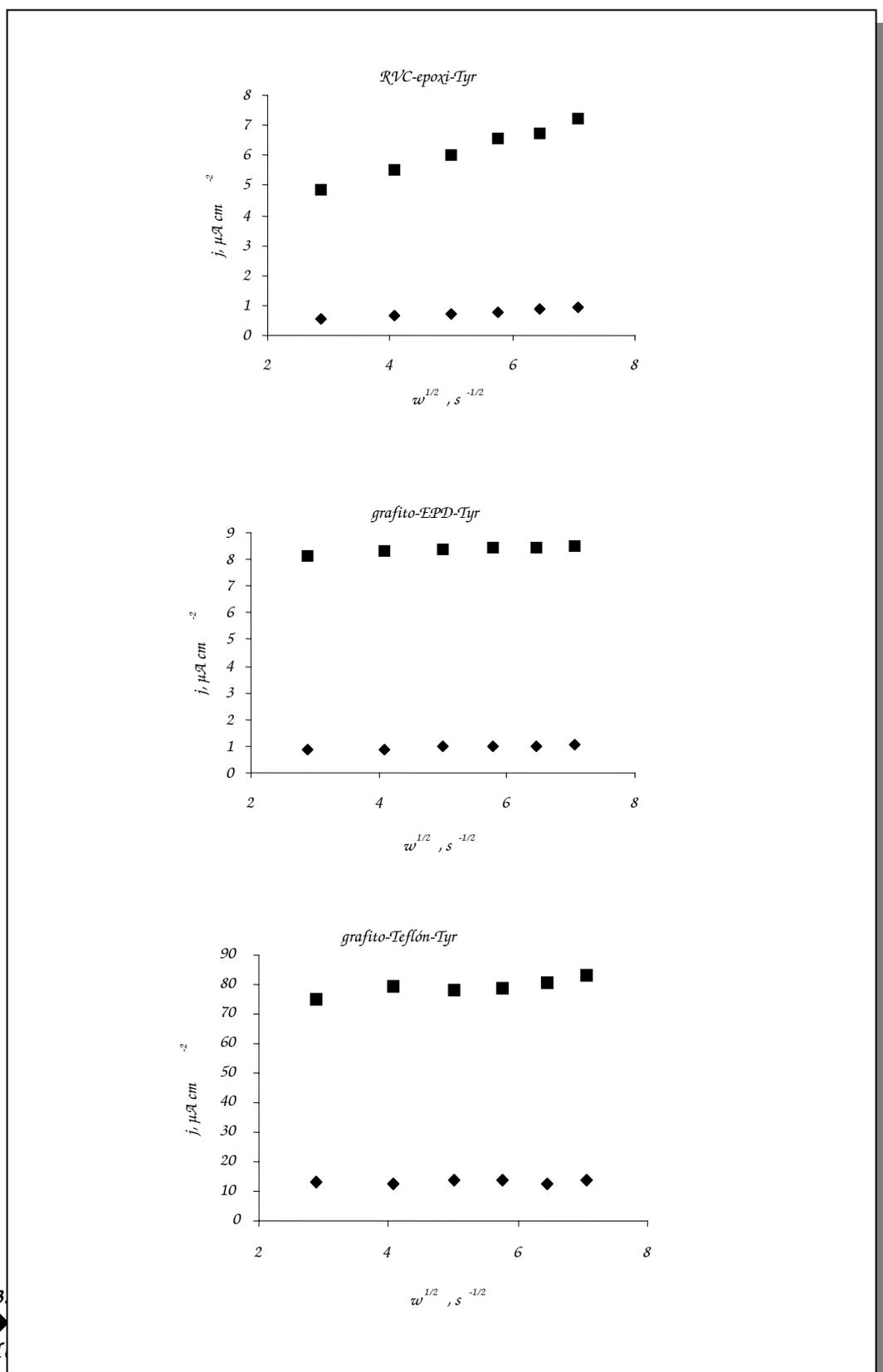


Figura 53.
 catecol (◆)
 L^{-1} de pH

a disolución de
 fosfato 0.05 mol

Tabla 23. Tiempo que se tarda en alcanzar el estado estacionario tras la adición a la célula de medida que contiene regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, la concentración de compuesto fenólico indicada entre paréntesis. $E_{\text{ap}} = -0.15 \text{ V}$.

Compuesto fenólico	Grafito-Teflón-Tyr			Grafito-EPD-Tyr			RVC-epoxi-Tyr		
	t , min (concn. en célula)	$V_{\text{máx}}$ μA	K_{m} $\text{M} \times 10^5$	t , min (concn. en célula), M	$V_{\text{máx}}$ μA	K_{m} $\text{M} \times 10^5$	t , min (concn. en célula), M	$V_{\text{máx}}$ μA	K_{m} $\text{M} \times 10^5$

Catecol	1.5 (1.0×10^{-5})	17.1	5.0	2 (1.0×10^{-6})	29.9	5.6	4 (1.0×10^{-5})	0.96	24
Fenol	1.5 (1.0×10^{-5})	24.4	7.8	3 (1.0×10^{-6})	38.4	6.3	6 (1.0×10^{-5})	0.98	20
4-clorofenol	7 (1.0×10^{-5})	12.5	6.9	5 (1.0×10^{-6})	14.4	2.5	7.8 (1.0×10^{-5})	3.79	97
2-clorofenol	7.5 (4.0×10^{-5})	3.6	11	30 (4.0×10^{-6})	12.2	5.3	13.5 (1.0×10^{-4})	0.111	410
4-cloro-2-metilfenol	25 (4.0×10^{-5})	3.4	17	40 (4.0×10^{-6})	5.8	5.8	35 (4.0×10^{-5})	0.08	120
4-cloro-3-metilfenol	3 (1.0×10^{-5})	13.1	3.7	23 (1.0×10^{-6})	2.44	0.089	22 (1.0×10^{-5})	0.35	6.8
2,3-dimetilfenol	10 (5.0×10^{-4})	2.29	440	7 (5.0×10^{-5})	4.51	36	10 (5.0×10^{-4})	0.11	1100
2,4-dimetilfenol	13.5 (4.0×10^{-5})	7.9	53	8 (1.0×10^{-5})	8.29	23	8 (4.0×10^{-5})	0.50	64
3,4-dimetilfenol	11 (1.0×10^{-5})	6.04	0.79	20 (1.0×10^{-6})	10.7	1.0	18 (1.0×10^{-5})	0.63	11

De la Figura 52 puede deducirse, asimismo, que el fenol no es capaz de reaccionar con la forma met de la tirosinasa, como se comentó en el apartado II.2.1.1. En dicho apartado, se puso de manifiesto también que la enzima en el estado inicial se encuentra mayoritariamente en su forma met. Esto hace que los compuestos monofenólicos presenten un período de estancamiento o “lag phase”, que se ha interpretado como un equilibrio dinámico entre las etapas enzimáticas y electrodoica que permita obtener una concentración suficiente de o-difenol, ya que sólo éste puede convertir la forma met en otras formas enzimáticas (Coche Gerente et al., 2001).

IV.2.8. Curvas de calibrado y características analíticas

Como condiciones experimentales para establecer las curvas de calibrado de los distintos fenoles se han empleado las optimizadas en estudios anteriores. En las Figuras 54, 55 y 56 se muestran, a modo de ejemplo, algunos de los registros intensidad-tiempo que se han obtenido con los tres electrodos compósitos para cuatro de los fenoles.

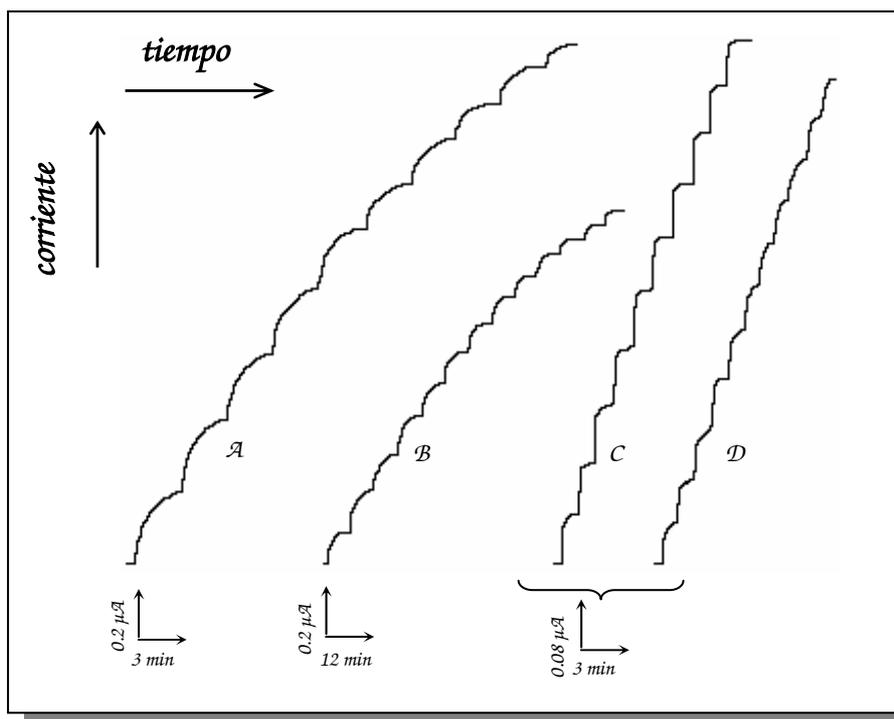


Figura 54. Registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-tirosinasa para adiciones sucesivas de $25\mu\text{L}$ de una disolución $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de: (A) 3,4-dimetilfenol, (B) 4-cloro-3-metilfenol, (C) catecol y (D) fenol, en 5 mL de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

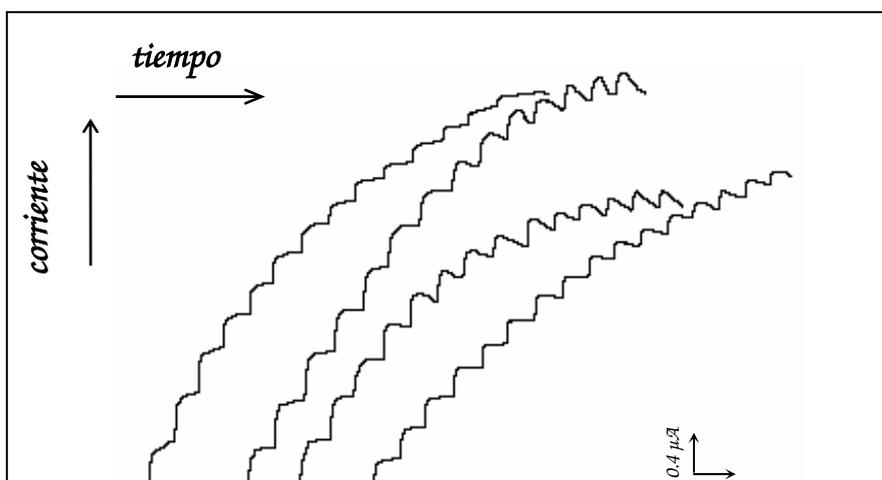


Figura 55. Registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa para adiciones sucesivas de $25\mu\text{L}$ de una disolución $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de: (A) 3,4-dimetilfenol, (B) catecol, (C) fenol y (D) 4-clorofenol, en 5 mL de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5.

$E_{\text{ap}} = -0.15 \text{ V}$.

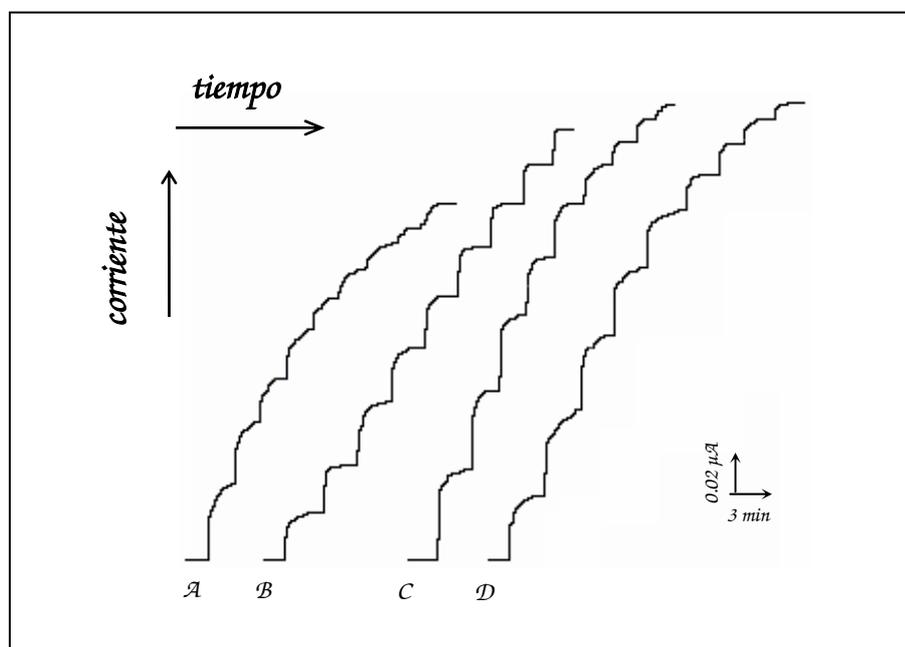


Figura 56. Registros de intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa para adiciones sucesivas de $25\mu\text{L}$ de una disolución $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de: (A) 4-cloro-3-metilfenol, (B) catecol, (C) 3,4-dimetilfenol y (D) fenol, en 5 mL de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5. $E_{\text{ap}} = -0.15 \text{ V}$.

En la Figura 57 se muestran las curvas de calibrado de los fenoles para los que se obtiene una mayor sensibilidad: 3,4-dimetilfenol, fenol, 4-cloro-3-metilfenol y catecol, sobre los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa, grafito-EPD-tirosinasa y RVC-resina epoxi-tirosinasa.

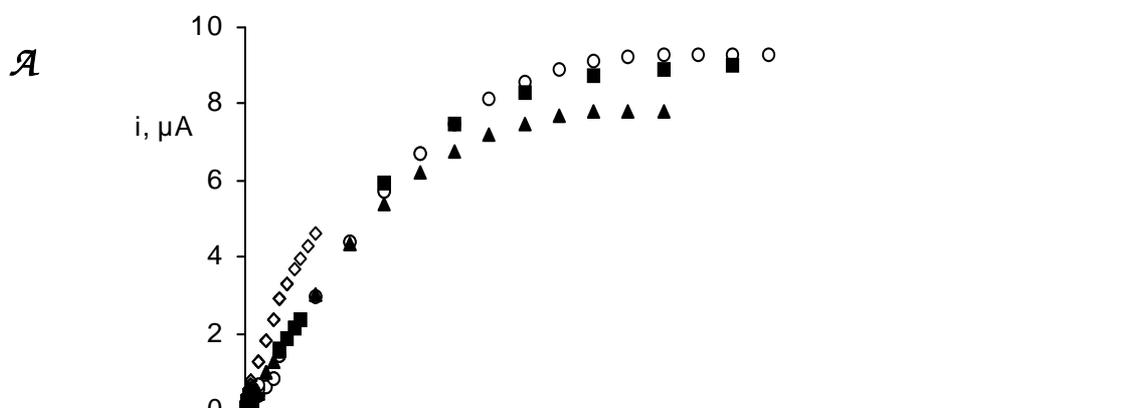


Figura 57. Curvas de calibrado obtenidas en disolución fosfato 0.05 mol L⁻¹ de pH 6.5, con el electrodo de: (A) grafito-Teflón-tirosinasa, (B) grafito-EPD-tirosinasa, y (C) RVC-resina epoxi-tirosinasa, para los sustratos: (Γ) 3,4-dimetilfenol, (μ) fenol, (■) 4-cloro-3-metilfenol y (σ) catecol; E_{ap} = -0.15 V.

Por otro lado, en la Figura 58 se representan las curvas de calibrado obtenidas para los tres fenoles que proporcionan una menor intensidad de corriente (2,4-dimetilfenol, 4-cloro-2-metilfenol y 2,3-dimetilfenol), con cada uno de los tres biosensores compósitos enzimáticos.

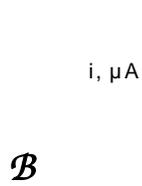
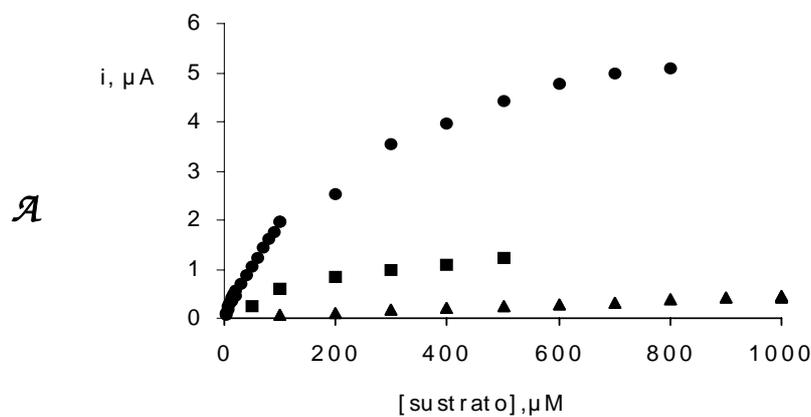


Figura 58. Curvas de calibrado obtenidas en la disolución reguladora de trabajo con los electrodos de: (A) grafito-Teflón-tirosinasa; (B) grafito-EPD-tirosinasa; y (C) PVC-resina epoxi-tirosinasa, para los sustratos: (■) 2,4-dimetilfenol, (●) 4-cloro-2-metilfenol y (▲) 2,3-dimetilfenol. $E_{ap} = -0.15V$.

En la Figura 59 se representan las curvas de calibrado para el fenol, catecol y 4-clorofenol obtenidas con los tres electrodos compósitos, con el fin de poder comparar gráficamente las respuestas relativas que se obtienen para estos compuestos con cada electrodo.

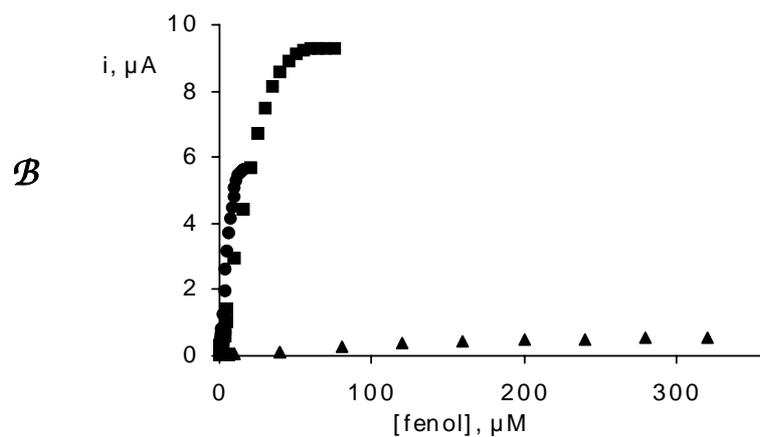
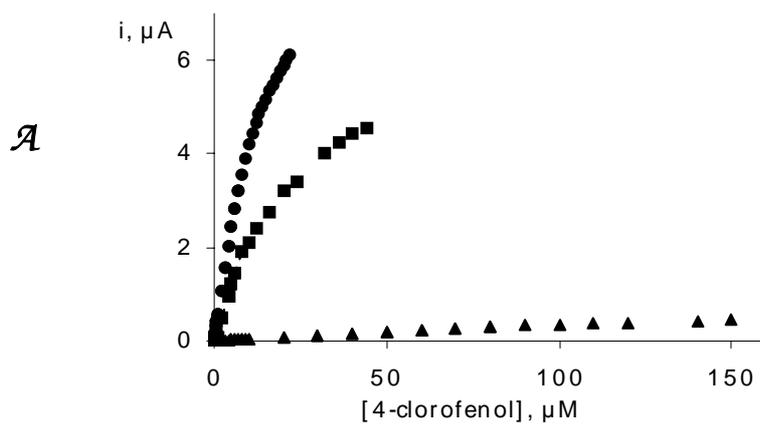


Figura 59. Curvas de calibrado obtenidas para (A) 4-clorofenol, (B) fenol y (C) catecol con el electrodo de (■) grafito-Teflón-tirosinasa; (●) grafito-EPD-tirosinasa; (▲) RVC-resina epoxi-tirosinasa. $E_{ap} = -0.15$ V.

Se ha considerado, en todos los casos, como intervalo de linealidad aquel que proporciona un coeficiente de correlación mayor de 0.997. En la Tabla 24 se recogen las características analíticas de los calibrados obtenidos para cada uno de los fenoles estudiados con los tres tipos de electrodos compósitos de tirosinasa. Los respectivos intervalos de confianza fueron calculados para un nivel de significación de 0.05.

Puede observarse cómo la sensibilidad obtenida es mayor para el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa y menor para el construido con RVC. La amplitud de los intervalos de linealidad sigue, en general, la misma tendencia. Estos resultados son concordantes con lo que cabía esperar teniendo en cuenta lo observado en los apartados precedentes.

En la Tabla 25 se recogen los valores de los límites de detección y de determinación. Los límites de detección se calcularon de acuerdo con el criterio $3s_b/m$ (Hasebe y Osteryoung, 1975) donde "m" es la pendiente del calibrado y " s_b " se estimó como la desviación estándar ($n=10$) de las señales obtenidas a partir de disoluciones diferentes de los sustratos a un nivel e concentración igual o próximo a la concentración más baja medida en el calibrado (véase columna "nivel de concentración" en la Tabla 25). Por su parte, los valores de los límites de determinación se calcularon utilizando el criterio $10s$ (ACS Commitee in Environmental Improvement, 1983), tomando como "s" el mismo valor que para el límite de detección, pero medido en concentración.

Tabla 24. Características analíticas de los calibrados para los fenoles utilizados como sustratos sobre los electrodos de:

1: Grafito-teflón-tirosinasa

2: Grafito-EPD-tirosinasa

3: RVC-resina epoxi-tirosinasa

SUSTRATO	Electrodo	INTERVALO	PENDIENTE	ORDENADA	r
		LINEAL (mol L ⁻¹)	($\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$)	EN EL ORIGEN (μA)	
fenol	1	(0.1-25) $\times 10^6$	(2.79 \pm 0.09) $\times 10^5$	(-2 \pm 9) $\times 10^2$	0.997
	2	(0.05-6) $\times 10^6$	(6.2 \pm 0.2) $\times 10^5$	(5 \pm 3) $\times 10^2$	0.998
	3	(0.02-4) $\times 10^5$	(3.4 \pm 3) $\times 10^3$	(0.3 \pm 3) $\times 10^3$	0.9997
Catecol	1	(0.1-15) $\times 10^6$	(3.0 \pm 0.1) $\times 10^5$	(-5 \pm 7) $\times 10^2$	0.997
	2	(0.05-8) $\times 10^6$	(6.6 \pm 0.1) $\times 10^5$	(2 \pm 3) $\times 10^2$	0.999
	3	(80.01-5) $\times 10^5$	(4.11 \pm 0.09) $\times 10^3$	(1 \pm 2) $\times 10^3$	0.999
3,4-DMF	1	(0.1-6) $\times 10^6$	(5.2 \pm 0.2) $\times 10^5$	(2.2 \pm 0.7) $\times 10^1$	0.998
	2	(0.2-9) $\times 10^7$	(1.2 \pm 0.1) $\times 10^6$	(6 \pm 5) $\times 10^2$	0.998
	3	(0.01-3) $\times 10^5$	(4.78 \pm 0.06) $\times 10^3$	(-0.2 \pm 5) $\times 10^4$	0.9997
4-cloro-3MF	1	(0.1-20) $\times 10^6$	(2.91 \pm 0.07) $\times 10^5$	(1.3 \pm 0.5) $\times 10^1$	0.999
	2	(0.2-3) $\times 10^7$	(2.0 \pm 0.4) $\times 10^6$	(4 \pm 6) $\times 10^2$	0.998
	3	(0.01-0.2) $\times 10^5$	(5.9 \pm 0.9) $\times 10^3$	(0.1 \pm 6) $\times 10^3$	0.999
4-clorofenol	1	(0.74-8) $\times 10^6$	(2.5 \pm 0.1) $\times 10^5$	(-6 \pm 6) $\times 10^2$	0.998
	2	(0.05-7) $\times 10^6$	(4.6 \pm 0.1) $\times 10^5$	(6 \pm 3) $\times 10^2$	0.999
	3	(0.01-8) $\times 10^5$	(3.94 \pm 0.06) $\times 10^3$	(0.2 \pm 2) $\times 10^3$	0.999
4-cloro-2-MF	1	(5-10) $\times 10^5$	(6 \pm 5) $\times 10^3$	(0 \pm 3) $\times 10^1$	0.998
	2	(2-30) $\times 10^6$	(7.1 \pm 0.4) $\times 10^4$	(-4 \pm 6) $\times 10^2$	0.999
	3	(5-10) $\times 10^5$	(2.1 \pm 0.4) $\times 10^2$	(-0.1 \pm 2) $\times 10^3$	0.998
2,4-DMF	1	(0.7-100) $\times 10^6$	(1.86 \pm 0.06) $\times 10^4$	(1.1 \pm 0.5) $\times 10^1$	0.998
	2	(1-50) $\times 10^6$	(3.3 \pm 0.1) $\times 10^4$	(5 \pm 2) $\times 10^2$	0.999
	3	(0.2-30) $\times 10^5$	(5.8 \pm 0.3) $\times 10^2$	(-3 \pm 3) $\times 10^3$	0.997
2,3-DMF	1	(1.0-10) $\times 10^4$	(4.0 \pm 0.8) $\times 10^2$	(2 \pm 5) $\times 10^2$	0.999
	2	(1-7) $\times 10^5$	(1.04 \pm 0.08) $\times 10^4$	(4 \pm 4) $\times 10^2$	0.998
	3	(2-40) $\times 10^4$	(7.7 \pm 0.4)	(3 \pm 8) $\times 10^4$	0.999

Tabla 25. Límites de detección y cuantificación para los compuestos fenólicos estudiados obtenidos con electrodos de:

1: Grafito-teflón-tirosinasa

2: Grafito-EPD-tirosinasa

<i>SUSTRATO</i>	<i>ELECTRODO</i>	<i>Nivel CC. (mol L⁻¹)</i>	<i>Límite de detección (mol L⁻¹)</i>	<i>Límite de determinación (mol L⁻¹)</i> 1)
<i>Fenol</i>	1	2.0×10^{-7}	9.9×10^{-8}	3.3×10^{-7}
	2	5.0×10^{-8}	2.63×10^{-8}	8.8×10^{-8}
	3	2.0×10^{-7}	1.1×10^{-7}	3.5×10^{-7}
<i>Catecol</i>	1	2.0×10^{-7}	1.0×10^{-7}	3.4×10^{-7}
	2	5.0×10^{-8}	2.8×10^{-8}	9.2×10^{-8}
	3	2.0×10^{-7}	9.2×10^{-8}	3.1×10^{-7}
<i>3,4-DMF</i>	1	1.0×10^{-7}	1.0×10^{-7}	3.4×10^{-7}
	2	2.0×10^{-8}	8.7×10^{-9}	2.9×10^{-8}
	3	1.0×10^{-7}	3.0×10^{-8}	1.0×10^{-7}
<i>4-Cl-3-MF</i>	1	1.0×10^{-7}	3.1×10^{-8}	4.2×10^{-7}
	2	2.0×10^{-8}	5.4×10^{-9}	1.8×10^{-8}
	3	2.0×10^{-7}	3.5×10^{-8}	1.1×10^{-7}
<i>4-Clorofenol</i>	1	1.0×10^{-7}	7.4×10^{-8}	2.5×10^{-7}
	2	5.0×10^{-8}	2.3×10^{-8}	7.8×10^{-8}
	3	1.0×10^{-7}	7.1×10^{-8}	2.4×10^{-7}
<i>4-Cl-2-MF</i>	1	5×10^{-5}	2.3×10^{-5}	4.3×10^{-5}
	2	2.0×10^{-8}	5.4×10^{-9}	1.8×10^{-8}
	3	5.0×10^{-5}	4.2×10^{-5}	9.0×10^{-5}
<i>2,4-DMF</i>	1	2.5×10^{-6}	7.1×10^{-7}	2.4×10^{-6}
	2	2.0×10^{-6}	6.7×10^{-7}	2.2×10^{-6}
	3	2.0×10^{-6}	1.3×10^{-6}	4.6×10^{-6}
<i>2,3-DMF</i>	1	1.0×10^{-4}	6.7×10^{-5}	1.2×10^{-4}
	2	1.0×10^{-5}	8.0×10^{-6}	2.0×10^{-5}
	3	2.0×10^{-4}	8.1×10^{-5}	2.7×10^{-4}

IV.2.9. Sensibilidad de los electrodos compósitos de tirosinasa para los distintos compuestos fenólicos estudiados

Según se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior, los electrodos compósitos de tirosinasa no muestran la misma sensibilidad para todos los compuestos fenólicos. Asimismo, se ha visto en el apartado IV.2.7 que cada compuesto presenta distinta afinidad por la enzima, lo que conlleva valores diferentes de la constante de Michaelis-Menten aparente, y

que la velocidad máxima aparente, que es una estimación de la velocidad de conversión del complejo enzima-sustrato en los productos de reacción, tampoco es igual para todos los fenoles. Como se predice teóricamente, la sensibilidad de los biosensores para cada compuesto fenólico es mayor cuanto menor es su constante de Michaelis y cuanto mayor es su velocidad máxima. Por lo tanto, la relación $V_{máx,ap}/K_{m,ap}$ denominada eficiencia catalítica (Frescht, 1980), da una indicación a priori de la tendencia de sensibilidad para los sustratos, de modo que, valores mayores de $V_{máx,ap}/K_{m,ap}$ implican una mayor sensibilidad. Además, este parámetro indica la especificidad de la enzima para los diferentes sustratos (Dixon y Webb, 1979).

En las Tablas 26, 27 y 28 se recogen los valores de la velocidad máxima aparente, de la constante de Michaelis-Menten, del cociente $V_{máx,ap}/K_{m,ap}$ y con objeto de poder comparar, asimismo los valores de las pendientes de calibrado para los distintos fenoles con cada uno de los biosensores enzimáticos desarrollados.

Tabla 26. Valores de las constantes cinéticas, de la eficiencia catalítica $V_{máx,ap}/K_m$ y de las pendientes de las curvas de calibrado para los compuestos fenólicos estudiados, obtenidos con un electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa.

COMPUESTO FENÓLICO	$V_{máx}$, μA	$K_m \times 10^5$, mol L^{-1}	PENDIENTE, $\mu A L mol^{-1}$	$V_{máx}/(K_m \times 10^5)$, mol L^{-1}
3,4-dimetilfenol	6.04	0.789	52×10^4	7.67
catecol	17.1	4.99	30×10^4	3.43
4-cloro-3-metilfenol	13.1	3.73	29×10^4	3.48
fenol	24.4	7.79	28×10^4	3.14
4-clorofenol	12.5	6.90	25×10^4	1.81
2-clorofenol	3.56	10.9	14×10^4	0.328
2,4-dimetilfenol	7.90	53.0	1.9×10^4	0.15
4-cloro-2-metilfenol	3.38	17.2	0.6×10^4	0.20
2,3-dimetilfenol	2.29	435	0.04×10^4	0.0053

Tabla 27. Valores de las constantes cinéticas, de la eficiencia catalítica $V_{máx,ap}/K_m$ y de las pendientes de las curvas de calibrado para los compuestos fenólicos estudiados, obtenidos con un electrodo de grafito-EPD-tirosinasa.

COMPUESTO FENÓLICO	$V_{máx}$, μA	$K_m \times 10^5$, mol L^{-1}	PENDIENTE, $\mu A L mol^{-1}$	$V_{máx}/(K_m \times 10^5)$, mol L^{-1}
4-cloro-3-metilfenol	2.44	0.089	200×10^4	27.4
3,4-dimetilfenol	10.7	1.04	120×10^4	10.3
catecol	29.9	5.63	66×10^4	5.31
fenol	38.4	6.26	62×10^4	6.13
4-clorofenol	14.4	2.53	46×10^4	5.69
2-clorofenol	12.2	5.3	20×10^4	2.30
4-cloro-2-metilfenol	5.79	5.80	7.1×10^4	1.00
2,4-dimetilfenol	8.29	22.9	3.3×10^4	0.36
2,3-dimetilfenol	4.51	36.1	1.0×10^4	0.125

Tabla 28. Valores de las constantes cinéticas, de la eficiencia catalítica $V_{máx,ap}/K_m$ y de las pendientes de las curvas de calibrado para los compuestos fenólicos estudiados, obtenidos con un electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa.

COMPUESTO FENÓLICO	$V_{máx}$, μA	$K_m \times 10^5$, mol L^{-1}	PENDIENTE, $\mu A L mol^{-1}$	$V_{máx}/(K_m \times 10^5)$, mol L^{-1}
4-cloro-3-metilfenol	0.35	6.80	0.59×10^4	0.052
3,4-dimetilfenol	0.63	11.0	0.48×10^4	0.057
catecol	0.96	20.0	0.41×10^4	0.048
4-clorofenol	3.79	97.0	0.39×10^4	0.039
fenol	0.98	24.0	0.34×10^4	0.041
2,4-dimetilfenol	0.50	64.0	0.058×10^4	0.0078
4-cloro-2-metilfenol	0.08	120	0.021×10^4	0.00067
2-clorofenol	0.06	94	0.017×10^4	0.00064
2,3-dimetilfenol	0.11	1122	0.00077×10^4	0.000098

Cuando se comparan las pendientes de los calibrados con los valores de $V_{máx,ap}/K_m$ se deduce que, efectivamente, existe una correlación entre la sensibilidad y la eficiencia catalítica de la reacción enzimática para cada uno de los sustratos fenólicos. Por otro lado, puede observarse cómo el orden de sensibilidad no es idéntico para los tres electrodos compósitos de tirosinasa, sino que existen algunas diferencias de una matriz a otra. No obstante, puede encontrarse una tendencia general para todos ellos. En los tres casos existen cuatro compuestos fenólicos para los que la sensibilidad es considerablemente menor que para el resto; son los que tienen una posición orto ocupada (2-clorofenol, 4-cloro-2-metilfenol, 2,4-dimetilfenol, 2,3-

dimetilfenol). Esto da lugar a un impedimento estérico para la unión del sustrato a la enzima, por lo que, en todos los casos estos sustratos poseen una constante de Michaelis-Menten aparente mayor. Por otra parte, se observa también que los compuestos fenólicos que poseen las posiciones 3 y 4 del anillo aromático ocupadas tienen una alta pendiente de sus curvas de calibrado, probablemente como consecuencia de que estos sustituyentes producen una estabilización de la unión enzima-sustrato. Esto se ve corroborado por los bajos valores de $K_{m,ap}$ obtenidos para estos compuestos con los tres electrodos compósitos.

El catecol también se detecta en los tres casos con una elevada sensibilidad como consecuencia de tener un grupo hidroxilo en posición orto, lo que facilita la conversión en quinona, mientras que el fenol y el 4-clorofenol proporcionan respuestas de sensibilidad parecidas, ya que ambos tienen las dos posiciones orto libres.

El orden de sensibilidad para los nueve fenoles ensayados con cada biosensor compósito de tirosinasa es el siguiente:

- Grafito-Teflón-Tyr: 3,4-DMF; catecol; 4-Cl-3-MF; fenol; 4-ClF; 2-ClF; 2,4-DMF; 4-Cl-2-MF; 2,3-DMF.
- Grafito-PED-Tyr: 4-Cl-3-MF; 3,4-DMF; catecol; fenol; 4-ClF; 2-ClF; 4-Cl-2-MF; 2,4-DMF; 2,3-DMF.
- PVC-resina epoxi-Tyr: 4-Cl-3-MF; 3,4-DMF; catecol; 4-ClF; fenol; 2,4-DMF; 4-Cl-2-MF; 2-ClF; 2,3-DMF.

El hecho de que existan diferencias en el orden de sensibilidad para los distintos compuestos fenólicos con cada biosensor sugiere la influencia de otros factores, además de los ya comentados, sobre las respuestas de los sustratos. Como ya se ha comentado, la naturaleza de la matriz electródica influye en las interacciones del ciclo catalítico de la tirosinasa. En general se puede decir que la respuesta del biosensor va a venir determinada por la afinidad entre la enzima y el sustrato, la velocidad de conversión catalítica, la capacidad de acumulación del analito sobre la superficie del electrodo, la hidrofobicidad del analito y la hidrofobicidad de la superficie electródica. Estos tres últimos factores dependen directamente de la naturaleza de la matriz electródica y pueden provocar diferencias en las respuestas amperométricas obtenidas para los mismos compuestos con cada electrodo compósito. Cuanto más parecida sea la polaridad del material aislante constituyente de la matriz y del compuesto fenólico, mayor tendencia tendrá éste hacia la superficie electródica, lo que supone una mayor posibilidad de que se produzca eficientemente la reacción con la enzima inmovilizada.

Por ejemplo, sobre el biosensor de grafito-Teflón-Tyr, el fenol para el que se observa una mayor sensibilidad es el 3,4-dimetilfenol, un compuesto bastante apolar con gran afinidad por la enzima. Sin embargo, con los otros dos biosensores compósitos, el compuesto fenólico que presenta mayor sensibilidad es el 4-cloro-3-metilfenol, que también posee gran afinidad por la enzima, pero que es más polar que el 3,4-dimetilfenol. Esto significa que el 3,4-dimetilfenol tiene una mayor afinidad que el 4-cloro-3-metilfenol por la superficie de grafito-Teflón, lo que puede atribuirse al carácter marcadamente hidrofóbico del Teflón, favoreciéndose así la reacción con la enzima. En definitiva, estos resultados demuestran que, dependiendo de las características de los analitos, la matriz electródica más adecuada para su detección puede ser distinta.

V.2.10. Protocolo para el aseguramiento de la calidad de las medidas realizadas con los biosensores

Dado que existe una serie de factores que influyen significativamente en la respuesta amperométrica de los biosensores, la utilización de los mismos en análisis de rutina debe exigir un control que asegure la calidad de las medidas efectuadas. A continuación se propone un protocolo básico como estrategia para asegurar dicha calidad:

- 1. Se han de seguir estrictamente los procedimientos de fabricación de los biosensores detallados en la Parte Experimental.*
- 2. Las pastillas madre deben almacenarse en frigorífico.*
- 3. Los electrodos de grafito-Teflón-Tyr y RVC-resina epoxi-Tyr deben almacenarse en frigorífico y en seco, tras lavado y secado de la superficie con agua milli-Q y papel suave. Los electrodos de grafito-EPD-Tyr deben almacenarse igualmente limpios y secos, pero a temperatura ambiente, protegidos del polvo ambiental.*
- 4. Cuando se vayan a realizar las medidas, se ha de permitir que se alcance la temperatura ambiente y se realizarán entonces medidas ($n=3$) de control para comprobar si su valor medio está incluido dentro del margen considerado como aceptable. Est margen está determinado por $\chi \pm 3s$, siendo χ la media de todas las medidas realizadas durante el primer día de medida, en el caso del grafito-Teflón-Tyr y del RVC-resina epoxi-Tyr, o el segundo día de medida, en el caso grafito-EPD-Tyr, para el primer electrodo de cada pastilla y de cada lote.*
- 5. Para llevar a cabo las medidas de control, se preparará diariamente una disolución estándar de fenol $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (o $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ si se trata del electrodo de grafito-EPD-Tyr) a partir de una disolución patrón de fenol 0.1 mol L^{-1} almacenada a 4°C . Se sumerge el biosensor en la célula de medida que contiene 5.0 mL de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5. Se aplica al electrodo un potencial constante de -0.15 V y, una vez que la corriente de fondo se estabilice, se añaden $25 \mu\text{L}$ de la disolución de fenol $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Por lo tanto, el valor de intensidad de corriente que corresponde a una concentración de fenol de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ con el grafito-EPD-Tyr) es el que se toma como referencia para realizar las medidas de control.*

6. Si la media de las medidas de control queda fuera de los límites establecidos, se procede a pulir la superficie electrodica durante 5 segundos con papel abrasivo de SiC. A continuación se repiten las medidas de control. Si tras la regeneración de la superficie electrodica las señales no quedan incluidas dentro de los límites de control, el biosensor debe desecharse y reemplazarse por uno nuevo.

IV.2.11. Electroodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa, grafito-EPD-tirosinasa y RVC-resina epoxi-tirosinasa como detectores amperométricos en sistemas en flujo

Las características ideales de un detector para medir en continuo son: alta sensibilidad, bajo límite de detección, bajo ruido de fondo, rapidez de respuesta, pequeña contribución al ensanchamiento de banda, amplio intervalo lineal, independencia del caudal, reproducibilidad y selectividad. En general, los detectores amperométricos se aproximan bastante al detector ideal, excepto en lo que respecta a la dependencia con el caudal y a la selectividad. La dependencia con el caudal de este tipo de detectores se puede optimizar y no supone un grave problema gracias al uso de bombas peristálticas. Por lo que respecta a la falta de selectividad, el problema se debe a que, en la mayoría de los casos, es necesario aplicar un potencial suficientemente oxidante/reductor para oxidar/reducir el analito, lo que da lugar a la existencia de interferencias por parte de otras especies electroactivas a dichos valores del potencial. Este problema puede minimizarse introduciendo en el sistema modificadores específicos, como en nuestro caso son las enzimas. Por lo tanto, los biosensores compósitos presentan en principio unas características adecuadas para su utilización en continuo, si bien la velocidad de respuesta en estos casos va a estar limitada por la velocidad de la reacción enzimática.

La técnica de análisis por inyección en flujo presenta una serie de ventajas frente a las medidas en discontinuo cuando la detección se lleva a cabo amperométricamente. Esto se debe a que la respuesta amperométrica es lo suficientemente estable y rápida como para mostrar los cambios en la intensidad de corriente que se producen como consecuencia de la presencia del analito en la disolución portadora, obteniéndose picos bien definidos que pueden distinguirse fácilmente de la señal de fondo. Además, estas respuestas pueden obtenerse en menor tiempo que las señales en discontinuo, ya que no es necesario medir la intensidad de corriente en el estado estacionario. Por todas estas razones, es interesante evaluar el funcionamiento de los biosensores compósitos desarrollados en sistemas en flujo.

En este tipo de biosensorización, las reacciones enzimáticas tienen lugar antes que la generación de la señal amperométrica, por lo que dichas reacciones deben ser rápidas para que los electroodos compósitos sean adecuados para el análisis en flujo. Ya se puso de manifiesto en las medidas en discontinuo la relativa rapidez de respuesta de los biosensores de tirosinasa, si bien, como ya se discutió, dicha velocidad de respuesta depende del sustrato fenólico. En la Figura 60 se muestran los diagramas obtenidos utilizando los electroodos compósitos de tirosinasa como sistemas de detección amperométrica para inyecciones sucesivas de fenol en un sistema de flujo.

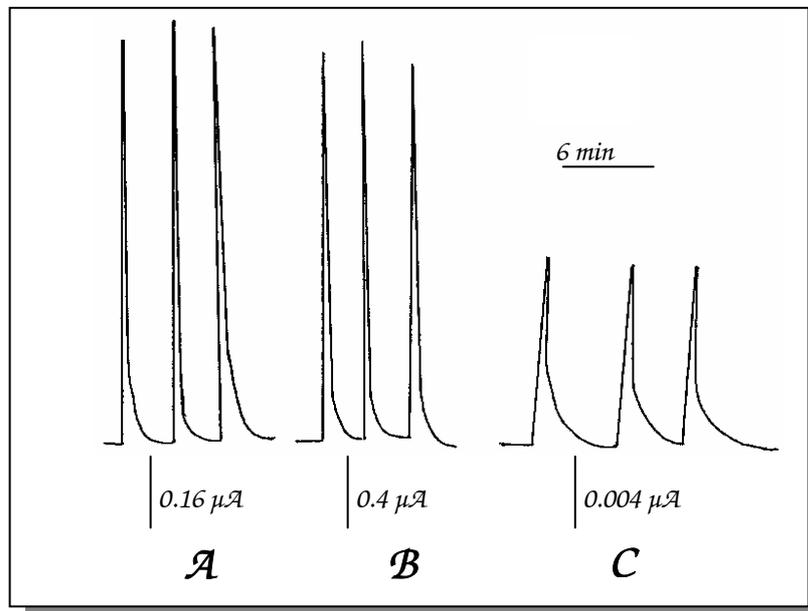


Figura 60. Diagramas obtenidos para inyecciones sucesivas de fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando como detector (A) el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa; (B) el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa; (C) el electrodo de RVC-epoxi-tirosinasa; Disolución portadora: regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5); caudal: 0.5 mL min^{-1} ; volumen de inyección: $90 \mu\text{L}$; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

En la figura se observa cómo en los tres casos se obtienen picos amperométricos bien definidos. Aunque la escala de intensidades es diferente, la escala de tiempo es la misma en los tres diagramas, por lo que puede apreciarse cómo los picos tienen más cola cuando el detector utilizado es un electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa. Recuérdese que en las medidas en discontinuo se observaron tiempos de respuesta mayores con este electrodo, lo que se atribuyó al hecho de poseer menos unidades de enzima en la superficie electródica. En un sistema hidrodinámico, en el que el caudal es el mismo en los tres casos, un pico con más cola puede indicar una mayor acumulación del analito en la superficie electródica debida a interacciones con la superficie, o a una menor velocidad de conversión del complejo enzima-sustrato en los productos.

Por otro lado, al igual que ocurría con las medidas en discontinuo, la respuesta amperométrica del electrodo de grafito-EPD-Tyr es aproximadamente 3 veces mayor que la del grafito-Teflón-Tyr y más de 150 veces que la del electrodo de RVC-resina epoxi-Tyr.

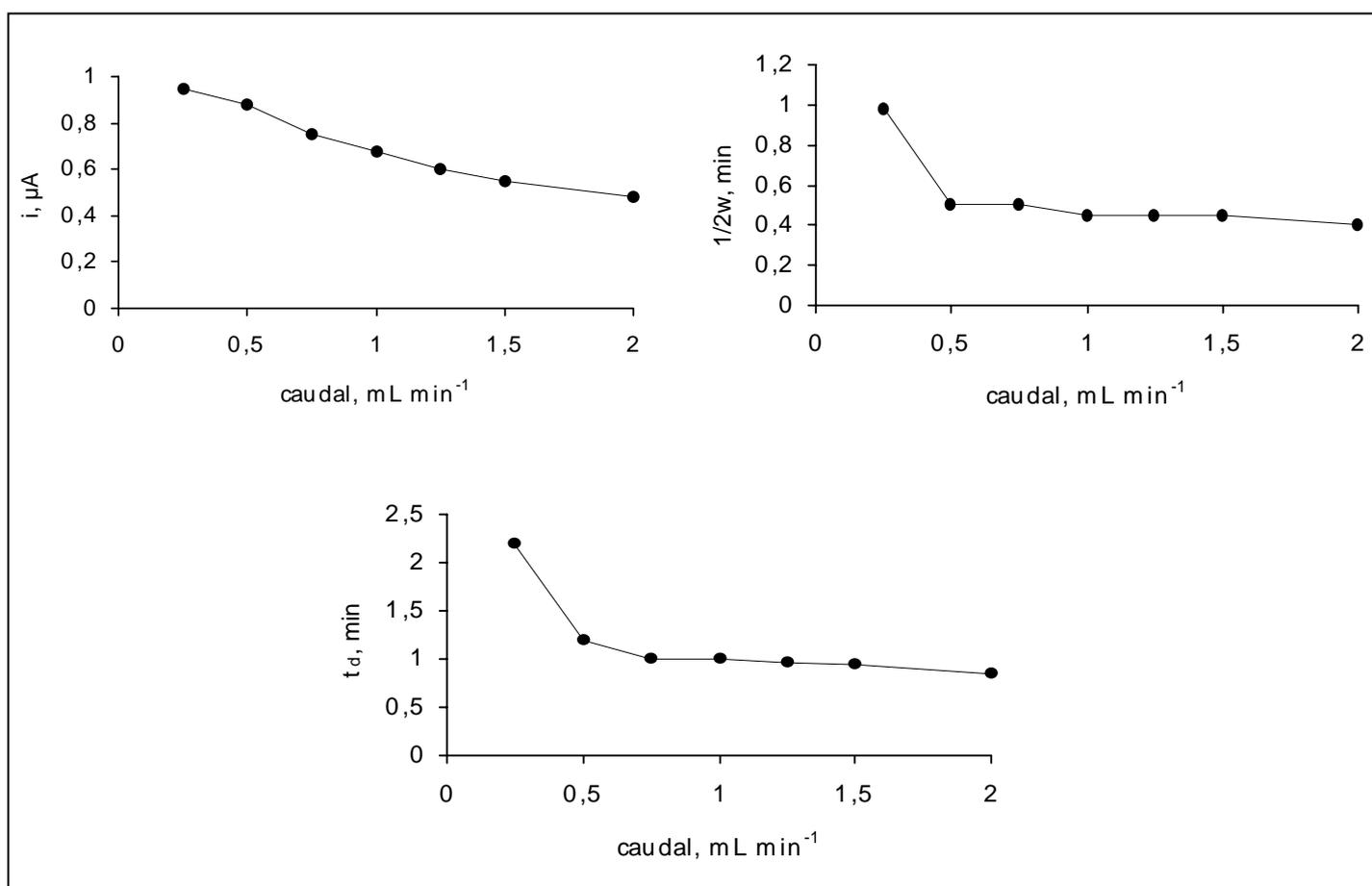
IV.2.11.1. Optimización de las variables experimentales

Las variables relacionadas con la composición de los electrodos, el pH de la disolución reguladora y el potencial aplicado, que tienen que ver con las reacciones enzimáticas y electroquímica, van a ser obviamente las mismas que las elegidas para las medidas en discontinuo. Por consiguiente, sólo se optimizarán las variables relacionadas con el sistema en flujo, es decir, el volumen de inyección y el caudal de la disolución portadora.

IV.2.11.1.1. Caudal de la disolución portadora

a) Electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa

En la Figura 61 se muestra la dependencia de la intensidad de pico, la anchura de pico a mitad de la altura y la anchura de pico en línea base, con el caudal de disolución portadora (regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5) para inyecciones de fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



línea base). *Electrolito:* regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹, pH 6.5; $E_{ap} = -0.15$ V; volumen de inyección: 50 μL . Detector: electrodo de grafeno-Teflón-Tyr.

Como se puede observar, la corriente de pico disminuye cuando aumenta el caudal. Este comportamiento es característico de los sistemas FIA en los que se utilizan biosensores enzimáticos como detectores amperométrico, y es diferente al observado en los sistemas FIA normales, en los cuales un aumento de caudal provoca un aumento de la altura de pico.

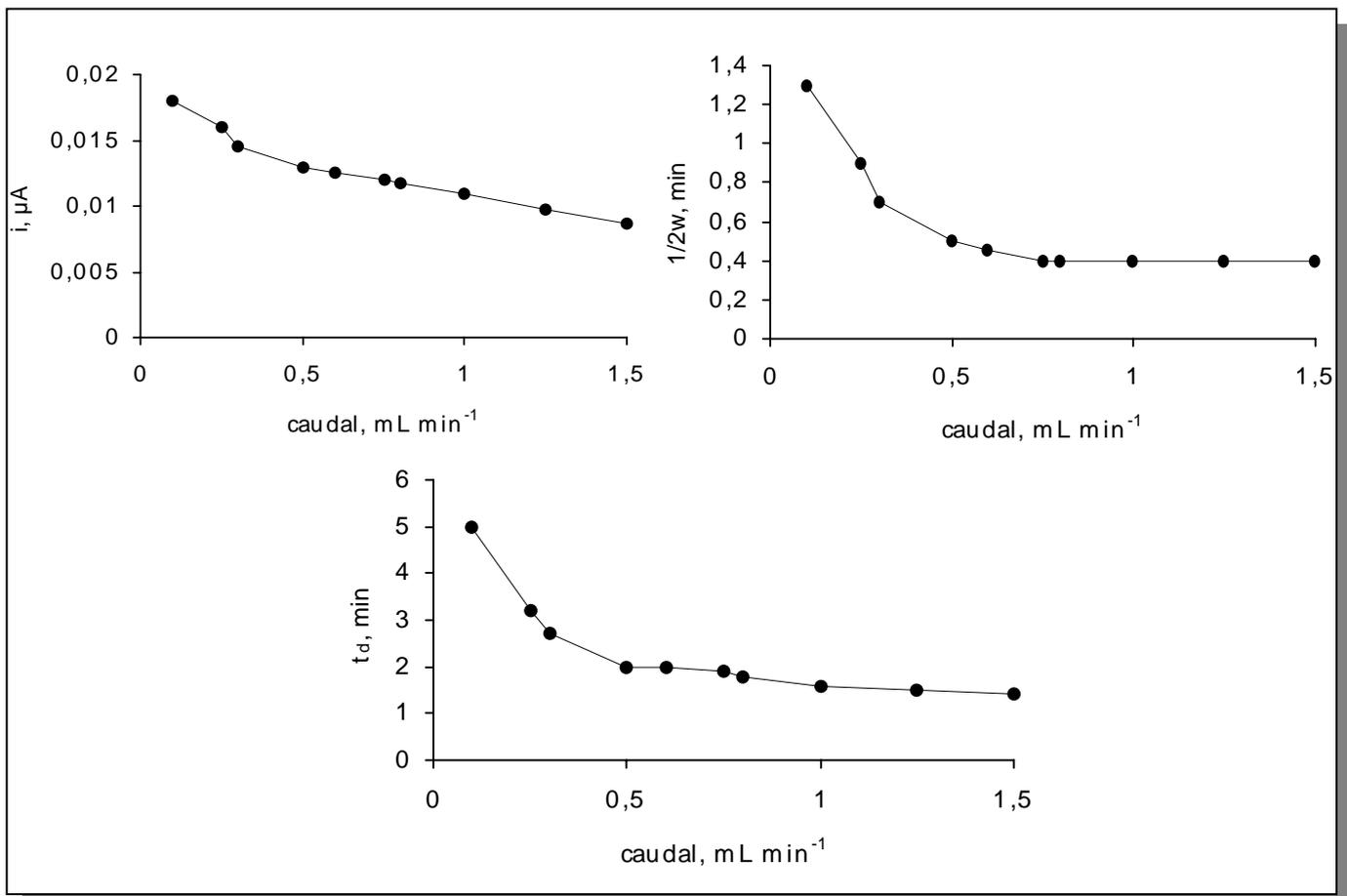
El comportamiento observado puede explicarse por el hecho de que, cuando se emplean biosensores enzimáticos, hay que tener en cuenta que la señal depende de la velocidad de reacción enzimática. Un aumento del caudal provoca que la reacción enzimática se produzca en menor extensión, por lo que la especie monitorizada, que normalmente es un producto de la reacción enzimática, tendrá una menor concentración, y proporcionará una menor intensidad de pico en el fiagrama.

Por otro lado, la anchura de pico medida en la semialtura y en línea base disminuyen al aumentar el caudal de la disolución portadora hasta alcanzar un valor prácticamente constante a 0.5 mL min⁻¹. Teniendo en cuenta estos factores, se ha elegido este caudal para estudios posteriores ya que permite obtener una altura de pico adecuada y tiempos de medida no demasiado grandes.

b) Electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa

En la Figura 62 se han representado los mismos parámetros mencionados anteriormente para el electrodo de grafito-Teflón-Tyr en función del caudal del portador empleando idénticas condiciones de medida.

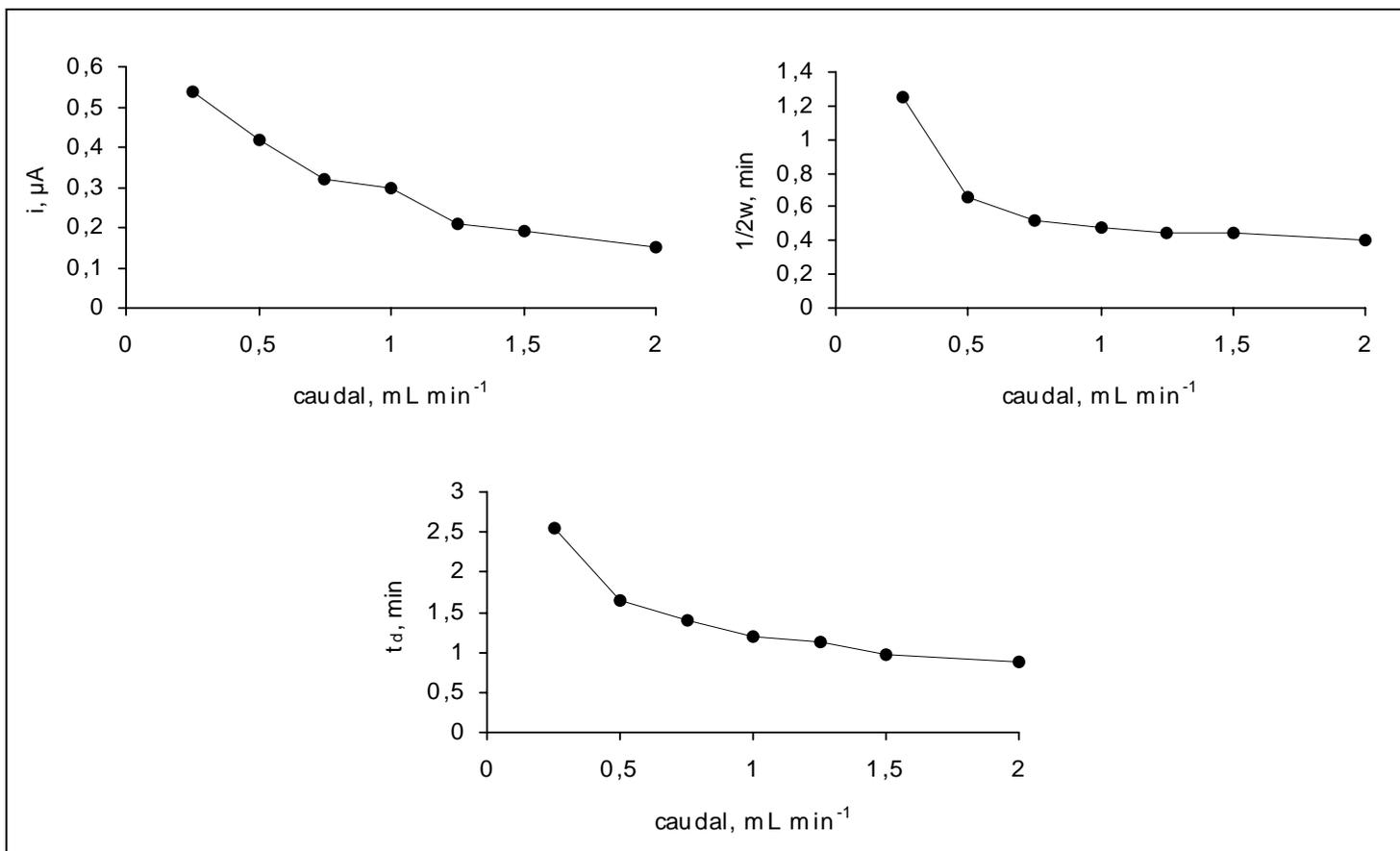
Como era de esperar, el comportamiento observado es análogo al ya comentado para el biosensor de grafito-Teflón-Tyr, por lo que el caudal escogido fue también de 0.5 mL min^{-1} .



media base). Electrodo: resina epoxi-EPD-tirosinasa. Volumen de inyección: 50 μL . Detector: electrodo de PVC-resina epoxi-Tyr.

c) Electrodo de grafito-EPD-tirosinasa

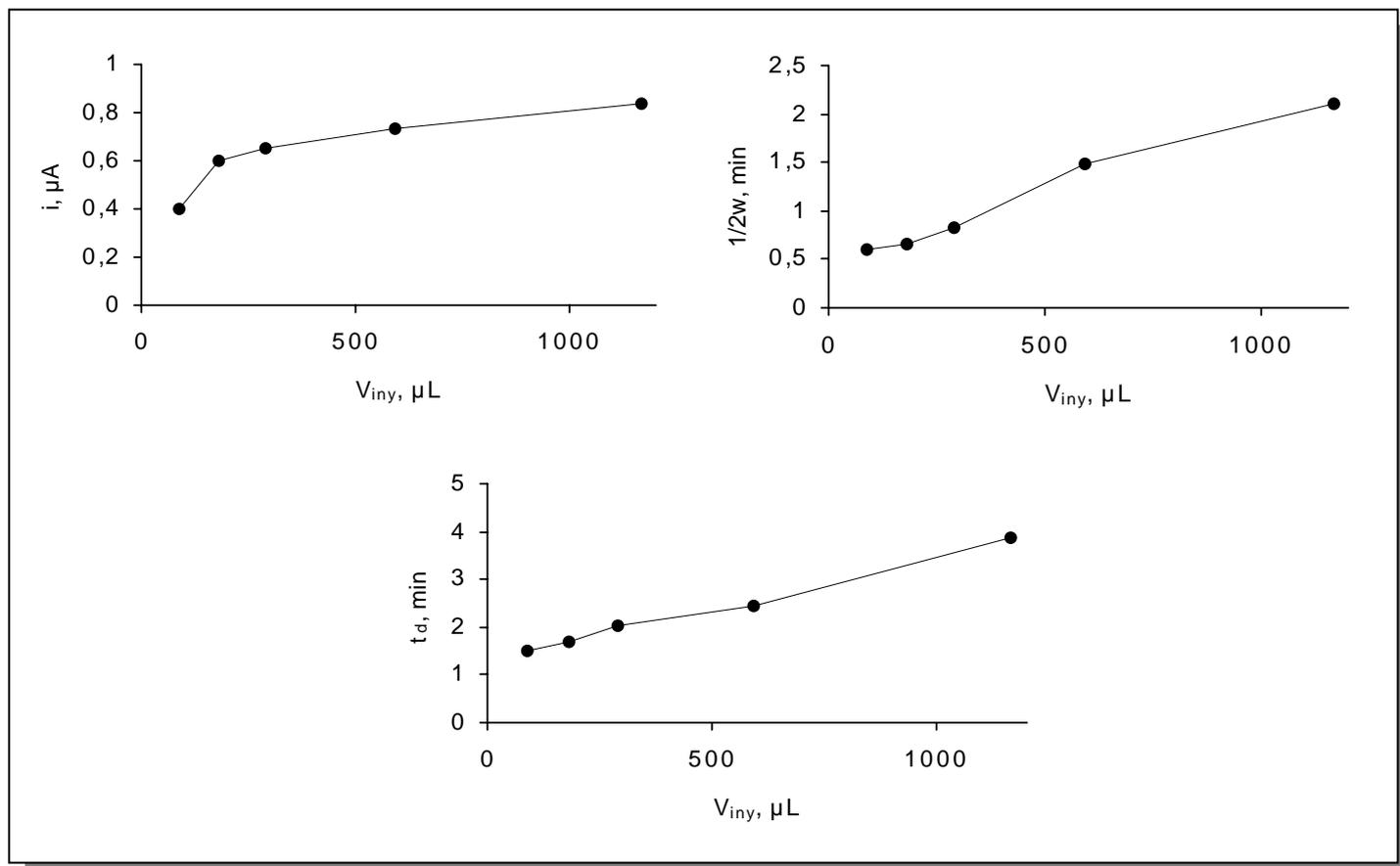
En la Figura 63 se muestra el mismo tipo de estudio para este biosensor. Nuevamente, la tendencia observada es la misma que para los otros dos biosensores compósitos, por lo que se ha elegido el mismo caudal, 0.5 mL min^{-1} , para estudios posteriores.



línea base). Portador: regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹, pH 6.5; E_{ap} = -0.15V; Volumen de inyección: 90 μL . Detector: electrodo de grafito-EPD-Tyr.

IV.2.11.1.2. Optimización del volumen de inyección

En los sistemas en flujo, un mayor volumen de inyección conlleva un pico más ancho y por tanto un mayor tiempo de análisis. En general, esto no es conveniente, por lo que el volumen de inyección debe ser el menor posible. Sin embargo, para muestras con concentraciones de analito muy cercanas al límite de detección, un mayor volumen de inyección permite la obtención de señales más intensas y por tanto más apropiadas para este tipo de análisis. A modo de ejemplo, en la Figura 64 se muestra la influencia del volumen de inyección sobre la intensidad de pico, la anchura de pico a la semialtura y en línea base, para inyecciones de fenol 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ utilizando como detector un electrodo de grafito-EPD-tirosinasa.



grafito-EPD-Tyr.

Puede observarse cómo al aumentar el volumen de inyección se produce un aumento notable de la intensidad de pico hasta un valor de 180 μL , a partir del cual dicho un aumento es menos pronunciado, ya que se está llegando al estado estacionario y por tanto no es posible alcanzar una mayor respuesta. Por otro lado, se aprecia una relación aproximadamente lineal entre el volumen de inyección y la anchura de pico en línea base y a la semialtura. Por lo tanto, puede concluirse que en ningún caso el volumen de inyección debe ser tan alto como para alcanzar el estado estacionario, ya que de esta forma sólo se conseguiría disminuir la velocidad de respuesta del electrodo. Para estudios posteriores se ha escogido el volumen mínimo de inyección utilizado, 90 μL , con objeto de obtener respuestas más rápidas.

IV.2.11.2. Repetibilidad de las señales amperométricas

Se ha evaluado la repetibilidad de las medidas obtenidas con cada uno de los electrodos compósitos de tirosinasa para cinco sustratos fenólicos, empleando las condiciones escogidas en los apartados anteriores. Para ello se realizaron 20 inyecciones sucesivas de cada fenol a los niveles de concentración indicados en la Tabla 29, en la que se recogen los valores de la desviación estándar relativa obtenidos en cada caso. En las Figura 65, 66 y 67 se muestran los diagramas obtenidos para las

inyecciones sucesivas de las disoluciones patrón de los cinco sustratos con los electrodos de grafito-EPD-Tyr, grafito-Teflón-Tyr y RVC-resina epoxy-Tyr, respectivamente.

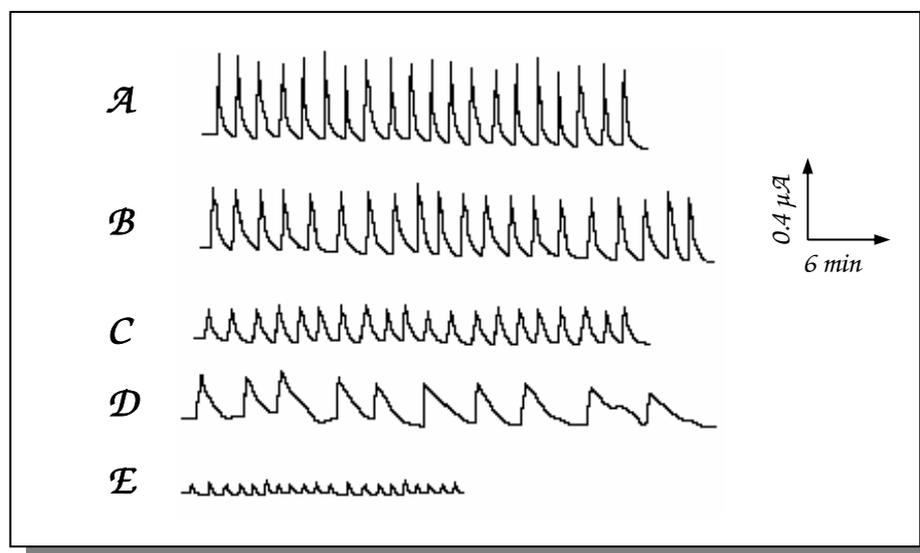


Figura 65. Diagramas obtenidos con el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa para inyecciones sucesivas de: (A) fenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) 3,4-dimetilfenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (D) 4-cloro-2-metilfenol $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; y (E) 2-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Portador: 0.05 mol L^{-1} de regulador fosfato, pH 6.5; caudal: 0.5 mL min^{-1} ; V_i : $90 \mu\text{L}$; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

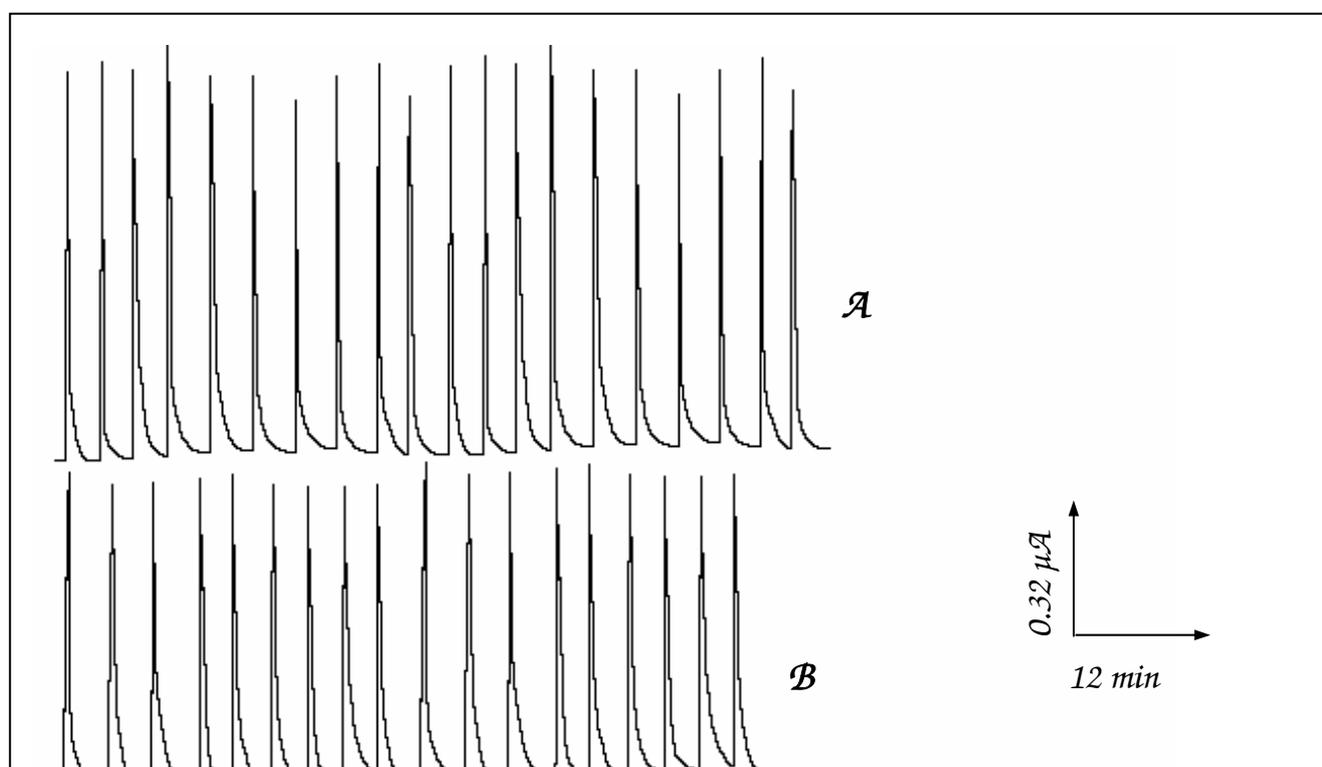
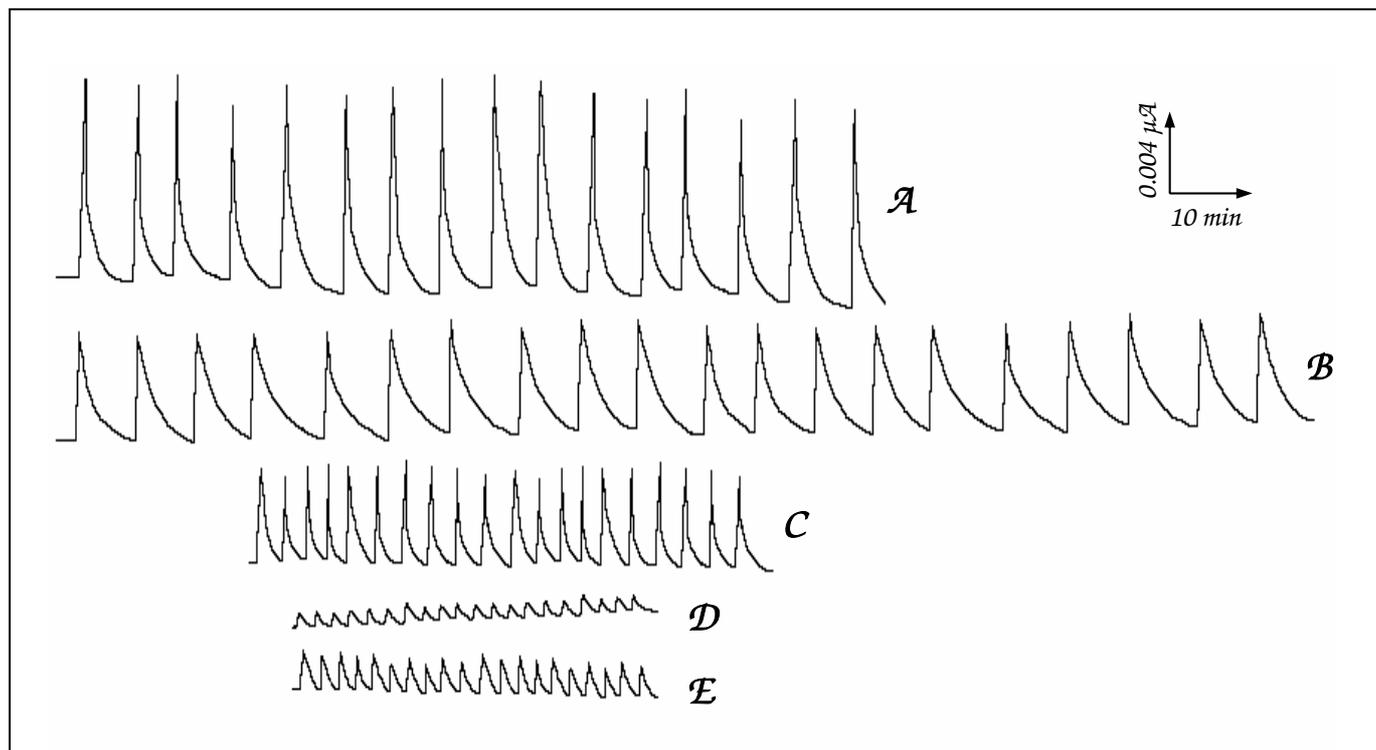


Figura 66. Diagramas obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa para inyecciones sucesivas de (A) fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (B) 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (C) 3,4-dimetilfenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) 4-cloro-2-metilfenol $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; y (E) 2-clorofenol $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Portador: 0.05 mol L^{-1} de regulador fosfato, pH 6.5; caudal: 0.5 mL min^{-1} ; V_i : $90 \mu\text{L}$; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.



(B) 4-clorofenol $1.0 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$; (C) 3,4-dimetilfenol $1.0 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$; (D) 4-cloro-2-metilfenol $1.0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$; y (E) 2-clorofenol $5.0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$. Portador: 0.05 mol L^{-1} de regulador fosfato, $\text{pH } 6.5$; caudal: 0.5 mL min^{-1} ; V_i : $90 \mu\text{L}$; $E_{\text{ap}} = -0.15 \text{ V}$.

Tabla 29. Valores de la desviación estándar relativa obtenidos para las señales amperométricas de 20 inyecciones sucesivas de los sustratos fenólicos al nivel de concentración indicado entre paréntesis cuando se utilizan los electrodos compósitos de tirosinasa como detectores amperométricos en sistemas de inyección en flujo. Portador: regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} ($\text{pH } 6.5$); caudal: 0.5 mL min^{-1} ; $E_{\text{ap}} = -0.15 \text{ V}$

	$RSD, \% \text{ (nivel de concentración)}$		
	Grafito-Teflón-Tyr	Grafito-EPD-Tyr	RVC-resina epoxy-Tyr
Fenol	6.8 ($1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$)	5.8 ($1.0 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$)	5.0 ($1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$)
2-Clorofenol	8.9 ($1.0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$)	9.4 ($1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$)	4.5 ($5.0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$)
4-Clorofenol	4.2 ($1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$)	8.9 ($1.0 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$)	5.0 ($1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$)
4-Cloro-2-metilfenol	7.3 ($5.0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$)	9.8 ($2.0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$)	6.9 ($1.0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$)
3,4-Dimetilfenol	6.5 ($1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$)	8.7 ($1.0 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$)	5.8 ($1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$)

Los valores de RSD obtenidos permiten deducir que la reproducibilidad de las medidas amperométricas es aceptable, lo que indica una buena inmovilización de la enzima en las tres matrices electródicas a pesar de las condiciones hidrodinámicas. Resulta llamativo, no obstante, que los valores mayores de RSD se obtengan para el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa que es con el que se conseguían respuestas con una mejor repetibilidad en discontinuo. Este hecho no es achacable a pérdida de

enzima por solubilización de ésta en el portador, ya que no se observa una disminución paulatina de la señal durante las veinte inyecciones de cada sustrato fenólico. La peor repetibilidad puede deberse a que, al no alcanzarse el estado estacionario, las variaciones entre señales serán mayores para velocidades de la reacción enzimática mayores, lo que da lugar a valores de RSD superiores a los que se obtienen cuando se alcanza el estado estacionario.

IV.2.11.3. Tiempo de vida útil de los electrodos compósitos de tirosinasa para la monitorización mediante inyección en flujo de compuestos fenólicos

Uno de los objetivos de esta Tesis es evaluar la posibilidad de utilizar los biosensores compósitos para la monitorización continua de fenoles en aguas de vertido. Un aspecto fundamental es, por tanto, la estabilidad de los biosensores de tirosinasa cuando fluye continuamente portador y se aplica un potencial constante.

Para evaluar dicha estabilidad, se ha utilizado como disolución portadora agua de grifo, en lugar de la disolución reguladora de fosfato, con objeto de que el portador sea lo más parecido a una muestra real. No obstante, se ha comprobado que la estabilidad utilizando disolución de regulador fosfato como portador es la misma. En la Figura 68 se muestran los valores de intensidad de corriente obtenidos para inyecciones de fenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, realizadas cada media hora sobre la disolución portadora consistente en agua de grifo a un caudal de 0.5 mL min^{-1} y aplicando un potencial constante de -0.15 V . En la Figura 69 se muestran los resultados para experimentos similares pero realizados a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para los electrodos de grafito-Teflón-Tyr y RVC-resina epoxi-Tyr, y de $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para el electrodo de grafito-EPD-Tyr.

De los resultados obtenidos puede deducirse que la estabilidad de la respuesta amperométrica con el tiempo es menor cuando la concentración del sustrato inyectado es mayor, lo que puede deberse a un mayor ensuciamiento de la superficie electródica a concentraciones más elevadas. Esto hará necesario regenerar la superficie electródica con mayor frecuencia.

También se puede deducir que, para un nivel de concentración de fenol de $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, el biosensor de grafito-Teflón-Tyr proporciona una respuesta estable durante aproximadamente 8 horas, al igual que el de RVC-resina epoxi, mientras que el de grafito-EPD lo hace durante 6 horas. Para las concentraciones más altas, el electrodo de grafito-Teflón responde dentro de los límites de control durante 1 hora y media, y el de grafito-EPD durante algo más de 3 horas, lo que puede deberse a que, para este último biosensor, la concentración de fenol es 10 veces menor, y por tanto, el ensuciamiento superficial es menor. Sin embargo, la disminución de la señal analítica con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa es tan lenta, que es

posible la utilización de este electrodo como dispositivo de alarma durante períodos de tiempo de aproximadamente 5 horas. Por otro lado, el electrodo de RVC-resina epoxi-Tyr ha demostrado ser el más estable a altas concentraciones, manteniéndose dentro de los límites de control durante casi 5 horas, si bien a partir de las tres horas se observa una ligera disminución de la señal con el tiempo.

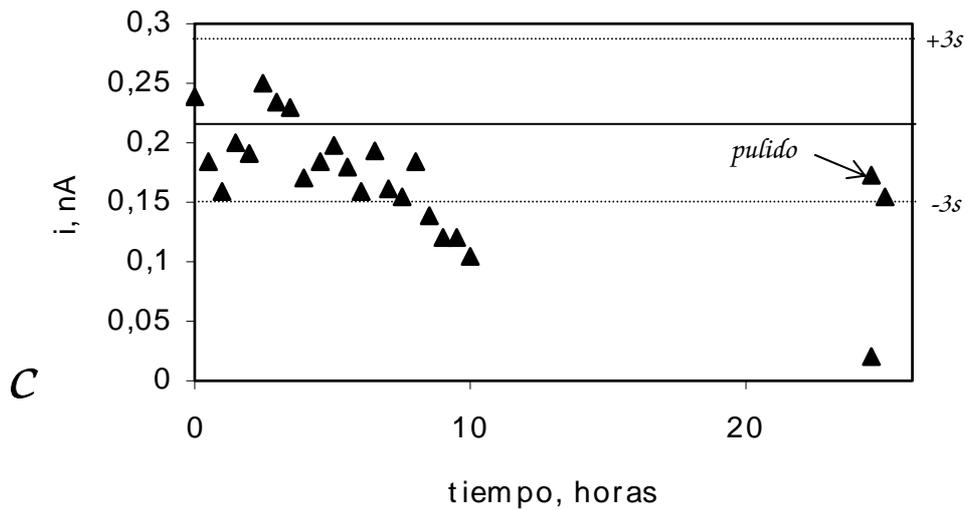
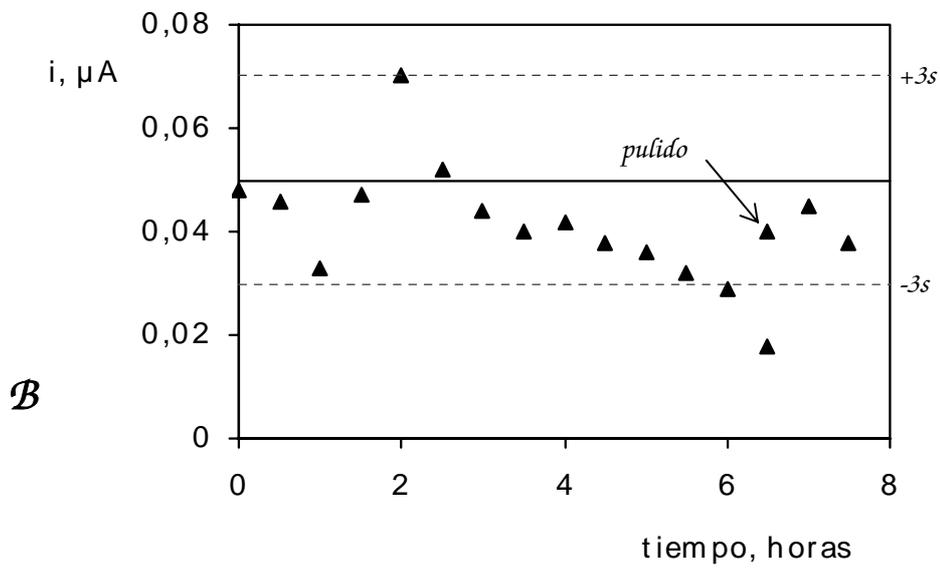
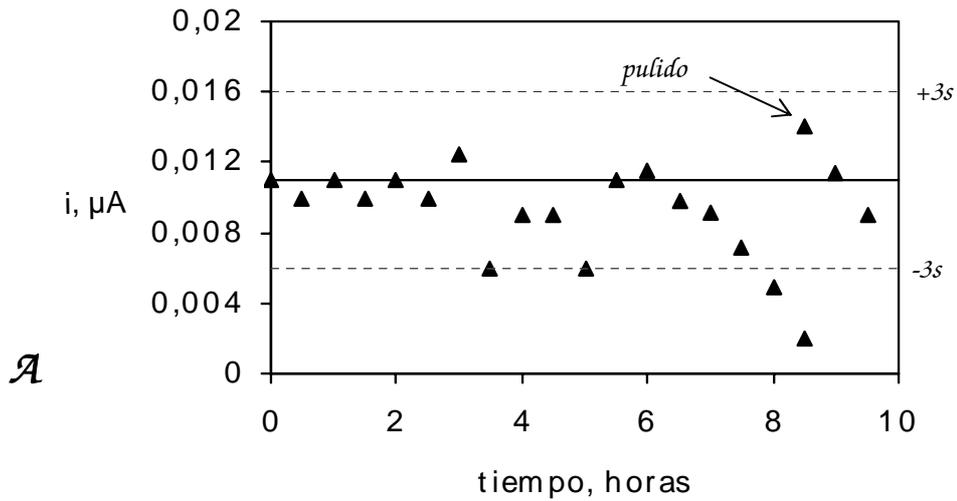


Figura
inyec
cauda

ra
un

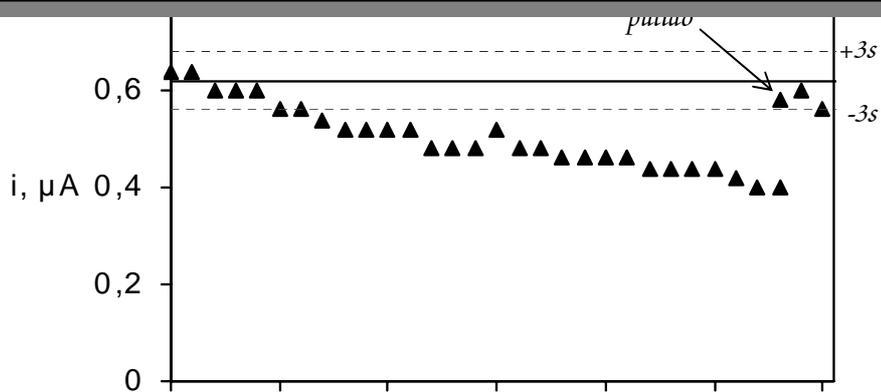


Figura 69. Respuestas amperométricas del electrodo de (A) grafito-Teflón-Tyr; (B) grafito-EPD-Tyr; y (C) RVC-resina epoxy-Tyr para inyecciones de fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para el caso del grafito-EPD-Tyr), realizadas cada media hora en una disolución portadora constituida por agua de grifo, a un caudal de 0.5 mL min^{-1} ; $V_i = 90 \mu\text{L}$; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Finalmente, puede observarse que cuando la señal disminuye y no queda incluida dentro de los límites de control, es posible recuperarla mediante pulido de la superficie electrodo en todos los casos, lo que indica de nuevo la eficiencia de este simple procedimiento de regeneración superficial. Estos resultados ponen de manifiesto que es posible utilizar los biosensores compósitos de tirosinasa para la monitorización en continuo de compuestos fenólicos, siempre y cuando se preceda a pulir su superficie cada cierto período de tiempo, dependiendo del nivel de concentración de fenoles en la muestra y del tipo de matriz de la misma.

IV.2.11.4. Curvas de calibrado y características analíticas

Una vez optimizadas las variables experimentales y evaluada la estabilidad de los electrodos compósitos de tirosinasa en un sistema FIA, se ha procedido al establecimiento de las características analíticas de los métodos en flujo para los sustratos fenólicos ensayados en las condiciones experimentales empleadas para el fenol. En la Figura 70 se muestran las curvas de calibrado obtenidas con cada uno de los electrodos compósitos enzimáticos.

En la Tabla 30 se recogen los intervalos de linealidad y los valores de las pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de correlación de dichas curvas de calibrado para los fenoles estudiados con los tres biosensores. En la Tabla 31 se dan los valores de los límites de detección y determinación calculados según el mismo criterio que en discontinuo (apartado IV.2.9), utilizando como estimador de s_b los valores de la desviación estándar para 10 medidas al nivel de concentración que aparece en la Tabla 31 y que corresponde a los puntos más bajos de los calibrados respectivos.

Con objeto de poder efectuar una comparación, en la Tabla 32 se han recogido los valores de las pendientes de los calibrados y de los límites de detección para los cinco sustratos fenólicos tanto en discontinuo como en FIA. La comparación de las pendientes se hace asimismo en forma de diagramas de barras en la Figura 71. Como puede observarse, las pendientes son siempre menores mediante FIA, como es lógico, ya que, debido al régimen dinámico, no se alcanza el estado estacionario. No obstante, el orden de sensibilidad de cada uno de los electrodos es el mismo que el orden que cada uno presentaba en discontinuo, excepto para el 3,4-dimetilfenol, que es para el que se observa una mayor sensibilidad en discontinuo con los tres biosensores, mientras que en flujo es el tercero más sensible en todos los casos. En discontinuo, la sensibilidad de los biosensores para cada sustrato fenólico se explicó en términos de constantes cinéticas ($K_{m,ap}$ y $V_{máx,ap}$), es decir, en función de la eficiencia catalítica de la enzima para cada sustrato. En el caso del FIA, al no alcanzarse el estado estacionario, la sensibilidad ya no está exactamente relacionada con la eficiencia catalítica, sino con la velocidad de reacción inicial. Por lo tanto, los compuestos que alcanzan más lentamente el estado estacionario tendrán sensibilidades menores en FIA, como es el caso del 3,4-dimetilfenol, para el que la sensibilidad en flujo es menor que para el fenol y el 4-clorofenol.

Por otro lado, cuando se comparan los intervalos lineales que se obtienen en inyección en flujo con los obtenidos en discontinuo, puede observarse que en FIA dichos intervalos son más amplios, como consecuencia de nuevo de no medir en condiciones de estado estacionario. Esta ampliación en el intervalo lineal es mayor para los sustratos con una respuesta más lenta, ya que los que responden más rápidamente, se aproximan al estado estacionario en el corto intervalo de tiempo que permanece el analito en la célula de flujo.

Finalmente, cuando se comparan los valores de los límites de detección, se observa que los compuestos con una respuesta rápida (véase Tabla 25) poseen valores similares en discontinuo y en flujo, mientras que los de respuesta lenta presentan valores más elevados en flujo.

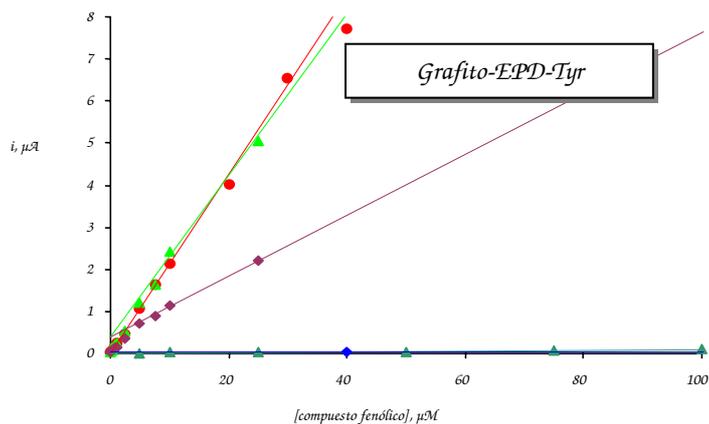
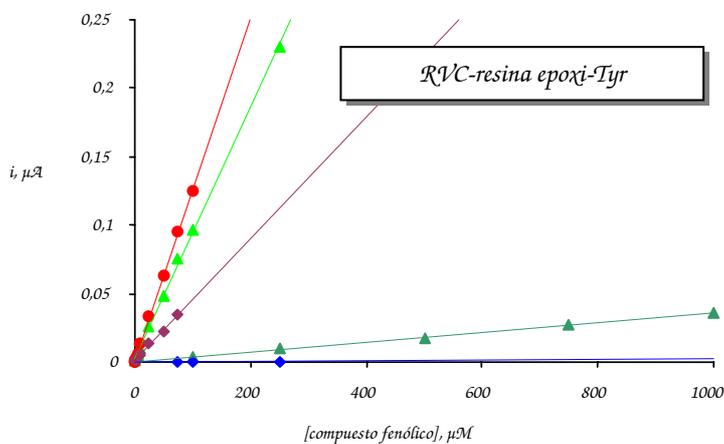
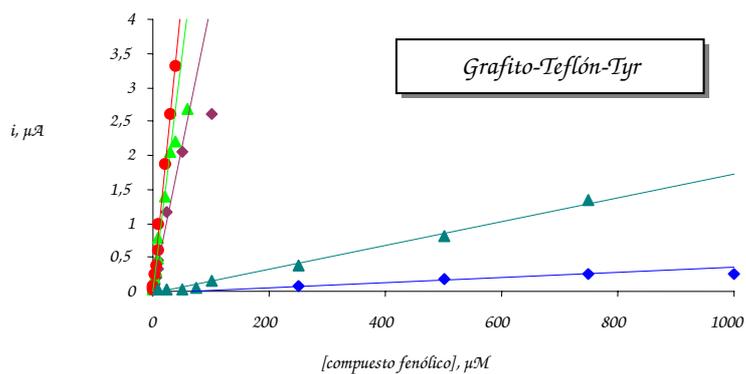


Figura
amperométrica
Tabla 3

amperométrica sobre los electrodos de:
 1: grafito-Teflón-tirosinasa
 2: grafito-EPD-tirosinasa
 3: RVC-resina epoxi-tirosinasa

ción
cación

	INTERVALO LINEAL, mol L ⁻¹	PENDIENTE, μA L mol ⁻¹	O.O., μA	r
Fenol	(0.1-400)×10 ⁶	85000 ± 2000	(3 ± 3)×10 ²	0.9975
	(0.01-300)×10 ⁶	213000 ± 3000	(-0.6 ± 4)×10 ²	0.9990
	(0.1-100)×10 ⁶	1254 ± 9	(5 ± 3)×10 ⁴	0.9998
2-clorofenol	(1-75)×10 ⁵	1800 ± 100	(-5 ± 4)×10 ²	0.9970
	(5-100)×10 ⁶	840 ± 30	(1 ± 0.2)×10 ²	0.9970
	(2-10)×10 ⁴	36.0 ± 0.8	(-0.2 ± 5)×10 ⁴	0.9993
4-clorofenol	(0.2-300)×10 ²	69000 ± 1500	(0.3 ± 2)×10 ²	0.9985
	(0.05-250)×10 ⁶	204000 ± 5000	(7 ± 4)×10 ²	0.9971
	(0.25-250)×10 ⁶	920 ± 8	(2 ± 0.7)×10 ³	0.9998
4-cloro-2-metilfenol	(2.5-7.5)×10 ⁴	370 ± 30	(-2 ± 2)×10 ²	0.9971
	(5-20)×10 ⁵	150 ± 9	(1 ± 2)×10 ²	0.9973
	(7.5-25)×10 ⁵	2.5 ± 0.1	(-2 ± 2)×10 ⁵	0.9983
3,4-dimetilfenol	(0.25-500)×10 ⁶	41800 ± 900	(2 ± 2)×10 ²	0.9981
	(0.1-400)×10 ⁶	135000 ± 2000	(2 ± 0.4)×10 ²	0.9996
	(1-75)×10 ⁶	440 ± 10	(1 ± 0.4)×10 ³	0.9981

Tabla 31. Valores de los límites de detección y de determinación para distintos compuestos fenólicos mediante inyección en flujo con detección amperométrica sobre los electrodos de: (1): grafito-Teflón-tirosinasa (2): grafito-EPD-tirosinasa (3): PVC-resina epoxi-tirosinasa

	Nivel de concentración, mol L ⁻¹	LD, mol L ⁻¹	LQ, mol L ⁻¹
Fenol	7.5×10 ⁸	5.2×10 ⁸	1.7×10 ⁷
	7.5×10 ⁸	3.8×10 ⁸	1.2×10 ⁷
	2.5×10 ⁷	2.0×10 ⁷	6.7×10 ⁷
2-clorofenol	1.0×10 ⁵	3.0×10 ⁶	1.0×10 ⁵
	1.0×10 ⁵	1.1×10 ⁵	3.5×10 ⁵
	1.0×10 ⁵	5.6×10 ⁶	1.9×10 ⁵
4-clorofenol	7.5×10 ⁸	6.3×10 ⁸	2.1×10 ⁷
	1.0×10 ⁷	7.4×10 ⁸	2.5×10 ⁷
	2.5×10 ⁷	2.7×10 ⁷	9.0×10 ⁷
4-cloro-2-metilfenol	2.5×10 ⁴	8.2×10 ⁵	2.7×10 ⁴
	1.0×10 ⁴	8.1×10 ⁵	2.7×10 ⁴
	2.5×10 ⁴	2.0×10 ⁴	6.7×10 ⁴
3,4-dimetilfenol	7.5×10 ⁸	5.7×10 ⁸	1.9×10 ⁷
	1.0×10 ⁷	6.9×10 ⁸	2.3×10 ⁷
	1.0×10 ⁸	1.0×10 ⁶	3.3×10 ⁶

Tabla 32. Comparación de las pendientes de los calibrados y de los límites de detección obtenidos en discontinuo y FIA con los biosensores:
 1: grafito-Teflón-tirosinasa
 2: grafito-EPD-tirosinasa
 3: RVC-resina epoxi-tirosinasa

		DISCONTINUO		FIA	
		PENDIENTE, $\mu A L mol^{-1}$	LD, $mol L^{-1}$	PENDIENTE, $\mu A L mol^{-1}$	LD, $mol L^{-1}$
Fenol	1	279000	9.9×10^8	85000	5.2×10^8
	2	620000	2.6×10^8	213000	3.8×10^8
	3	3400	1.1×10^7	1254	2.0×10^7
2-clorofenol	1	140000	8.7×10^7	1800	3.0×10^6
	2	200000	6.1×10^7	840	1.1×10^5
	3	170	1.7×10^6	36.0	5.6×10^6
4-clorofenol	1	250000	7.4×10^8	69000	2.1×10^7
	2	460000	2.3×10^8	204000	2.5×10^7
	3	3940	7.1×10^8	920	2.7×10^7
4-cloro-2-metilfenol	1	6000	2.3×10^5	370	8.2×10^5
	2	71000	5.4×10^9	150	8.1×10^5
	3	210	4.2×10^5	2.5	2.0×10^4
3,4-dimetilfenol	1	520000	1.0×10^7	41800	1.9×10^7
	2	1200000	8.9×10^9	135000	2.3×10^7
	3	4780	3.0×10^8	440	1.0×10^6

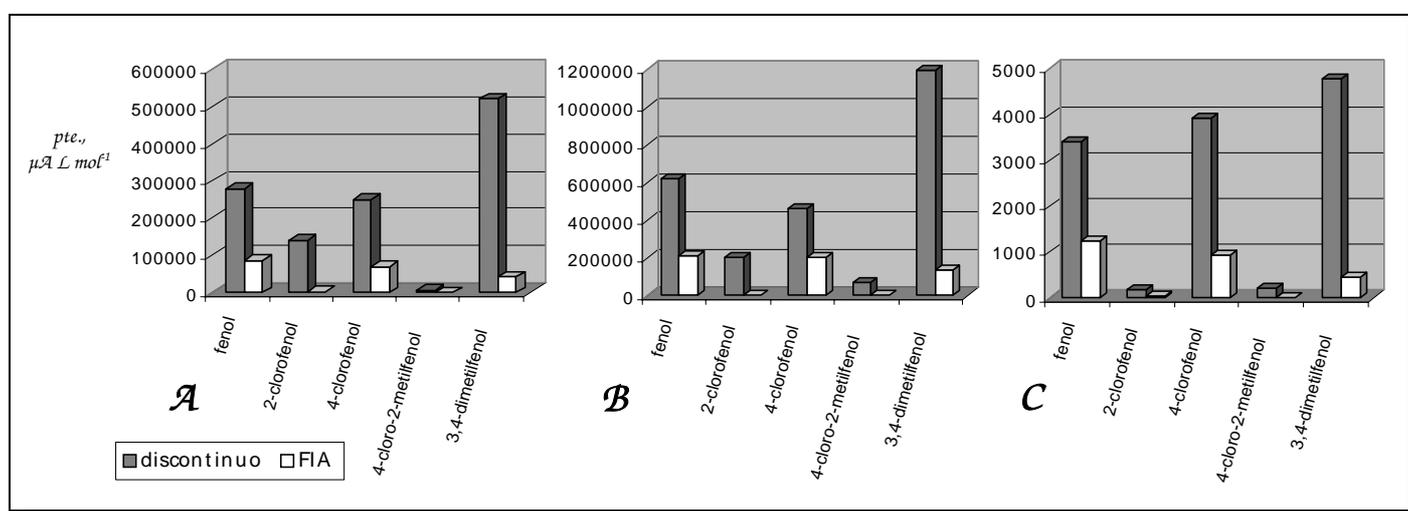


Figura 71. Pendientes de las curvas de calibrado obtenidas para distintos compuestos fenólicos en discontinuo y en FIA con electrodos de (A) grafito-Teflón-tirosinasa; (B) grafito-EPD-tirosinasa; y (C) RVC-resina epoxi-tirosinasa.

Resulta también interesante comparar la anchura de los picos FIA que se obtienen con cada electrodo para los sustratos fenólicos. En las Figuras 65, 66 y 67 se pueden comparar visualmente los diagramas obtenidos en cada uno de los casos, mientras que en la Figura 72 se comparan las anchuras de pico en línea base correspondientes.

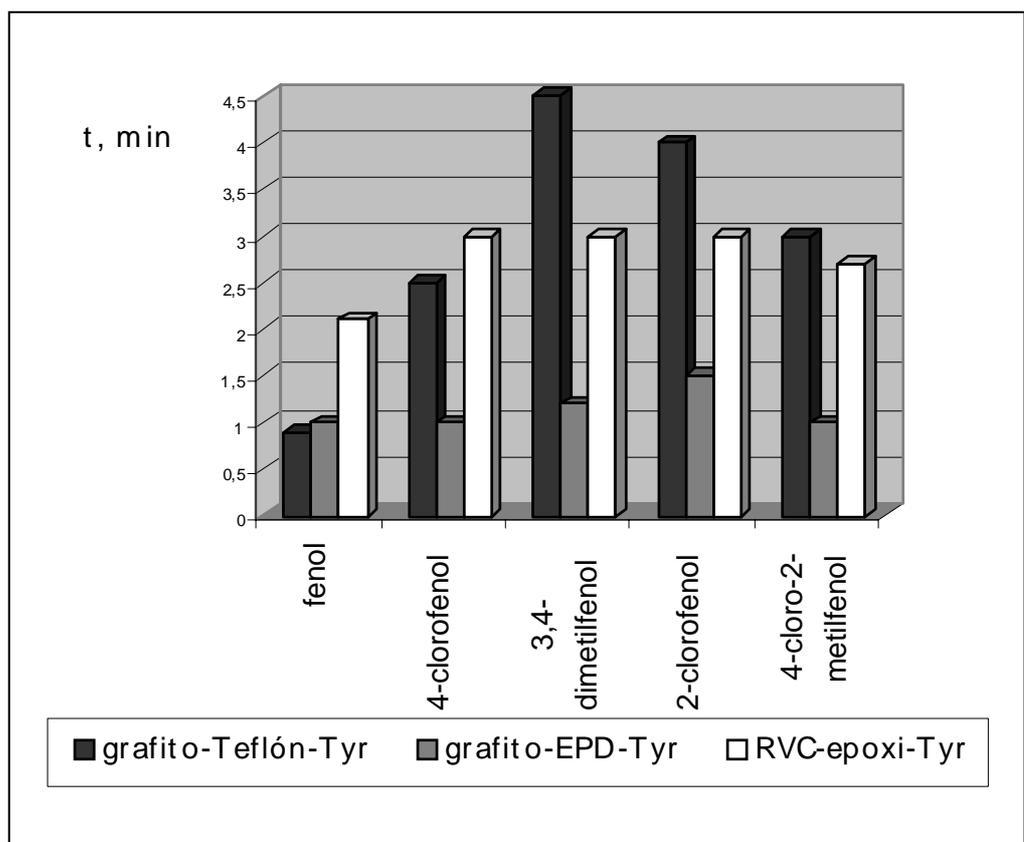


Figura 72. Tiempo de desaparición de los picos PA (anchura de pico en la base) para cinco sustratos fenólicos obtenidos con los biosensores amperométricos de tirosinasa. Portador: regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5); Caudal: 0.5 mL min^{-1} ; $V_i=90 \mu\text{L}$; $E_{ap}=-0.15\text{V}$.

Como puede deducirse, el electrodo con el que se obtienen picos con menos cola es, en general, el de grafito-EPD-tirosinasa, mientras que con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa se obtiene un pico estrecho para el fenol y picos con mucha cola para el resto de los sustratos fenólicos estudiados. Con el electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa se observan tiempos largos de desaparición de pico para todos los sustratos. El hecho de que un sustrato de lugar a picos con una cola mayor puede atribuirse principalmente a dos factores: (a) a que el compuesto presente un valor de velocidad máxima ($V'_{m\acute{a}x,ap}$) pequeño, y por tanto la velocidad de conversión del complejo enzima-sustrato en productos sea lenta; (b) por otro lado se ha puesto de manifiesto que un biosensor proporciona valores de $V'_{m\acute{a}x,ap}$ mayores cuanto mayor es la cantidad de enzima presente en la superficie del electrodo. Esto es concordante con el comportamiento observado para los electrodos de grafito-EPD-Tyr y de RVC-resina epoxi-Tyr. Sin embargo, para el electrodo de grafito-Teflón-Tyr, los picos son más anchos de lo que cabría esperar teniendo en cuenta los valores de velocidad máxima, excepto en el caso del fenol. Este comportamiento puede explicarse por la influencia de otro factor en la anchura de los picos, como es la afinidad entre el sustrato y la superficie del electrodo, que provoca que los compuestos fenólicos tengan una mayor o menor tendencia a acumularse sobre dicha superficie. En el caso de la matriz de grafito-Teflón, ésta está compuesta mayoritariamente por Teflón, que es un polímero apolar, por lo que los compuestos apolares tienden a acumularse en su superficie como ya se ha comentado, proporcionando de esta forma picos con

cola larga. El fenol, que es el más polar de los compuestos fenólicos estudiados, presenta un pico estrecho, ya que no se acumula sobre la superficie del electrodo.

IV.3. Electrodo compuesto de grafito-Teflón-tirosinasa utilizando como medio de trabajo micelas inversas

El desarrollo y utilización de los biosensores amperométricos se ha llevado a cabo tradicionalmente en medio acuoso. Sin embargo, a principios de la pasada década pudo demostrarse la existencia de biocatálisis enzimática en disolventes orgánicos (Saini et al., 1991; Wang et al., 1992; Wang et al., 1993c; Fernández et al., 1995). Recientemente, se ha demostrado asimismo que es posible utilizar medios predominantemente no acuosos, como son las micelas inversas (emulsiones agua/aceite), como medios adecuados para el empleo de biosensores amperométricos enzimáticos (Liu et al., 1994a y b; Reviejo et al., 1995; Pérez et al., 1997; Ortiz et al., 1997). Estas emulsiones agua/aceite están compuestas, como ya se indicó en el apartado II.2.2.3, por un disolvente orgánico que actúa como fase continua, una pequeña cantidad de una disolución acuosa de un electrolito soporte adecuado como fase dispersa, y un tensoactivo como agente emulsificante. Estos medios organizados pueden considerarse como medios de solubilización universal tanto para analitos hidrofóbicos como hidrofílicos, lo que supone una gran ventaja cuando se trata de determinar compuestos fenólicos, ya que algunos de ellos son escasamente solubles en agua y, en muchos casos, es necesario extraerlos de las muestras con un disolvente orgánico. Otra importante característica del empleo de estos medios es el fácil control del contenido de agua que se necesita para la hidratación de la enzima y, en consecuencia para el buen funcionamiento del biosensor, lo que resulta ventajoso con respecto a los electrodos enzimáticos en fase orgánica, sobre todo cuando se utilizan disolventes inmiscibles en agua.

En nuestro Grupo de Investigación se desarrolló un biosensor amperométrico de tirosinasa capaz de trabajar en micelas inversas, que se utilizó para la determinar compuestos fenólicos. En este biosensor, la enzima se inmovilizaba por adsorción directa sobre la superficie de un electrodo de disco de grafito (Liu et al., 1994a), y las micelas inversas estaban formadas por acetato de etilo como fase continua, una disolución reguladora de fosfato como fase dispersa y AOT como agente emulsificante. Por lo tanto, se ha elegido este mismo medio para realizar los estudios preliminares de caracterización del electrodo compuesto de grafito-Teflón-tirosinasa. La composición del biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa es la misma que la del biosensor desarrollado para el medio acuoso, es decir, las pastillas contienen un 70% de Teflón y 90000 unidades de tirosinasa.

IV.3.1. Efecto de la composición de la micela inversa sobre la respuesta del biosensor de tirosinasa

IV.3.1.1. Naturaleza del disolvente orgánico

La naturaleza del disolvente orgánico utilizado para constituir la fase continua de las micelas inversas puede afectar drásticamente tanto a la actividad enzimática como a la estabilidad del biosensor. En general, se ha establecido que la actividad enzimática está relacionada con la polaridad del disolvente, la cual puede expresarse por el valor del $\log P$ (Laane et al., 1987), donde P es el coeficiente de partición del disolvente en el sistema bifásico octanol/agua. A medida que el valor del $\log P$ aumenta, la hidrofobicidad del disolvente orgánico también aumenta.

En esta Tesis se ha estudiado la influencia de cuatro disolventes orgánicos: *n*-hexano ($\log P=3.48$), cloroformo ($\log P=2.24$), diclorometano ($\log P=1.25$), y acetato de etilo ($\log P=0.66$), así como mezclas de ellos, sobre la señal amperométrica obtenida con el biosensor. El tensoactivo utilizado como agente emulsificante fue, en todos los casos, AOT 0.1 mol L^{-1} .

En la Figura 73 se muestran los registros corriente-tiempo obtenidos con el electrodo enzimático para fenol 0.4 mM a un potencial constante de -0.15 V inmerso en 5.0 mL de micelas inversas diferentes formadas con cada uno de los disolventes orgánicos mencionados anteriormente, y un 4% de fase acuosa.

Como se puede observar, el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa exhibe una respuesta bien definida en las micelas inversas formadas con acetato de etilo y cloroformo, ligeramente peor cuando el disolvente orgánico diclorometano, y prácticamente no hay respuesta en las emulsiones formadas con *n*-hexano. Por lo que respecta a mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo, puede apreciarse cómo sólo se obtiene una señal amperométrica útil con una proporción 1:1 de ambos disolventes, si bien la intensidad de corriente es aproximadamente 5 veces menor que la registrada en micelas inversas formadas sólo con acetato de etilo como fase continua. Aunque dicha mezcla de disolventes no se va a utilizar en los estudios posteriores, podría ser útil con fines analíticos en los casos en los que el analito a determinar tuviera que ser extraído necesariamente en *n*-hexano.

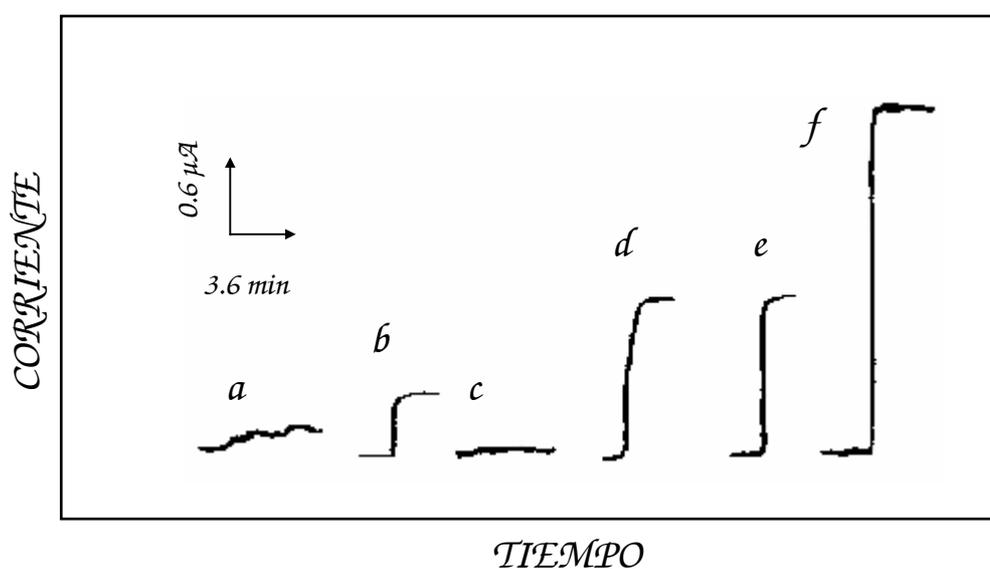


Figura 73. Registros intensidad-tiempo obtenidos con un electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa para una adición de $25 \mu\text{L}$ de una emulsión patrón de fenol 0.08 mol L^{-1} en 5 mL de micelas inversas formadas con (a) *n*-hexano:acetato de etilo (9:1), (b) *n*-hexano:acetato de etilo (1:1), (c) *n*-hexano, (d) diclorometano, (e) cloroformo y (f) acetato de etilo como fase continua, 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} ($\text{pH } 7.4$) y 0.1 M de AOT como agente emulsificante. $E_{\text{ap}}=-0.15 \text{ V}$.

Aunque se ha sugerido que los disolventes con $\log P < 2$ no son apropiados para la biocatálisis en medio orgánico debido a que pueden distorsionar fuertemente la interacción enzima-agua (por ejemplo, eliminando la capa de agua esencial para la biocatálisis) (Laane et al., 1987), los resultados que se muestran en la Figura 73 no concuerdan con esta teoría. En

efecto, puede observarse la mejor respuesta se ha obtenido con acetato de etilo, que es, de los disolventes estudiados, el de menor $\log P$. Este hecho se debe a la mayor constante dieléctrica del acetato de etilo, comparada con la de los otros disolventes, lo que asegura la necesaria conductividad de las emulsiones agua/aceite formadas. Además, como se verá a lo largo de este capítulo, el empleo de acetato de etilo como fase continua en las micelas inversas no daña la interacción enzima-agua. Por todo ello, se eligió el acetato de etilo como disolvente orgánico para formar las micelas inversas.

IV.3.1.2. Efecto de la naturaleza del agente emulsificante y del contenido de fase acuosa dispersa en la micela inversa

Se estudió cómo afecta la naturaleza del tensoactivo utilizado como agente emulsificante a la respuesta del biosensor. Para ello se eligieron tres tensoactivos de naturaleza diferente: aniónico (AOT), catiónico (Hyamina 3500) y no iónico (Tritón X-405). Las micelas inversas se prepararon con acetato de etilo como fase continua, diferentes porcentajes, entre 0 y 7%, de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 como fase dispersa, y cada uno de los tensoactivos mencionados en un porcentaje del 4% (corresponde a 0.1 mol L^{-1} de AOT).

El aspecto de las micelas inversas depende del contenido de fase acuosa dispersa utilizada. Se obtuvieron microemulsiones transparentes y claras con un 1% de fase acuosa e Hyamina 3500 y Tritón X-405, y hasta con un 5% cuando se empleó AOT como agente emulsificante. Porcentajes mayores de fase acuosa a las mencionadas dan a lugar a emulsiones translúcidas o lechosas. No obstante, las micelas inversas formadas con porcentajes de fase acuosa del 7% o superiores se rompían en pocos minutos, apareciendo dos fases diferenciadas, por lo que, este tipo de emulsiones se descartaron con fines analíticos.

Los amperogramas para fenol $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ registrados en cada una de las micelas inversas ensayadas se registraron a un potencial constante de -0.15 V . En el caso del Tritón X-405, tensoactivo no iónico, fue necesario añadir a la disolución un electrolito como perclorato de terbutilamonio en concentración 0.02 mol L^{-1} (Liu et al., 1994a), con objeto de hacer la emulsión suficientemente conductora como para obtener señales amperométricas analíticamente útiles. En la Figura 74 se muestra la dependencia de la corriente en estado estacionario obtenida, con el contenido de disolución reguladora de fosfato para las micelas inversas formadas con los tres tensoactivos. En general, puede decirse que la corriente aumenta cuando lo hace el porcentaje de fase dispersa hasta alcanzar un valor constante, que puede considerarse como la cantidad de agua necesaria para conseguir la actividad óptima de la enzima. En el caso de la Hyamina 3500, este valor se alcanza a partir del 2% de fase acuosa, produciéndose una disminución de la corriente para porcentajes superiores al 5%. Para el Triton X-405, se observa un ligero aumento de la señal amperométrica con el porcentaje de fase dispersa a partir del 1%, mientras que en el caso del AOT los valores máximos de la corriente en estado estacionario se alcanzan para un 5-6% de fase acuosa.

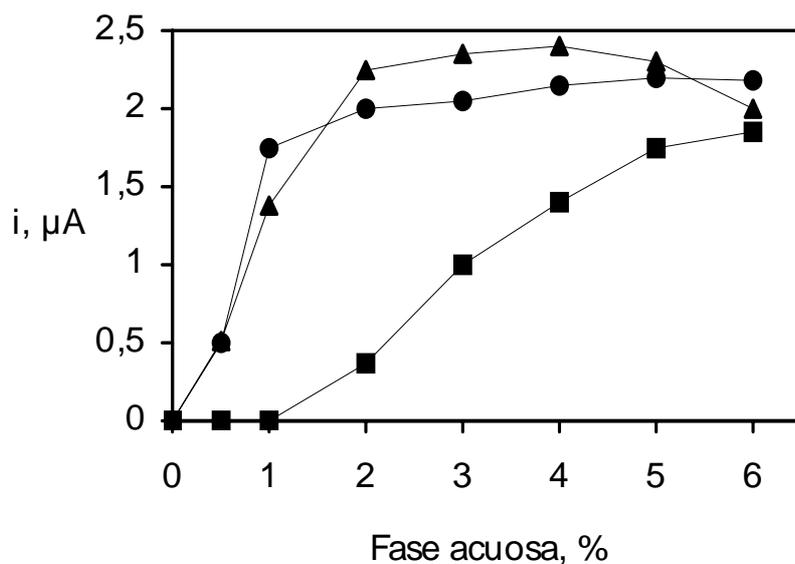


Figura 74. Efecto del contenido de fase acuosa sobre la corriente en estado estacionario fenol $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en las micelas inversas formadas con acetato de etilo como fase continua y AOT (■), Tritón X-405 (●) o Hiyamina 3500 (▲) como agente emulsificante. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Si bien se obtienen intensidades de corriente en el estado estacionario mayores cuando las micelas inversas se formaron con Hiyamina 3500 ó con Triton X-405, se eligió el AOT como agente emulsificante para llevar a cabo estudios posteriores. Esto se debió a la falta de reproducibilidad de las señales obtenidas en las micelas inversas formadas con los tensoactivos catiónico y no iónico, lo que puede atribuirse a la menor estabilidad de estas micelas, incluso las formadas con bajos porcentajes de fase acuosa, cuando se las compara con las que contienen AOT. Además, puede observarse en la Figura 74 cómo la diferencia de los valores de intensidad no es grande para ninguno de los tres tipos de emulsiones estudiados para porcentajes de fase acuosa del 5-6%.

IV.3.2. Influencia de las diferentes variables experimentales sobre la respuesta amperométrica del electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa

En este apartado se describirá la optimización de variables experimentales que se refieren a la composición de la micela inversa, como son, la concentración de AOT y el porcentaje de fase acuosa, así como el valor de su pH, y a aspectos electroquímicos, como es el potencial aplicado.

IV.3.2.1. Optimización de la composición de la micela inversa

En primer lugar se procedió a evaluar la influencia de la proporción de fase dispersa en la micela inversa sobre la respuesta del biosensor para una concentración de fenol, 2,4-dimetilfenol y 4-cloro-3-metilfenol de $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando un potencial constante de -0.15 V . En la figura 75 se observa que sólo se obtuvieron señales medibles para los tres compuestos fenólicos para porcentajes de fase acuosa superiores al 2%. Se aprecia asimismo cómo dicha señal aumenta a medida que lo hace el porcentaje de disolución reguladora de fosfato hasta aproximadamente un 5%, indicando que, para este contenido de fase acuosa, la hidratación de la enzima sobre la superficie del electrodo es óptima para su actividad enzimática. Además, la corriente adopta, en todos los casos, valores prácticamente iguales para porcentajes del 5 y del 6%, por lo que se eligió un 5% de disolución reguladora de fosfato para preparar en lo sucesivo las micelas inversas.

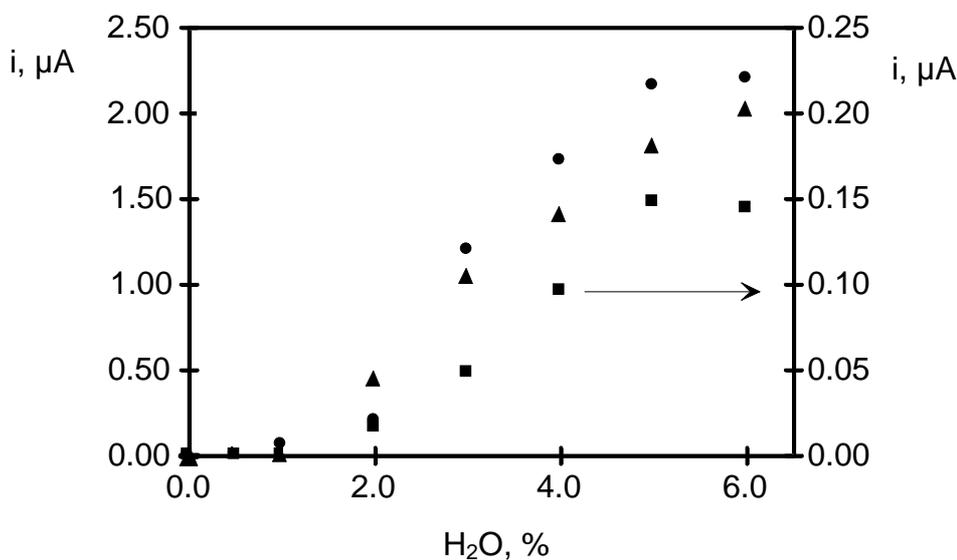


Figura 75. Influencia del porcentaje de fase acuosa dispersa sobre la intensidad de corriente en estado estacionario en micelas inversas formadas con acetato de etilo, disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 como fase dispersa, y AOT 0.1 mol L^{-1} como agente emulsificante; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$. $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ fenol (▲), 2,4-dimetilfenol (■) y 4-cloro-3-metilfenol (●).

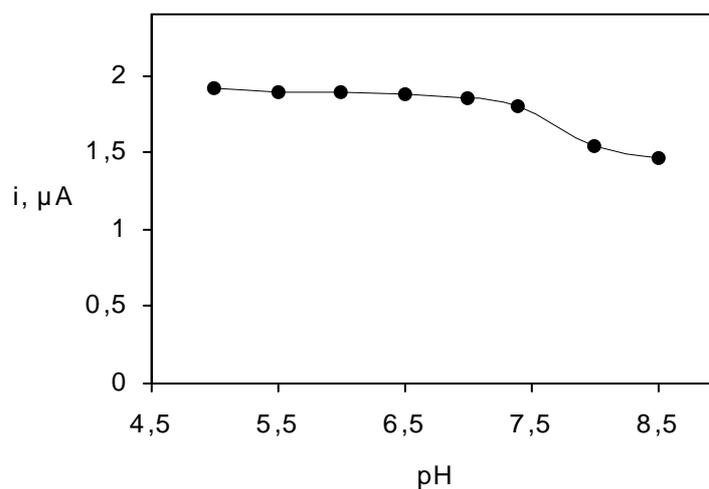
Debe destacarse que la respuesta amperométrica para los tres sustratos fenólicos sigue la misma tendencia con la proporción de fase acuosa, a pesar de tener una solubilidad diferente tanto en agua como en acetato de etilo. Esto indica que el medio de trabajo es efectivamente un medio de solubilización universal, y que las variaciones en la fase acuosa afectan solamente a la actividad enzimática.

Si se comparan los resultados obtenidos con los reportados por nuestro propio Grupo (Liu et al., 1994a), utilizando un medio de micelas inversas con los mismos constituyentes y un electrodo de grafito con una capa de tirosinasa directamente

adsorbida en su superficie, se observa que el porcentaje de fase acuosa óptimo es mayor con el electrodo compuesto de grafito-Teflón. En el caso del biosensor preparado por adsorción, donde la enzima no está muy fuertemente unida a la superficie, la limitación en el porcentaje de fase acuosa utilizable era consecuencia de la solubilización de la enzima en las microgotículas de disolución acuosa de la micela inversa, cuando éstas alcanzaban un cierto tamaño. Sin embargo, en el biosensor compuesto de grafito-Teflón la enzima está atrapada físicamente en la matriz electrodica, y por tanto no se observa ningún efecto de solubilización de la enzima. Por consiguiente, el porcentaje de disolución acuosa en la micela está ahora solamente limitado por la estabilidad de ésta. Este hecho permite utilizar porcentajes de fase dispersa para los que la sensibilidad es máxima, algo que no es posible con el biosensor preparado directamente por adsorción de la enzima.

Asimismo, se evaluó la influencia del pH de la fase acuosa de la micela inversa en la respuesta amperométrica del biosensor empleando como sustrato el fenol. En la Figura 76 se muestran los resultados obtenidos.

Figura 76. Influencia del pH de la fase acuosa dispersa sobre la intensidad de corriente en estado estacionario en micelas inversas formadas con acetato de etilo, disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} como fase dispersa, y AOT 0.1 mol L^{-1}



como agente emulsificante; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$. $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ fenol.

La respuesta amperométrica permanece constante en el intervalo pH comprendido entre 5 y 7,4, y decrece a valores superiores. Por lo tanto, se continuó empleando el valor de pH 7.4 para estudios posteriores.

Por otra parte, se evaluó la influencia de la concentración de tensoactivo en la micela. En la figura 77 se muestra efecto de la concentración de AOT sobre la respuesta amperométrica obtenida para fenol, 2,4-dimetilfenol y 4-cloro-3-metilfenol. Como se puede observar, se obtienen señales máximas para los tres fenoles para una concentración de AOT de alrededor de 0.1 mol L^{-1} . A partir de este valor, la intensidad de corriente en estado estacionario permanece prácticamente constante para el fenol y el 4-cloro-3-metilfenol, hasta una concentración de AOT de 0.3 mol L^{-1} . Sin embargo, para el 2,4-

dimetilfenol se observa una disminución progresiva en el valor de la intensidad de corriente a partir de una concentración de tensoactivo de 0.1 mol L^{-1} . Por lo tanto, se ha elegido esta concentración para llevar a cabo los estudios posteriores.

El comportamiento diferente para el 2,4-dimetilfenol puede deberse a que es el más insoluble en agua de los tres compuestos fenólicos estudiados, por lo que, al aumentar la concentración de AOT en la micela inversa, se produce un aumento en el número de moléculas de tensoactivo alrededor de las microgotículas de agua que provoca una disminución de la constante de reparto entre los dominios acuoso y orgánico de una forma tan acusada que disminuye la señal amperométrica.

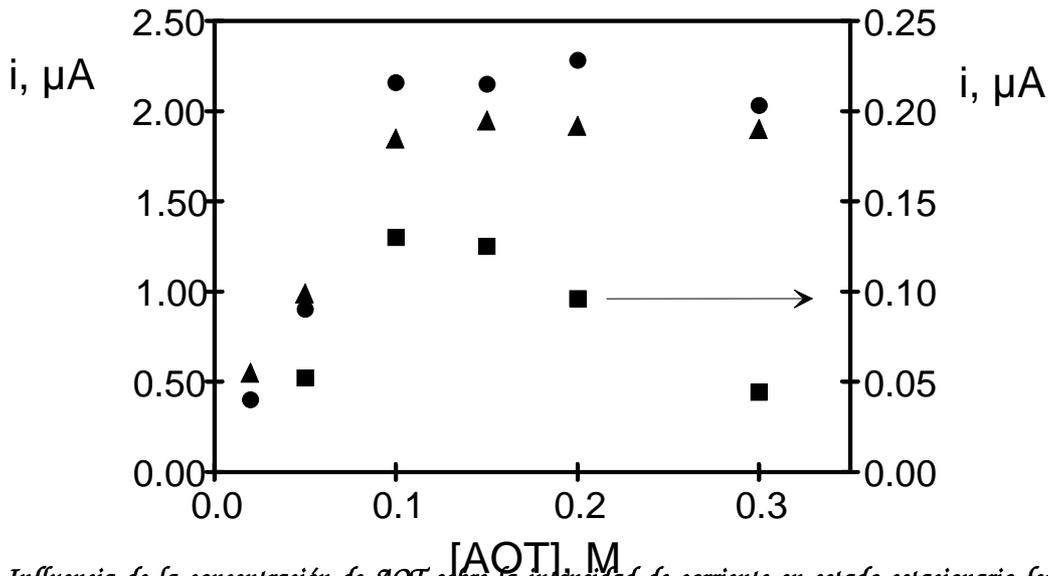


Figura 77. Influencia de la concentración de AOT sobre la intensidad de corriente en estado estacionario fenol (▲), 2,4-dimetilfenol (■) y 4-cloro-3-metilfenol (●) $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, en micelas inversas formadas por acetato de etilo como fase continua, regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 como fase dispersa y AOT como agente emulsificante. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

IV.3.2.2. Efecto del potencial aplicado

La dependencia de la respuesta del electrodo compuesto de tirosinasa con el potencial aplicado se evaluó empleando como sustratos fenol, 2,4-dimetilfenol y 4-cloro-3-metilfenol a un nivel de concentración de $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en las micelas inversas. En la Figura 78 se muestran los resultados obtenidos en el intervalo de potenciales comprendido entre -0.30 y $+0.30 \text{ V}$. Como era de esperar, el comportamiento para los tres compuestos estudiados es similar, lo que indica que la quinona formada en la reacción enzimática para cada uno de los sustratos se reduce a valores de potencial prácticamente iguales. La intensidad de corriente en el estado estacionario aumenta rápidamente entre $+0.20$ y -0.15 V , seguido por una disminución de la respuesta observada a potenciales más negativos. Esta disminución de la señal amperométrica puede ser debida a la polimerización de la correspondiente o-quinona producida a esos potenciales negativos (Liu et al., 1994a). En consecuencia, se escogió un valor de -0.15 V como potencial de trabajo para estudios subsiguientes.

Este comportamiento es también similar al observado para este mismo biosensor en medio acuoso, por lo que puede deducirse que la electroreducción de las quinonas formadas se produce fundamentalmente en los microdominios acuosos de la superficie del electrodo cuando se utilizan las micelas inversas como medio de trabajo.

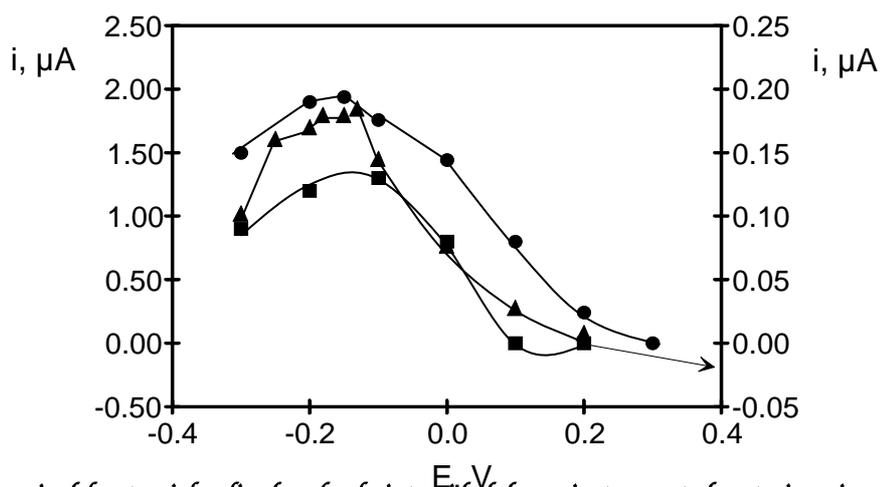


Figura 78. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario para fenol (\blacktriangle), 4-cloro-3-metilfenol (\bullet) y 2,4-dimetilfenol (\blacksquare) $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en micelas inversas formadas por acetato de etilo como fase continua, regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 como fase dispersa y AOT como agente emulsificante. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

IV.3.3. Estabilidad del electrodo compuesto de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas

A pesar de que ya se han realizado estudios de estabilidad del electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en medio acuoso, se consideró necesario evaluar de nuevo estos aspectos cuando se utilizan las micelas inversas como medio de trabajo, dado que en ellas se producen otro tipo de mecanismos, como reparto del analito entre la fase continua y dispersa, interacciones enzima-acetato de etilo, solubilidad de los compuestos fenólicos, etc, que pueden hacer variar la reproducibilidad de las respuestas amperométricas y la estabilidad del biosensor. Algunos de los aspectos ya estudiados, como son la reproducibilidad en la fabricación de los electrodos o el tiempo de almacenamiento de la pastilla madre son exactamente los mismos, si bien, se evaluarán nuevamente y se compararán con los resultados obtenidos en el medio puramente acuoso.

Se ha evaluado la repetibilidad de las señales amperométricas realizadas con el electrodo compuesto sin pulir la superficie electrodo, la reproducibilidad de la respuesta amperométrica realizando la medida después de regenerar la superficie del electrodo mediante pulido, la estabilidad de la señal con el tiempo, el tiempo de vida útil del biosensor, la reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes biosensores enzimáticos, y el efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre. Todos estos estudios se realizaron utilizando fenol como sustrato en concentración $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ y aplicando un potencial de -0.15 V . Las micelas inversas estaban formadas por acetato de etilo como fase continua, una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 como fase dispersa, y AOT 0.1 mol L^{-1} como agente emulsificante.

IV.3.3.1. Repetibilidad de las medidas amperométricas sin regeneración de la superficie electrodo

Se realizaron medidas amperométricas en diez micelas inversas diferentes en las condiciones indicadas anteriormente, y sin regenerar la superficie electrodo por pulido entre ellas. En la Tabla 33 se recogen los resultados obtenidos, así como el

valor medio de la intensidad de corriente en el estado estacionario con su intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05, y el valor de la desviación estándar relativa correspondiente.

Tabla 33. Intensidad de corriente en el estado estacionario para medidas sucesivas realizadas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa sin regeneración de la superficie electrodo en micelas inversas formadas por acetato de etilo como fase continua, regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ de pH 7.4 como fase dispersa y AOT 0.1 mol L⁻¹ como agente emulsificante. Concentración de fenol 4.0x10⁻⁴ mol L⁻¹; E_{ap} = -0.15 V.

MEDIDA	<i>i</i> , μA	\bar{i} , μA	RSD, %
1	1.76		
2	1.72		
3	1.76		
4	1.74		
5	1.80	1.81±0.07	3.8
6	1.92		
7	1.88		
8	1.84		
9	1.88		
10	1.78		

Como puede observarse, el valor de RSD indica una buena repetibilidad de las medidas. Dicho valor es muy similar al obtenido para este mismo estudio en el medio acuoso (4%), lo que pone de manifiesto que las micelas inversas no suponen un aumento de irreproducibilidad de las medidas amperométricas para la determinación de fenoles.

IV.3.3.2. Reproducibilidad de las medidas amperométricas después de regenerar la superficie electrodo por pulido

Ya se ha visto que una de las mayores ventajas que presentan los biosensores compósitos enzimáticos es la posibilidad de regeneración por simple pulido de su superficie. La evaluación de la reproducibilidad de la respuesta amperométrica tras el proceso de regeneración se ha llevado a cabo realizando 3 medidas de disoluciones diferentes de fenol después de cada pulido y un total de 10 pulidos. A modo de ejemplo, en la Figura 79 se muestran 3 series de 3 medidas realizadas después de regenerar la superficie del biosensor.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 34, así como la desviación estándar relativa correspondiente a los 10 valores medios de la corriente en estado estacionario de cada serie. El intervalo de confianza está calculado para un nivel de significación de 0.05.

Pulido	Pulido	Pulido

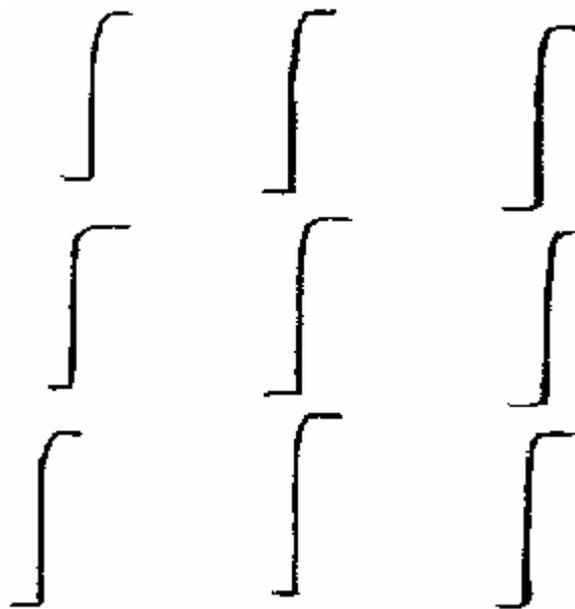


Figura 79. Registros intensidad-tiempo obtenidos con un electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa regenerando la superficie electródica antes de realizar cada serie de tres medidas. Concentración de fenol $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en micelas inversas. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

El valor de RSD obtenido para los 10 pulidos es de 8.8% lo que indica que el electrodo compuesto enzimático permite obtener respuestas amperométricas con una reproducibilidad aceptable tras haber sido sometido al procedimiento de renovación de su superficie, y que la enzima está distribuida uniformemente en el seno de la matriz del electrodo.

El valor de RSD obtenido para este mismo estudio con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr en medio acuoso fue de 4.4%. Teniendo en cuenta que la variabilidad de la señal con los pulidos sólo depende de la cantidad de enzima en la superficie del electrodo, dicha diferencia sólo debe atribuirse a errores aleatorios.

Tabla 34. Intensidad de corriente en el estado estacionario para medidas realizadas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa previa regeneración de la superficie electródica por pulido en micelas inversas formadas por acetato de etilo como fase continua, regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 como fase dispersa y AOT 0.1 mol L^{-1} como agente emulsificante. Concentración de fenol $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

nº de pulido	i^* , μA	\bar{i} , μA	RSD , %
1	1.97		
2	1.80		
3	1.82		
4	2.04		

5	2.17	1.9±0.2	8.8
6	2.14		
7	1.95		
8	1.77		
9	1.70		
10	1.73		

* corriente media para tres medidas sucesivas de disoluciones diferentes de fenol.

IV.3.3.3. Vida útil de un electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa

La estabilidad de un electrodo enzimático compósito con el tiempo se evaluó con dos electrodos diferentes. Con uno de ellos (electrodo A) se realizaron diariamente 5 medidas de emulsiones de fenol de 4.0×10^{-4} mol L^{-1} diferentes. Con el otro electrodo (electrodo B), las medidas se realizaron diariamente durante 3 ó 4 días consecutivos, guardando el electrodo después en frigorífico durante diferentes periodos de tiempo, y utilizándolo de nuevo pasado el periodo de almacenamiento. La concentración de fenol fue la misma que con el electrodo A. Para ambos electrodos se construyeron cartas de control del tipo de las vistas en el capítulo anterior.

En la Figura 80 se muestran los resultados obtenidos para el electrodo A. Se tomó como valor central del gráfico el valor medio de la corriente en estado estacionario obtenido para la serie de diez medidas amperométricas efectuadas sin regeneración de la superficie electródica. Los límites de control superior e inferior se tomaron como $\pm 3s$, donde s es la desviación estándar de este valor medio. Como ya se comentó en el capítulo anterior, cuando el valor medio de las medidas que se realizan en el mismo día quedaban fuera del límite inferior de control, la superficie del electrodo se pulió, pudiendo entonces recuperarse la señal dentro de los límites de control. En la Figura 80 puede observarse cómo los valores medios de la señal amperométrica permanecen dentro de los límites de control entre 8 y 10 días sin necesidad de pulir la superficie electródica. Por otro lado, se observa que el biosensor tiene un tiempo de vida útil de al menos 40 días, que ha sido el intervalo de tiempo en el que se ha realizado el estudio. La desviación estándar relativa, para todos los valores medios de la corriente en estado estacionario obtenidos durante esos 40 días (excluyendo las señales medidas inmediatamente antes de pulir), fue del 7.3%.

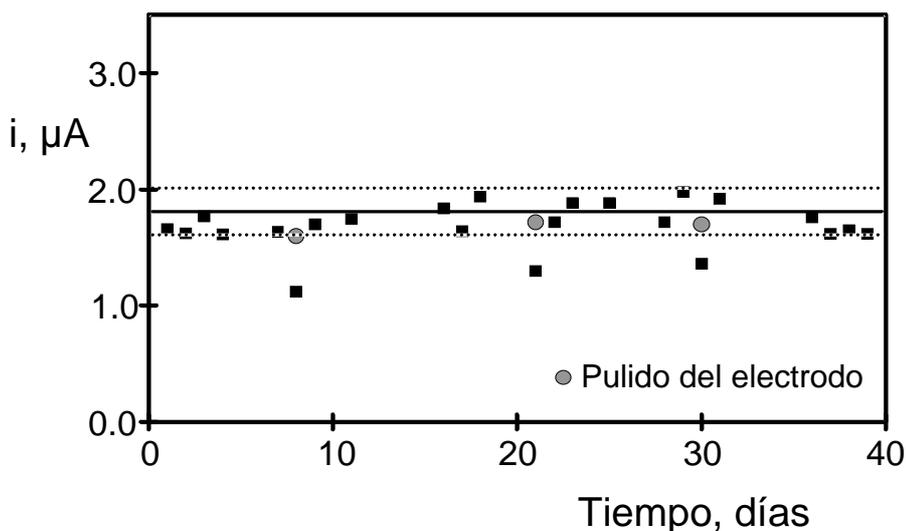


Figura 80. Gráfico de control para la dependencia de la corriente en estado estacionario con el tiempo para fenol $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ obtenido con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas formadas con acetato de etilo, 5% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} ($\text{pH } 7.4$) y AOT 0.1 mol L^{-1} . $E_{\text{ap}} = -0.15 \text{ V}$.

En la Figura 81 se muestra el gráfico de control correspondiente al electrodo B, donde se observa cómo, al igual que ocurría para el electrodo A, la regeneración de la superficie electrodo por pulido permite recuperar la señal amperométrica cuando una media de tres medidas quedaba fuera de los límites de control. También también puede deducirse que la estabilidad del biosensor depende del número de días que se utilice y no del número de días transcurridos desde su fabricación, puesto que los electrodos pueden ser almacenados durante largos periodos de tiempo sin pérdida aparente de actividad enzimática. Así, un período de almacenamiento del electrodo de 64 días (desde el día 19 al 84) no impidió que se recuperara la señal tras el pulido de su superficie. Puesto que este pulido fue necesario para obtener la señal adecuada, puede deducirse que la pérdida de la actividad después de este largo período sin usar el electrodo se produce sólo en su superficie y no ocurre en el seno de la matriz compósita.

A partir de aproximadamente 95 días la señal amperométrica no pudo recuperarse por pulido de la superficie electrodo. Teniendo en cuenta que sólo se realizaron 5 pulidos durante todo este tiempo, la pérdida permanente de señal no puede atribuirse a una disminución grande del grosor de pastilla, sino a una pérdida de actividad enzimática irreversible, que puede ser consecuencia de los cambios de temperatura que sufre la matriz compósita del biosensor desde la temperatura de almacenamiento (4°C) a la temperatura de trabajo y viceversa, en cada sesión de trabajo. Esta pérdida de actividad enzimática irreversible se produce cuando el electrodo fue utilizado más de 20 jornadas de trabajo.

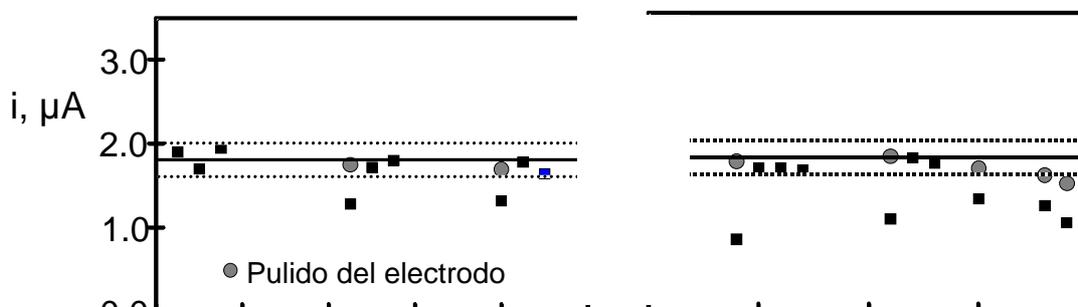


Figura 81. Gráfico de control para la dependencia de la corriente en estado estacionario con el tiempo para fenol 4.0×10^{-4} mol L^{-1} obtenido con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa. El electrodo se almacenó durante algunos días después de llevar a cabo las medidas en 3-4 días consecutivos. Micelas inversas formadas por acetato de etilo, 5% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 7.4) y AOT 0.1 mol L^{-1} . $E_{ap} = -0.15$ V.

Cuando se comparan los gráficos de control obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr en las micelas inversas con los que se obtuvieron en medio acuoso, pueden observarse dos diferencias significativas. En primer lugar, el tiempo de vida del biosensor en las micelas inversas es claramente superior al del medio acuoso. En segundo lugar, la necesidad de pulir la superficie del electrodo se ve reducida significativamente en el medio emulsionado.

La mayor estabilidad del biosensor en el medio predominantemente orgánico es consecuencia del efecto del disolvente sobre la enzima. Como se ha indicado en la Introducción, el aumento de estabilidad de las enzimas en disolventes orgánicos puede ser muy significativo (Klibanov, 1989), probablemente por un aumento de enlaces de hidrógeno intramoleculares y de la rigidez de la molécula proteica. Disolventes orgánicos más solubles en agua que el acetato de etilo, como el metanol o el acetonitrilo, no son capaces de provocar esta estabilización enzimática, sin embargo, el acetato de etilo permite obtener una estabilidad de la actividad de la tirosinasa mucho mayor que en agua.

Por otra parte, la disminución del número de pulidos necesarios puede deberse a esta estabilización enzimática, que hace que no se produzca pérdida de actividad de la tirosinasa, y también al hecho conocido (Scheller et al., 1997) de la supresión de las reacciones colaterales de polimerización de las quinonas en la superficie del electrodo en medio orgánico, lo que evita su ensuciamiento.

En definitiva, puede concluirse que la utilización de las micelas inversas como medio de trabajo produce un efecto beneficioso sobre la estabilidad del biosensor, lo que supone una importante ventaja que se traduce en ahorro de tiempo y costes.

IV.3.3.4. Reproducibilidad en la fabricación de diferentes electrodos

En la Tabla 35 se recogen los resultados obtenidos con cinco electrodos diferentes, tres de ellos fabricados de la misma pastilla y los otros dos contruidos a partir de una pastilla distinta. Con cada electrodo se llevaron a cabo cinco medidas amperométricas para fenol $4.0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. En valor de la desviación estándar relativa obtenido para los cinco electrodos indica que el proceso de fabricación de los electrodos compósitos es reproducible y fiable, lo que ya se demostró en un estudio similar con los electrodos de grafito-Teflón-Tyr en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5.

Tabla 35. Reproducibilidad de las respuestas obtenidas con diferentes electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas. Ver texto para condiciones.

<i>Pastilla</i>	<i>Electrodo</i>	<i>i, μA</i>	\bar{i} , μA	<i>RSD, %</i>
	1	1.86±0.08		
1	2	1.84±0.08		
	3	1.82±0.09	1.85±0.04	2.0
	1	1.90±0.09		
2	2	1.84±0.09		

IV.3.3.5. Efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla compósita

Al igual que ocurría en el medio acuoso, pudo demostrarse que tras al menos siete meses de almacenamiento de la pastilla madre a 4°C en refrigerador, no se observó ninguna pérdida significativa de la actividad enzimática. Así, se obtuvieron respuestas amperométricas similares (y reproducibles) a las que se muestran en la Tabla 35, cuando se construyó el bioelectrodo a partir de dicha pastilla madre una vez transcurrido el periodo de tiempo mencionado.

IV.3.4. Cálculo de las constantes cinéticas de la reacción enzimática

Los disolventes orgánicos afectan a la constante de Michaelis-Menten y a la constante catalítica, que es directamente proporcional a $V_{m\acute{a}x}$ (Scheller et al., 1997). La constante de Michaelis-Menten depende de la solubilidad del sustrato, su coeficiente de partición entre los dos medios, y la solvatación del sustrato y de la enzima. Por lo tanto, estos parámetros son distintos en micelas inversas a los que se obtuvieron con el mismo electrodo en medio acuoso, y deben calcularse nuevamente.

Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y de $K_{M,ap}$ se determinaron en las condiciones experimentales optimizadas para el fenol, para los siguientes sustratos: fenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol, 3,5-dimetilfenol, 2,3-dimetilfenol, 4-cloro-2-metilfenol, 4-clorofenol, 2-clorofenol y catecol. El cálculo se ha realizado utilizando los datos de la intensidad de corriente medida en el estado estacionario para adiciones sucesivas del volumen apropiado de disoluciones patrón de cada uno de los compuestos fenólicos, preparadas como se indica en el apartado III.3.1 de la Parte Experimental, hasta no obtener variación apreciable de la intensidad de corriente. Las curvas de saturación obtenidas para cada uno de los fenoles se muestran en las figuras 82 y 83, las cuales presentan la forma típica de los sistemas enzimáticos.

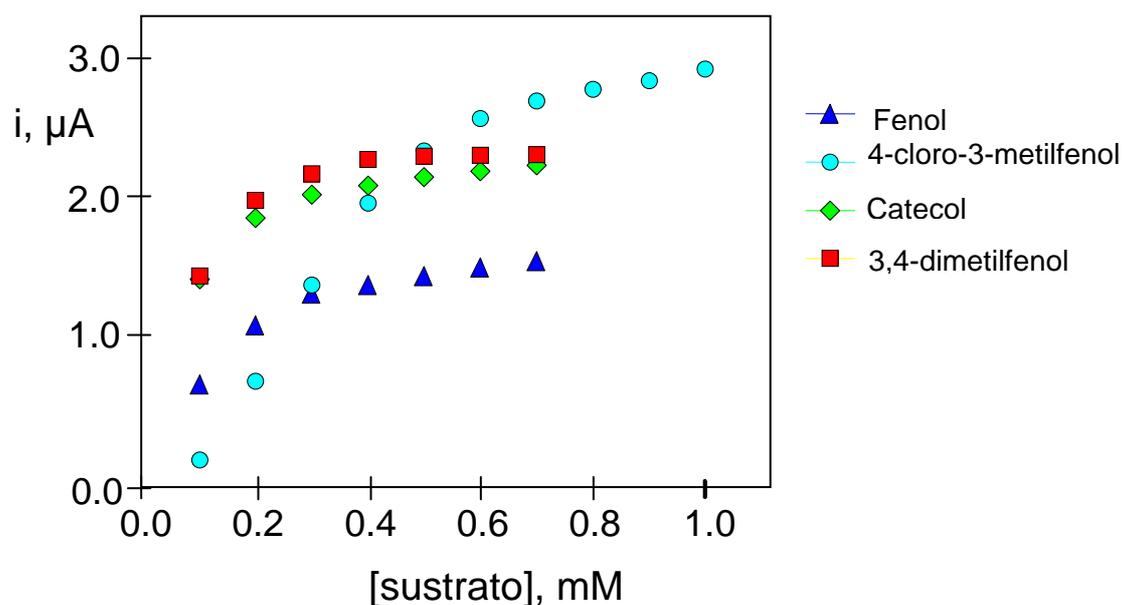


Figura 82. Curvas de saturación de la enzima obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

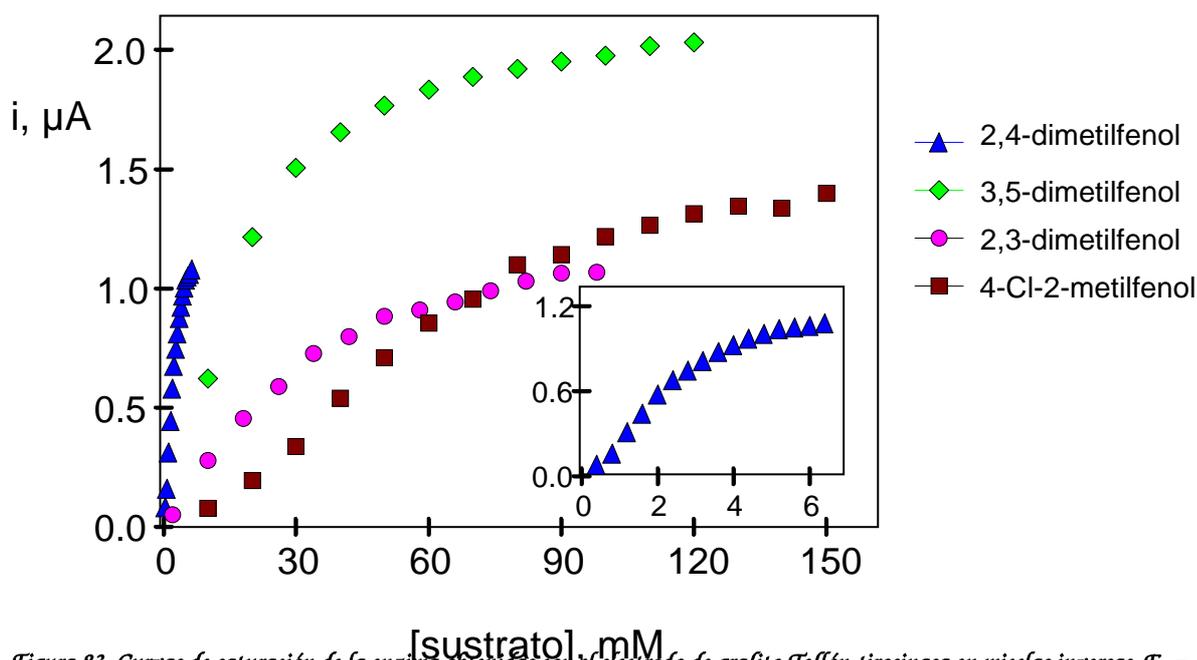


Figura 83. Curvas de saturación de la enzima obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Antes de calcular las constantes cinéticas, se verificó que las reacciones enzimáticas implicadas para los diferentes sustratos obedecían a una cinética del tipo Michaelis-Menten. Para ello, se calculó el parámetro "χ" de la ecuación de Hill al igual que se hizo en el medio acuoso. Los gráficos de Hill, en los que se representa el $\log((i_{max}/i)-1)$ en función del logaritmo de la concentración de sustrato, se muestran en la Figura 84.

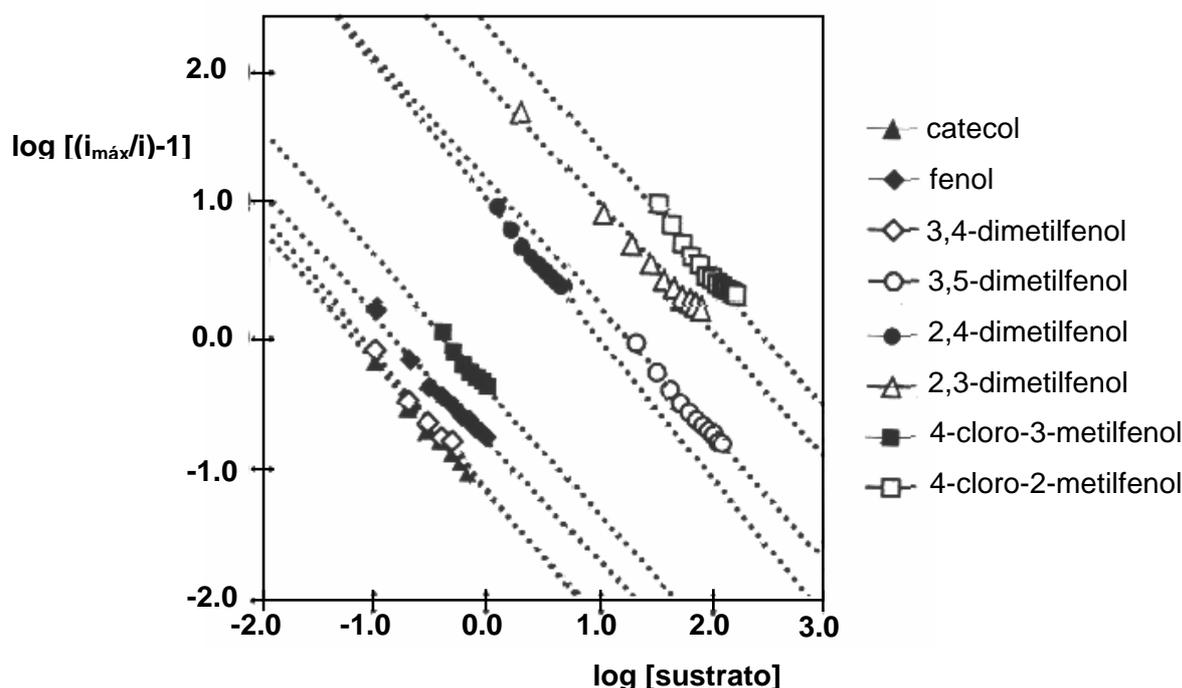


Figura 84. Gráficos de Hill para los diferentes sustratos fenólicos, obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Los valores de χ (pendiente con el signo cambiado de los gráficos de Hill) obtenidos se recogen en la Tabla 36. Como se puede apreciar, dicho valor es en todos los casos muy próximo a 1, lo que indica que el medio de trabajo predominantemente no acuoso utilizado no altera el comportamiento de la reacción enzimática que se ajusta a la cinética de Michaelis-Menten. La determinación de los parámetros cinéticos se realizó mediante el método de Lineweaver-Burk, cuyas representaciones gráficas se muestran en las Figuras 85, 86 y 87. Los valores de $K_{M,ap}$ y de $V_{máx}$ obtenidos para cada uno de los fenoles se recogen en la Tabla 36, donde además se exponen los valores de $K_{M,ap}$ y $V_{máx}$ que se obtuvieron en medio acuoso con fines comparativos.

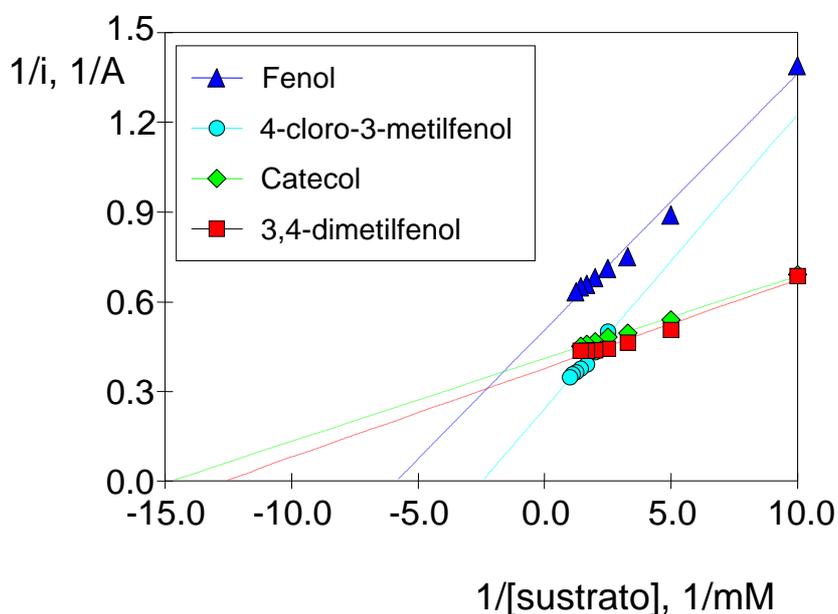


Figura 85. Representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

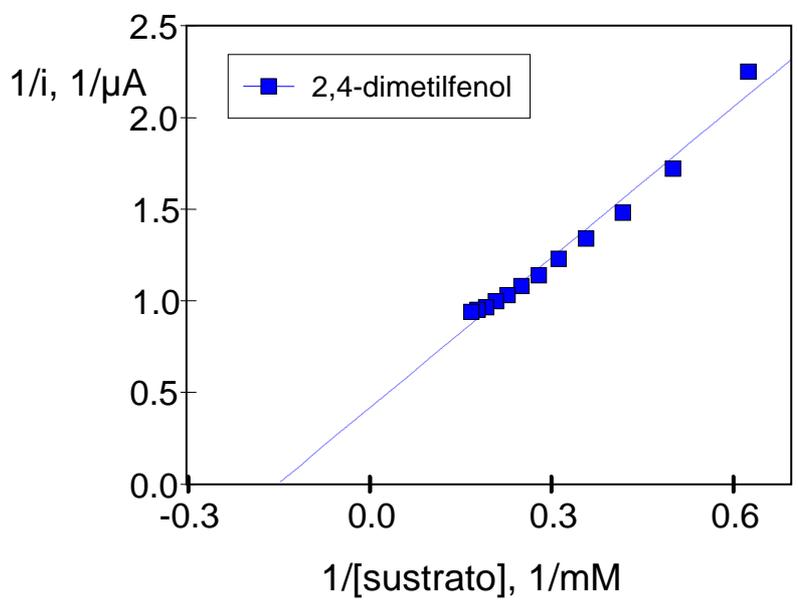


Figura 86. Representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas. $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$

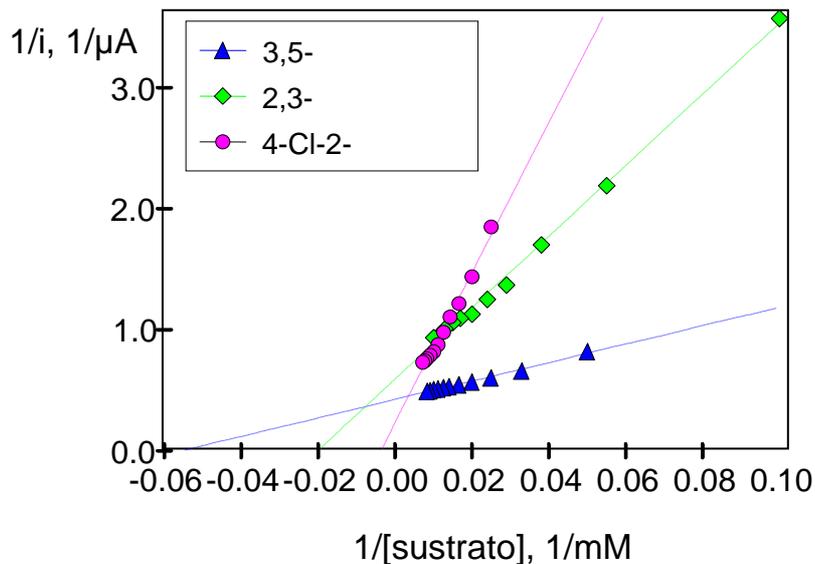


Figura 87. Representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas. $E_{ap} = -0.15$ V.

Tabla 36. Parámetros cinéticos obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr para compuestos fenólicos en micelas inversas y en medio acuoso

SUSTRATO	χ	$V_{max, ap}$ μA		$K_{M, ap}$ mM	
		Micelas inversas	Medio acuoso	Micelas inversas	Medio acuoso
Catecol	0.98	2.44	17.1	0.07	0.0499
Fenol	0.95	2.03	24.4	0.16	0.0776
4-clorofenol	1.01	1.49	12.5	0.55	0.0690
2,4-dimetilfenol	1.03	2.98	7.9	6.6	0.530
3,4-dimetilfenol	1.02	2.66	6.04	0.08	0.00788
3,5-dimetilfenol	0.96	2.36	---	13.8	---
2,3-dimetilfenol	0.96	2.64	2.29	101	4.35
4-Cl-3-metilfenol	0.98	4.17	13.1	0.41	0.0376
4-Cl-2-metilfenol	0.98	4.35	3.38	269	0.172

Comparando las constantes de Michaelis-Menten aparentes, puede observarse que éstas son notablemente mayores en las micelas inversas que en el medio acuoso. Si se tiene en cuenta el significado de esta constante, cuyo valor es la concentración de sustrato que produce un valor de velocidad igual a la mitad de la velocidad máxima, y que es proporcional a la constante de disociación del complejo enzima-sustrato, un valor de $K_{M, ap}$ alto indica que se necesitan mayores concentraciones de sustrato para saturar la enzima, y que la afinidad entre la enzima y el sustrato es menor. Como ya se ha

señalado, la reacción enzima-sustrato tiene lugar en el microdominio acuoso. Cuando se añade sustrato a la célula de medida, éste se reparte entre el medio orgánico y el medio acuoso, pero sólo hay reacción con la enzima por parte del compuesto que se encuentra en el medio acuoso. Esto significa, que los valores de las constantes que se obtienen no son reales, ya que en realidad se desconoce la concentración de compuesto fenólico en el microdominio acuoso, que es la responsable de la respuesta amperométrica, pero esta concentración será siempre menor que la nominal, lo que dará lugar, por tanto, a constantes de Michaelis-Menten más altas.

Por otro lado, si se ordenan los valores de las constantes de Michaelis-Menten de menor a mayor en ambos medios de trabajo se tiene:

- Micelas inversas: catecol < 3,4-dimetilfenol < fenol < 4-cloro-3-metilfenol < 4-clorofenol < 2,4-dimetilfenol < 3,5-dimetilfenol < 2,3-dimetilfenol < 4-cloro-2-metilfenol.
- Medio acuoso: 3,4-dimetilfenol < 4-cloro-3-metilfenol < catecol < 4-clorofenol < fenol < 4-cloro-2-metilfenol < 2,4-dimetilfenol < 2,3-dimetilfenol.

La razón de que se produzca una alteración en el orden de afinidad entre ambos medios es la distinta solubilidad de cada sustrato fenólico en los dos medios de trabajo. Así, en principio, un compuesto más polar, más soluble en agua, tenderá a encontrarse en mayor extensión en el medio acuoso que en la fase orgánica, lo que dará lugar a una disminución del valor de $K_{M,ap}$. Por el contrario, un compuesto más apolar tenderá a permanecer en el medio orgánico, y se obtendrá un valor mayor de la constante de Michaelis-Menten, ya que será necesario añadir más compuesto fenólico para conseguir la misma concentración en el microdominio acuoso. En un medio de trabajo exclusivamente acuoso, los compuestos más apolares tendrán una mayor tendencia a acumularse en la superficie del electrodo, debido a las interacciones hidrofóbicas con el Teflón. Esta es la razón de que, para sustratos fenólicos más apolares, el aumento de las constantes de Michaelis-Menten en micelas inversas con respecto al medio acuoso sea más acusado que para fenoles más polares, como el catecol y el fenol.

Por lo que respecta a los valores de la velocidad máxima en las micelas inversas, éstos son, en general, sensiblemente más bajos que los que se obtienen en el medio acuoso. Estos valores, como se vio, son proporcionales a la constante catalítica de la reacción enzimática, y pueden verse limitados, en muchos casos, por la cantidad máxima de sustrato fenólico soluble en el medio acuoso. Así, el hábito de las curvas de saturación puede ser consecuencia de la saturación de la disolución acuosa por el sustrato fenólico, y no por la saturación de la enzima por el sustrato.

Por todo lo anteriormente expuesto, debido a la complejidad de los procesos que ocurren en un medio de trabajo como las micelas inversas, el cociente $V_{m\acute{a}x}/K_{M}$ ya no puede considerarse una estimaci3n v\acute{a}lida de la eficiencia catal\itica, puesto que, adem\acute{a}s de depender de la propia reacci3n enzim\acute{a}tica, depende de las constantes de reparto de los sustratos entre las dos fases de la micela inversa.

IV.3.5. Curvas de calibrado y características analíticas

Las curvas de calibrado para los distintos compuestos fenólicos estudiados se obtuvieron en las condiciones experimentales elegidas anteriormente. A modo de ejemplo, en la Figura 88 se muestran las curvas obtenidas para los fenoles que muestran una mayor sensibilidad (catecol, fenol, 3,4-dimetilfenol y 4-cloro-3-metilfenol).

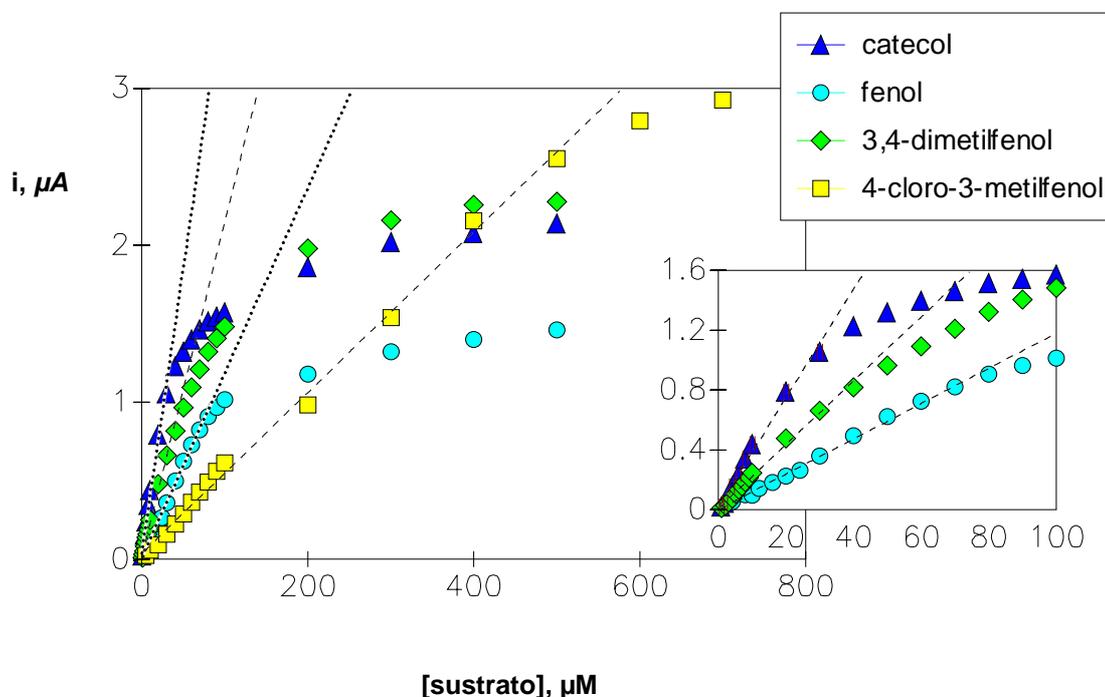


Figura 88. Curvas de calibrado obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas para fenol, catecol, 3,4-dimetilfenol y 4-cloro-3-metilfenol.

Los criterios para determinar el intervalo lineal de los correspondientes calibrados, así como para calcular los límites de detección y de determinación para cada compuesto, fueron los mismos que los empleados con los electrodos compósitos de tirosinasa en medio acuoso.

En la Tabla 37 se recogen las características analíticas de los calibrados para cada uno de los fenoles estudiados, habiéndose calculado los intervalos de confianza para un nivel de significación de 0.05. En la Tabla 38 se muestran los valores de los límites de detección y de determinación para cada sustrato fenólico. Como estimador de la desviación estándar del blanco se tomó la correspondiente a las diez señales de disoluciones diferentes de los sustratos a los niveles de concentración que se muestran en dicha Tabla, en la que aparecen, además, los valores de RSD para dichos niveles de concentración.

Tabla 37. Características analíticas de las curvas de calibrado para diferentes compuestos fenólicos obtenidas con electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas.

SUSTRATO	INTERVALO LINEAL, mol L ⁻¹	PENDIENTE, μA mol ⁻¹ L	ORDENADA EN EL ORIGEN, μA	r
----------	---------------------------------------	-----------------------------------	---------------------------	---

Catecol	$(1-30)\chi 10^6$	$(3.6\pm 0.4)\chi 10^4$	$(2\pm 5)\chi 10^{-2}$	0.997
Fenol	$(4-80)\chi 10^6$	$(1.28\pm 0.05)\chi 10^4$	$(0.04\pm 2)\chi 10^{-2}$	0.998
4-cloro-2-metilfenol	$(5-80)\chi 10^3$	14.9 ± 0.7	$(-7\pm 3)\chi 10^{-2}$	0.998
4-cloro-3-metilfenol	$(4-500)\chi 10^6$	$(5.12\pm 0.02)\chi 10^4$	$(3\pm 4)\chi 10^{-2}$	0.998
2,3-dimetilfenol	$(2-30)\chi 10^3$	31 ± 1	$(-4\pm 2)\chi 10^{-2}$	0.998
2,4-dimetilfenol	$(5-300)\chi 10^5$	$(2.8\pm 0.2)\chi 10^2$	$(-2\pm 2)\chi 10^{-2}$	0.997
3,4-dimetilfenol	$(1-40)\chi 10^6$	$(2.1\pm 0.1)\chi 10^4$	$(1\pm 2)\chi 10^{-2}$	0.997
3,5-dimetilfenol	$(2-20)\chi 10^3$	62 ± 2	$(-3\pm 3)\chi 10^{-2}$	0.999

Aunque ahora no es posible establecer una relación directa entre la sensibilidad y la eficiencia catalítica de la enzima para cada sustrato fenólico, sí que es posible observar una relación entre el valor de la constante de Michaelis-Menten aparente y la amplitud del intervalo lineal. Además, también se aprecia que cuanto menor es la constante de Michaelis-Menten, mayor es la sensibilidad, como se predice teóricamente.

Por otro lado, si se comparan las características analíticas obtenidas en las micelas inversas con las del medio acuoso, se observa claramente que la sensibilidad es menor en el medio predominantemente orgánico, al igual que son peores los límites de detección. Esto es consecuencia del reparto de los analitos entre las dos fases de la micela inversa, ya que la concentración en los microdominios acuosos y por lo tanto la concentración que interacciona con la enzima, es siempre menor que en el medio acuoso, debido a la mayor solubilidad de estos compuestos en acetato de etilo. Sin embargo, ha quedado demostrado que cuando no se necesiten límites de detección muy bajos, o bien cuando sea necesario extraer el analito de la muestra con un disolvente orgánico, el medio de micelas inversas presenta innegables ventajas.

Tabla 38. Características analíticas de la determinación de varios compuestos fenólicos con electrodos compósitos de grafito-Teflón-tirosinasa en micelas inversas.

SUSTRATO	CONCENTRACIÓN mol L ⁻¹	RSD, %	L.D., mol L ⁻¹	L.Q., mol L ⁻¹
Catecol	$4.0\chi 10^6$	8.7	$4.6\chi 10^7$	$1.5\chi 10^6$
Fenol	$1.0\chi 10^5$	6.8	$1.1\chi 10^6$	$3.7\chi 10^6$
4-cloro-2-metilfenol	$5.0\chi 10^3$	6.6	$1.3\chi 10^3$	$4.4\chi 10^3$
4-cloro-3-metilfenol	$1.0\chi 10^5$	7.7	$4.4\chi 10^7$	$1.5\chi 10^6$
2,3-dimetilfenol	$2.0\chi 10^3$	7.5	$4.7\chi 10^4$	$1.6\chi 10^3$
2,4-dimetilfenol	$5.0\chi 10^5$	8.2	$3.4\chi 10^5$	$1.1\chi 10^4$
3,4-dimetilfenol	$3.0\chi 10^6$	8.6	$1.0\chi 10^6$	$3.3\chi 10^6$

3,5-dimetilfenol

2.0×10^3

6.4

2.0×10^4

6.7×10^4

Por lo que respecta a los intervalos de linealidad, la enzima se saturará en las micelas inversas a concentraciones mayores que en el medio acuoso, debido al ya comentado reparto del compuesto fenólico entre ambas fases en la emulsión. Por tanto, la cantidad de sustrato que interacciona con la tirosinasa es menor en este medio para la misma concentración en la célula de medida, y los intervalos lineales son más amplios en las micelas inversas.

IV.4. Electrodo compósito de grafito-Teflón- peroxidasa

Como ya se mencionó, uno de los objetivos prioritarios de esta Tesis es la construcción de biosensores que sirvan para llevar a cabo un screening de compuestos fenólicos. Como se ha visto también, los biosensores de tirosinasa están restringidos a la monitorización de aquellos compuestos fenólicos que posean al menos una de sus dos posiciones orto- del anillo aromático libre. Con objeto de diseñar un biosensor que sea capaz de detectar un número mayor de estos compuestos se ha procedido a construir electrodos compósitos de peroxidasa. Como se discutió en la Introducción, los compuestos fenólicos actúan como segundo sustrato en las reacciones de oxidación del peróxido de hidrógeno catalizadas por la enzima peroxidasa (Kulys et al., 1991; Ruzgas et al., 1995), por lo que, en condiciones de exceso de H_2O_2 , el peróxido actúa como cofactor y el fenol como sustrato. En la superficie de un electrodo el mecanismo de las diversas reacciones implicadas es el que se muestran en la Figura 89.

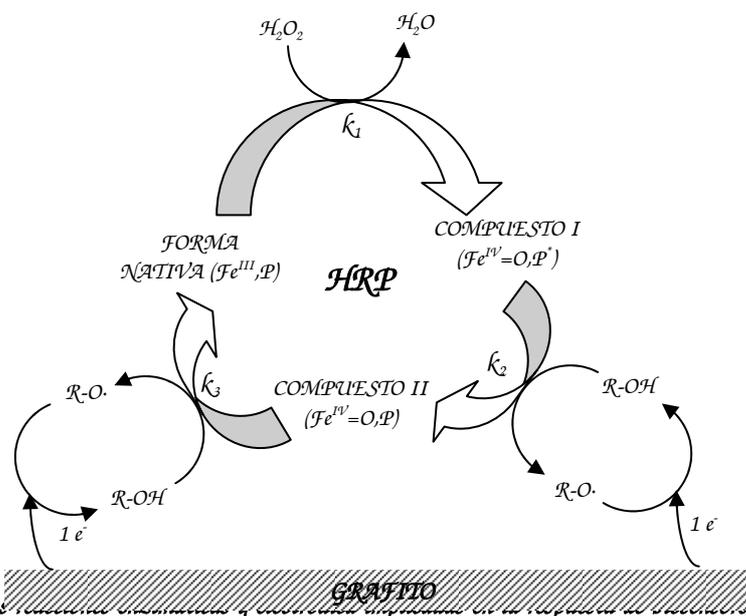


Figura 89. Diagrama de las reacciones electroquímicas de peroxidasa hacia los compuestos fenólicos.

La monitorización de la reacción enzimática se realiza mediante la reducción electroquímica de los radicales fenólico formados, siendo esta corriente de reducción proporcional a la concentración del compuesto fenólico en disolución.

En nuestro Grupo de Investigación se desarrolló con anterioridad un electrodo compuesto de grafito-Teflón-peroxidasa para la monitorización de H_2O_2 (del Cerro et al., 1997), por lo que las variables que conciernen a la fabricación de dicho electrodo, como son el porcentaje de Teflón en la matriz electrodica (70%), y la cantidad de peroxidasa (1.5%) fueron las mismas que las optimizadas anteriormente.

En la Figura 90 se muestran los amperogramas obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón(70%)-peroxidasa tras una adición de $25 \mu L$ de una disolución patrón de H_2O_2 de concentración $0.1 \text{ mol } L^{-1}$ a 5.0 mL de disolución reguladora de fosfato $0.05 \text{ mol } L^{-1}$ de pH 6.5. Una vez alcanzado el estado estacionario se llevaron a cabo adiciones sucesivas de $25 \mu L$ de disoluciones patrón $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$ de 4-clorofenol(A), 2,4-diclorofenol(B) y 4-cloro-2-metilfenol (C). Como era de esperar, la señal amperométrica obtenida para el peróxido de hidrógeno es prácticamente constante en todos los casos, por lo que, en lo que

sigue, los registros *i-t* se mostrarán sin dicha señal, es decir, sólo se representarán las señales producidas por los diferentes compuestos fenólicos.

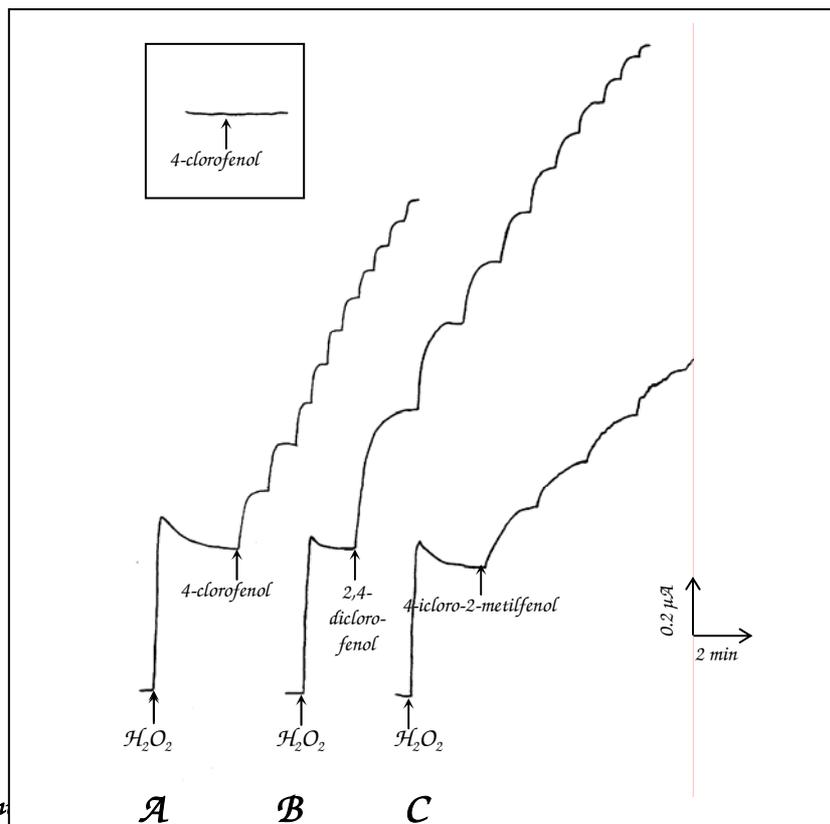


Figura 90. Registros *i-t* de peroxidasa para una unión de 25 μL de una disolución patrón de H₂O₂ 0.1 mol L⁻¹ y uniones sucesivas de 25 μL de disoluciones patrón 4.0x10⁻³ mol L⁻¹ de: A) 4-clorofenol; B) 2,4-diclorofenol, C) 4-cloro-2-metilfenol. Cuadro superior: Adición de la disolución patrón de 4-clorofenol sin añadir H₂O₂ a la disolución. E_{ap} = 0.0 V.

Como puede apreciarse, el electrodo de peroxidasa tiene una respuesta rápida a los cambios en la concentración de los sustratos, alcanzándose la corriente en el estado estacionario en aproximadamente 120 s. Esta rápida respuesta está favorecida, como ya se ha comentado, por no existir barreras en forma de membrana sobre la superficie del electrodo, ni enlaces covalentes para mantener la enzima inmovilizada en la superficie del electrodo. Por otra parte, no se observó ninguna señal amperométrica medible tras la adición de compuestos fenólicos cuando no se añadió peróxido de hidrógeno a la disolución de trabajo.

IV.4.1. Optimización de variables experimentales

Con el fin de obtener la mejor señal amperométrica, se optimizaron las variables experimentales que influyen en la reacción enzimática, como son el pH de la disolución de trabajo y el contenido de peróxido de hidrógeno en esta disolución. Por otra parte, se estudió la influencia del potencial aplicado en la reducción de los radicales fenólico formados en las reacciones enzimáticas.

IV.4.1.1. Influencia de la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución de trabajo

Es un hecho bien conocido que se produce inhibición de la actividad de la peroxidasa cuando la concentración de peróxido de hidrógeno excede de un determinado valor (Scheller et al., 1997; Bogdanovskaya et al., 1994). Así, se ha reportado que se produce pérdida de actividad a partir de una concentración de H_2O_2 de aproximadamente $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$, utilizando un electrodo de carbono vitrificado con HRP inmovilizada en su superficie y aplicando un potencial constante de 0.2 V vs. Ag/AgCl (Bogdanovskaya et al., 1994). A medida que el potencial aplicado se hace más reductor, la pérdida de actividad ocurre para mayores concentraciones de H_2O_2 . Según Nakajima y Yamazaki (1980) la reacción de inactivación se origina a partir del Compuesto I. La presencia de un sustrato reductor, tal y como son los compuestos fenólicos, frena dicha inactivación, ya que compite con el H_2O_2 por el Compuesto I. Dado que, como se puso de manifiesto en el apartado II.2.4, cuando no existe un segundo sustrato la reducción de la enzima se realiza electródicamente, un aumento en la polarización catódica daría lugar a un aumento de la velocidad de reducción del Compuesto I y provocaría que la pérdida de actividad por el H_2O_2 no se produjera hasta valores de concentración mayores (Arnao et al., 1990), lo que está de acuerdo con la hipótesis de Nakajima y Yamazaki.

Estas razones hicieron que se optimizara la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución de trabajo. En la Figura 91 se muestra la variación de la intensidad de corriente en estado estacionario con la concentración de 4-clorofenol en disoluciones con concentraciones de H_2O_2 de 2.5×10^{-4} , 5.0×10^{-4} y $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$. Puede observarse cómo a medida que la concentración de peróxido de hidrógeno aumenta, la señal amperométrica es mayor. Sin embargo, el tiempo que se necesita para la estabilización de la línea base, así como el ruido de fondo, también aumentan con la concentración de H_2O_2 . Teniendo en cuenta que para concentraciones de 5.0×10^{-4} y $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$ se obtienen intervalos de linealidad similares, se escogió $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol } L^{-1}$ para realizar posteriores experimentos.

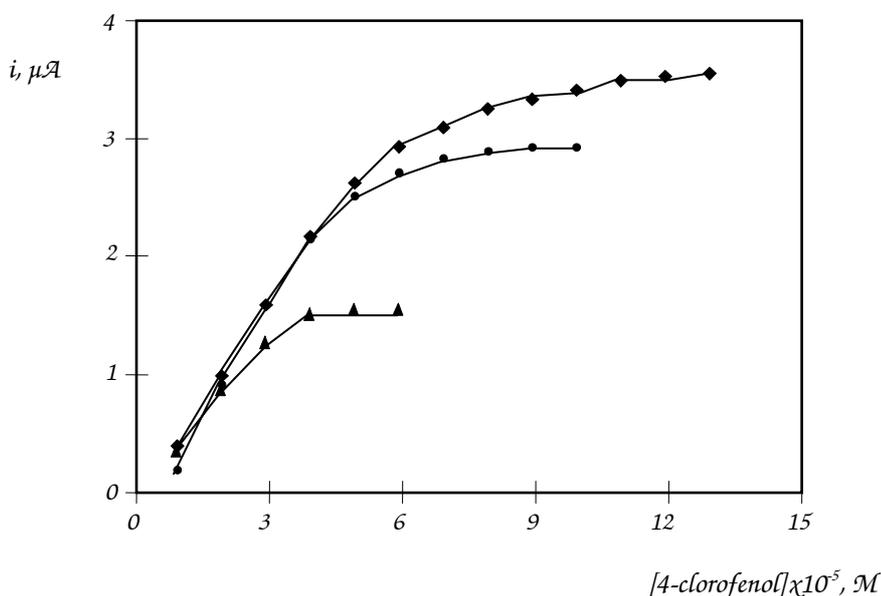


Figura 91. Influencia de la concentración de peróxido de hidrógeno ($2.5 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$ (▲), $5.0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$ (●), $1.0 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ (◆)) sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida 4-clorofenol $1.0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo compuesto de grafito-Teflón- $\text{H}_2\text{R}_2\text{P}$; $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$; regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5).

La concentración de peróxido de hidrógeno elegida no es suficientemente alta para afectar significativamente la actividad de la enzima en las condiciones experimentales utilizadas.

IV.4.1.2. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en estado estacionario

Se estudió cómo influye el pH de la disolución reguladora acuosa de trabajo sobre la intensidad de corriente en estado estacionario de reducción de los radicales fenólico formados en la reacción enzimática. Para ello se utilizaron distintas disoluciones reguladoras de fosfato 0.05 mol L^{-1} cuyo pH variaba entre 5.5 y 8.5, conteniendo H_2O_2 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Se aplicó un potencial constante de 0.00 V , y el sustrato empleado fue 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. En la Figura 92 se muestran los resultados obtenidos.

Puede apreciarse que se obtiene una meseta de intensidad en el intervalo de pH 5.5-6.5, produciéndose una disminución de la señal a partir de pH 6.5. Esta disminución puede deberse a que cuando el compuesto fenólico reacciona con la enzima peroxidasa, se produce la transferencia de un electrón y de un protón simultáneamente del grupo $-\text{OH}$ del fenol al centro activo de la enzima. Por tanto, y con el fin de no emplear un valor de pH demasiado ácido, se ha elegido como pH óptimo para estudios posteriores el valor de 6.5.

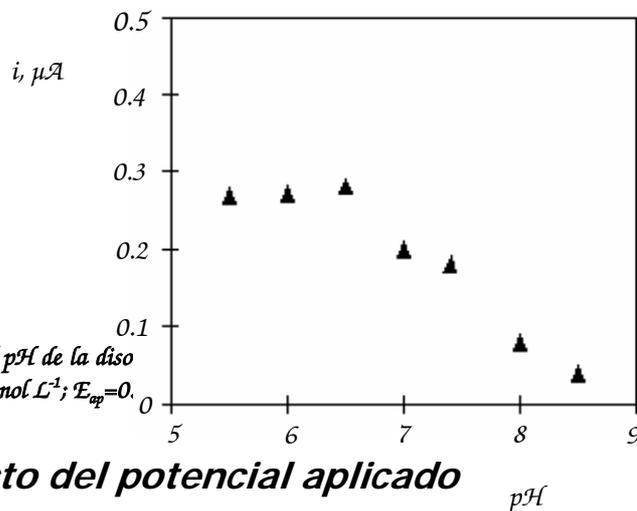


Figura 92. Influencia del pH de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} para 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{\text{ap}}=0$.

Intensidad de corriente en estado estacionario

IV.4.1.3. Efecto del potencial aplicado

El efecto del potencial aplicado sobre la respuesta amperométrica del biosensor de grafito-Teflón-peroxidasa, se evaluó empleando como sustratos distintos compuestos fenólicos, a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 que contiene $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . A modo de ejemplo, en la Figura 93 se muestra la tendencia obtenida para el 4-clorofenol, el 2,4-diclorofenol y 4-cloro-2-metilfenol.

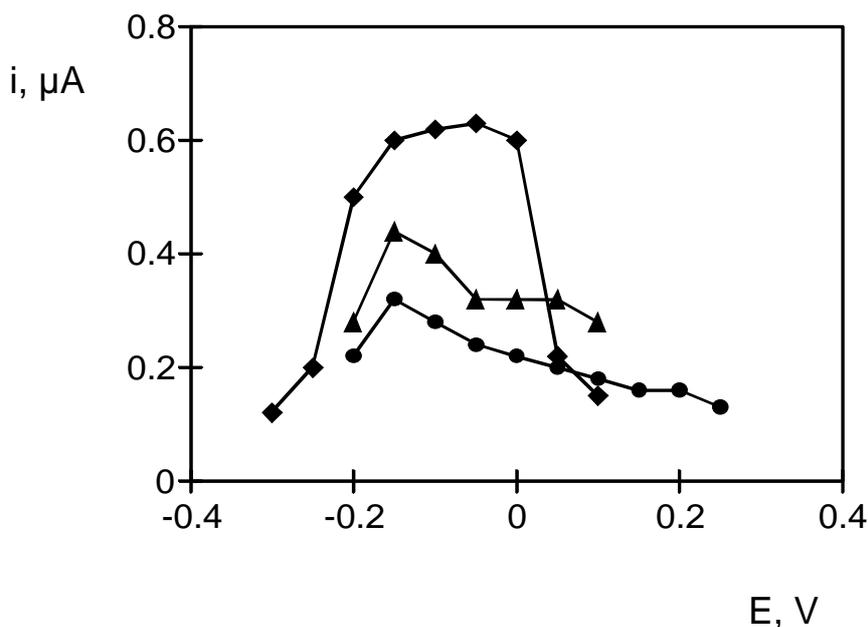


Figura 93. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-peroxidasa para (◆) 2,4-diclorofenol, (▲) 4-clorofenol y (●) 4-cloro-2-metilfenol, $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5.

Para los tres compuestos fenólicos la corriente en el estado estacionario aumentó entre 0.1 y -0.2 V aproximadamente, para después obtenerse un decrecimiento gradual de la respuesta a medida el valor del potencial se hacía más reductor. Este comportamiento es atribuible al ensuciamiento de la superficie del electrodo como consecuencia de la polimerización de los productos de la reacción enzimática, la cual está favorecida a medida que el potencial se hace más negativo (Marko-Varga et al., 1995). Un comportamiento similar al mostrado en la Figura 93 se encontró para todos los compuestos fenólicos estudiados.

Por otra parte, pudo observarse que el tiempo necesario para alcanzar una línea base estable era mínimo a 0.00V , siendo mayor tanto a potenciales más negativos como a más positivos de este valor. La máxima intensidad de corriente no se alcanzó al mismo valor del potencial para todos los compuestos fenólicos ensayados, por lo que se escogió un potencial de trabajo al cual se obtuvieran buenas señales amperométricas para todos ellos, lo que permitiría realizar su "screening". El potencial elegido fue de 0.00V , ya que cumple los requisitos mencionados. Lógicamente, si, en alguna aplicación particular, se deseara realizar una determinación individual de algún compuesto fenólico, el potencial a aplicar no tendría porqué ser el mismo que el escogido ahora.

IV.4.2. Estabilidad del electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP

La estabilidad de un biosensor es un aspecto de gran importancia, puesto que de ella depende su aplicabilidad. Se ha evaluado el número de medidas y cuánto tiempo es posible utilizar el biosensor con una respuesta reproducible, al igual que se hizo para los electrodos compósitos de tirosinasa. Por tanto, se evaluaron aspectos como la repetibilidad de la señal sin pulir el electrodo, su reproducibilidad cuando se regenera la superficie del electrodo mediante pulido, la reproducibilidad en la fabricación de los electrodos, el tiempo de utilización del biosensor y el efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre con la que se fabrican los electrodos. Para llevar a cabo estos estudios de estabilidad se eligió el 4-clorofenol como sustrato.

Puesto que en nuestro grupo de investigación ya se utilizó el electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa para la monitorización de peróxidos (del Cerro et al., 1997), aspectos como el efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla o la reproducibilidad en la fabricación de los electrodos, deben ser similares a los que se obtengan Ahora. Se efectuará, por tanto, una comparación entre los resultados obtenidos entre ambos casos.

IV.4.2.1. Repetibilidad de las medidas

La repetibilidad de la intensidad de la respuesta amperométrica del electrodo de grafito-Teflón-HRP sin regeneración de la superficie electródica, se evaluó utilizando una disolución de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. El medio de trabajo fue una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 conteniendo peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, y el potencial aplicado fue de 0.00 V .

En la Tabla 39 se muestran los resultados obtenidos en este estudio, su valor medio con el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05 y la desviación estándar relativa de la serie de medidas realizadas, que indica una buena repetibilidad de las medidas amperométricas sin necesidad de regenerar la superficie del electrodo.

Sin embargo, cuando se evaluó la repetibilidad con una concentración mayor de 4-clorofenol ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) o con otros compuestos fenólicos, como por ejemplo, fenol, se observó una disminución acusada de las respuestas para medidas consecutivas sin pulir la superficie electródica. Este comportamiento se ha atribuido al ensuciamiento de la superficie electródica por los productos de la reacción química de los grupos fenóxido generados en la reacción enzimática. Estos productos son dímeros y polímeros que ensucian irreversiblemente la superficie del electrodo, y por tanto provocan que se obtengan señales menores, siendo necesario regenerar la superficie electródica para recuperar la señal inicial, como comentará en el siguiente apartado.

A este respecto conviene mencionar explícitamente los resultados obtenidos para este estudio con el fenol. En este caso, la desviación estándar relativa que se obtuvo fue de un 40% para una concentración de fenol de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, lo que indica que el ensuciamiento por formación de dímeros y polímeros es mucho mayor que para el 4-clorofenol.

Con objeto de minimizar dicho ensuciamiento se añadió el tensoactivo Tritón X-100 en concentración 0.05% (p/v) a la disolución de trabajo. Este tensoactivo se había utilizado en trabajos precedentes (Ruzgas et al., 1995) para evitar que los radicales formados en la oxidación de los compuestos fenólicos se adhirieran al electrodo. En estas condiciones, se obtuvo un valor de \mathcal{RSD} del 38% para una serie de 10 medidas sucesivas. Puesto que no se mejoró sustancialmente la repetibilidad, se decidió seguir utilizando como medio de trabajo el regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 con una concentración de H_2O_2 de 5.0×10^{-4} mol L^{-1} , sin adición de tensoactivo.

Tabla 39. Intensidad de corriente en estado estacionario para medidas sucesivas realizadas con el electrodo compuesto enzimático sin regeneración de la superficie electrodo. Concentración de 4-clorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} ; disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5); H_2O_2 5.0×10^{-4} mol L^{-1} ; $E_{ap} = 0.00V$.

MEDIDAS	i , μA	\bar{i} , μA	\mathcal{RSD} , %
1	0.21		
2	0.21		
3	0.20		
4	0.23		
5	0.22		
6	0.22	0.21 ± 0.01	5.3
7	0.24		
8	0.20		
9	0.19		
10	0.21		

IV.4.2.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica por pulido

La gran ventaja que poseen los electrodos compósitos enzimáticos de obtener una superficie electródica renovada y, por tanto, un nuevo biosensor, mediante un simple pulido de dicha superficie, constituye un hecho especialmente relevante en el caso en que los productos de la reacción enzimática no electroactivos puedan ensuciar notablemente la superficie del electrodo. Por ello, en este caso es importante llevar a cabo un estudio de la reproducibilidad de las medidas con el proceso de regeneración del biosensor. Se realizaron 10 pulidos y tres medidas diferentes después de cada pulido para dos niveles de concentración de 4-clorofenol: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. En la Tabla 40 se recogen los resultados obtenidos.

Los valores de la desviación estándar relativa obtenidos para los 10 valores medios de la corriente de cada serie fueron 8.1 y 7.7% para un nivel de concentración de 4-clorofenol de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y de $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estos valores indican que el electrodo compósito de peroxidasa permite obtener respuestas amperométricas reproducibles después de llevar a cabo el procedimiento de regeneración del biosensor, incluso a una concentración elevada de 4-clorofenol, lo que indica que la enzima está uniformemente distribuida en el seno de la matriz electródica.

Tabla 40. Reproducibilidad de la señal obtenida con el electrodo compuesto enzimático de HRP para 4-clorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} y 1.0×10^{-3} mol L^{-1} tras regenerar la superficie del electrodo por pulido. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5; concentración de H_2O_2 5.0×10^{-4} mol L^{-1} ; $E_{ap} = 0.00V$.

N° de pulido	[4-clorofenol] = 1.0×10^{-5} mol L^{-1}			[4-clorofenol] = 1.0×10^{-3} mol L^{-1}		
	i , μA	\bar{i} , μA	RSD, %	i , μA	\bar{i} , μA	RSD, %
1	0.19			8.1		
2	0.18			9.0		
3	0.17			7.5		
4	0.17			8.3		
5	0.18			7.4		
6	0.22	0.19 ± 0.01	8.1	8.6	8.1 ± 0.4	7.7
7	0.22			7.4		
8	0.17			8.7		
9	0.18			7.3		
10	0.18			7.3		

IV.4.2.3. Tiempo de vida útil de un biosensor

El tiempo de vida útil de un biosensor compuesto de peroxidasa se evaluó realizando diariamente tres medidas de disoluciones de 4-clorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} diferentes. La Figura 94 muestra el gráfico de control construido, tomando como valor central el valor medio de las 10 medidas sucesivas realizadas sin regeneración de la superficie electrodica. Los límites superior e inferior del gráfico de control se tomaron siguiendo el mismo criterio que para los electrodos de tirosinasa.

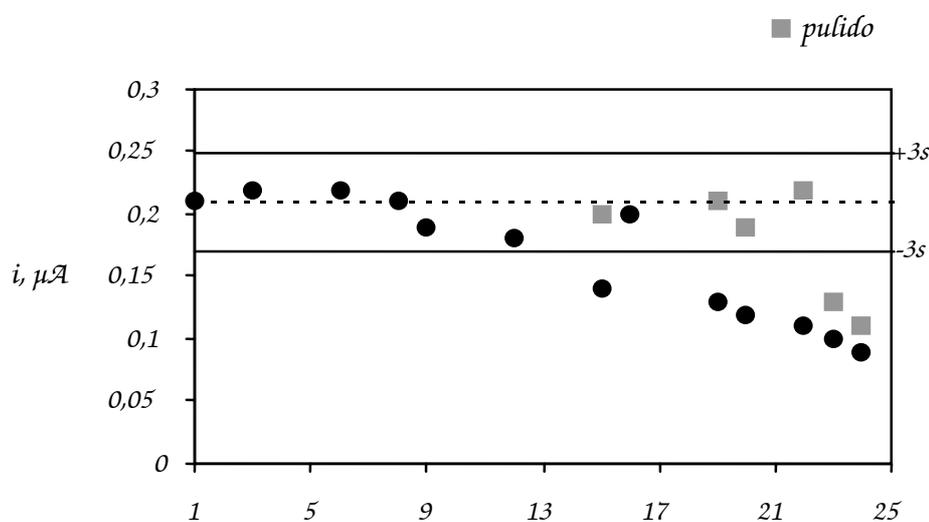


Figura 94. Gráfico de control para la dependencia de la corriente en estado estacionario con el tiempo para 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ medida con un electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP: (●) sin pulido, (■) pulido. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5; H_2O_2 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{ap} = 0.00V$.

El mismo electrodo compuesto de peroxidasa pudo utilizarse, a este nivel de concentración, durante aproximadamente 12 días sin necesidad de regenerar la superficie del electrodo. A partir de alrededor de 20 días, la respuesta amperométrica no puede ser recuperada por pulido. Teniendo en cuenta que el tiempo de vida de un biosensor de grafito-Teflón-HRP-ferroceno desarrollado en nuestro Grupo de Investigación para la determinación de peróxidos fue estimado en aproximadamente 2 meses (del Cerro et al., 1997), puede deducirse que el proceso de ensuciamiento del electrodo por los productos de la reacción enzimática cuando están implicados compuestos fenólicos, produce un envenenamiento irreversible de la enzima que reduce considerablemente el tiempo de vida útil del biosensor.

Debe destacarse que, en varias ocasiones, se necesitó realizar más de un pulido para recuperar la señal amperométrica, lo que indica que la inactivación enzimática afecta no sólo a la superficie del biosensor, sino que también influye hasta una cierta profundidad en la matriz. Obviamente, esto implica una disminución del tiempo de vida útil del electrodo en comparación con el empleado para la determinación de peróxidos.

IV.4.2.4. Reproducibilidad de las medias obtenidas con diferentes electrodos

Obviamente, cuando el bioelectrodo compuesto dejaba de ser utilizable, era necesario cambiar de electrodo. Por consiguiente, la reproducibilidad de las respuestas obtenidas con diferentes electrodos, construidos a partir de la misma pastilla

madre y a partir de pastillas diferentes, es un aspecto esencial a evaluar. Se construyeron 3 electrodos diferentes a partir de 3 pastillas madre distintas, y se realizaron cinco medias amperométricas con cada electrodo de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

En la Tabla 41 se recogen los resultados obtenidos para los 9 electrodos. Los intervalos de confianza se calcularon para un nivel de significación de 0.05. La desviación estándar relativa para todos los valores medios obtenidos con los nueve electrodos fue de 7.2 %, lo que indica que el proceso de fabricación de los electrodos es reproducible y fiable.

Tabla 41. Reproducibilidad de las medidas realizadas con diferentes electrodos de grafito-Teflón-HERP contruidos a partir de la misma pastilla y a partir de pastillas distintas, i es el valor medio de 5 medidas para 4-clorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} . Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5; H_2O_2 5.0×10^{-4} mol L^{-1} ; $E_{ap} = 0.00V$.

ELECTRODO	i , μA (RSD (%))		
	PASTILLA 1	PASTILLA 2	PASTILLA 3
1	0.20 (4.5)	0.21 (6.0)	0.21 (8.4)
2	0.22 (8.1)	0.20 (6.2)	0.20 (8.6)
3	0.23 (9.1)	0.18 (7.2)	0.20 (10.0)
i media de cada pastilla (μA)	0.22 (6.9)	0.20 (8.4)	0.20 (2.9)
MEDIA TOTAL	0.21 (7.2)		

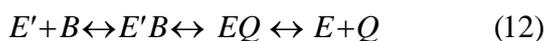
IV.4.2.5. Efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre

Finalmente, se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre, es decir, cuánto tiempo es posible almacenar la pastilla compósita enzimática sin observar pérdida de la actividad de la peroxidasa. No se observaron diferencias significativas en las respuestas amperométricas cuando el electrodo se construyó a partir de una pastilla que llevaba 8 meses almacenada en seco a $4^{\circ}C$. De hecho, los resultados que se muestran para el electrodo 3 pastilla 1, en la Tabla 41, corresponden a dicho electrodo. De esta forma se puso de manifiesto que no existía pérdida significativa de la actividad de la enzima inmovilizada en la matriz compósita, al menos durante el tiempo de almacenamiento mencionado, lo que demuestra una vez más la bondad del método de inmovilización de la enzima empleada.

IV.4.3. Cálculo de las constantes cinéticas

Ya se puso de manifiesto en los estudios desarrollados con los electrodos de tirosinasa, que el cálculo de las variables cinéticas de la reacción enzimática que tiene lugar con los diferentes sustratos, permite obtener información útil sobre la sensibilidad y el intervalo dinámico de concentración, aspectos fundamentales desde el punto de vista analítico en el desarrollo de biosensores. Además, dichas variables proporcionarán también información acerca de cómo afecta la estructura del sustrato de la reacción enzimática. En las reacciones en las que está implicado un solo sustrato, las variables cinéticas (velocidad máxima aparente y constante de Michaelis–Menten aparente), se pueden calcular de forma sencilla a partir de las curvas de saturación de la enzima con el sustrato. Sin embargo, cuando hay dos sustratos implicados, como ocurre en este caso, el cálculo no es tan sencillo, ya que las reacciones enzimáticas pueden seguir distintas vías.

Cuando las reacciones enzimáticas transcurren a través de una serie de complejos binarios, como ocurre con la peroxidasa, el mecanismo se denomina de doble desplazamiento o “ping-pong”, y viene descrito por la siguiente serie de reacciones:



donde A y B son los dos sustratos implicados, E y E' son dos estados de oxidación diferentes de la enzima y P y Q son productos de las reacciones enzimáticas. En este caso, la ecuación general de velocidad es:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_{M,ap}^A}{[A]} + \frac{K_{M,ap}^B}{[B]}} \quad (13)$$

donde $K_{M,ap}^A$ y $K_{M,ap}^B$ son las constantes de Michaelis-Menten para el sustrato A y B respectivamente, las cuales dependen de la concentración del otro sustrato en disolución, $[A]$ y $[B]$ son las concentraciones de los sustratos A y B, v es la velocidad de reacción y $V_{máx}$ es la velocidad máxima de la reacción.

La forma recíproca de esta ecuación es:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{M,ap}^A}{V_{máx}} + \frac{1 + \frac{K_{M,ap}^B}{[B]}}{V_{máx}} \quad (14)$$

por lo que, la representación de $1/v$ frente a la inversa de la concentración de uno de los dos sustratos proporciona familias de líneas rectas paralelas manteniendo la concentración del otro sustrato fija. Los valores de las constantes pueden obtenerse a partir de los gráficos secundarios en los que los que se representan las ordenadas en el origen de los gráficos recíprocos frente a la inversa de la concentración de sustrato. En la Tabla 42 se recogen los parámetros que permiten calcular las constantes cinéticas mediante este método (Cornish-Bowden y Wharton, 1988).

Otro método más sencillo para calcular las constantes cinéticas consiste en mantener uno de los dos sustratos a una concentración constante lo suficientemente alta como para saturar la enzima, y variar la concentración del otro sustrato, de modo que la reacción enzimática global se simplifique a una reacción enzimática de un solo sustrato y se puedan calcular las diferentes variables cinéticas según las ecuaciones:

$$v = \frac{V_{\text{máx}}}{1 + K_{M,ap}^A / [A]} \quad (15)$$

$$v = \frac{V_{\text{máx}}}{1 + K_{M,ap}^B / [B]} \quad (16)$$

Tabla 42. Parámetros representados en los gráficos recíprocos para sistemas que obedecen la ecuación (13).

GRÁFICO	ORDENADA EN EL		
	PEN(DIEN)TE	ORIGEN	ABCISA EN EL ORIGEN
Gráfico primario: 1/i frente a 1/[A]	$K_{M,ap}^A/V_{máx}$	$(1 + K_{M,ap}^B)/[B]/V_{máx}$	$-(1 + K_{M,ap}^B)/[B]/K_{M,ap}^A$
Gráfico secundario: Ordenadas en el origen del gráfico primario frente a 1/[A]	$K_{M,ap}^B/V_{máx}$	$1/V_{máx}$	$-1/K_{M,ap}^B$
Gráfico primario: 1/i frente a 1/[B]	$K_{M,ap}^B/V_{máx}$	$(1 + K_{M,ap}^A)/[A]/V_{máx}$	$-(1 + K_{M,ap}^A)/[A]/K_{M,ap}^B$
Gráfico secundario: Ordenadas en el origen del gráfico primario frente a 1/[B]	$K_{M,ap}^A/V_{máx}$	$1/V_{máx}$	$-1/K_{M,ap}^A$

En este caso, $K_{M,ap}^A$ y $K_{M,ap}^B$ pueden definirse como la concentración de A y de B, respectivamente, para las que la velocidad es la mitad de la velocidad máxima a concentraciones de saturación de B y de A, respectivamente, y deben coincidir, en las condiciones empleadas, con los valores de $K_{M,ap}^A$ y $K_{M,ap}^B$ que aparecen en la ecuación (13). Los valores de ambas constantes pueden calcularse a partir de las curvas de saturación de uno de los dos sustratos cuando el otro se encuentra en disolución a altas concentraciones (Cornish-Bowden y Wharton, 1988).

Antes de calcular las constantes cinéticas por este método, es preciso verificar que la reacción enzimática para cada sustrato obedece realmente a una cinética de tipo Michaelis-Menten. Para ello, se calculó el parámetro "χ" de la ecuación de Hill (Iwuoha et al., 1994). Los gráficos de Hill, donde se representa el $\log[(i_{máx}/i) - 1]$ en función del logaritmo de la concentración de cada uno de los sustratos fenólicos, para una concentración de peróxido de hidrógeno constante (2.0×10^{-3} mol L^{-1}), y el $\log[(i_{máx}/i) - 1]$ en función del logaritmo de la concentración de H_2O_2 con cada sustrato fenólico en disolución a concentración constante (2.0×10^{-3} mol L^{-1}), se muestran en la Figura 95.

Los valores de χ obtenidos se recogen en la Tabla 43. Como se puede apreciar, dicho valor es en todos los casos próximo a 1, lo que indica que, en condiciones de saturación del otro sustrato, la reacción enzimática para cada sustrato se ajusta a una cinética del tipo Michaelis-Menten.

El cálculo de los parámetros cinéticos por el método simplificado se ha realizado a partir de las medidas de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidas para adiciones sucesivas del volumen apropiado de una disolución patrón de cada uno de los sustratos hasta no obtener variación apreciable de dicha intensidad, manteniendo constante la concentración del otro sustrato (peróxido de hidrógeno o compuesto fenólico según el caso) en $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Entre los diferentes experimentos, fue necesario pulir la superficie del electrodo, debido a que se observó pérdida de señal si no se procedía a regenerar dicha superficie, habida cuenta de las altas concentraciones utilizadas.

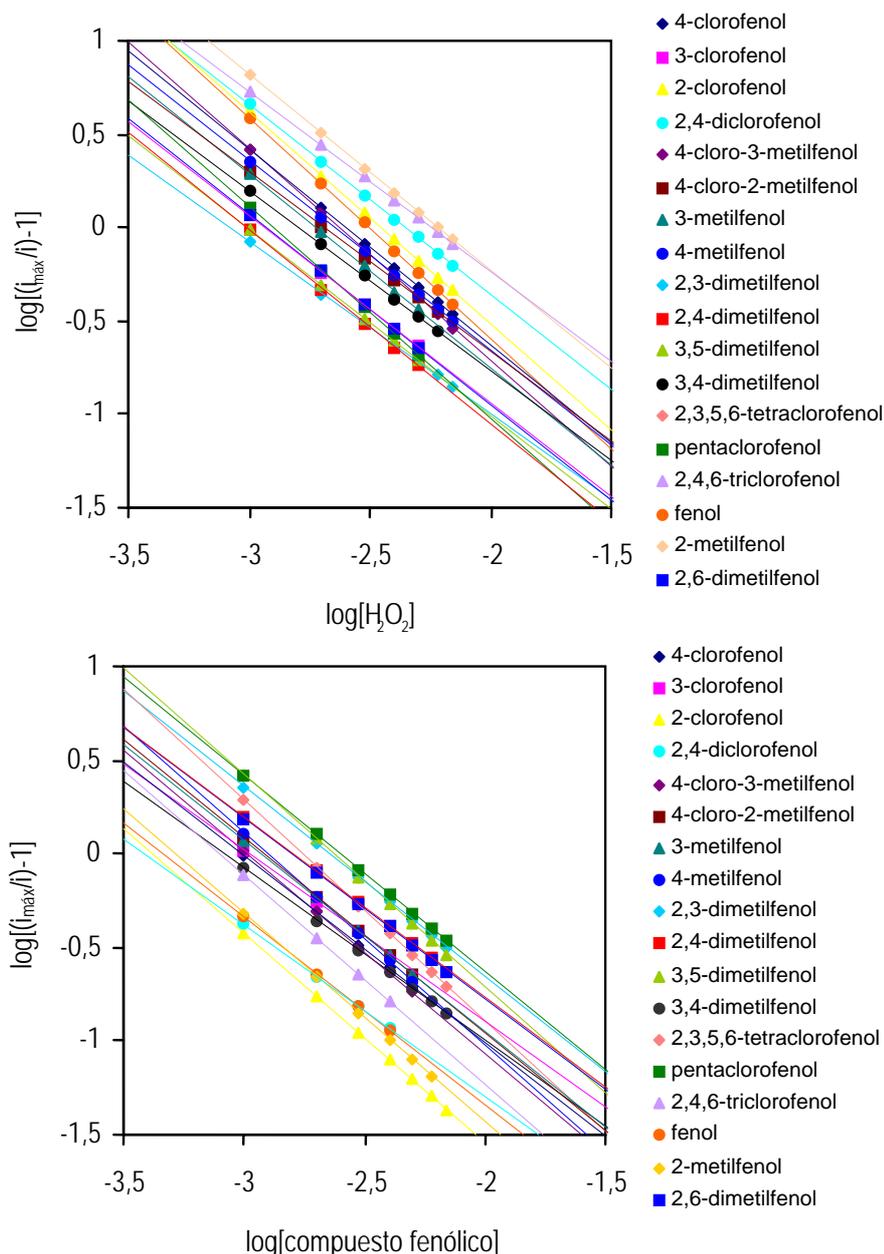


Figura 95. Gráficos de Hill para diferentes sustratos fenólicos, obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa en regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de $\text{pH } 6.5$; $E_{\text{ap}}=0.00 \text{ V}$. (A) $2.0 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 en la disolución de medida y variando la concentración de compuesto fenólico hasta saturación; (B) $2.0 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ de compuesto fenólico en la disolución de medida y variando la concentración de H_2O_2 hasta saturación.

Las variables cinéticas se han calculado mediante este método para los 18 sustratos fenólicos estudiados y para el peróxido de hidrógeno con cada uno de los 18 fenoles en disolución. Con objeto de confirmar la validez de los resultados obtenidos mediante este método simplificado, se han comparado con las constantes cinéticas calculadas aplicando el método de las gráficas recíprocas (primer método comentado y mucho más tedioso y complejo que el simplificado), para el 4-clorofenol y 2-clorofenol.

En las Figuras 96A y 96B se muestran las curvas de saturación obtenidas para todos los sustratos estudiados, las cuales tienen la forma típica de los sistemas enzimáticos. En las Figuras 97A y 97B se recogen las representaciones de Lineweaver-Burk, a partir de las que se obtuvieron las constantes cinéticas. Como ya se comentó, el punto de intersección con

la ordenada en el origen corresponde a la inversa de la velocidad máxima, mientras que la intersección con el eje de abscisas es la inversa de la constante aparente de Michaelis-Menten cambiada de signo.

Tabla 43. Parámetros cinéticos obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP para los diferentes sustratos fenólicos.

COMPUESTO FENÓLICO	i , μA ($1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$)	$K_{\text{a}}, \text{H}_2\text{O}_2$ (M) X	$K_{\text{a}}, \text{fenol}$ (M) X
4-clorofenol	0.22	2.13×10^{-3} 3.0×10^{-3} (*) 1.07	5.1×10^{-4} 6.2×10^{-4} (*) 0.95
2-clorofenol	0.70	4.3×10^{-3} 4.1×10^{-3} (*) 0.97	5.8×10^{-5} 6.1×10^{-4} (*) 0.93
3-clorofenol	0.03	2.8×10^{-3} 1.04	8.5×10^{-4} 1.00
fenol	0.40	3.5×10^{-3} 1.03	4.8×10^{-5} 1.05
2,4-diclorofenol	0.37	4.7×10^{-3} 0.90	2.5×10^{-4} 1.01
2,4,6-triclorofenol	0.63	3.1×10^{-3} 1.01	2.0×10^{-4} 0.99
2,3,5,6-tetraclorofenol	0.01	2.3×10^{-3} 1.05	1.2×10^{-3} 0.98
pentaclorofenol	0.01	1.7×10^{-3} 0.97	4.0×10^{-3} 1.03
4-cloro-2-metilfenol	0.15	1.3×10^{-3} 1.08	7.0×10^{-4} 0.94
4-cloro-3-metilfenol	0.28	3.1×10^{-3} 0.97	4.3×10^{-4} 0.97
2-metilfenol	0.15	3.9×10^{-3} 1.07	1.6×10^{-4} 1.01
3-metilfenol	0.22	5.0×10^{-3} 0.96	6.5×10^{-4} 0.96
4-metilfenol	0.19	1.3×10^{-3} 1.04	8.4×10^{-4} 0.96
2,3-dimetilfenol	0.06	1.1×10^{-3} 1.02	3.0×10^{-3} 0.96
2,4-dimetilfenol	0.05	1.7×10^{-3} 1.01	1.6×10^{-3} 0.98
3,5-dimetilfenol	0.01	1.6×10^{-3} 1.03	2.9×10^{-3} 0.95
3,4-dimetilfenol	0.09	1.0×10^{-3} 1.02	8.7×10^{-4} 0.95
2,6-dimetilfenol	0.02	1.1×10^{-3} 1.08	0.9×10^{-3} 1.02

(*) Constantes calculadas por el método de los gráficos recíprocos.

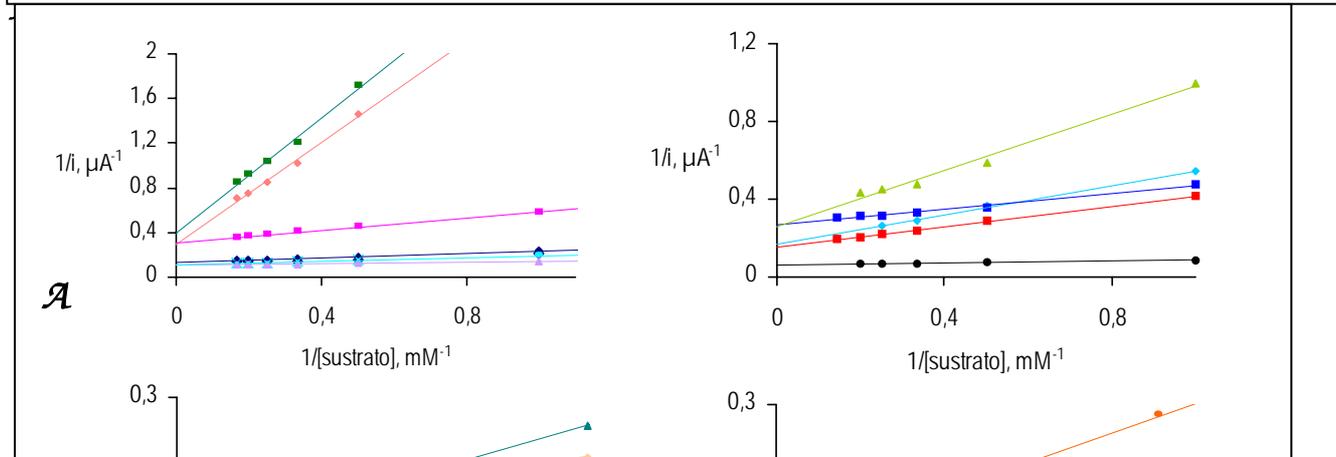
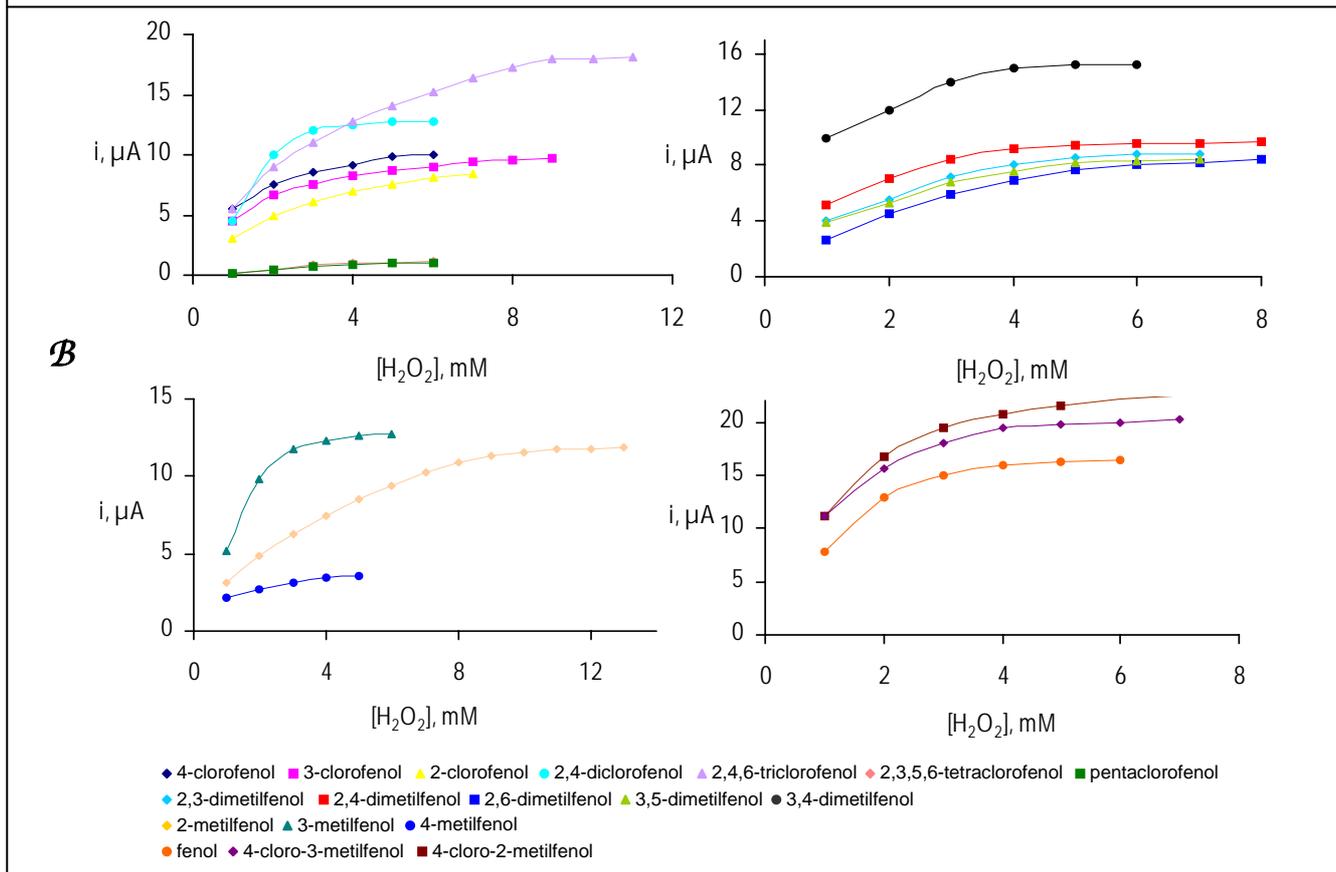
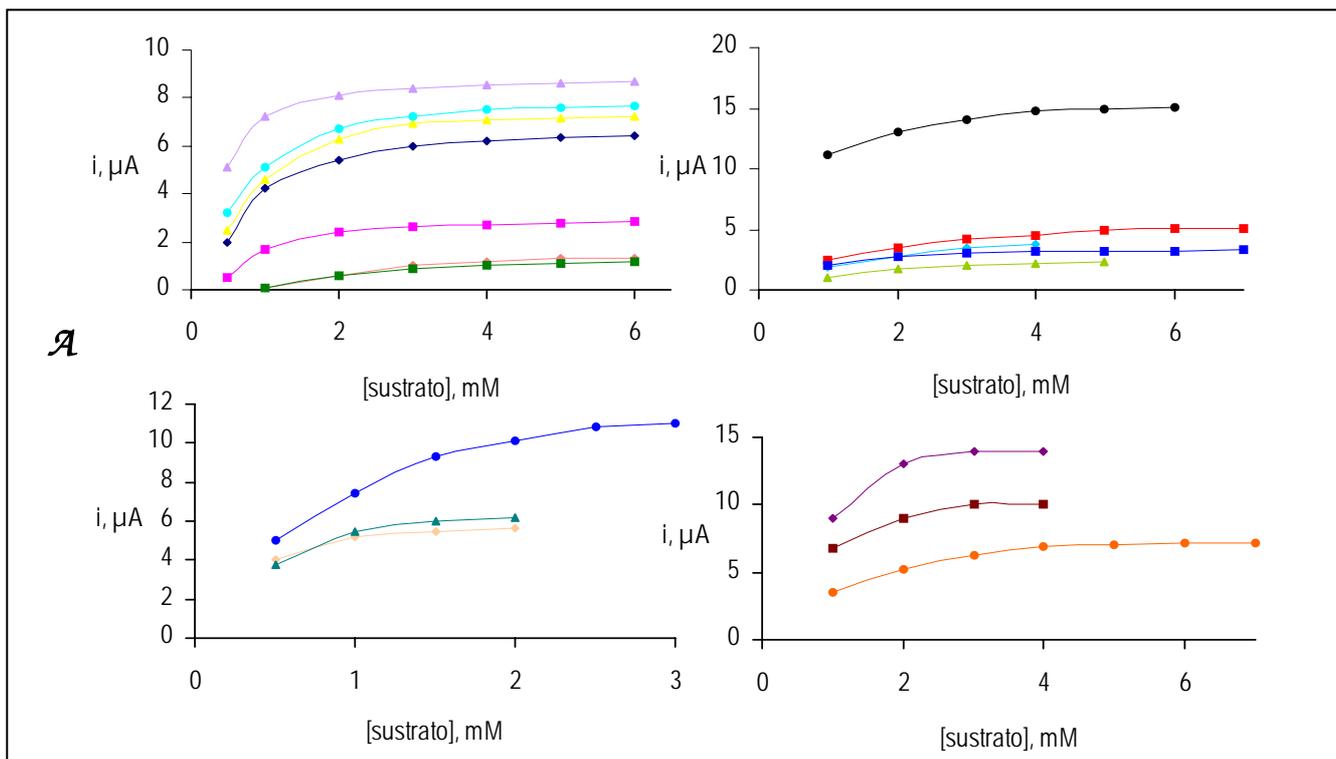
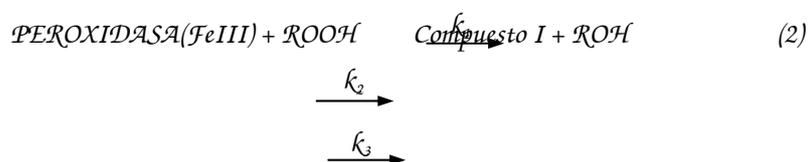


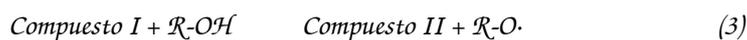
Figura 97A. Representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas a partir de las curvas de saturación de los compuestos fenólicos.

Figura 97B. Representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas a partir de las curvas de saturación del peróxido de hidrógeno.

Los valores obtenidos de $K_{m,ap}$ y $V_{máx}$ para cada sustrato se recogen en la Tabla 42. Los valores de las constantes cinéticas para el 2-clorofenol y el 4-clorofenol, calculados por el método de las gráficas recíprocas (*), no difieren significativamente de los calculados por el método simplificado, por lo que puede pensarse que ambos métodos de cálculo de las constantes cinéticas son válidos.

De acuerdo con el mecanismo de las reacciones enzimáticas de doble desplazamiento, que en nuestro caso puede escribirse como:





puede decirse que la afinidad entre el compuesto fenólico y el Compuesto I es mayor a medida que la constante de Michaelis-Menten para el compuesto fenólico, $\mathcal{K}_{m,ap}^B$ es menor (Cornish-Bowden y Wharton, 1988), y, por tanto, desde un punto de vista analítico se obtiene una mayor sensibilidad y un menor intervalo lineal. Por lo que se refiere a la influencia del sustrato fenólico sobre la reacción enzimática parcial del peróxido de hidrógeno, se puede decir que a medida que el sustrato fenólico presente una mayor afinidad por el Compuesto I ($\mathcal{K}_{m,ap}^B$ menor), se obtendrá una constante de Michaelis-Menten para el $\mathcal{H}_2\text{O}_2$ ($\mathcal{K}_{m,ap}^A$) mayor, ya que se regenera la enzima en su forma nativa más rápidamente, y por consiguiente, se necesita una mayor concentración de peróxido de hidrógeno para saturarla.

Este comportamiento teórico se confirmó por los resultados experimentales obtenidos (Tabla 43), observándose que los compuestos fenólicos para los que se tiene una mayor respuesta amperométrica, proporcionan un valor mayor de $\mathcal{K}_{m,ap}^A$ y un valor de $\mathcal{K}_{m,ap}^B$ menor. También puede observarse que los valores de velocidad máxima para la reacción enzimática del peróxido de hidrógeno son mayores para los sustratos fenólicos que proporcionan respuestas más sensibles, lo que pone de manifiesto una mayor rapidez en el reciclaje enzimático que se produce en estos casos.

IV.4.4. Curvas de calibrado y características analíticas

Las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de los distintos compuestos fenólicos con el electrodo de grafito-Teflón- HfRP son las optimizadas anteriormente, es decir: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, conteniendo peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, y aplicando un potencial constante de 0.00 V .

En las Figura 98 se muestran las curvas de calibrado obtenidas, y en la Tabla 43 se recogen las características de dichos calibrados para cada uno de los fenoles estudiados. Los intervalos de confianza se calcularon par a un nivel de significación de 0.05. El intervalo de linealidad se ha establecido tomando como criterio que el coeficiente de correlación de la regresión por mínimos cuadrados no fuera menor de 0.997.

Como era de esperar, los compuestos fenólicos con una $\mathcal{K}_{m,ap}^B$ menor y una $\mathcal{K}_{m,ap}^A$ mayor son más sensibles, mostrando una mayor pendiente y un menor intervalo lineal.

Como se puede observar, no se han incluido en la Tabla 44 las características de los calibrados para el fenol, 2-metilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,4,6-triclorofenol, y pentaclorofenol, debido a que no fue posible obtener señales reproducibles, adecuadas para construir una curva de calibrado con las sucesivas adiciones (sin regeneración de la superficie electroódica por pulido). Sin embargo, en la Figura 99, puede apreciarse como el electrodo de grafito-Teflón- H^{RP} , sí permite observar una variación de la intensidad de corriente cuando se añade uno de estos compuestos fenólicos. Por lo tanto, sería posible utilizar dicha señal detectar su presencia, es decir, con fines de "screening" cualitativo.

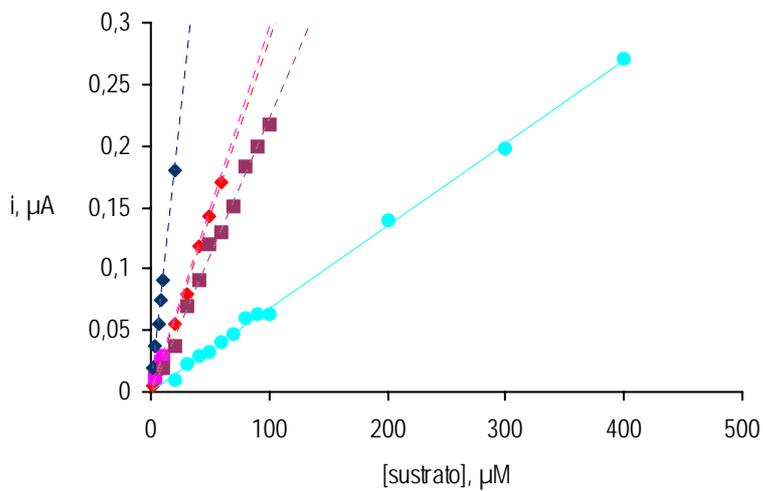
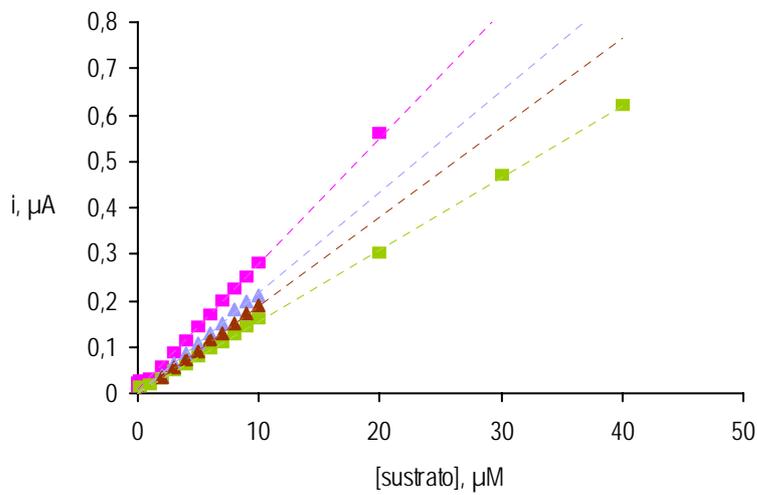
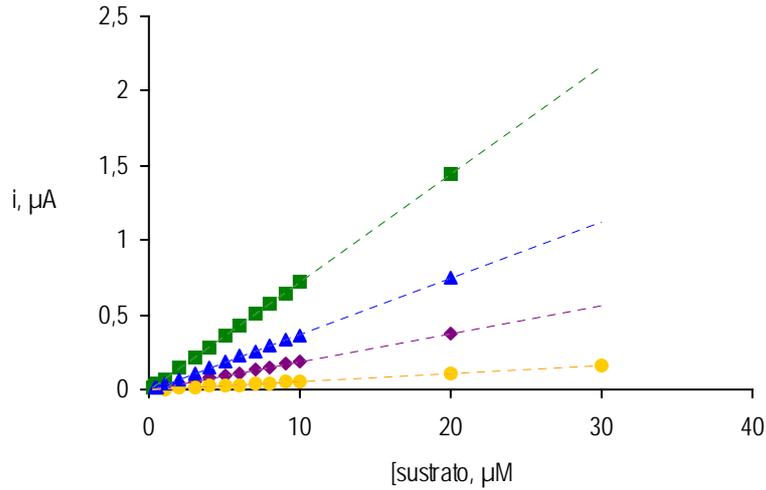


Figura 98. Curvas de calibrado para distintos compuestos fenólicos obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-*HRP* a un potencial aplicado de 0.00 V. (◆) 4-clorofenol; (●) 3-clorofenol; (■) 2-clorofenol; (▲) 2,4-dimetilfenol; (■) 4-cloro-3-metilfenol; (■) 4-cloro-2-metilfenol; (▲) 3-metilfenol; (▲) 4-metilfenol; (◆) 2,3-dimetilfenol; (◆) 2,4-dimetilfenol; (■) 3,5-dimetilfenol; (◆) 3,4-dimetilfenol; (●) 2,3,5,6-tetraclorofenol.

Tabla 44. Intervalo lineal, pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de regresión de los calibrados obtenidos para distintos compuestos fenólicos con el electrodo de grafito-teflón-peroxidasa.

COMPUESTO FENÓLICO	INTERVALO LINEAL, mol L ⁻¹	Pte., $\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$	O.O., μA	r
4-clorofenol	$(0.05-2.00)\times 10^{-5}$	$(1.88\pm 0.06)\times 10^4$	$(8\pm 5)\times 10^{-3}$	0.998
2-clorofenol	$(0.02-2.00)\times 10^{-5}$	$(7.20\pm 0.04)\times 10^4$	$(-3\pm 0.5)\times 10^{-2}$	0.999
3-clorofenol	$(0.10-3.00)\times 10^{-5}$	$(5.4\pm 0.2)\times 10^3$	$(-1\pm 0.5)\times 10^{-2}$	0.999
Fenol				
2,4-diclorofenol	$(0.04-2.00)\times 10^{-5}$	$(3.7\pm 0.1)\times 10^4$	$(7\pm 8)\times 10^{-3}$	0.998
2,4,6-triclorofenol				
2,3,5,6-tetraclorofenol	$(0.12-4.00)\times 10^{-4}$	$(6.90\pm 0.03)\times 10^2$	$(-2\pm 3)\times 10^{-3}$	0.999
Pentaclorofenol				
4-cloro-2-metilfenol	$(0.09-4.00)\times 10^{-5}$	$(1.55\pm 0.04)\times 10^4$	$(3\pm 0.8)\times 10^{-2}$	0.998
4-cloro-3-metilfenol	$(0.05-2.00)\times 10^{-5}$	$(2.80\pm 0.01)\times 10^4$	$(0\pm 0.1)\times 10^{-2}$	0.997
2-metilfenol				
3-metilfenol	$(0.16-1.50)\times 10^{-5}$	$(2.2\pm 0.1)\times 10^4$	$(7\pm 9)\times 10^{-3}$	0.997
4-metilfenol	$(0.14-2.00)\times 10^{-5}$	$(1.88\pm 0.02)\times 10^4$	$(4\pm 2)\times 10^{-3}$	0.9998
2,3-dimetilfenol	$(0.2-6.0)\times 10^{-5}$	$(2.80\pm 0.08)\times 10^3$	$(1\pm 0.2)\times 10^{-2}$	0.999
2,4-dimetilfenol	$(0.45-1.00)\times 10^{-5}$	$(2.95\pm 0.09)\times 10^3$	$(-2\pm 4)\times 10^{-3}$	0.997
3,5-dimetilfenol	$(0.11-1.3)\times 10^{-4}$	$(2.22\pm 0.05)\times 10^3$	$(-7\pm 2)\times 10^{-3}$	0.999
2,6-dimetilfenol				
3,4-dimetilfenol	$(0.03-2.00)\times 10^{-5}$	$(9.2\pm 0.3)\times 10^3$	$(-2\pm 3)\times 10^{-3}$	0.998

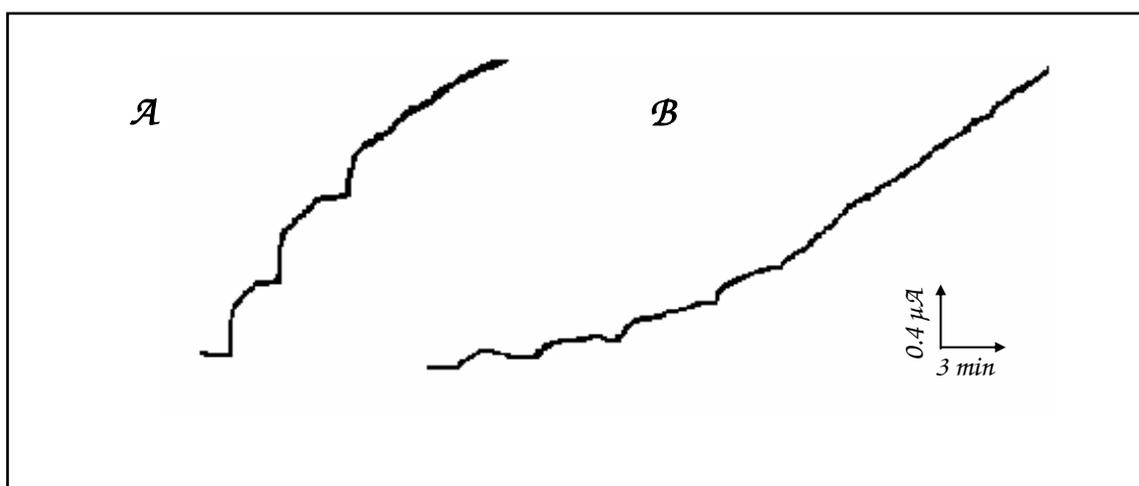


Figura 99. Registros intensidad-tiempo obtenidos para adiciones sucesivas de (a) fenol y (b) 2-metilfenol con el electrodo de grafito-Teflón-HRP en regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5. H_2O_2 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $E_{ap}=0.00\text{V}$.

En la Tabla 45 se recogen los valores de los límites de detección y de determinación para los distintos compuestos fenólicos, calculados según los criterios ya mencionados en capítulos anteriores, tomando como estimador de s_b la desviación estándar ($n=10$) de las señales obtenidas a partir de diferentes disoluciones de los sustratos a un nivel de concentración correspondiente a la concentración más baja del respectivo calibrado. Los valores de los límites de detección son considerablemente mejores que los encontrados en la bibliografía obtenidos con biosensores de peroxidasa utilizando otros tipos de matrices compósitas, incluyendo pasta de carbono (Marko-Varga et al., 1995) o cuando se utiliza un electrodo de grafito sólido (Ruzgas et al., 1995). Esto es especialmente cierto en el caso de los metilfenoles y de la mayoría de los compuestos clorados, los cuales en muchas ocasiones no son detectados por otros biosensores amperométricos de peroxidasa (Lindgren et al., 1997). Asimismo, los límites de detección obtenidos son mejores que los reportados para electrodos que emplean mediadores de Os (Kane et al., 1998).

Si se comparan los límites de detección obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP con los que proporcionó el electrodo de grafito-Teflón-Tyr, puede observarse cómo para algunos fenoles (fenol, catecol, 4-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 3,4-dimetilfenol y 2,4-dimetilfenol), los límites de detección son mejores con el electrodo de tirosinasa, mientras que para el resto, son mejores con el de peroxidasa, habida cuenta de que, además, muchos de estos compuestos no son siquiera detectados con el biosensor de tirosinasa.

Tabla 45. Características analíticas para la determinación de diferentes compuestos fenólicos obtenidas con electrodos compósitos de grafito-Teflón-HRP.

COMPUESTO FENÓLICO	L.D. (mol L^{-1})	L.Q. (mol L^{-1})
4-clorofenol	5.0×10^{-7}	1.7×10^{-6}
2-clorofenol	1.6×10^{-7}	5.3×10^{-7}
3-clorofenol	9.9×10^{-7}	3.3×10^{-6}
Fenol		
2,4-diclorofenol	4.5×10^{-7}	1.5×10^{-6}
2,4,6-triclorofenol		
2,3,5,6-tetraclorofenol	1.2×10^{-5}	4.1×10^{-5}
Pentaclorofenol		
4-cloro-2-metilfenol	9.5×10^{-7}	3.1×10^{-6}

<i>4-cloro-3-metilfenol</i>	4.6×10^7	1.6×10^6
<i>2-metilfenol</i>		
<i>3-metilfenol</i>	1.6×10^6	5.3×10^6
<i>4-metilfenol</i>	1.4×10^6	4.8×10^6
<i>2,3-dimetilfenol</i>	2.0×10^6	6.8×10^6
<i>2,4-dimetilfenol</i>	4.5×10^7	1.5×10^6
<i>3,5-dimetilfenol</i>	1.1×10^5	3.7×10^5
<i>2,6-dimetilfenol</i>		
<i>3,4-dimetilfenol</i>	3.5×10^7	1.2×10^6

L.D.: límite de detección

L.Q.: límite de cuantificación

IV.4.5. Influencia de la velocidad de reacción sobre la reproducibilidad de la señal analítica

La observación de las señales obtenidas cuando se realizan las medidas para el cálculo de las constantes cinéticas y para la construcción de los calibrados de cada uno de los fenoles, permite ver que el tiempo que se tarda en alcanzar el estado estacionario es diferente para cada uno de los sustratos. Por ejemplo, el 4-clorofenol necesita 120 segundos, mientras que para el 4-cloro-2-metilfenol dicho tiempo es de aproximadamente 4 minutos. Por otro lado está el hecho de la imposibilidad de construir calibrados para 5 de los fenoles que se han estudiado.

Estos dos hechos están relacionados entre sí, y pueden estar asociados con la formación de dímeros y polímeros mediante reacciones de los correspondientes radicales fenóxido entre sí del tipo:



Estas reacciones químicas compiten con la reducción electrodoica de los radicales fenóxido que constituye la señal analítica (17). Si la reacción electrodoica está más favorecida, el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario será menor, pues se evita que se produzcan las reacciones químicas (6) y (7). Sin embargo, si las velocidades de las reacciones electrodoica y química son similares, el tiempo que se tarda en alcanzar el estado estacionario será mayor, ya que los radicales fenóxido tendrán dos vías diferentes de reacción.

Con objeto de confirmar esta hipótesis, y teniendo en cuenta que la formación de dímeros y polímeros ensucia irreversiblemente la superficie del electrodo (Apartado IV.4.1), se llevaron a cabo medidas sucesivas en diferentes disoluciones para tres compuestos fenólicos, 4-clorofenol (respuesta rápida), 4-cloro-2-metilfenol (respuesta lenta) y 2,4,6-triclorofenol (imposibilidad de realizar calibrados) a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Los registros intensidad-tiempo obtenidos se muestran en la Figura 100 y las intensidades de corriente en estado estacionario para cada uno de ellos en función del número de medidas se representa en la Figura 101.

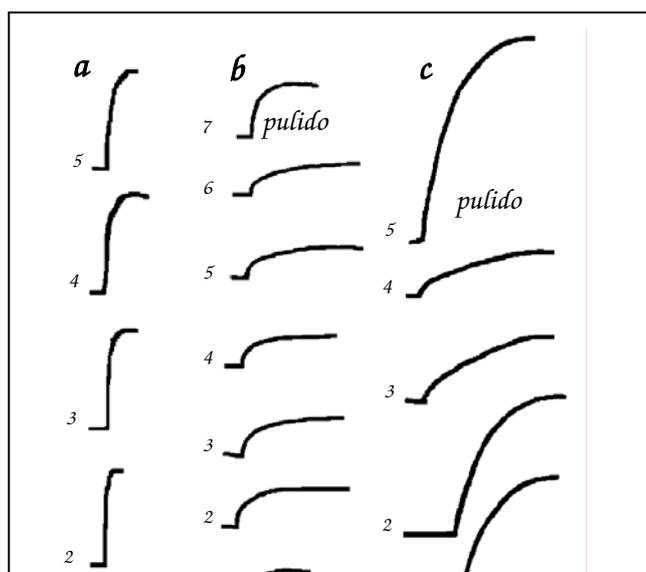


Figura 100. Registros intensidad-tiempo para medidas sucesivas de (a) 4-clorofenol, (b) 4-cloro-2-metilfenol y (c) 2,4,6-triclorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} , en disolución reguladora de fosfato a pH 6.5 y H_2O_2 5.0×10^{-4} mol L^{-1} obtenidos con el electrodo compuesto de peroxidasas aplicando un potencial de 0.00 V.

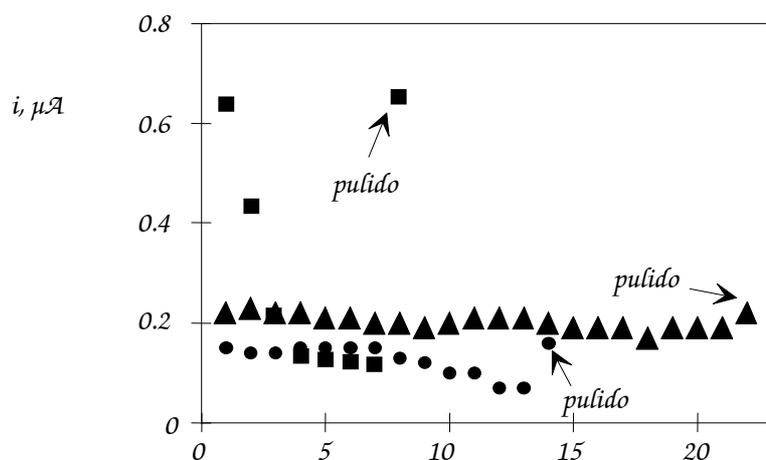


Figura 101. Intensidad de corriente en estado estacionario para medidas sucesivas de (□) 4-clorofenol, (●) 4-cloro-2-metilfenol y (■) 2,4,6-triclorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} . Disolución de trabajo: regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 que contiene 5.0×10^{-4} mol L^{-1} de H_2O_2 . $E_{ap} = 0.00V$.

Como puede observarse en ambas figuras, en el caso del 4-clorofenol no se observó disminución de la corriente en el estado estacionario para las 20 medidas consecutivas realizadas en disoluciones diferentes, lo que indica que no hay ensuciamiento apreciable de la superficie del electrodo. Es decir, en este caso la formación de dímeros o de polímeros es despreciable, debido a que la velocidad de reducción electródica de los radicales fenóxido formados es mayor que la velocidad de las reacciones químicas de formación de dichos dímeros y polímeros. Sin embargo, para el 4-cloro-2-metilfenol se observó una disminución apreciable de la corriente en el estado estacionario a partir de la octava medida, lo que indica un ligero ensuciamiento de la superficie del electrodo debido a la formación de los dímeros o polímeros, lo que hace que el tiempo en alcanzar el estado estacionario sea mayor que en el caso del 4-clorofenol. Por último, en el caso del 2,4,6-triclorofenol, se observó una fuerte disminución de la corriente en el estado estacionario incluso para la segunda medida consecutiva, lo que sugiere un fuerte ensuciamiento del electrodo por la formación de los dímeros o polímeros correspondientes, indicando que en este caso el acoplamiento químico de los radicales fenóxido está más favorecido que la reacción electródica. Es importante señalar que, al final de cada una de las series de medidas para cada compuesto se procedió a regenerar la superficie del electrodo por pulido, lo que permitió recuperar en todos los casos la intensidad de corriente en el estado estacionario de la primera medida.

Estos resultados confirman la hipótesis planteada y, por tanto, se puede afirmar que el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario, así como la reproducibilidad de las medidas sin pulir la superficie electródica, va a depender de la velocidad relativa de la reacción electródica y de las reacciones químicas de los radicales fenóxido formados en la reacción enzimática.

IV.4.6. Comparación de la sensibilidad obtenida con el biosensor de peroxidasa para los diferentes compuestos fenólicos

La peroxidasa exhibe una especificidad relativamente baja hacia compuestos donadores de electrones, entre los que se encuentran los fenoles, como bien puede deducirse de los resultados obtenidos en nuestros estudios, donde se ha observado que los 18 compuestos fenólicos estudiados proporcionan una señal amperométrica. También puede observarse que hay grandes diferencias en la sensibilidad para los diferentes sustratos fenólicos, como se pone de manifiesto por los valores de las pendientes de los calibrados correspondientes (Tabla 44). En este apartado se va a tratar de explicar las causas por las que se producen estas diferencias de sensibilidad hacia los compuestos fenólicos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP.

Como indican Marko-Varga y col. (1995), la sensibilidad de los electrodos modificados con HRP va a depender en gran medida de la estabilidad de los radicales fenóxido obtenidos como producto de la reacción enzimática y que son reducidos electroquímicamente. Por otro lado, se ha demostrado que para sustratos aromáticos se transfieren un protón y un electrón simultáneamente desde el compuesto donador de electrones al grupo hemo de la enzima (Bogdanovskaya et al., 1994). Por tanto, los compuestos fenólicos con una constante de acidez (K_a) mayor transferirán el protón al grupo hemo de la enzima más fácilmente y, posiblemente, formen radicales fenóxido más estables. Además, Kane y col. (1998) indican que los compuestos fenólicos con sustituyentes donadores de electrones en posición orto- y los sustituyentes aceptores de electrones en posición meta- tienen una respuesta menos sensible e incluso no proporcionan respuesta. Teniendo en cuenta que no fue posible construir calibrados para todos los compuestos fenólicos estudiados por las razones que se han comentado anteriormente, la comparación de sensibilidad se llevó a cabo para todos los compuestos ensayados, comparando la magnitud de su respuesta amperométrica para una concentración fija de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. En la Tabla 46 se muestran estos resultados junto con el valor de pK_a de cada compuesto.

Para tratar de explicar las diferencias de sensibilidad observadas para los compuestos fenólicos, se han dividido los sustratos en tres grupos: compuestos fenólicos clorados, compuestos fenólicos metilados y compuestos fenólicos con ambos tipos de sustituyentes.

Por lo que se refiere al primer grupo, la sensibilidad sigue la siguiente tendencia: 2-clorofenol > 2,4,6-triclorofenol > 2,4-diclorofenol > 4-clorofenol > 3-clorofenol > 2,3,5,6-tetraclorofenol > pentaclorofenol. Esta tendencia cumple las consideraciones antes expuestas, ya que a medida que el valor de pK_a del compuesto fenólico aumenta, disminuye la sensibilidad, y la menor sensibilidad se obtuvo para el fenol monoclorado con la posición meta- ocupada. Por otro lado, la sensibilidad es independiente del pK_a a medida que aumenta el número de átomos de cloro en el anillo aromático, con la

excepción del triclorofenol, si tenemos en cuenta los compuestos fenólicos con al menos una posición orto- ocupada (2-clorofenol > 2,4,6-triclorofenol > 2,4-diclorofenol > 2,3,5,6-tetraclorofenol > pentaclorofenol). Esto puede atribuirse a dos causas; en primer lugar, al aumentar el número de cloros en el anillo aromático se produce un aumento del volumen de la molécula que puede producir un impedimento estérico de la molécula para acceder al centro activo de la enzima, y por tanto, la sensibilidad de los fenoles con mayor número de cloros en el anillo aromático disminuye. En segundo lugar, el hecho de que los átomos de cloro sean atractores de electrones no va a facilitar la transferencia de un electrón al grupo hemo de la enzima, por lo que la sensibilidad también disminuiría al aumentar el número de cloros en el anillo aromático. Este planteamiento se cumple en todos los casos con excepción del 2,4,6-triclorofenol, lo que puede ser debido a su bajo valor de pK_a que, probablemente, estabiliza el radical fenóxido, proporcionando una señal más intensa.

Tabla 46. Señales amperométricas obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-*HFRP* para diferentes compuestos fenólicos a un nivel de concentración de 1.0×10^{-5} mol L^{-1} . Valores de pK_a para estos compuestos.

COMPUESTO	i , μA	pK_a
4-clorofenol	0.22	9.37
3-clorofenol	0.03	9.02
2-clorofenol	0.70	8.48
fenol	0.40	9.99
2,4-diclorofenol	0.37	7.85
2,4,6-triclorofenol	0.63	6.00
2,3,5,6-tetraclorofenol	0.05	5.44
pentaclorofenol	0.01	5.26
4-cloro-2-metilfenol	0.15	9.12
4-cloro-3-metilfenol	0.28	9.55
2-metilfenol	0.15	10.26
3-metilfenol	0.22	10.00
4-metilfenol	0.19	10.26
2,3-dimetilfenol	0.06	10.5
2,4-dimetilfenol	0.05	10.58
3,5-dimetilfenol	0.01	10.19
2,6-dimetilfenol	0.02	10.59
3,4-dimetilfenol	0.09	10.36

Por lo que respecta a los compuestos metilados, la tendencia en la sensibilidad es: 3-metilfenol > 4-metilfenol > 2-metilfenol > 3,4-dimetilfenol > 2,3-dimetilfenol \approx 2,4-dimetilfenol > 2,6-dimetilfenol > 3,5-dimetilfenol. En este caso esta tendencia está relacionada directamente con el pK_a del compuesto fenólico. A medida que el pK_a es mayor la sensibilidad disminuye. En el caso del 4-metilfenol, el valor del pK_a es igual al del 2-metilfenol, pero como se ha dicho anteriormente, el sustituyente donador en la posición orto del anillo aromático hace disminuir acusadamente la sensibilidad.

Por último, en el caso de que ambos tipos de sustituyentes (cloro y metilo) estén presentes en el compuesto fenólico, como ocurre en el 4-cloro-3-metilfenol y en el 4-cloro-2-metilfenol, la menor sensibilidad se encuentra, como era de esperar, para el que tiene la posición orto- ocupada por un grupo metilo. Por lo que se refiere al 4-cloro-3-metilfenol, éste presenta una sensibilidad ligeramente superior a la del 4-clorofenol y el 3-metilfenol, por lo que puede deducirse que el hecho de poseer un sustituyente más en la posición para-, si el sustituyente es cloro, y en la posición meta-, si el sustituyente es un grupo metilo, no influye en la sensibilidad observada para el compuesto fenólico con el electrodo de grafito-Teflón-*HFRP*.

Con objeto de visualizar mejor las diferentes sensibilidades encontradas, en la Figura 102 se han recogido las señales para todos los compuestos fenólicos en forma de diagrama de barras.

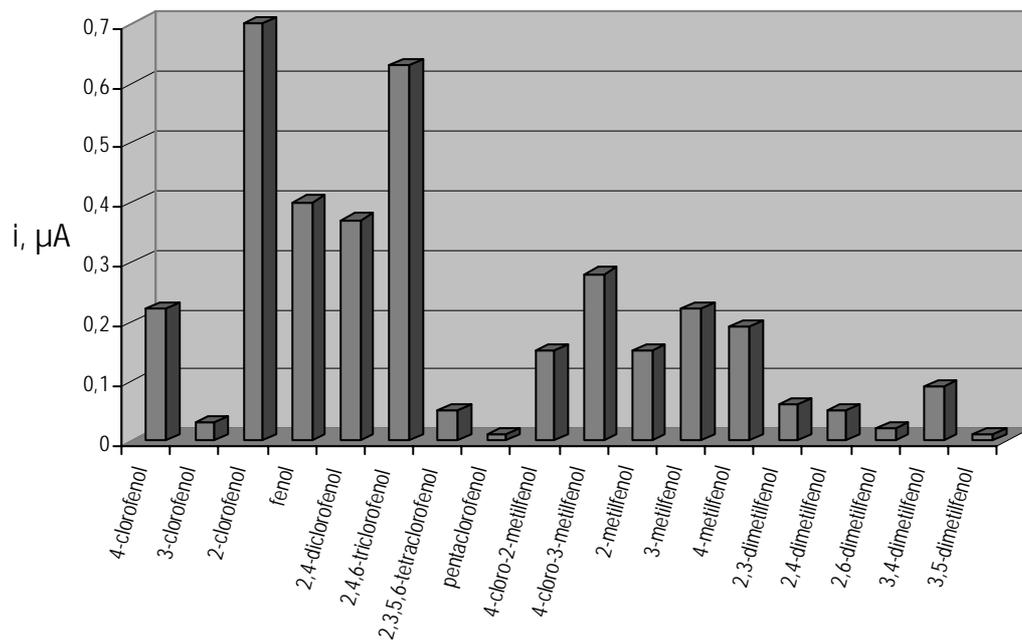
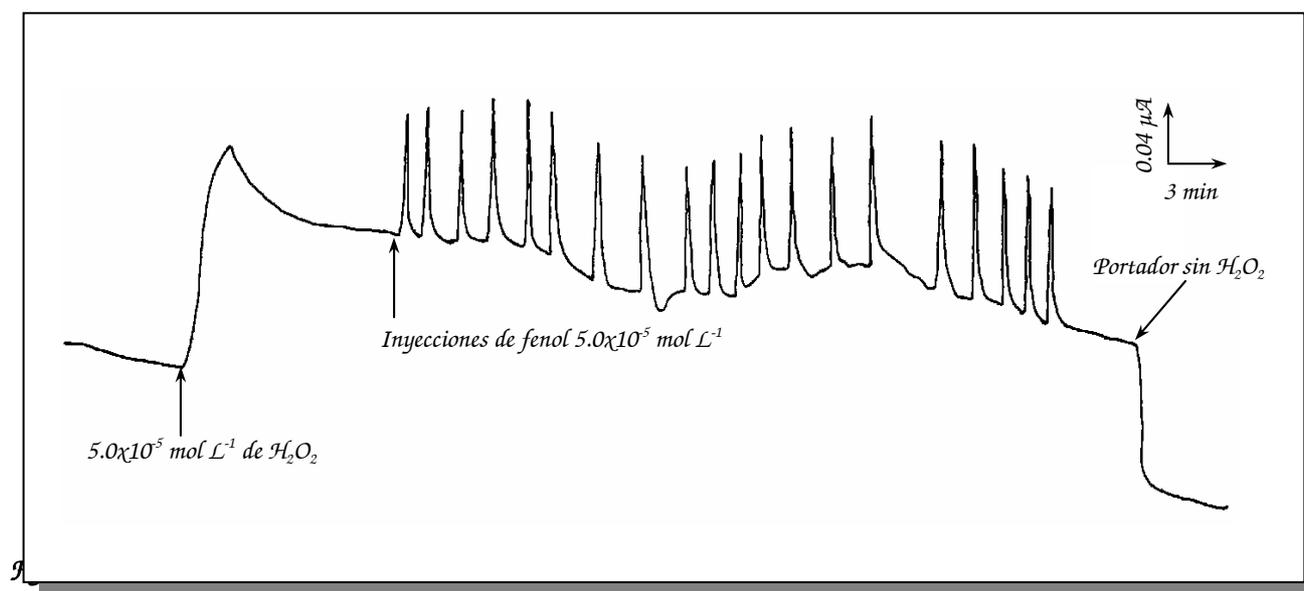


Figura 102. Intensidades de corriente en estado estacionario obtenidas para distintos compuestos fenólicos a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, con el electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa.

IV.4.7. Electrodos de grafito-Teflón-peroxidasa como detectores en sistemas de inyección en flujo

Se evaluó el comportamiento del biosensor de peroxidasa en un sistema en flujo utilizando la misma célula de flujo de tipo "wall-jet" de gran volumen empleada con los biosensores de tirosinasa. La disolución portadora fue una disolución de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 que contiene una cantidad adecuada de peróxido de hidrógeno, y el potencial aplicado constante fue de 0.00 V . Se escogieron seis compuestos fenólicos para llevar a cabo estos estudios: fenol, 2-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 4-cloro-2-metilfenol y 3,4-dimetilfenol. A modo de ejemplo, en la Figura 103 se muestran los diagramas obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP realizando inyecciones sucesivas de fenol en una disolución portadora que contiene peróxido de hidrógeno en una concentración de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



portadora de fosfato 0.05 mol L^{-1} y $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrógeno. Caudal = 0.5 mL min^{-1} . $V_i = 90 \mu\text{L}$. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.4.7.1. Optimización de las variables experimentales

Se optimizaron algunas variables que influyen sobre la respuesta amperométrica en flujo. No obstante, otras variables que también afectan a dicha respuesta, como son el pH de la disolución portadora y el potencial aplicado, no van a tratarse, tomándose las mismas que ya fueron optimizadas en discontinuo.

IV.4.7.1.1. Efecto del caudal de la disolución portadora

Se evaluó la influencia del caudal de la disolución portadora sobre los parámetros característicos del fiagrama (intensidad de pico, i_p , anchura de pico en línea base, w_b , y anchura del pico a la semialtura, $w_{1/2}$). Para ello, se inyectaron 90 μL de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. La concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución portadora fue de $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 104.

Como se puede observar, la corriente de pico disminuye cuando aumenta el caudal de disolución portadora. Este comportamiento es típico de los sistemas FIA que emplean biosensores enzimáticos como detectores, y es contrario a lo que ocurre en los sistemas FIA con detectores convencionales, en los que un aumento de caudal provoca un aumento de la altura de pico. Este comportamiento ya ha sido comentado anteriormente (apartado IV.2.11.1.1).

Por otro lado, como era de esperar, la anchura de pico a media altura y en línea base disminuyen al aumentar el caudal del portador. Teniendo en cuenta estos factores, se eligió un caudal de 0.5 mL min^{-1} para realizar los estudios posteriores, ya que la altura de pico obtenida era adecuada, y la anchura de pico no era demasiado grande y no variaba para caudales próximos.

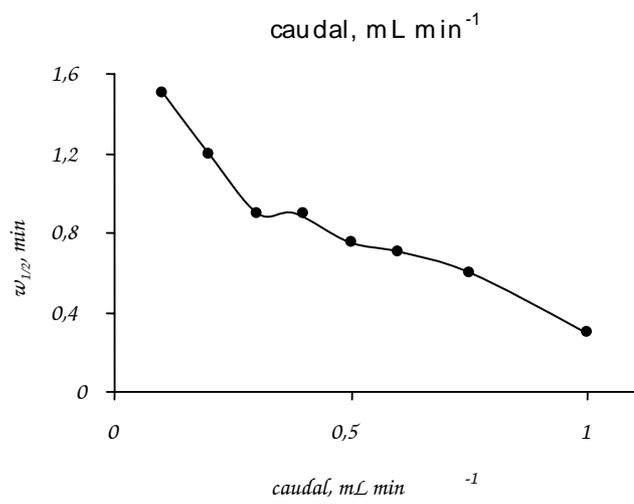
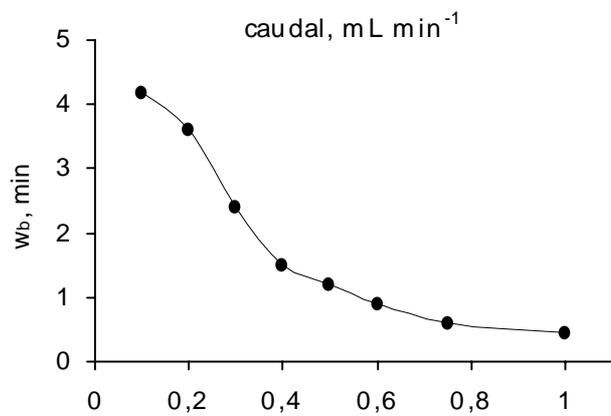
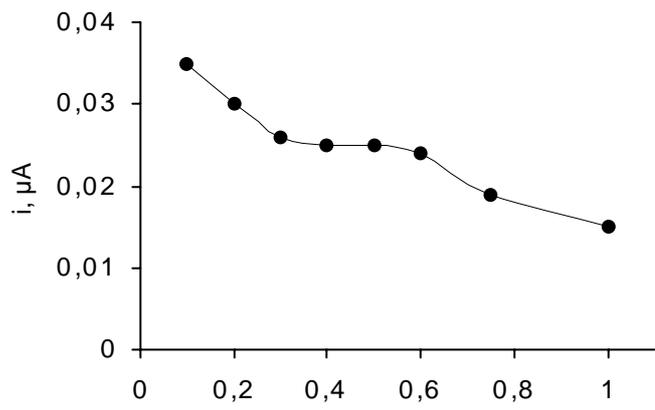


Figura
1.0x10⁻⁴ m

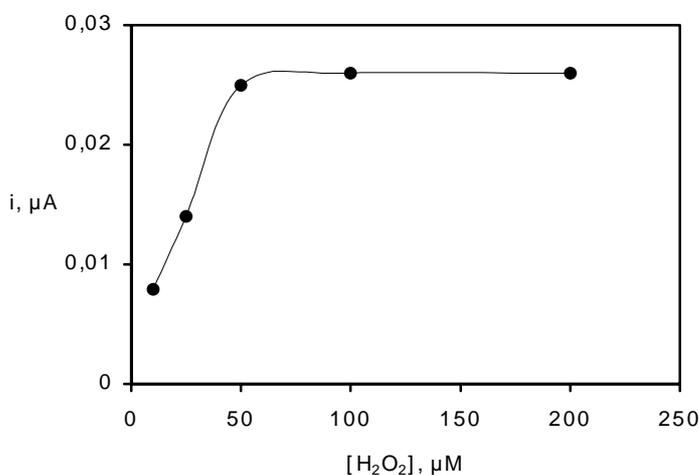
l L⁻¹ y

IV.4.7.1.2. Optimización de la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución portadora

Como ya se vio cuando se estudió la influencia de la concentración de peróxido de hidrógeno sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario en discontinuo, es importante tener en cuenta que la extensión de la respuesta depende de dicha concentración, y que el peróxido de hidrógeno produce una inhibición de la actividad enzimática para concentraciones elevadas. Por otro lado, al realizar las medidas en flujo, las reacciones enzimáticas se van a producir durante el período de residencia del compuesto fenólico en la superficie del electrodo, por lo que la cantidad de peróxido necesaria no tiene por qué coincidir con la que se optimizó en discontinuo.

En la Figura 105 se representan las respuestas del electrodo de grafito-Teflón-HRP para adiciones de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en disoluciones portadoras que contienen diferentes concentraciones de H_2O_2 . Puede verse cómo la señal amperométrica aumenta con la concentración de peróxido de hidrógeno, hasta alcanzar un valor constante a partir de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Por lo tanto, se eligió dicha concentración para los estudios subsiguientes, con objeto de evitar pérdida de actividad enzimática a concentraciones de H_2O_2 más elevadas.

Figura 105. Influencia de la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución portadora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 sobre la intensidad de corriente del pico FIA obtenido para 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$; caudal = 0.5 mL min^{-1} .



IV.4.7.2. Repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas

La repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas mediante inyección en flujo, utilizando como detector el biosensor de peroxidasa, se evaluó inyectando $90\ \mu\text{L}$ de cada disolución de compuesto fenólico a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$. En la Figura 106 se muestran los diagramas obtenidos para los seis compuestos fenólicos estudiados, y en la Tabla 47 se recogen los valores de la *RSD* obtenidos para la corriente de pico en cada serie de medidas. Con fines de comparación, se recogen también las *RSDs* que se obtuvieron para los estudios de este tipo en discontinuo. El valor de *RSD* para el 2,4,6-triclorofenol en discontinuo se obtuvo a partir de diez medidas de distintas disoluciones del triclorofenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-6}\ \text{mol L}^{-1}$, diez veces menor que la utilizada en los demás estudios, debido a que este fenol presenta una respuesta muy lenta en discontinuo.

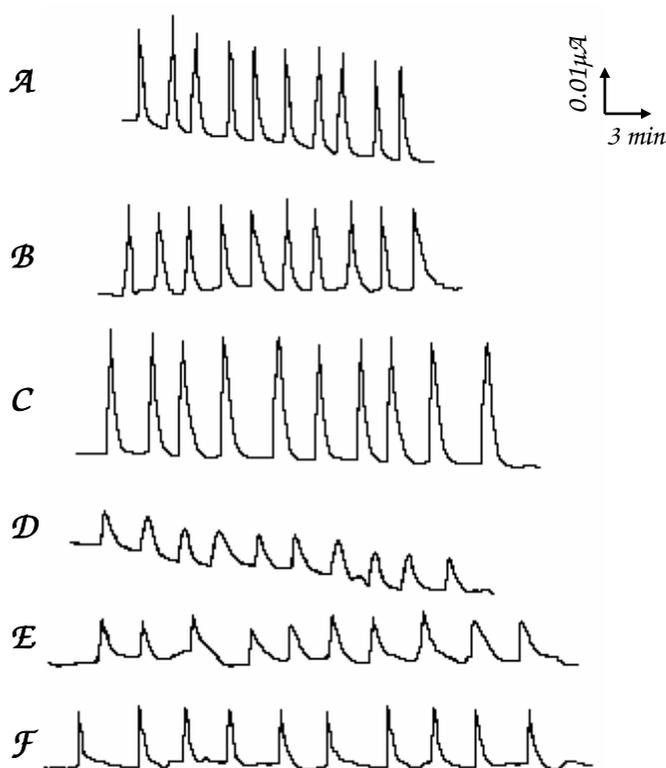


Figura 106. Diagramas obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP para una concentración $1.0 \times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$ de A) fenol, B) 2-clorofenol, C) 4-clorofenol, D) 2,4,6-triclorofenol, E) 4-cloro-2-metilfenol y F) 3,4-dimetilfenol. Disolución portadora de regulador fosfato $0.05\ \text{mol L}^{-1}$ de pH 6.5 conteniendo $5.0 \times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrógeno; $E_{ap} = 0.00\ \text{V}$; volumen de inyección = $90\ \mu\text{L}$; caudal = $0.5\ \text{mL min}^{-1}$.

Tabla 47. Valores de desviación estándar relativa para series de 10 medidas de compuestos fenólicos a un nivel de concentración de 1.0×10^5 mol L^{-1} realizadas con el electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa en discontinuo (disolución de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} y H_2O_2 5.0×10^4 mol L^{-1} , $E_{ap.} = 0.00$ V) y mediante análisis por inyección en flujo (disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} y H_2O_2 5.0×10^5 mol L^{-1} , caudal = 0.5 mL min^{-1} , $E_{ap.} = 0.00$ V)

	$RSD, \% (1.0 \times 10^5 \text{ mol } L^{-1})$	
	DISCONTINUO	FLUJO
FENOL	40.1	10.0
2-CLOROFENOL	6.5	6.8
4-CLOROFENOL	7.0	6.5
2,4,6-TRICLOROFENOL	48.8*	24.5
4-CLORO-2-METILFENOL	29.7	14.0
3,4-DIMETILFENOL	5.4	7.4

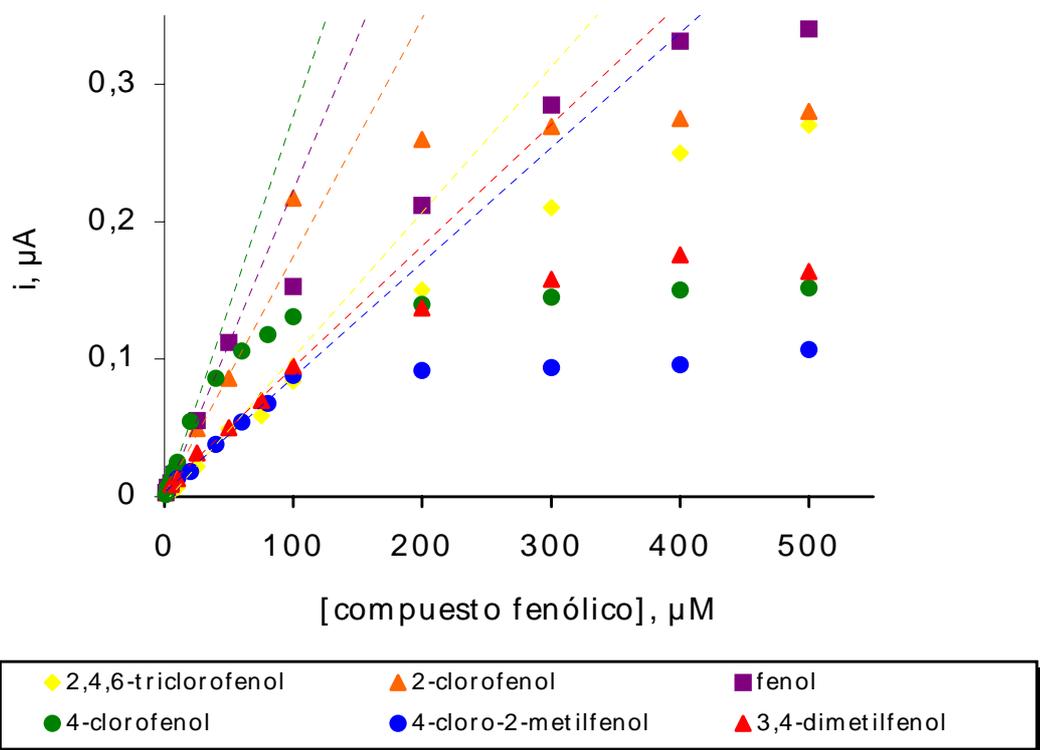
* 1.0×10^6 mol L^{-1}

A la vista de los datos puede decirse que, en general, se observa un aumento de la repetibilidad cuando las medidas se realizan en FIA en lugar de en discontinuo, fundamentalmente para aquellos compuestos que presentaban mayores valores de RSD en discontinuo. Estos compuestos, como se vio, dan lugar a los radicales fenóxido correspondientes, que se reducen electródicamente más difícilmente que los radicales procedentes de los compuestos fenólicos para los que se obtiene una mejor repetibilidad. Por tanto, se generan con mayor probabilidad dímeros y polímeros que ensucian la superficie electródica. Cuando las medidas se realizan en flujo, el compuesto fenólico está en contacto con la superficie del electrodo un tiempo reducido, por lo que la reacción enzimática, y por tanto también la reacción electródica, se dan en menor extensión. Aunque la intensidad de corriente obtenida en FIA es menor, también lo es la cantidad de dímeros y polímeros formados, por lo que el ensuciamiento producido es menor y la respuesta en flujo presenta una repetibilidad mejor.

IV.4.7.3. Curvas de calibrado y características analíticas

En la Figura 107 se muestran las curvas de calibrado obtenidas en las condiciones experimentales optimizadas anteriormente, para los distintos compuestos fenólicos. En la Tabla 48 se recogen las características de dichos calibrados, con sus intervalos de confianza respectivos que han sido calculados a un nivel de significación de 0.05.

Figura 107. Curvas de calibrado para los compuestos fenólicos estudiados obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-HRP mediante



inyección en flujo con detección amperométrica.

Para establecer el intervalo lineal que aparece en la Tabla 48, se tomó como criterio que el coeficiente de correlación de la regresión por mínimos cuadrados correspondiente al intervalo considerado no fuera menor de 0.997.

Tabla 48. Características de los calibrados obtenidos mediante inyección en flujo con detección amperométrica sobre electrodos de grafito-Teflón-GRP para distintos compuestos fenólicos.

COMPUESTO FENÓLICO	INTERVALO LINEAL, mol L ⁻¹	PENDIENTE, $\mu\text{A L}$ mol ⁻¹	O.O., μA	r
Fenol	(1-50) $\times 10^6$	2240 \pm 50	(-0.4 \pm 1.0) $\times 10^{-3}$	0.9989
2-clorofenol	(1-50) $\times 10^6$	1730 \pm 60	(2 \pm 1) $\times 10^{-3}$	0.9975
4-clorofenol	(0.5-20) $\times 10^6$	2780 \pm 70	(-1.4 \pm 0.7) $\times 10^{-3}$	0.9988
2,4,6-triclorofenol	(5-50) $\times 10^6$	1010 \pm 30	(-2.2 \pm 0.6) $\times 10^{-3}$	0.9986
4-cloro-2-metilfenol	(1-10) $\times 10^5$	830 \pm 20	(3 \pm 1) $\times 10^{-3}$	0.9984
3,4-dimetilfenol	(5-100) $\times 10^6$	890 \pm 30	(6 \pm 2) $\times 10^{-3}$	0.9977

En la Tabla 49 se recogen los valores de los límites de detección y de cuantificación calculados de acuerdo con los criterios que se han mencionado repetidamente a lo largo de esta Memoria. Se tomaron como estimadores de la desviación estándar del blanco los valores de dicha desviación, obtenidos con 10 disoluciones diferentes de cada uno de los compuestos fenólicos a la concentración más baja de sus calibrados respectivos.

Si se comparan estos valores con los obtenidos con el mismo electrodo de peroxidasa en discontinuo (Tabla 50), lo primero que hay que destacar es que mediante inyección en flujo fue posible obtener curvas de calibrado para todos los fenoles, lo que no era posible en discontinuo debido a la irreproducibilidad de la respuesta obtenida para el fenol y el 2,4,6-triclorofenol. Es decir, mediante inyección en flujo es posible detectar y cuantificar todos los compuestos fenólicos estudiados.

Tabla 49. Límites de detección y de cuantificación para distintos compuestos fenólicos empleando el electrodo de grafito-Teflón-GRP como detector amperométrico en análisis por inyección en flujo. Disolución portadora: regulador fosfato (pH 6.5) con 5.0×10^{-5} mol L^{-1} de peróxido de hidrógeno; $E_{ap} = 0.00V$; caudal= 0.5 mL min^{-1} ; volumen de inyección=90 μL .

	L_D , mol L^{-1}	L_Q , mol L^{-1}
Fenol	1.5×10^{-6}	5.2×10^{-6}
2-clorofenol	5.7×10^{-6}	1.9×10^{-5}
4-clorofenol	2.8×10^{-7}	9.3×10^{-7}
2,4,6-triclorofenol	5.0×10^{-6}	1.7×10^{-5}
4-cloro-2-metilfenol	5.0×10^{-6}	1.7×10^{-5}
3,4-dimetilfenol	4.7×10^{-6}	1.6×10^{-5}

Otro dato destacable es que el valor de las pendientes en FIA es menor que el obtenido en discontinuo, lo que es lógico ya que en el sistema en flujo no se permite que la reacción alcance el estado estacionario. Por esta razón, con los compuestos que tienen una respuesta lenta se obtiene una pendiente del calibrado sensiblemente menor que en discontinuo, alterándose el orden de sensibilidad al pasar del modo amperométrico de medida en discontinuo a la técnica en flujo.

Los intervalos de linealidad que se obtienen en flujo son, en general, más amplios en FIA que en discontinuo, debido, nuevamente a que las medidas en el régimen hidrodinámico no alcanzan el estado estacionario, siendo necesaria una mayor concentración de sustrato para saturar la enzima. Sin embargo, para los fenoles cuya velocidad de reacción sea muy alta, aún en condiciones hidrodinámicas se puede alcanzar o estar cerca de alcanzar el estado estacionario, por lo que su intervalo lineal será similar tanto en discontinuo como en flujo. Este es el caso, por ejemplo, del 4-clorofenol.

Tabla 50. Comparación de los valores de las pendientes y de los límites de detección obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP en discontinuo y FIA para seis compuestos fenólicos.

	DISCONTINUO		FIA	
	PENDIENTE, $\mu\text{A } \text{L mol}^{-1}$	LD, $\text{mol } \text{L}^{-1}$	PENDIENTE, $\mu\text{A } \text{L mol}^{-1}$	LD, $\text{mol } \text{L}^{-1}$
Fenol	---	---	2233	1.5×10^{-6}
2-clorofenol	72000	1.6×10^{-7}	1729	5.7×10^{-6}
4-clorofenol	18000	5.0×10^{-7}	2782	2.8×10^{-7}
2,4,6-triclorofenol	---	---	1054	5.0×10^{-6}
4-cloro-2-metilfenol	16000	9.5×10^{-7}	834	5.0×10^{-6}
3,4-dimetilfenol	9200	3.5×10^{-7}	885	1.7×10^{-6}

Los límites de detección se mejoran lógicamente en el caso de los fenoles cuya respuesta es rápida, como es el caso del 4-clorofenol, y aumentan para los fenoles con una respuesta lenta.

IV.4.7.4. Tiempo necesario para recuperar la línea base del pico FIA

La observación de las señales obtenidas en las medidas de la concentración de los distintos compuestos fenólicos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP en FIA demuestra que el tiempo necesario para recuperar la línea base tras la inyección de sustrato es distinto en cada caso. En la Figura 108 se representa el tiempo necesario para restablecer la línea base como una función de la concentración de compuesto fenólico.

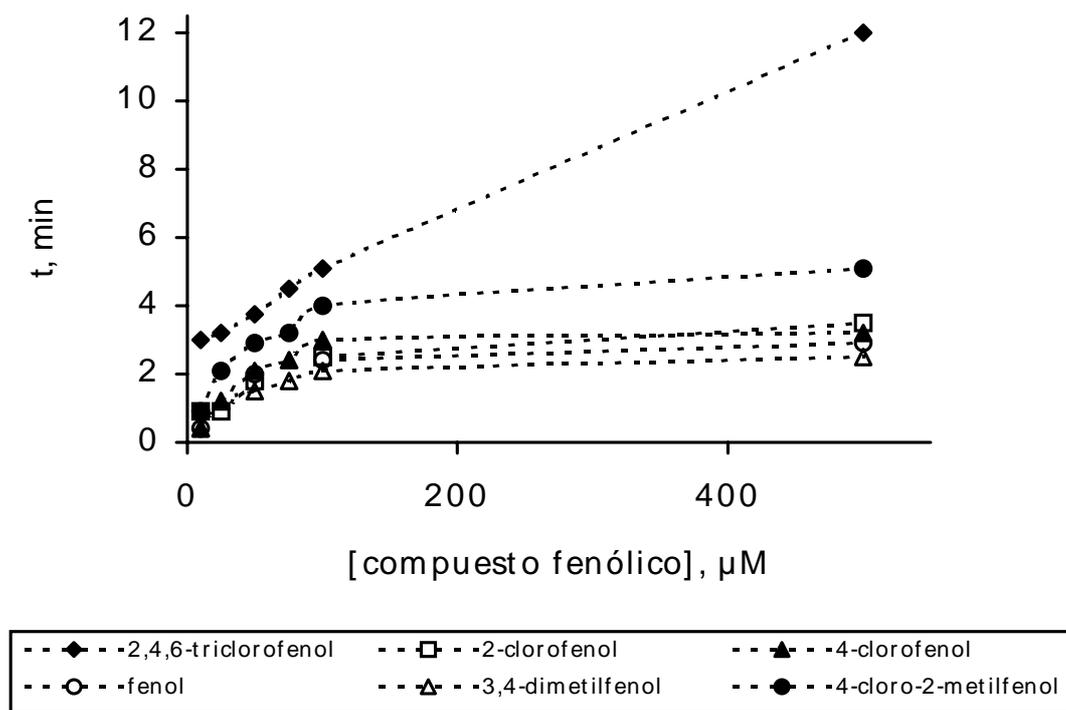


Figura 108. Tiempo necesario para recuperar la línea base tras la inyección de la disolución patrón de compuesto fenólico en función de su concentración. Disolución portadora: regulador fosfato (pH 6.5) con $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrógeno; $E_{ap} = 0.00\text{V}$; caudal= 0.5 mL min^{-1} ; volumen de inyección= $90 \mu\text{L}$.

En dicha Figura se observa cómo el compuesto que proporciona picos amperométricos con más cola es el 2,4,6-triclorofenol, seguido del 4-cloro-2-metilfenol, siendo muy similar para el resto de los compuestos. El hecho de poseer una cola larga significa que la velocidad con la que el complejo enzima-sustrato se convierte en producto más enzima es muy lenta. Por lo tanto, se observa una corriente debida a la reducción del radical fenóxido correspondiente a tiempos superiores que para otros fenoles, observación que concuerda con los valores de K_m (Tabla 43). Por consiguiente, es posible concluir que, al menos para estos compuestos fenólicos, la etapa limitante de la velocidad de reacción es la conversión del complejo enzima-sustrato a productos. Además, excepto para el 2,4,6-triclorofenol, la anchura de pico es prácticamente constante para concentraciones superiores de $100 \mu\text{M}$, lo que es lógico dado que a estas concentraciones se está en la región de saturación de la enzima, y por tanto no es posible aumentar la formación de complejo ES.

De todos los estudios y discusiones comentados anteriormente, se puede concluir que el hecho de utilizar el electrodo de peroxidasa en flujo es altamente ventajoso, ya que es posible obtener respuestas reproducibles con todos los compuestos fenólicos. Sin embargo, los límites de detección obtenidos son en muchos casos peores que en discontinuo, debido a la reacción lenta de algunos fenoles con la enzima.

IV.5. Electrodo compósito de grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa

El empleo de la enzima peroxidasa para la construcción de biosensores amperométricos útiles para la detección de compuestos fenólicos ha demostrado ser una buena alternativa a la tirosinasa, puesto que amplía en gran medida el número de

estos compuestos que pueden ser detectados. Sin embargo, como se ha mencionado en la apartado IV.4.1.1, el peróxido de hidrógeno que debe estar presente en la disolución de trabajo causa la inactivación de la enzima a largo plazo y es inestable en disolución. Por estas razones, se planteó la posibilidad de generar "in situ" el peróxido necesario para la reacción enzimática con los compuestos fenólicos, utilizando la enzima glucosa oxidasa. Esta enzima en su reacción con glucosa genera peróxido de hidrógeno como uno de los productos de la reacción. Por lo tanto, el fundamento de la detección de compuestos fenólicos mediante este mecanismo es el que se esquematiza en la Figura 109.

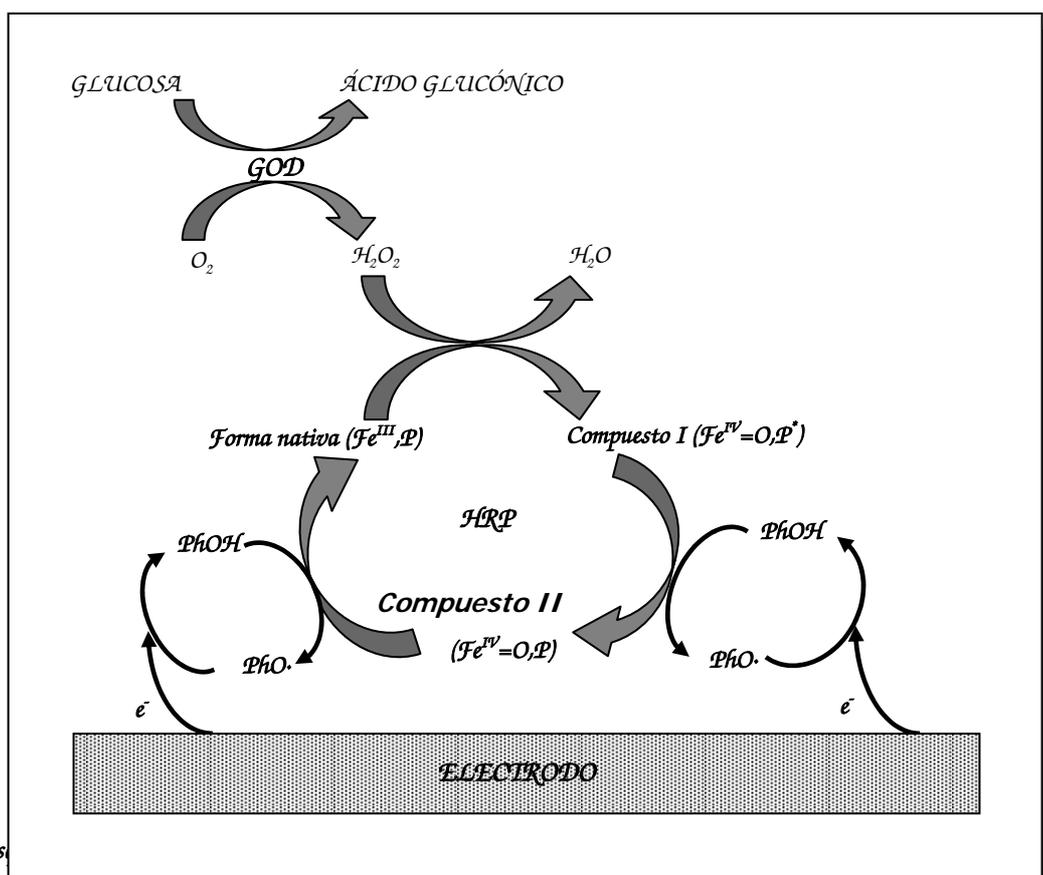


Figura 109. Es

le fenoles.

Las reacciones en las que está implicada la peroxidasa y la reacción electroquímica que permite la monitorización de los sustratos, son las mismas que las ya comentadas para el electrodo de HRP. La diferencia es que ahora el peróxido de hidrógeno no se añade a la célula de medida, sino que es generado in situ por la acción de la glucosa oxidasa sobre la glucosa en presencia de oxígeno. Por lo tanto, con este diseño de biosensor bienzimático será necesario añadir glucosa al medio de trabajo.

Del Cerro y col. (1997) han puesto de manifiesto que la intensidad de corriente medida con un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP para una concentración determinada de glucosa era muy inferior a la intensidad generada medida con un electrodo de grafito-Teflón-HRP para la misma concentración de peróxido de hidrógeno. Este hecho puso de manifiesto que, incluso para concentraciones altas de glucosa, la cantidad de peróxido de hidrógeno generada en la superficie del electrodo bienzimático es mucho menor que la que existe en un electrodo de peroxidasa, cuando se añade peróxido de hidrógeno a la disolución. Con objeto de verificar este hecho, se calcularon las constantes de velocidad de las respuestas amperométricas de los

electrodos de grafito-Teflón-HRP y grafito-Teflón-GOD-HRP a peróxido de hidrógeno y glucosa, respectivamente, en una concentración $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, asumiendo que dichas respuestas siguen una cinética de primer orden como consecuencia del exceso de sustrato. Las constantes se obtuvieron a partir del valor de la pendiente de las representaciones del logaritmo neperiano de la intensidad de corriente frente al tiempo. Estas representaciones se muestran en la Figura 110 y las constantes se recogen en la Tabla 50. Como era de esperar dicha constante es considerablemente menor en el caso del electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP.

Tabla 50. Constantes de velocidad para la respuesta amperométrica de los electrodos de grafito-Teflón-HRP y grafito-Teflón-GOD-HRP para peróxido de hidrógeno y glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

$k_i \text{ s}^{-1}$ H_2O_2 (grafito-Teflón-HRP)	$k_i \text{ s}^{-1}$ Glucosa (grafito-Teflón-GOD-HRP)
0.176	0.0466

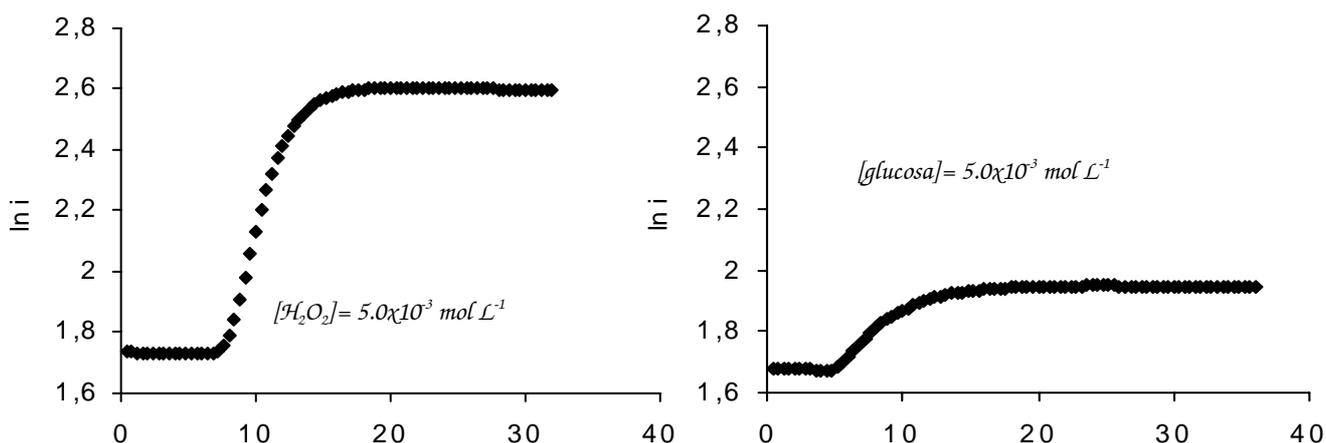


Figura 110. Representaciones del logaritmo neperiano de la intensidad de corriente en función del tiempo para glucosa y peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sobre electrodos de grafito-Teflón-GOD-HRP y grafito-Teflón-HRP, respectivamente.

Utilizando el electrodo de bienzimático se evita la presencia continua y en concentración elevada de peróxido de hidrógeno en la disolución de trabajo, generándose sólo en pequeña cantidad en la superficie del electrodo. En presencia de un compuesto fenólico, el consumo de H_2O_2 por parte de la HRP aumentará, lo que dará lugar a la generación de más peróxido por la reacción de la glucosa con la glucosa oxidasa. De esta manera, se pretende conseguir que la presencia de peróxido en el medio sea sólo la necesaria, minimizándose su acción negativa sobre la HRP.

Los biosensores bienzimáticos se han construidos empleando las mismas cantidades de Teflón y de HRP que las utilizadas para el biosensor de grafito-Teflón-HRP. El contenido de glucosa oxidasa inmovilizada en la matriz electrodica,

ha sido el mismo que el de *HRP*. La respuesta de este biosensor a los cambios de concentración de 4-clorofenol se muestra en la Figura 111.

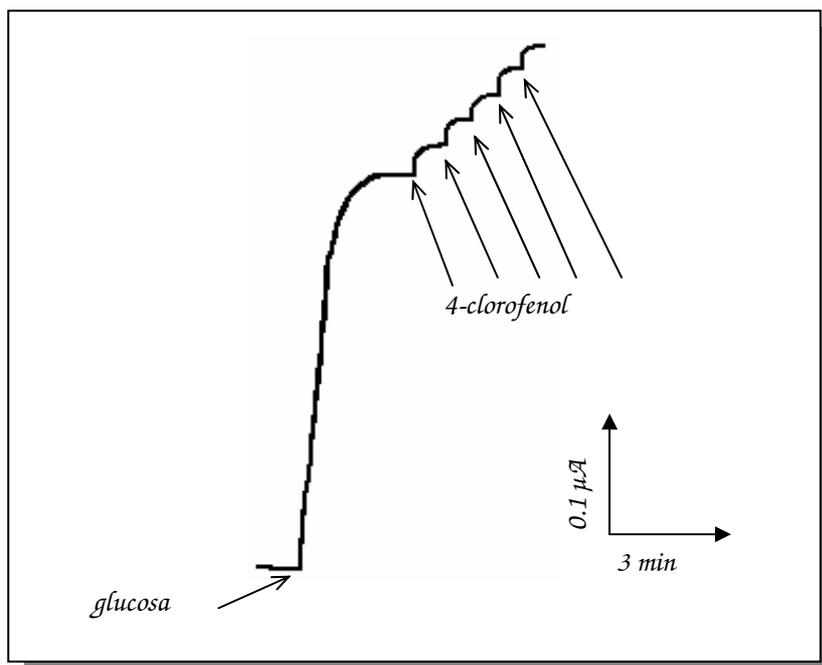


Figura 111. Respuesta amperométrica del electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP a la adición de $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa y adiciones sucesivas de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Puede apreciarse cómo el biosensor responde rápidamente tanto a la concentración de glucosa como a los cambios en la concentración de 4-clorofenol. No se obtuvo respuesta amperométrica tras efectuar adiciones de compuesto fenólico en ausencia de glucosa en el medio de trabajo.

IV.5.1. Optimización de variables experimentales

Se optimizaron algunas de las variables experimentales que influyen en las reacciones enzimáticas y electroquímica, tales como la concentración de glucosa en el medio de trabajo, la cual está directamente relacionada con la concentración de peróxido de hidrógeno en la superficie del electrodo, así como el pH y el potencial aplicado.

IV.5.1.1. Influencia de la concentración de glucosa en disolución sobre la intensidad de corriente en estado estacionario

La influencia de la concentración de glucosa sobre la señal del biosensor se evaluó preparando disoluciones de trabajo de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, que contenían cantidades de glucosa que variaban desde 1.0×10^{-3} a $7.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Estas diferentes concentraciones de glucosa, generarán, a través de la reacción enzimática catalizada por la GOD, distinta

concentración de peróxido en la capa de difusión, lo que afectará a la intensidad de la respuesta amperométrica del biosensor. En la Figura 112 se muestran los resultados obtenidos. Puede verse cómo la intensidad de corriente en estado estacionario para 4-clorofenol aumenta con la concentración de glucosa hasta un valor de $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, permaneciendo prácticamente constante para concentraciones superiores. Puesto que ésta es la concentración mínima de glucosa con la que se obtiene una respuesta máxima, es la que se ha escogido para estudios posteriores.

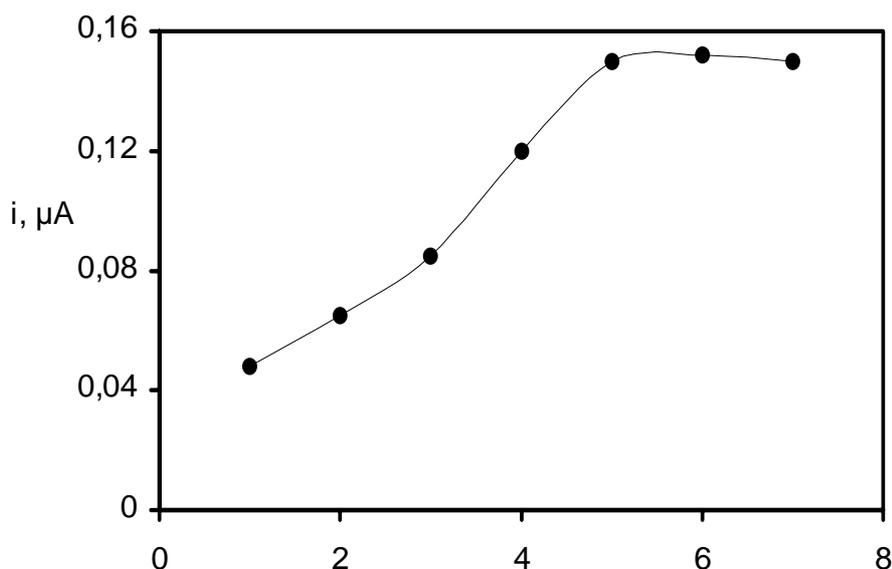


Figura 112. Influencia de la concentración de glucosa sobre la intensidad de corriente en estado estacionario para 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ obtenida con un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP. Disolución de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5; $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

IV.5.1.2. Influencia del pH

Ya se ha comentado que la concentración de protones en el medio influye de manera decisiva en la actividad de las enzimas, ya que su actividad catalítica se basa en la mayoría de los casos en la capacidad de transferir o recibir un protón de manera localizada, por lo que es importante conocer qué valor de pH favorece dicha actividad. Aunque ya se optimizó el pH para la respuesta del electrodo de HRP, se verificó cuál era su efecto sobre la señal obtenida con el biosensor bienzimático. Para ello se midió la corriente en el estado estacionario para una concentración de 4-clorofenol en regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} , conteniendo $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa, variando el valor de pH entre 5.0 y 8.0. Los resultados obtenidos aplicando un potencial de 0.00 V se muestran en la Figura 113.

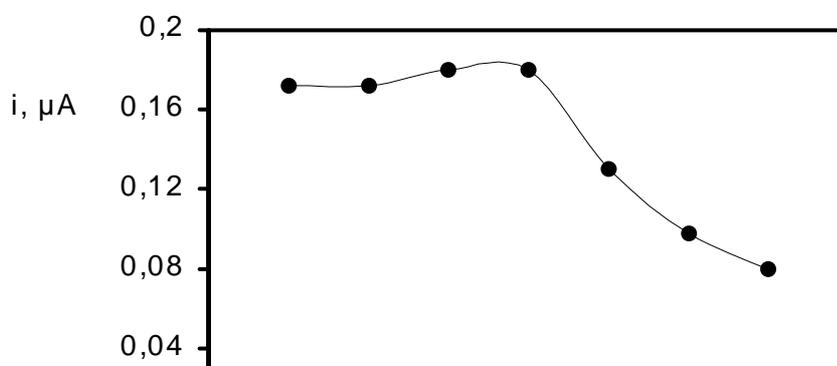


Figura 113. Influencia del pH de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} sobre la intensidad de corriente en estado estacionario de 4-clorofenol de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{glucosa}] = 5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{\text{ap}} = 0.00 \text{ V}$.

Como se puede deducir, la señal amperométrica permanece prácticamente constante hasta pH 6.5. A valores de pH superiores, la intensidad de corriente disminuye drásticamente. Esta tendencia es la misma que se observó con el electrodo monoenzimático, por lo que se eligió el mismo valor de pH (6.5) que en su caso para llevar a cabo estudios posteriores.

IV.5.1.3. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario

Se evaluó la influencia del potencial aplicado sobre la señal amperométrica obtenida con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-GOD-HRP empleando como sustratos 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 4-cloro-2-metilfenol en concentración $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 que contiene glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. En la Figura 114 se muestran los resultados obtenidos.

Si se comparan estos resultados con los que se obtuvieron para estos mismos sustratos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP (apartado IV.4.1.3), se observa una tendencia similar para potenciales comprendidos entre 0.15 y -0.20 aproximadamente, por lo que puede concluirse que la reacción previa de glucosa con glucosa oxidasa no tiene influencia sobre la reacción de reducción de los radicales fenóxido. Sin embargo, con el electrodo de grafito-Teflón-HRP se observaba una disminución de la señal para valores de potencial más negativos, que se atribuyó a la formación de dímeros y polímeros produciendo el ensuciamiento de la superficie electrodo. Por el contrario, con el electrodo bienzimático no se observa esta disminución de la señal para esos potenciales negativos, sino que la respuesta permanece prácticamente constante. Este hecho pone de manifiesto que el ensuciamiento superficial para el electrodo de GOD-HRP es menor que con el biosensor monoenzimático, lo que puede deberse a que el peróxido de hidrógeno en concentración elevada favorece la formación de dímeros y polímeros mencionada, por lo que al generarse ahora el peróxido de manera controlada, dicha formación es menor.

A la vista de estos resultados se escogió el mismo valor de potencial que el empleado con el electrodo de peroxidasa, es decir, 0.00 V para estudios subsiguientes.

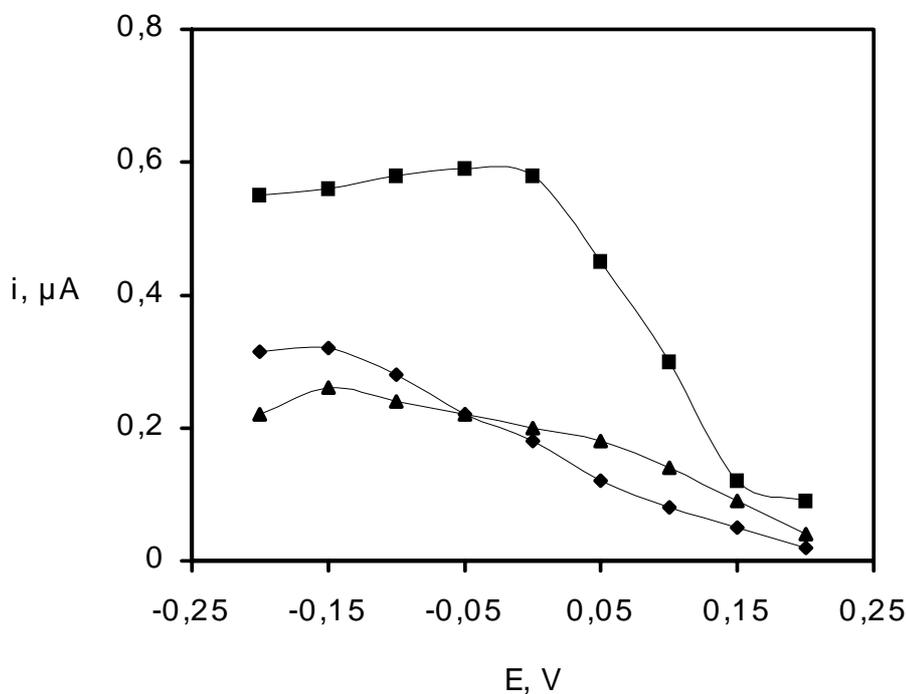


Figura 114. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario de 4-clorofenol (◆), 2,4-diclorofenol (■) y 4-cloro-2-metilfenol (▲) de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, conteniendo glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.5.2. Estabilidad del electrodo compuesto de grafito-Teflón-GOD-HRP

El objetivo fundamental para construir un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP es conseguir aumentar la estabilidad de este biosensor en relación al de grafito-Teflón-HRP. En los estudios de reproducibilidad y estabilidad que se comentan a continuación se pondrá de manifiesto el efecto de la segunda reacción enzimática implicada en el biosensor de GOD-HRP sobre estos aspectos, efectuándose una comparación con los resultados obtenidos para los estudios análogos con el electrodo de peroxidasa.

IV.5.2.1. Repetibilidad de las medidas

Se llevaron a cabo medidas amperométricas repetidas para 4-clorofenol, 4-cloro-2-metilfenol, fenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol, a un nivel de concentración para cada uno de ellos de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, excepto en el caso del pentaclorofenol que fue de $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como consecuencia de su baja respuesta amperométrica, y del 2,4,6-triclorofenol, para el que la concentración utilizada fue de $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ debido a su lenta respuesta.

En la Tabla 51 se recogen los resultados obtenidos para cada serie de medidas, su valor medio con el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05, y la desviación estándar relativa correspondiente. Como puede observarse, los valores de RSD fueron superiores al 10% para el fenol, 2,4,6-triclorofenol y 4-cloro-2-metilfenol.

Tabla 51. Intensidad de corriente en el estado estacionario para medidas sucesivas realizadas con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-GOD-HRP para distintos compuestos fenólicos. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} a pH 6.5 con $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

MEDIDA	$i, \mu\text{A}$				
	4-clorofenol	fenol	2,4,6-triclorofenol	4-cloro-2-metilfenol	penta-clorofenol
	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$
1	0.160	0.140	0.320	0.228	0.570
2	0.152	0.090	0.285	0.198	0.532
3	0.136	0.120	0.250	0.168	0.550
4	0.140	0.100	0.230	0.152	0.560
5	0.162	0.115	0.230	0.198	0.530
6	0.168	0.110	0.310	0.208	0.545
7	0.163	0.120	0.200	0.220	0.570
8	0.168	0.095	0.330	0.200	0.540
9	0.160	0.090	0.270	0.240	0.560
10	0.154	0.095	0.230	0.232	0.540
$i_{media}, \mu\text{A}$	0.156 ± 0.008	0.11 ± 0.01	0.27 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.55 ± 0.01
$RSD, \%$	6.9	14.9	16.5	14.0	2.7

En la Tabla 52 se comparan los valores de RSD con los obtenidos para estudios similares con el electrodo de grafito-Teflón-HRP. A modo de ejemplo, en la Figura 115 se presentan los registros intensidad-tiempo para medidas sucesivas de disoluciones diferentes de pentaclorofenol $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ con ambos biosensores.

Como puede deducirse a la vista de los resultados obtenidos, la repetibilidad de las medidas realizadas con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP es notablemente mejor que la de las medidas efectuadas con el biosensor monoenzimático. Este comportamiento sólo puede atribuirse a la disminución de la cantidad de peróxido de hidrógeno presente en la superficie de los electrodos, que, como ya se ha mencionado, puede favorecer la reacción de los radicales fenóxido para formar dímeros y polímeros, provocando un mayor ensuciamiento del electrodo.

Tabla 52. Comparación de los valores medios de intensidad para series de 10 medidas realizadas sin regeneración de la superficie electrodica, y de los valores de la desviación estándar relativa para distintos sustratos fenólicos obtenidos con los electrodos de grafito-Teflón-HRP y grafito-Teflón-GOD-HRP. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 con H_2O_2 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ y con glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

COMPUESTO FENÓLICO	GRAFITO-TEFLÓN(-)HRP		GRAFITO-TEFLÓN(-)GOD-HRP	
	$i_{media}, \mu\text{A}$	$RSD, \%$	$i_{media}, \mu\text{A}$	$RSD, \%$
4-CLOROFENOL	0.21 ± 0.01	5.3	0.156 ± 0.008	6.9

FENOL	0.15 ± 0.04	40.1	0.11 ± 0.01	14.9
2,4,6-TRICLOROFENOL	0.20 ± 0.07	49.6	0.27 ± 0.03	16.5
4-CLORO-2-METILFENOL	0.11 ± 0.02	30.4	0.20 ± 0.02	14.0
PENTAFLOROFENOL	0.3 ± 0.1	48.2	0.55 ± 0.01	2.7

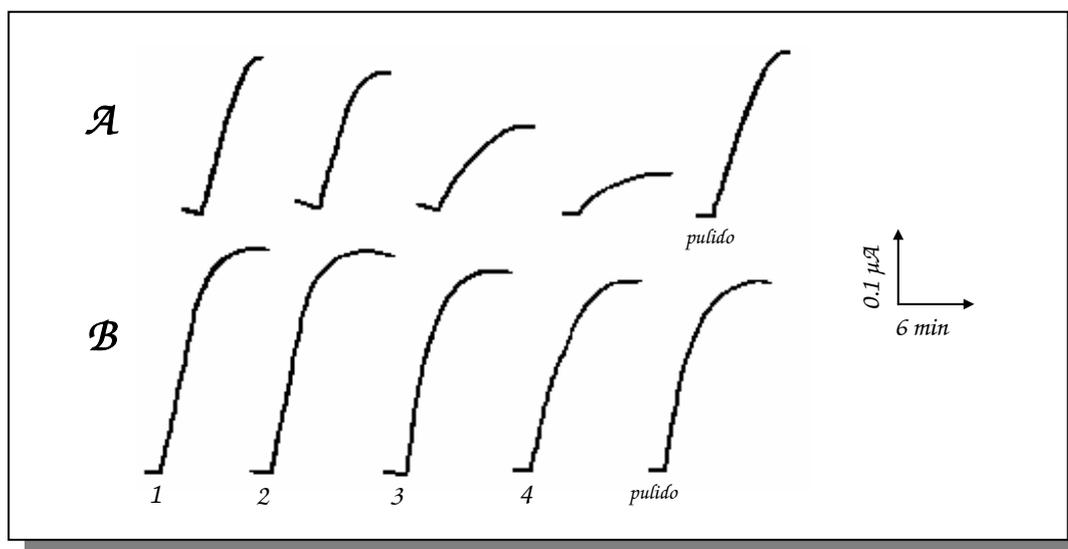


Figura 115. Respuestas amperométricas obtenidas con los electrodos de (A) grafito-Teftlon-HRP y (B) grafito-Teftlon-GOD-HRP para distintas disoluciones de pentaclorofenol $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.5.2.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie del electrodo por pulido

La ventaja de regenerar el biosensor por simple pulido de su superficie es especialmente interesante en este caso, ya que se ha comprobado que el ensuciamiento superficial como consecuencia de la formación de dímeros y polímeros a partir de los radicales formados en la reacción enzimática con la peroxidasa, es importante. Se realizaron 10 series tres de medidas para cada sustrato fenólico al mismo nivel de concentración mencionado en el apartado anterior, puliéndose el biosensor tras cada serie de tres medidas. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 53 donde se comparan además con los del biosensor de peroxidasa.

Puede observarse cómo los valores de RSD obtenidos son similares con ambos biosensores, demostrándose que el proceso de regeneración es adecuado para eliminar los compuestos adsorbidos en la superficie de los electrodos que producen el ensuciamiento.

Tabla 53. Valores de RSD de las señales obtenidas después de pulir la superficie de los electrodos de grafito-Teflón-HRP y grafito-Teflón-GOD-HRP para los distintos sustratos fenólicos estudiados. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 con H_2O_2 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ y con glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. $E_{ap} = 0.00V$.

COMPUESTO FENÓLICO	HRP	GOD-HRP
	$RSD, \%$	
4-CLOROFENOL	8.1	6.0
FENOL	9.9	8.2
2,4,6-TRICLOROFENOL	9.1	8.0
4-CLORO-2-METILFENOL	7.2	7.1
PENTACLOROFENOL	10.0	8.4

IV.5.2.3. Vida útil de un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP

Se construyó un gráfico de control de las mismas características que el construido para el biosensor de HRP, es decir, se realizaron diariamente tres medidas de disoluciones diferentes de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. En la Figura 116 se muestra el gráfico de control obtenido para el biosensor bienzimático.

Si se comparan los gráficos de control obtenidos para ambos biosensores (véase apartado IV.4.2.3 para el electrodo de grafito-Teflón-HRP), puede observarse cómo el electrodo con glucosa oxidasa permite usarse durante 50 días, regenerando la respuesta amperométrica por pulido en caso necesario. Esto supuso más del doble del período de vida útil obtenido para el electrodo de peroxidasa.

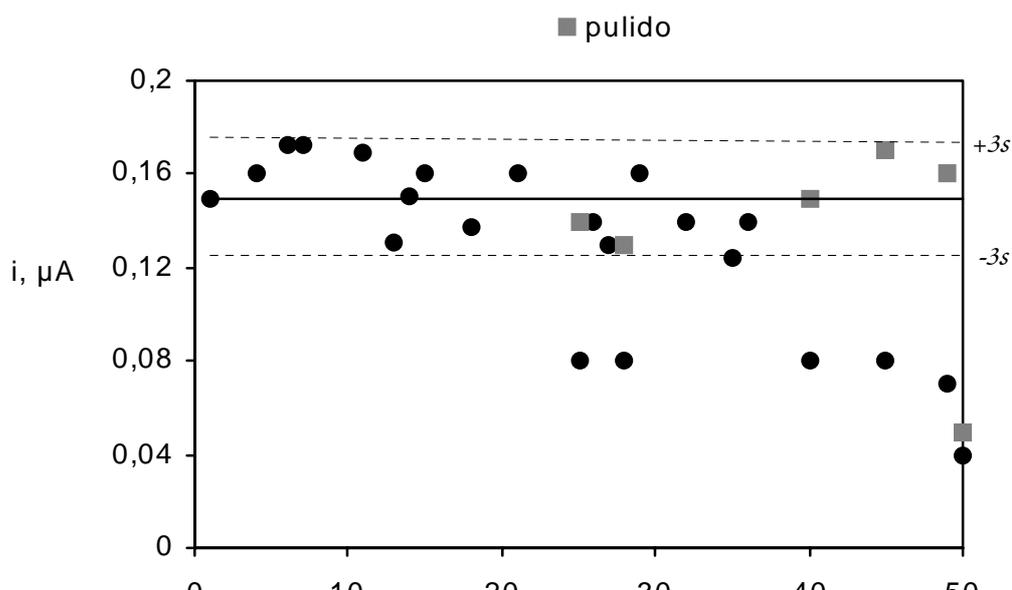


Figura 116. Gráfico de control construido para un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP. Concentración de 4-clorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 conteniendo glucosa 5.0×10^{-3} mol L^{-1} . $E_{ap} = 0.00$ V.

También puede decirse que la necesidad de efectuar pulido para recuperar la señal dentro de los límites de control es menor con el biosensor bienzimático, lo que demuestra una vez más que el ensuciamiento superficial de este biosensor es menor que el que sufre el electrodo de HRP.

Puede concluirse, pues, que la coinmovilización de las dos enzimas en la matriz electródica permite mejorar notablemente el período de vida del biosensor. Además, esta diferencia de comportamiento puede ser debida, en parte, también a la acción negativa del peróxido de hidrógeno sobre la peroxidasa a largo plazo.

IV.5.2.4. Reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos

Para evaluar la reproducibilidad en la fabricación de diferentes electrodos, se realizaron cinco medidas de disoluciones diferentes de 4-clorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} con electrodos contruidos con porciones de la misma pastilla madre y contruidos de pastillas madre diferentes. La media de esas cinco medidas y los correspondientes valores de la desviación estándar relativa se recogen en la Tabla 54. Como puede observarse, la reproducibilidad de las medidas realizadas con distintos electrodos, fabricados tanto a partir de la misma pastilla como a partir de pastillas diferentes, es aceptable.

Tabla 54. Reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos de grafito-Teflón-GOD-HRP fabricados a partir de dos pastillas madre diferentes; 4-clorofenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} . Regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 con 5.0×10^{-3} mol L^{-1} de glucosa. $E_{ap} = 0.00$ V.

	<i>i</i> , μA (RSD, %)	
	PASTILLA 1	PASTILLA 2
ELECTRODO 1	0.15 (7.0)	0.14 (4.5)
ELECTRODO 2	0.16 (5.4)	0.16 (8.0)
i_{media} , μA (para cada pastilla)	0.16 (6.5)	0.15 (7.4)
i_{media} , μA (total)	0.15 (2.3)	

IV.5.3. Curvas de calibrado y características analíticas

En las condiciones experimentales mencionadas anteriormente, se obtuvieron curvas de calibrado para los cinco sustratos fenólicos con las características que aparecen en la Tabla 55. Los intervalos de confianza están calculados para un nivel de significación de 0.05.

En la Tabla 56 se recogen los límites de detección y determinación calculados siguiendo los mismos criterios expuestos en ocasiones anteriores.

Tabla 55. Características de los calibrados obtenidos para distintos sustratos fenólicos con el biosensor de grafito-Teflón-GOD-HRP.

COMPUESTO FENÓLICO	INTERVALO LINEAL, mol L ⁻¹	ORDENADA EN EL ORIGEN, μA	PENDIENTE, μA mol ⁻¹ L	r
Fenol	(0.5-60) × 10 ⁶	(-5 ± 0.5) × 10 ²	(4.1 ± 0.1) × 10 ⁴	0.999
4-clorofenol	(0.5-100) × 10 ⁶	(4 ± 2) × 10 ⁴	(1.8 ± 0.3) × 10 ⁴	0.999
4-cloro-2-metilfenol	(0.75-60) × 10 ⁶	(2 ± 0.1) × 10 ²	(1.7 ± 0.1) × 10 ⁴	0.997
2,4,6-triclorofenol	(0.1-60) × 10 ⁶	(6 ± 5) × 10 ²	(4.8 ± 0.2) × 10 ⁴	0.997
pentaclorofenol	(1-150) × 10 ⁶	(-1 ± 0.4) × 10 ²	(2.4 ± 0.3) × 10 ³	0.999

Tabla 56. Límites de detección y límites de cuantificación para distintos sustratos fenólicos con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP.

COMPUESTO	L.D., mol L ⁻¹	L.Q., mol L ⁻¹
Fenol	4.3 × 10 ⁷	2.0 × 10 ⁶
4-clorofenol	1.4 × 10 ⁷	4.6 × 10 ⁷
4-cloro-2-metilfenol	5.6 × 10 ⁷	1.0 × 10 ⁶
2,4,6-triclorofenol	1.1 × 10 ⁷	4.9 × 10 ⁷
pentaclorofenol	4.7 × 10 ⁶	1.7 × 10 ⁵

Si se comparan las características analíticas con las que se obtuvieron con el electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa, hay que mencionar en primer lugar que con el electrodo bienzimático sí es posible construir calibrados para todos los

compuestos fenólicos ensayados, lo que no ocurría con el biosensor monoenzimático para el 2,4,6-triclorofenol, fenol y pentaclorofenol.

Para el resto de los compuestos estudiados (el 4-clorofenol y el 4-cloro-2-metilfenol) los valores de las pendientes obtenidos con los biosensores de HRP y de GOD-HRP son muy similares. Esto indica que el electrodo bioenzimático es capaz de generar el peróxido de hidrógeno necesario para que se obtenga la misma sensibilidad que la que se obtenía con el electrodo de peroxidasa. Los límites de detección son algo mejores con el biosensor de GOD-HRP , probablemente como consecuencia de una mayor repetibilidad en las medidas.

IV.5.4. Electrodo de grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa como detectores en sistemas de inyección en flujo

Se ha demostrado que la inclusión de la enzima glucosa oxidasa en la matriz electródica y el uso de glucosa como reactivo en lugar del peróxido de hidrógeno, dan lugar a una serie de mejoras con respecto al empleo del electrodo de HRP , como son la posibilidad de cuantificar compuestos fenólicos que no podían ser determinados con el electrodo de peroxidasa, y una mayor estabilidad del electrodo, es decir, una mayor vida útil.

Por otra parte, en el apartado IV.4.7 se puso de manifiesto la mejora de algunas características analíticas cuando el electrodo de grafito-Teflón- HRP era utilizado en flujo.

Por lo tanto, se ha evaluado la utilización del electrodo de grafito-Teflón- GOD-HRP en FIA como sistema de detección amperométrico para compuestos fenólicos. A modo de ejemplo, en la Figura 117 se muestra el diagrama obtenido para inyecciones sucesivas de fenol, utilizando la misma célula de flujo que se empleó con el electrodo monoenzimático. La disolución portadora fue regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) que contiene glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, el potencial aplicado 0.00 V y el volumen de inyección $90 \mu\text{L}$. Como se puede observar, la línea base que se obtiene es mucho más estable que la obtenida cuando se emplea el electrodo de peroxidasa y el portador contiene peróxido de hidrógeno (Figura 103). También se puede ver que la respuesta obtenida con el biosensor de GOD-HRP es ligeramente inferior a la del biosensor monoenzimático.

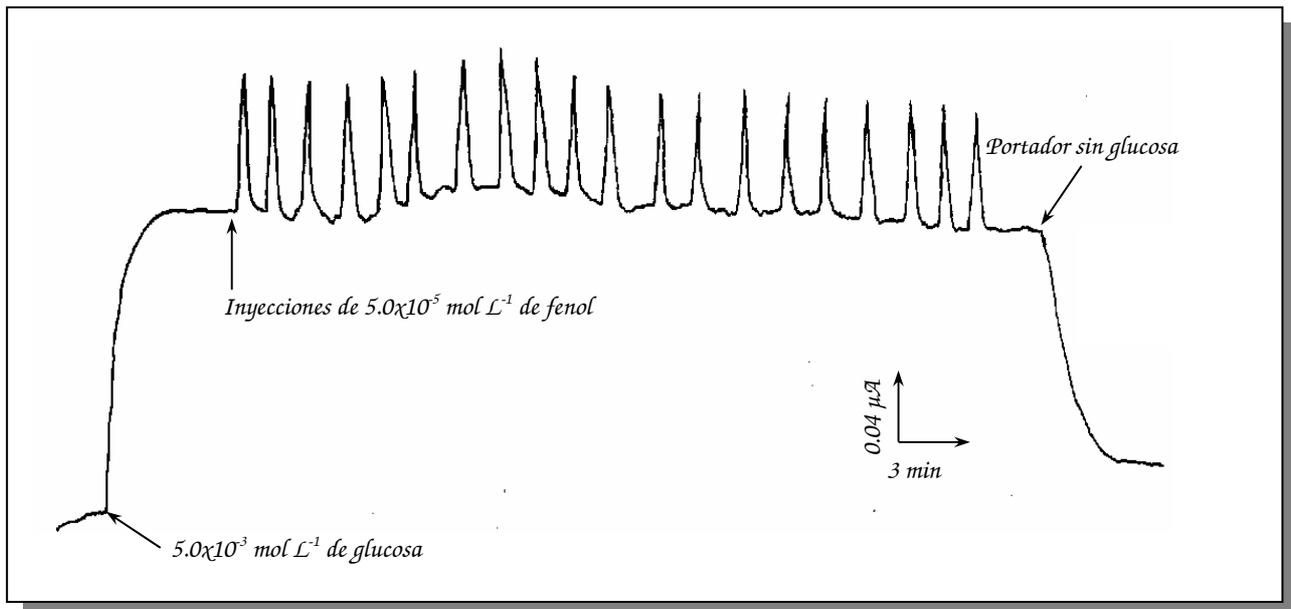


Figura 117. Fograma obtenido con el electrodo compuesto de GOD-HRP para 20 inyecciones sucesivas de fenol $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Disolución portadora: fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 y glucosa $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Caudal = 0.5 mL min^{-1} . $V_i = 90 \mu\text{L}$. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.5.4.1. Optimización de las variables experimentales

Al igual que se realizó con otros biosensores compósitos, se optimizaron aquellas variables que influyen directamente sobre el pico FIA y que no han sido ya optimizadas en el modo discontinuo.

IV.5.4.1.1. Influencia del caudal

La influencia del caudal de disolución portadora sobre la intensidad de pico, i_p , la anchura de pico en línea base, w_b , y la anchura de pico a la semialtura, $w_{1/2}$ se evaluó inyectando 90 μL de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. La concentración de glucosa en la disolución portadora fue de $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Los resultados en la Figura 118.

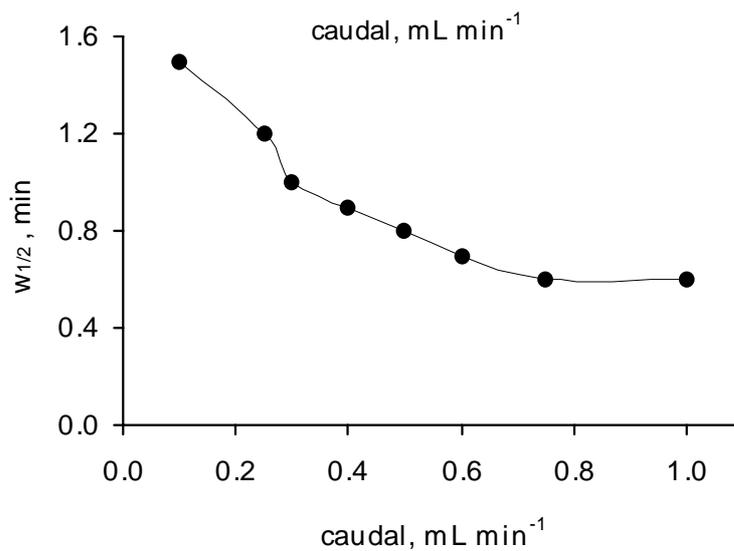
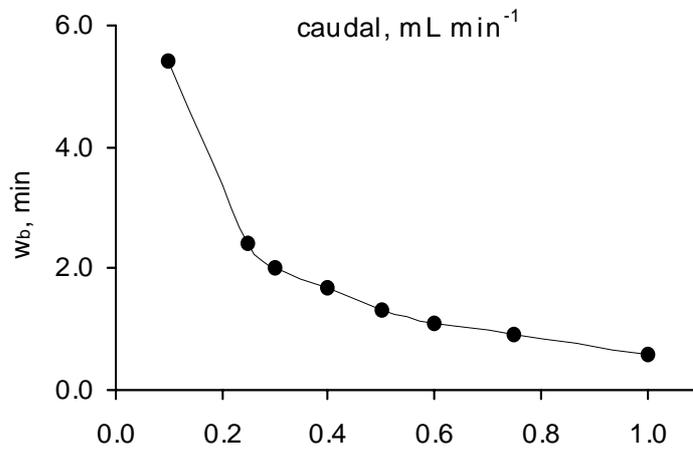
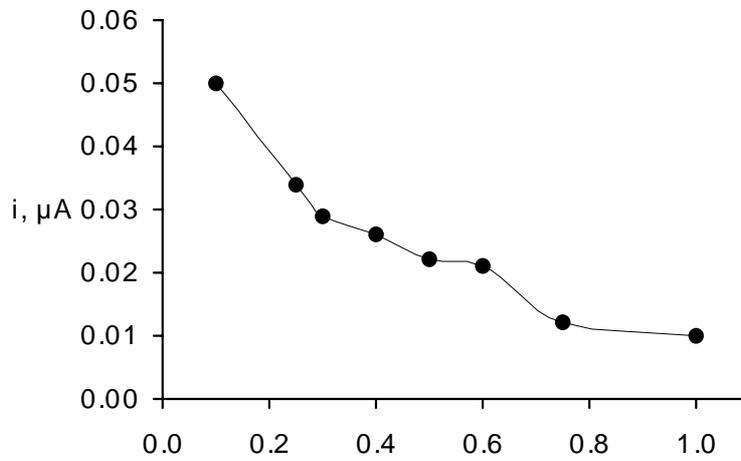


Figura 118. Influencia del caudal sobre i_p , $w_{1,2}$ y w_b . Disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} y $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa; $\text{pH } 6.5$. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. Volumen de inyección = $90 \mu\text{L}$.

Puede observarse cómo la respuesta del electrodo sigue la misma tendencia que la ya comentada para el electrodo compuesto de peroxidasa. La anchura de pico en línea base es ligeramente superior en el caso del electrodo bienzimático, como era previsible, dada la mayor lentitud de la respuesta con este electrodo. En este caso, también se escogió como caudal para llevar a cabo las experiencias subsiguientes 0.5 mL min^{-1} , por las mismas razones expuestas para el biosensor de peroxidasa y para poder comparar los resultados obtenidos en uno y otro caso.

IV.5.4.1.2. Optimización de la concentración de glucosa en la disolución portadora

La influencia de la concentración de glucosa en la disolución portadora sobre el pico amperométrico se optimizó, puesto que las características hidrodinámicas del sistema hacen que las condiciones en las que se producen las reacciones sean diferentes a las de discontinuo. En la Figura 119 se muestran las respuestas del electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP para inyecciones de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en disoluciones portadoras conteniendo distintas concentraciones de glucosa.

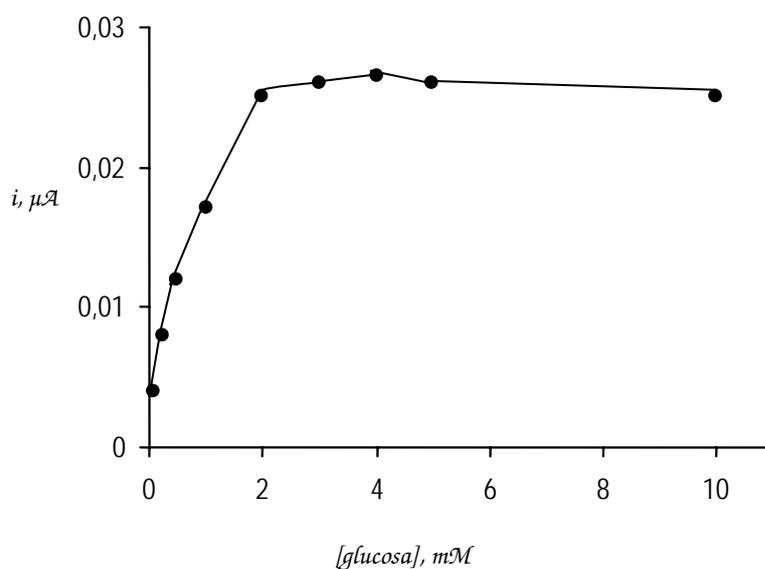


Figura 119. Influencia de la concentración de glucosa sobre la corriente del pico FIA obtenido para una concentración de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$; regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} ($\text{pH } 6.5$); caudal = 0.5 mL min^{-1} . $V_{in} = 90 \mu\text{L}$.

Puede apreciarse que la señal del 4-clorofenol aumenta a medida que la concentración de glucosa en el portador aumenta, hasta alcanzar un valor prácticamente constante para concentraciones superiores a $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, habiéndose escogido esta concentración para estudios posteriores.

Es interesante observar cómo, al igual que ocurría en discontinuo, la respuesta que se consigue una vez optimizada la concentración de glucosa es similar a la obtenida con el electrodo de peroxidasa, lo que sugiere que el aporte de peróxido de hidrógeno que se consigue a través de la reacción de la glucosa oxidasa es suficiente para permitir la reacción con el compuesto fenólico a los niveles de concentración utilizados.

IV.5.4.2. Repetibilidad de las señales amperométricas

Una vez optimizadas las variables experimentales, se procedió a evaluar la repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas mediante inyección en flujo aplicando un potencial de 0.00 V. El volumen de inyección para cada compuesto fenólico fue de 90 μL a un nivel de concentración de 1.0×10^{-5} mol L^{-1} . En la Figura 120 se muestran los diagramas obtenidos para los seis compuestos estudiados, y en la Tabla 56 se recogen los valores de RSD para cada serie de medidas y se comparan con los obtenidos para estudios similares en discontinuo y con el electrodo de grafito-Teflón-HRP en flujo. El valor de RSD para el 2,4,6-triclorofenol en discontinuo se ha obtenido a partir de diez medidas de distintas disoluciones del triclorofenol a un nivel de concentración de 1.0×10^{-6} mol L^{-1} , que es diez veces menor que la utilizada en todos los demás estudios, debido a que este fenol presenta una respuesta muy sensible en discontinuo.

Como se aprecia claramente, la repetibilidad de los resultados es considerablemente mejor con el biosensor bienzimático en flujo, ya que se suman los dos factores que contribuyen a la mejora de dicha repetibilidad, como ya se ha comentado anteriormente.

Por otro lado, otro factor que puede contribuir a una mayor repetibilidad, es la estabilidad de la línea base. Ya se ha comentado, que la comparación de las Figuras 103 y 117 permite deducir que se obtiene una línea base mucho más estable cuando hay glucosa en el portador que cuando hay peróxido de hidrógeno.

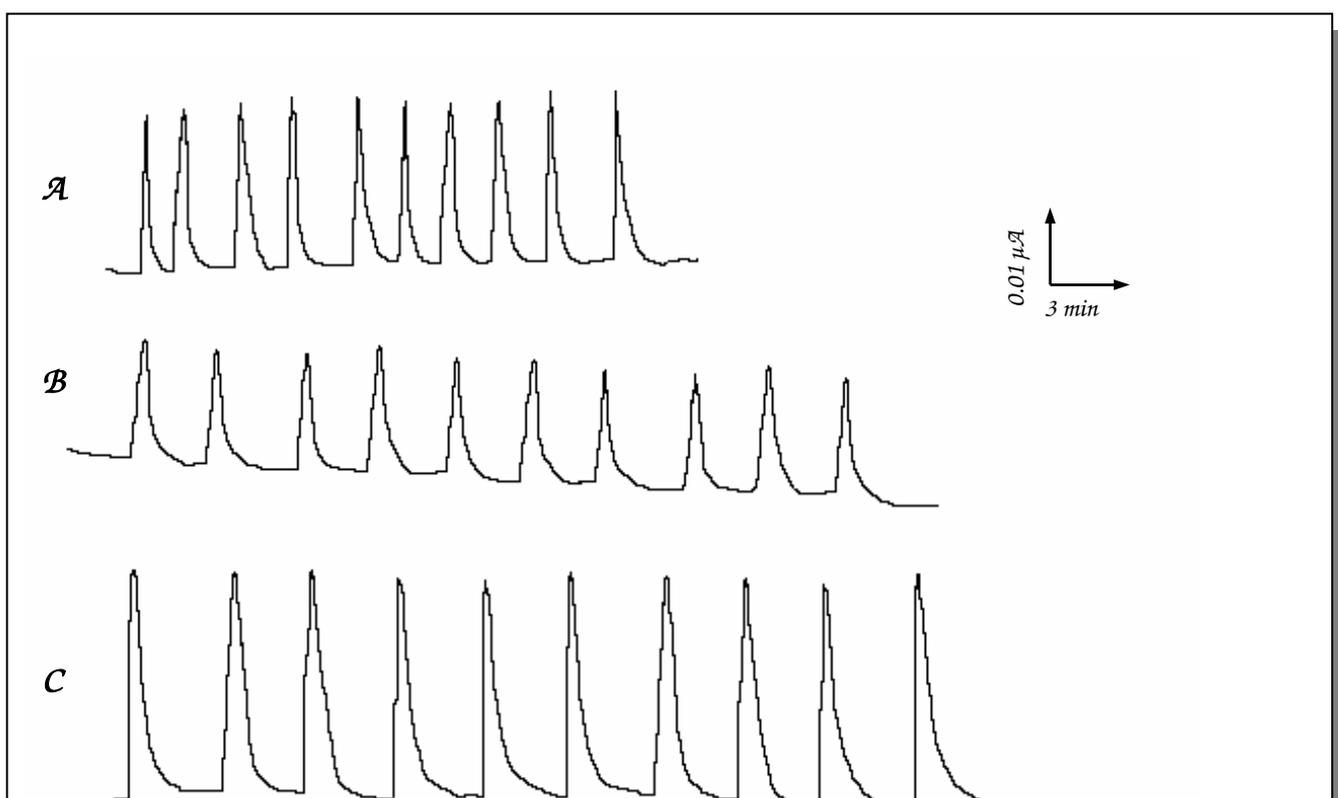


Figura 120. Registros de intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP mediante inyección en flujo de A) fenol, B) 2-clorofenol, C) 4-clorofenol, D) 2,4,6-triclorofenol, E) 4-cloro-2-metilfenol y F) 3,4-dimetilfenol, 1.0×10^{-5} mol L⁻¹. Disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ (pH 6.5) que contiene 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de glucosa; E_{ap} = 0.00 V; volumen de inyección = 90 μ L; caudal = 0.5 mL min⁻¹.

Tabla 56. Valores de la desviación estándar relativa obtenidos para series de 10 medidas de los compuestos fenólicos a un nivel de concentración de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ utilizando el electrodo de grafito-Teflón-glucosa oxidasasa-peroxidasa, en discontinuo (disolución de regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ y glucosa 5.0×10^{-3} mol L⁻¹, E_{ap} = 0.00 V) y mediante inyección en flujo (disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ y glucosa 2.0×10^{-3} mol L⁻¹, caudal = 0.5 mL min⁻¹, E_{ap} = 0.00 V), y utilizando el electrodo de grafito-Teflón-HRP mediante inyección en flujo (disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ y H₂O₂ 5.0×10^{-5} mol L⁻¹, caudal = 0.5 mL min⁻¹, E_{ap} = 0.00 V).

	RSD, % (1.0×10^{-5} mol L ⁻¹)		
	GOD-HRP		HRP
	DISCONTINUO	FLUJO	FLUJO
FENOL	14.9	3.8	10.0
2-CLOROFENOL	7.9	6.3	6.8
4-CLOROFENOL	6.9	3.5	6.5
2,4,6-TRICLOROFENOL	16.5*	8.5	24.5
4-CLORO-2-METILFENOL	14.0	7.0	14.0
3,4-DIMETILFENOL	9.2	8.6	7.4

* 1.0×10^{-6} mol L⁻¹

IV.5.4.3. Estabilidad del electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP en flujo continuo

Se evaluó la estabilidad del biosensor bienzimático haciendo circular disolución portadora, consistente en agua de grifo, a través del detector, aplicando un potencial constante de 0.00 V, y realizando medidas de 4-clorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ cada media hora. En la Figura 121 se comparan los resultados con los que se obtuvieron para este mismo estudio con el electrodo de grafito-Teflón-HRP. Puede verse cómo la señal obtenida con el electrodo bienzimático permanece estable durante al menos 12 horas, 7 horas más comparando con el electrodo monoenzimático. Tras el período nocturno, durante el que se hizo circular portador a través de la célula de medida y se mantuvo el potencial aplicado al electrodo, la señal disminuyó sensiblemente. Sin embargo, un pulido de la superficie del biosensor permitió recuperar la señal inicial.

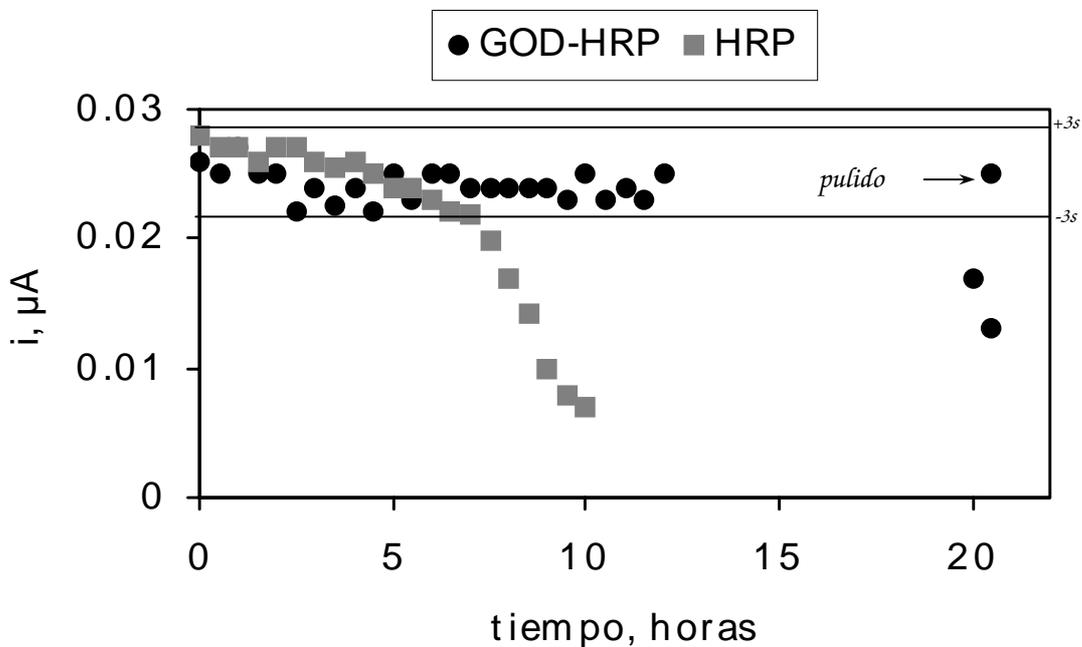


Figura 121.

Estabilidad de los electrodos de grafito-Teflón HRP y grafito-Teflón-GOD-HRP en flujo continuo para sucesivas adiciones de 4-clorofenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Las condiciones de medida con el electrodo de HRP se especifican en la Figura 105. Condiciones de medida con el electrodo de GOD-HRP: portador: agua de grifo con $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa; caudal: 0.5 mL min^{-1} ; $V_i = 90 \mu\text{L}$; $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Estos resultados ponen nuevamente de manifiesto la conveniencia de la utilización de glucosa oxidasa conjuntamente con peroxidasa para la monitorización de fenoles. Por un lado, la disolución de glucosa es más estable que la de peróxido de hidrógeno, y por otro, el período de vida útil del electrodo es mayor trabajando con las dos enzimas.

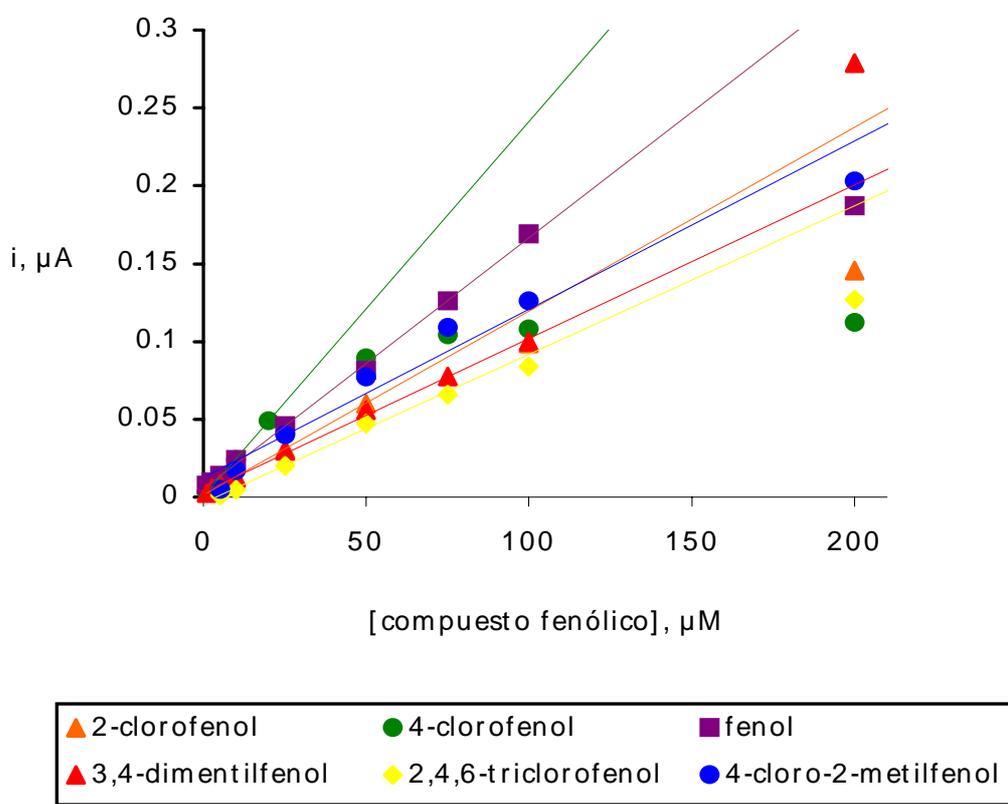
IV.5.3.4. Curvas de calibrado y características analíticas

Una vez evaluadas la influencia de las variables experimentales y la repetibilidad de las medidas, se calcularon las características analíticas para la determinación de distintos compuestos fenólicos, en las condiciones mencionadas anteriormente, es decir: disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, que contiene glucosa a un nivel de concentración de $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; un caudal de 0.5 mL min^{-1} , volumen de inyección de $90 \mu\text{L}$, y potencial aplicado de 0.00 V .

En la Figura 122 se muestran las distintas curvas de calibrado, y en la Tabla 57 se recogen las características de dichos calibrados, con sus intervalos de confianza respectivos, calculados para un nivel de significación de 0.05.

Para determinar el intervalo lineal de los calibrados se tomó como criterio que el coeficiente de correlación de la regresión por mínimos cuadrados correspondiente al intervalo tomado no fuera menor de 0.997.

Figura 122. Curvas de calibrado para distintos compuestos fenólicos obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP mediante FIA.



Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizaron medidas de 10 disoluciones diferentes de los distintos compuestos fenólicos a las concentraciones más bajas del calibrado respectivo. Los criterios para establecer el límite de detección y de cuantificación fueron los mismos que los comentados en discontinuo. Estos valores se muestran en la Tabla 58.

Tabla 57. Características de los calibrados para distintos compuestos fenólicos con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP mediante inyección en flujo.

	INTERVALO LINEAL, mol L ⁻¹	PENDIENTE, μA L mol ⁻¹	O.O., μA	r
Fenol	(0.1-10) $\times 10^{-5}$	1610 \pm 20	(6 \pm 1) $\times 10^{-3}$	0.9993
2-clorofenol	(0.1-5.0) $\times 10^{-5}$	1160 \pm 40	(1.92 \pm 0.01) $\times 10^{-3}$	0.9999
4-clorofenol	(0.1-2.0) $\times 10^{-5}$	2410 \pm 30	(6 \pm 3) $\times 10^{-4}$	0.9998
2,4,6-triclorofenol	(0.1-5.0) $\times 10^{-5}$	950 \pm 30	(5.0 \pm 0.8) $\times 10^{-3}$	0.9993
4-cloro-2-metilfenol	(0.5-30) $\times 10^{-5}$	1080 \pm 50	(1.2 \pm 0.7) $\times 10^{-3}$	0.9927
3,4-dimetilfenol	(0.1-10) $\times 10^{-5}$	990 \pm 20	(3 \pm 1) $\times 10^{-3}$	0.9987

Tabla 58. Límites de detección y de cuantificación de diferentes compuestos fenólicos obtenidos empleando el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP como detector amperométrico en inyección en flujo. Disolución portadora: regulador fosfato (pH 6.5) con 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de glucosa; E_{ap} = 0.00 V; caudal = 0.5 mL min⁻¹; volumen de inyección = 90 μ L.

	LD, mol L ⁻¹	LQ, mol L ⁻¹
Fenol	1.5×10^{-6}	5.0×10^{-6}
2-clorofenol	2.2×10^{-6}	7.3×10^{-6}
4-clorofenol	6.6×10^{-7}	2.2×10^{-6}
2,4,6-triclorofenol	1.3×10^{-6}	4.3×10^{-6}
4-cloro-2-metilfenol	1.9×10^{-6}	6.3×10^{-6}
3,4-dimetilfenol	1.4×10^{-6}	4.7×10^{-6}

En la Tabla 59 se comparan los valores de las pendientes y de los límites de detección obtenidos con los biosensores de HRP y GOD-HRP. Puede apreciarse cómo la sensibilidad que se obtiene con el electrodo de glucosa oxidasa-peroxidasa es menor que la obtenida con el electrodo de peroxidasa en la mayoría de los casos. Esto puede atribuirse de nuevo a una menor velocidad en la reacción enzimática con el electrodo bienzimático.

Tabla 59. Comparación de los valores de las pendientes y los límites de detección de las curvas de calibrado obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-HRP y con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP en FIA para las seis compuestos fenólicos estudiados.

	HRP		GOD-HRP	
	PENDIENTE, $\mu A L mol^{-1}$	LD, $mol L^{-1}$	PENDIENTE, $\mu A L mol^{-1}$	LD, $mol L^{-1}$
Fenol	2240 \pm 50	1.5 $\times 10^6$	1610 \pm 20	1.5 $\times 10^6$
2-clorofenol	1730 \pm 60	5.7 $\times 10^6$	1160 \pm 40	2.2 $\times 10^6$
4-clorofenol	2780 \pm 70	2.8 $\times 10^7$	2410 \pm 30	6.6 $\times 10^7$
2,4,6-triclorofenol	1010 \pm 30	5.0 $\times 10^6$	950 \pm 30	1.3 $\times 10^6$
4-cloro-2-metilfenol	830 \pm 20	5.0 $\times 10^6$	1080 \pm 50	1.9 $\times 10^6$
3,4-dimetilfenol	890 \pm 30	4.7 $\times 10^6$	990 \pm 20	1.4 $\times 10^6$

Por lo que respecta a los límites de detección, éstos son peores que los obtenidos en discontinuo, al igual que ocurría con el electrodo de grafito-Teflón-HRP. Sin embargo, son ligeramente mejores que los obtenidos con el biosensor monoenzimático en flujo, a pesar de tener una menor pendiente en los calibrados. Esto es debido a la mejor repetibilidad de las medidas y a la mayor estabilidad de la línea base observada con el electrodo de GOD-HRP y glucosa en la disolución portadora. Dado que el cálculo de los límites de detección se realizó tomando como estimador de la desviación estándar del blanco, la correspondiente a 10 disoluciones de concentración igual a la más diluida del intervalo lineal del calibrado, la referida mejor repetibilidad dará lugar a desviaciones menores.

IV.5.4.5. Tiempo necesario para la desaparición del pico FIA

Cuando se compararon los resultados obtenidos con los electrodos de grafito-Teflón-GOD-HRP y grafito-Teflón-HRP en discontinuo, ya se puso de manifiesto que la respuesta amperométrica del electrodo bienzimático era algo más lenta que la del monoenzimático. Es decir, el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario es mayor cuando el peróxido de hidrógeno requerido se aporta a través de la reacción enzimática de GOD con glucosa. Cuando se comparan los tiempos de desaparición de los picos FIA empleando ambos biosensores (Figura 123), puede verse cómo son aproximadamente iguales en ambos casos. Puesto que el régimen de medida es hidrodinámico, el hecho de que las reacciones sean más lentas con el electrodo de GOD-HRP no afecta al tiempo de desaparición de pico, sino a la altura de éste que se alcanza, por lo que las pendientes de los calibrados son menores para este electrodo, como se ha indicado anteriormente.

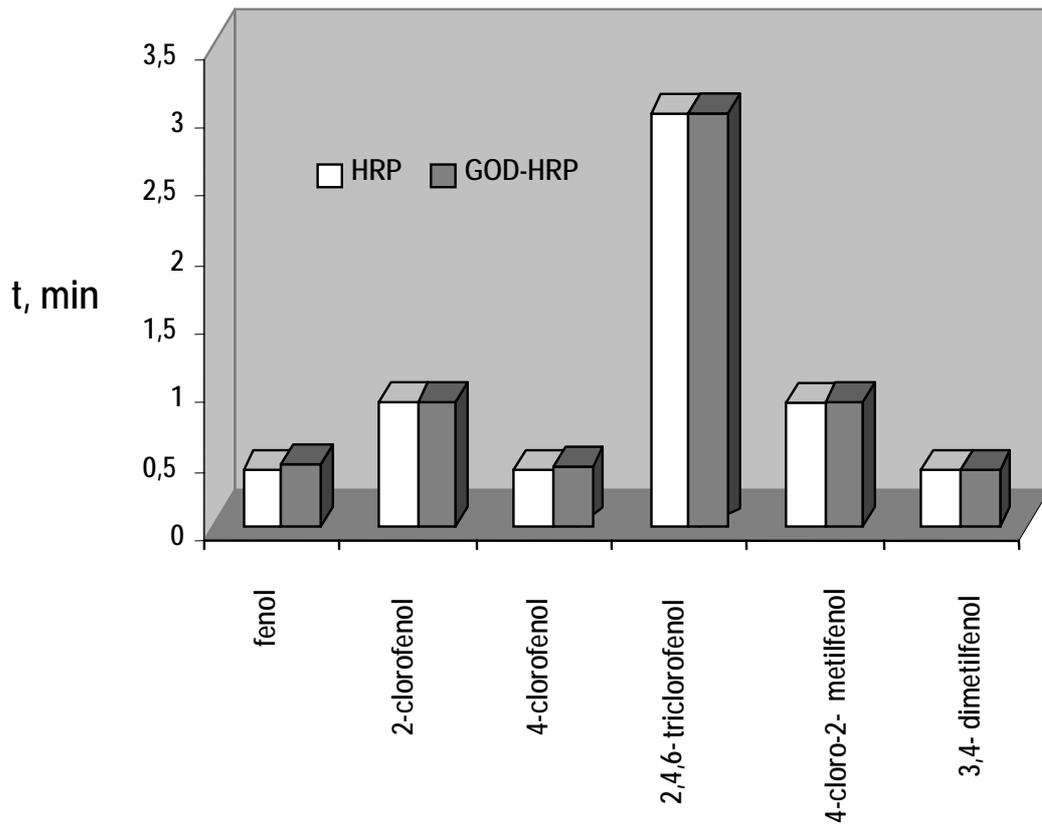


Figura 123.
Tiempo de

desaparición de los picos FIA para diferentes sustratos fenólicos utilizando como detectores el biosensor compuesto de HRP, y el de GOD-HRP. Portador: regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5), con $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 ó $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa, respectivamente. Caudal: 0.5 mL min^{-1} ; $V_i=90 \mu\text{L}$ de disoluciones patrón $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cada fenol; $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.6. Electrodo compósito de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa

En apartados anteriores se ha puesto de manifiesto que los biosensores de peroxidasa exhiben una baja especificidad hacia los compuestos donadores de electrones como son los fenoles. También se ha visto que los biosensores que emplean tirosinasa poseen una mayor selectividad, y sólo son sensibles a aquellos fenoles con al menos una de sus posiciones orto- libre. La respuesta amperométrica del biosensor de tirosinasa hacia estos compuestos es mucho más sensible, en general, que la que se obtiene con el electrodo de peroxidasa, tal y como se observa en la Figura 124, en la que se comparan las respuestas obtenidas con los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa y grafito-Teflón-peroxidasa para varios compuestos fenólicos. Por lo tanto, dado que cada tipo de biosensor presenta cualidades ventajosas, con el objeto de monitorizar el mayor número posible de compuestos fenólicos con la mayor sensibilidad posible, se procedió a inmovilizar ambas enzimas en la matriz electródica compósita. Lógicamente, debido a los problemas encontrados para la detección de algunos compuestos fenólicos cuando se emplea el electrodo de grafito-Teflón-HRP, parecería adecuado inmovilizar también glucosa oxidasa, que, como se ha demostrado, resuelve estos problemas y proporciona una mayor estabilidad operacional. Sin embargo, algunos aspectos del comportamiento del electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP en la detección de compuestos fenólicos, son ajenos a la presencia de glucosa oxidasa. Por tanto, en primer lugar se realizaron algunos estudios con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr-HRP.

IV.6.1. Electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa-peroxidasa

Se procedió a comparar las señales amperométricas obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr-HRP con las de los electrodos de grafito-Teflón-Tyr y grafito-Teflón-HRP. Para ello, se midieron las corrientes en estado estacionario obtenidas en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 para un nivel de concentración de cada compuesto fenólico de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. En la Tabla 60 se comparan con las respuestas que se obtuvieron con los electrodos de grafito-Teflón-Tyr y grafito-Teflón-HRP, por separado, para 18 compuestos fenólicos.

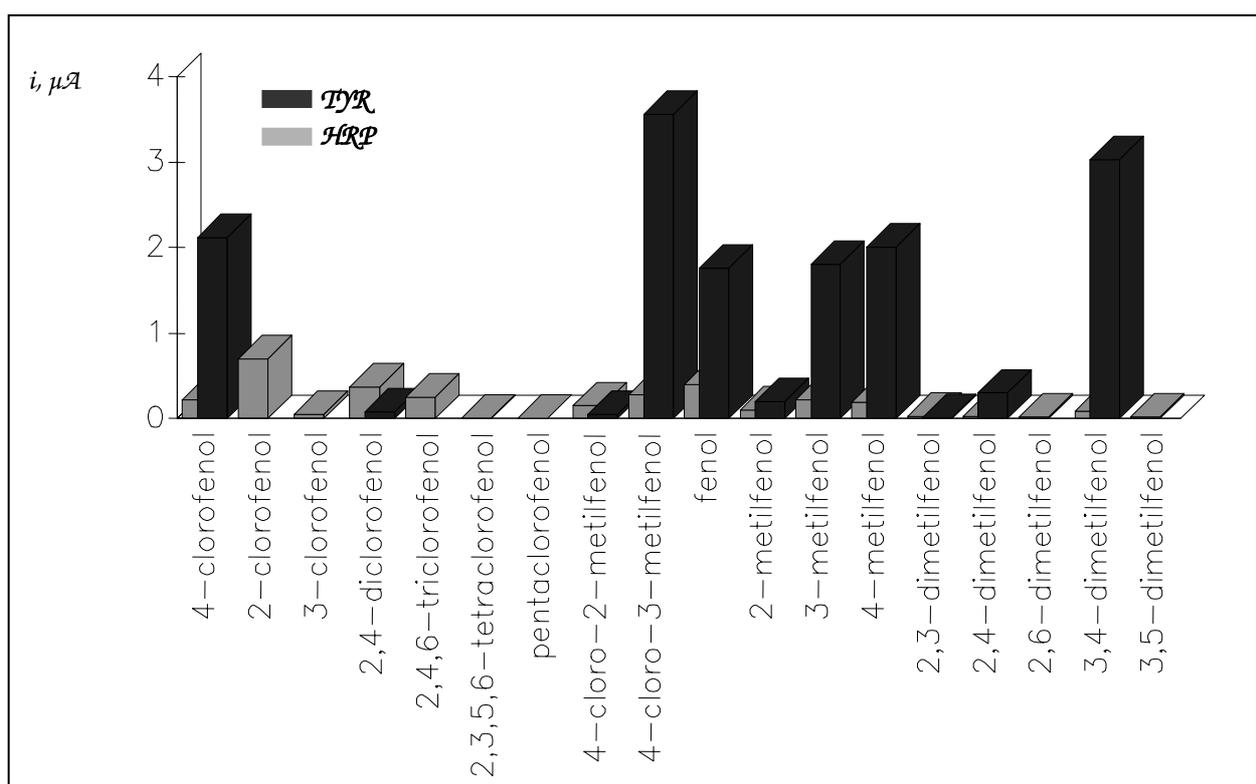


Figura 124. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con un electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa a un potencial aplicado de 0.00 V en disolución de trabajo de regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ (pH 6.5) y H₂O₂ 5.0x10⁻⁴ mol L⁻¹, y con un electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa a un potencial aplicado de -0.15 V en disolución de trabajo de regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ (pH 6.5), para un nivel de concentración de cada compuesto fenólico de 1.0x10⁻⁵ mol L⁻¹.

Como puede observarse, el electrodo bienzimático responde a todos los compuestos que daban señal con la peroxidasa, y, además, dicha respuesta es en general mayor. Si se compara el electrodo bienzimático con el de tirosinasa, se observa un comportamiento desigual dependiendo del compuesto fenólico. En el caso de aquellos fenoles que proporcionan respuestas intensas en comparación con el resto con el electrodo de tirosinasa (por ejemplo el 4-clorofenol – $i_{ss} = 2.12 \mu\text{A}$), la corriente medida con el electrodo compuesto bienzimático ($i_{ss(4\text{-clorofenol})} = 1.88 \mu\text{A}$) disminuye en relación a la obtenida con el electrodo de tirosinasa en todos los casos. Este comportamiento puede atribuirse a que el compuesto fenólico se reparte entre cada una de las reacciones enzimáticas en las que está implicado como sustrato. Puesto que, en estos casos, la señal amperométrica obtenida con el electrodo de tirosinasa es mucho mayor que con el electrodo de peroxidasa, la intensidad de corriente observada con el electrodo bienzimático disminuye.

Tabla 60. Corriente en estado estacionario obtenida para una concentración 1.0x10⁻⁵ mol L⁻¹ de compuesto fenólico con el electrodo de peroxidasa, tirosinasa y bienzimático (con y sin peróxido de hidrógeno en el medio de trabajo).

COMPUESTO	$i, \mu\text{A}$ (HRP)	$i, \mu\text{A}$ (TYR)	$i, \mu\text{A}$ (HRP-TYR)	
			Sin H ₂ O ₂	Con H ₂ O ₂
fenol	0.40	1.8	1.8	1.75
4-clorofenol	0.22	2.12	1.52	1.88
3-clorofenol	0.03	0.75	0.7	0.82
2-clorofenol	0.70	0.05	0.04	0.76
2,4-diclorofenol	0.60	0.2	0.1	1.04
2,4,6-triclorofenol	0.63	n.r.	n.r.	0.60
2,3,5,6-tetraclorofenol	0.05	n.r.	n.r.	0.042
pentaclorofenol	0.027	n.r.	n.r.	0.025
4-cloro-2-metilfenol	0.15	n.r.	n.r.	0.14
4-cloro-3-metilfenol	0.23	2.5	2.72	1.44
2,3-dimetilfenol	0.03	n.r.	n.r.	0.015
2,4-dimetilfenol	0.03	0.30	0.37	0.64
2,6-dimetilfenol	0.02	n.r.	n.r.	0.04
3,4-dimetilfenol	0.09	4.1	1.36	2.08
3,5-dimetilfenol	0.02	n.r.	n.r.	0.02
2-metilfenol	0.07	0.04	0.04	0.06
3-metilfenol	0.22	0.69	0.67	0.75
4-metilfenol	0.19	0.60	0.58	0.86

Por otro lado, y como es lógico, en el caso de los compuestos fenólicos cuya señal analítica con el electrodo de tirosinasa es nula o muy pequeña, con el electrodo bienzimático se obtiene una intensidad de corriente en el estado estacionario similar a la obtenida con el electrodo de peroxidasa.

Cuando se emplea el biosensor bienzimático sin peróxido de hidrógeno en disolución, las respuestas amperométricas son similares a las que se obtienen con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa, como era de esperar, ya que la peroxidasa sólo es capaz de oxidar los compuestos fenólicos tras haber reaccionado con el peróxido.

Además de la intensidad de respuesta, debe mencionarse otro aspecto, como es la velocidad de dicha respuesta, es decir, el tiempo que tarda el electrodo bienzimático en alcanzar el estado estacionario. En los apartados IV.2.3 y IV.4.5 se discutió el tiempo necesario para que distintos sustratos fenólicos alcanzaran dicho estado estacionario con los electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa y de grafito-Teflón-peroxidasa, respectivamente. En la Figura 125 se comparan los tiempos de respuesta del electrodo bienzimático con los de los otros dos biosensores.

El tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario con el electrodo bienzimático es sensiblemente menor que el requerido con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr, siendo también menor, en muchos casos, que con el electrodo de grafito-Teflón-HRP. Este hecho parece ser consecuencia de la acción del peróxido de hidrógeno sobre la tirosinasa. Algunos autores (Cosnier et al., 1996; Jolley et al., 1974; Eikman et al., 1978) han puesto de manifiesto que el peróxido de hidrógeno provoca un aumento de la forma oxi de la tirosinasa (forma más oxidada de la enzima), que es la que está involucrada en la ortohidroxilación del fenol y su posterior oxidación a quinona mediante la reacción enzimática correspondiente. Por tanto, el peróxido de hidrógeno acelera una de las etapas de la reacción de la enzima con los monofenoles, que es la responsable del "lag phase" o fase de retardo comentada en el apartado IV.2.6, por lo que, el tiempo de respuesta es menor.

Para los compuestos que sólo responden con el sistema H_2O_2 -HRP, la respuesta es aproximadamente igual de rápida con el electrodo bienzimático y con el de peroxidasa, ya que, como es lógico, la respuesta en el electrodo con ambas enzimas se debe exclusivamente a la acción de la peroxidasa. Sin embargo, para los compuestos cuya señal amperométrica con la tirosinasa es apreciable, el tiempo de respuesta disminuye mucho cuando se realizan las medidas con el electrodo bienzimático en presencia de peróxido de hidrógeno, por las razones comentadas anteriormente.

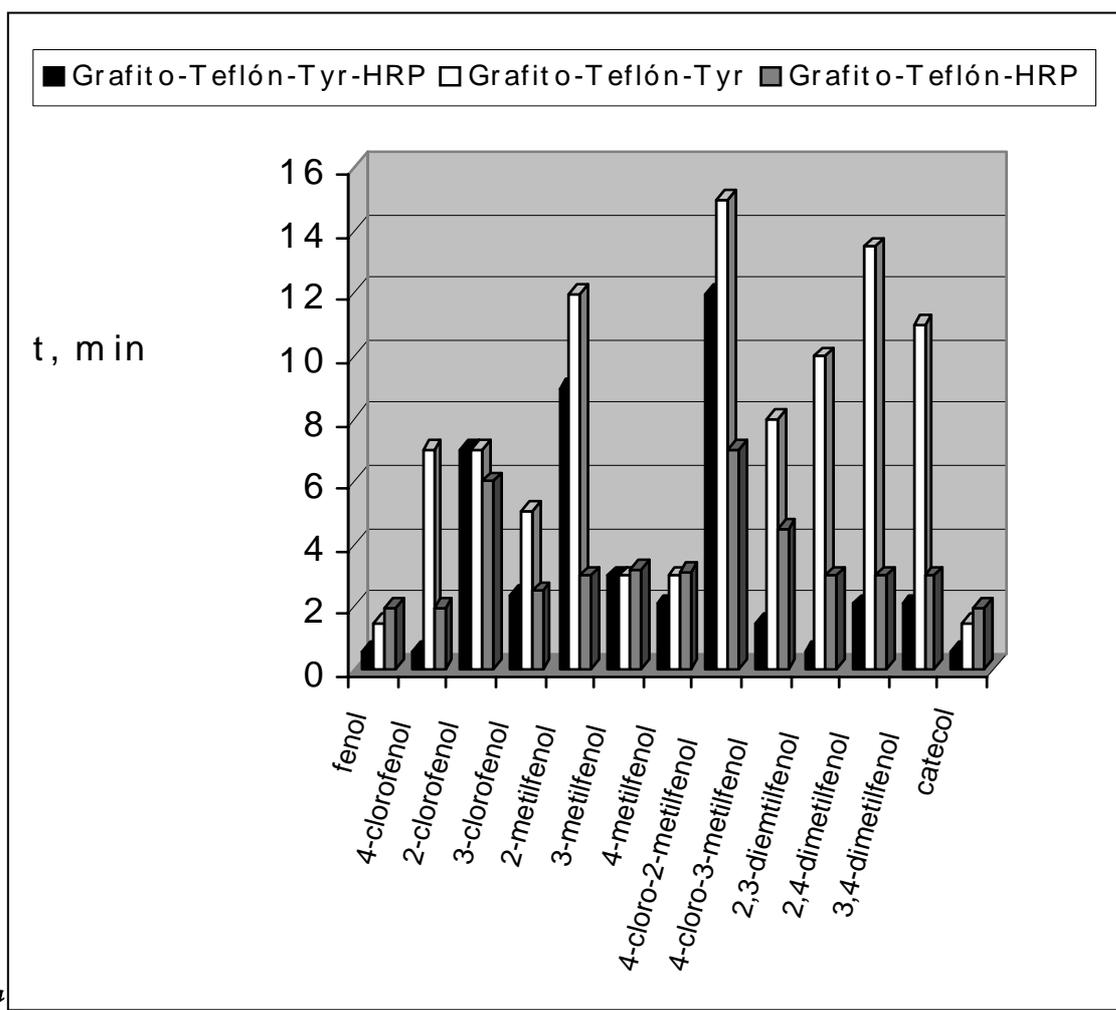


Figura 1. Respuesta de los electrodos de grafito-teflón-*tyr* y grafito-teflón-*tyr*-*hrp* para distintos sustitutos fenólicos.

Teflón-Tyr

Hay que destacar que el electrodo bienzimático presenta una respuesta más rápida para los fenoles que el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa, aun en ausencia de peróxido de hidrógeno. Esto sólo ocurre tras haber sumergido al menos una vez al electrodo en una disolución que contiene peróxido de hidrógeno, por lo que parece que el electrodo posee “efecto memoria” tras entrar en contacto con el H_2O_2 . Es decir, la forma oxi de la tirosinasa en la superficie del electrodo, formada debido a la presencia de peróxido de hidrógeno, permanece en medidas posteriores. Sin embargo, tras el pulido de la superficie electródica, la velocidad de la respuesta vuelve a ser la misma en ausencia de H_2O_2 que la del biosensor de tirosinasa.

IV.6.2. Electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa

A la vista de las mejoras que conlleva la inmovilización de las enzimas peroxidasa y tirosinasa en la matriz electrodo, y habida cuenta de que los electrodos de GOD-HRP han demostrado poseer un mejor comportamiento funcional que los de HRP para la detección de los compuestos fenólicos (principalmente en lo referido a la estabilidad del biosensor) se procedió a coinmovilizar las tres enzimas en la matriz de grafito-Teflón. Aunque se realizaron algunos estudios preliminares en discontinuo con objeto de evaluar la influencia del potencial, la repetibilidad de las medidas y su estabilidad, el objetivo fundamental fue el de evaluar el comportamiento del biosensor trienzimático en sistemas en flujo. Puesto que el valor de pH elegido fue el mismo para ambos sistemas enzimáticos por separado, se tomó este mismo valor (pH 6.5) para llevar a cabo las experiencias con el electrodo trienzimático.

IV.6.2.1. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario

El efecto del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP en discontinuo, se evaluó utilizando como sustrato fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, en presencia y en ausencia de glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 126. Las medidas en ausencia de glucosa se llevaron a cabo después de haber sumergido durante unos minutos el electrodo trienzimático en una disolución que contenía glucosa, aplicándose el mismo valor de potencial ensayado, con objeto de observar el efecto del peróxido de hidrógeno formado sobre la tirosinasa. Cuando no se realizó esta operación previa, la variación de la intensidad de corriente en estado estacionario con el potencial presenta la misma tendencia observada con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr.

Como puede apreciarse, tanto en presencia como en ausencia de glucosa, la i_{ss} permanece prácticamente constante para valores de potencial menores o iguales de 0.00 V , produciéndose una disminución progresiva a potenciales mayores. Se escogió, para estudios posteriores, un potencial aplicado de 0.00 V .

También puede observarse cómo la señal amperométrica es mayor con glucosa en disolución, lo que resulta lógico ya que de esta forma la concentración de peróxido de hidrógeno en la superficie del electrodo es mayor.

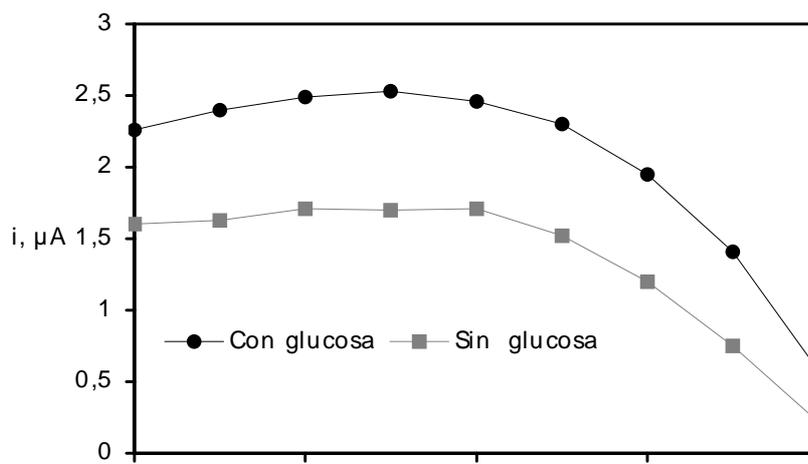


Figura 126. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP para fenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) sin y con glucosa 5.0×10^{-3} mol L^{-1}

IV.6.2.2. Estabilidad del electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP

Aunque la estabilidad de los electrodos de grafito-Teflón-Tyr y grafito-Teflón-GOD-HRP ya ha sido estudiada anteriormente, es necesario realizar este tipo de estudio de nuevo con el electrodo compuesto trienzimático, dado que las enzimas no tienen porqué permanecer inalteradas cuando se inmovilizan conjuntamente en una matriz. De hecho, se ha puesto ya de manifiesto que el peróxido de hidrógeno interacciona con la tirosinasa (apartado IV.6.1), por lo que la repetibilidad y estabilidad de la respuesta amperométrica puede variar.

IV.6.2.2.1. Repetibilidad de las medidas

La repetibilidad de la respuesta amperométrica en el estado estacionario con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP se evaluó realizando 10 medidas de disoluciones diferentes de fenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, en ausencia y en presencia de glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando un potencial de 0.00 V .

En la Tabla 61 se recogen los valores obtenidos para cada una de las medidas, su valor medio con el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05 y la desviación estándar relativa correspondiente.

Se observa una buena repetibilidad de las medidas tanto con glucosa en la disolución como sin ella, sin regeneración de la superficie electrodo por pulido.

Tabla 61. Intensidad de corriente en el estado estacionario para medidas sucesivas realizadas con el electrodo compuesto trienzimático sin regeneración de la superficie electrodo. Concentración de fenol: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) sin y con glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

MEDIDA	CON GLUCOSA			SIN GLUCOSA		
	$i, \mu\text{A}$	$i \text{ media}, \mu\text{A}$	RSD, %	$i, \mu\text{A}$	$i \text{ media}, \mu\text{A}$	RSD, %
1	1.78			1.30		
2	1.96			1.18		
3	1.90			1.14		
4	1.83			1.26		
5	1.92			1.30		
6	1.96	1.85 ± 0.07	5.1	1.16	1.29 ± 0.08	8.8
7	1.90			1.32		
8	1.66			1.50		
9	1.78			1.42		
10	1.83			1.33		

IV.6.2.2.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electrodo

Al igual que para el resto de los biosensores desarrollados en este trabajo, se realizaron 10 series de tres medidas tras pulir la superficie del electrodo después de cada serie, de disoluciones diferentes de fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. En la Tabla 62 se recogen los valores de las medidas obtenidos, así como la desviación estándar relativa de cada serie.

Tabla 62. Reproducibilidad de la señal amperométrica obtenida con el electrodo compuesto trienzimático después de pulir su superficie tras cada serie de tres medidas. Concentración de fenol: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) sin y con glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

MEDIDA	CON GLUCOSA			SIN GLUCOSA		
	$i, \mu\text{A}$	$i \text{ media}, \mu\text{A}$	RSD, %	$i, \mu\text{A}$	$i \text{ media}, \mu\text{A}$	RSD, %
1	1.78	1.73 ± 0.08	6.6	1.55	1.28 ± 0.09	9.8

2	1.76	1.18
3	1.83	1.11
4	1.52	1.26
5	1.90	1.25
6	1.75	1.16
7	1.82	1.24
8	1.66	1.45
9	1.64	1.20
10	1.64	1.37

Nuevamente, los valores de RSD obtenidos demuestran que las respuestas amperométricas son reproducibles tras someter al electrodo al proceso de pulido, lo que indica que es posible coinmovilizar de forma homogénea las tres enzimas en la misma matriz electrodo de grafito-Teflón.

IV.6.2.2.3. Estabilidad del electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP con el tiempo

Para llevar a cabo este estudio se realizaron tres medidas de fenol y de 4-clorofenol de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} a pH 6.5 con glucosa en concentración $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Los límites del gráfico de control se tomaron utilizando el mismo criterio que en los gráficos de control construidos para los electrodos enzimáticos anteriores. En la Figura 127 se muestra dicho gráfico de control para ambos sustratos fenólicos con el electrodo trienzimático. Las señales que aparecen en el gráfico son las que se obtuvieron tras pulir la superficie del electrodo, ya que de un día para otro se observaba una disminución drástica de la corriente en caso de no proceder a regenerar el biosensor. Como puede verse, las respuestas del electrodo para los dos compuestos fenólicos quedan incluidas dentro de los límites de control durante los siete primeros días, a partir del cual disminuyen por debajo del límite inferior, sin que puedan recuperarse por pulido.

Esta menor estabilidad del electrodo trienzimático con respecto al resto de biosensores enzimáticos desarrollados, se ha atribuido a la presencia del peróxido de hidrógeno, que si bien por un lado aumenta la velocidad de respuesta de la tirosinasa, por otro hace disminuir su tiempo de vida desactivando irreversiblemente la enzima a largo plazo (Coche Guerente et al., 2001).

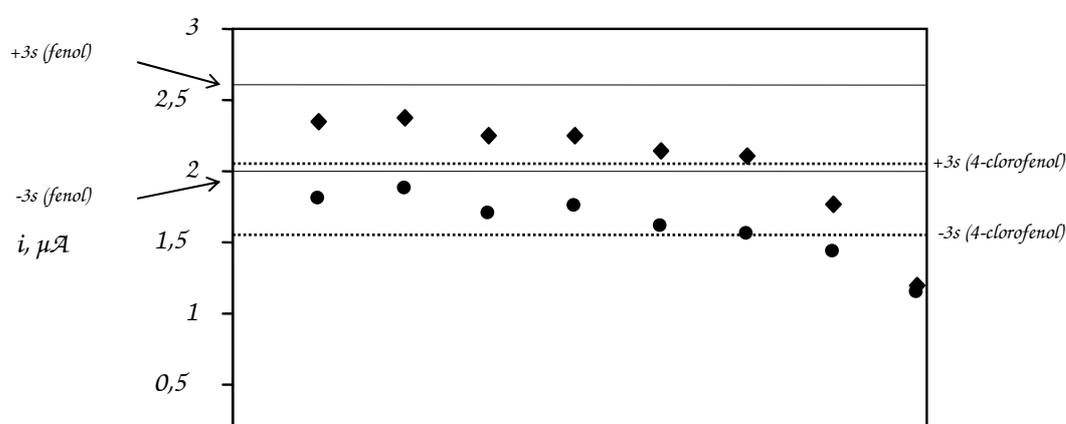


Figura 127. Gráfico de control construido para los valores medios correspondientes a tres medidas realizadas cada día con el electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP en disoluciones diferentes de fenol y 4-clorofenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Disolución de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) con $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.6.2.2.4. Reproducibilidad de las medidas efectuadas con diferentes electrodos

Para evaluar esta reproducibilidad se realizaron cinco medidas de disoluciones diferentes de fenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 sin y con $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa, con cuatro electrodos diferentes. En la Tabla 63 puede observarse que si bien los valores de desviación estándar relativa son algo más elevados que los obtenidos con los electrodos compósitos enzimáticos estudiados anteriormente, dichos valores son en ambos casos inferiores al 10%, lo que permite concluir que la reproducibilidad de las medidas que se obtuvieron con distintos electrodos fabricados de la misma manera, es aceptable.

Tabla 63. Intensidad de corriente en el estado estacionario obtenidas con 4 electrodos diferentes de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP. Fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ con y sin glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Electrodo	Con glucosa		Sin glucosa	
	$i, \mu\text{A}$	RSD, %	$i, \mu\text{A}$	RSD, %
1	1.8 ± 0.1	9.7	1.29 ± 0.06	8.0
2	2.04 ± 0.05		1.38 ± 0.08	
3	2.01 ± 0.06		1.54 ± 0.09	
4	1.78 ± 0.05		1.32 ± 0.08	

IV.6.3. Electrodo compósito de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa como detectores amperométricos en sistemas en flujo

IV.6.3.1. Optimización de variables experimentales

IV.6.3.1.1. Influencia del caudal

La influencia del caudal de la disolución portadora sobre los parámetros característicos del fiagrama (intensidad de pico, i_p , tiempo de desaparición del pico, t_d y anchura de pico a la semialtura, $w_{1/2}$) se evaluó sobre la detección amperométrica de fenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Se utilizó como disolución portadora el regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 que contiene glucosa $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. El volumen de inyección es fue $90 \mu\text{L}$, y el potencial aplicado de 0.00 V . En la Figura 128 se muestran los resultados obtenidos, de donde puede deducirse que el tiempo de desaparición del pico y la anchura del mismo son menores que los que se obtenían para caudales iguales con el resto de biosensores desarrollados en este trabajo. Este hecho se debe al efecto ya comentado del peróxido de hidrógeno (en este caso generado a partir de la reacción de la glucosa con la glucosa oxidasa) sobre la tirosinasa. El caudal elegido con en este sistema fue de 0.3 mL min^{-1} , al cual se obtuvieron respuestas amperométricas elevadas y picos estrechos.

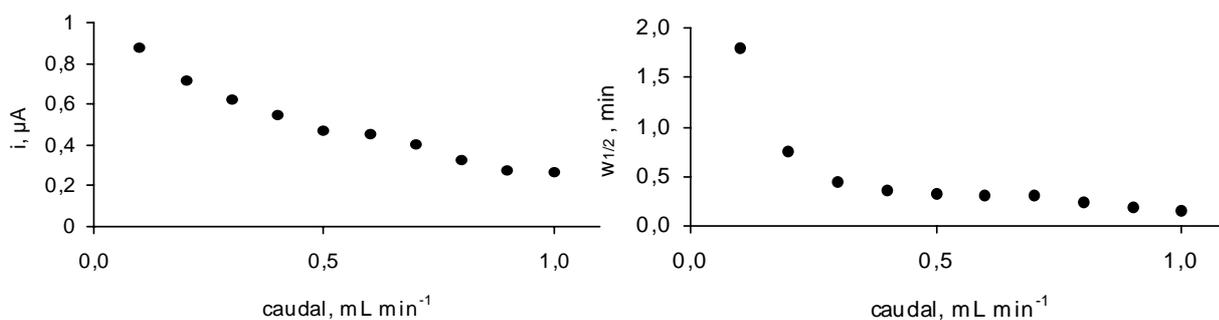


Figura 128. Influencia del caudal de la disolución portadora sobre i_p , $w_{1/2}$ y w_b . Portador: regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) y $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. $V_i = 90 \mu\text{L}$.

IV.6.3.1.2. Influencia de la concentración de glucosa en la disolución portadora

Se evaluó la influencia de la concentración de glucosa en el portador sobre la respuesta amperométrica del electrodo compósito de tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa a inyecciones de fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. La variación de la altura de pico FIA con la concentración de glucosa, que se muestra en la Figura 129, Permite decir que, a partir de una concentración de glucosa de $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, la intensidad del pico permanece prácticamente constante, de manera análoga a lo que ocurría con

el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP. Por lo tanto, dicha concentración de glucosa fue la utilizada en los estudios posteriores.

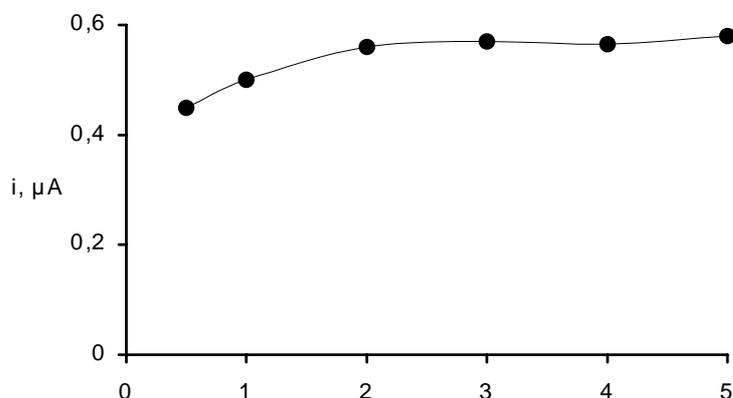


Figura 129. Influencia de la concentración de glucosa en la intensidad de pico para inyecciones de fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{ap}=0.00 \text{ V}$; $V_i=90 \mu\text{L}$; caudal: 0.3 mL min^{-1} .

IV.6.3.2. Repetibilidad de los picos FIA

Se procedió a evaluar la repetibilidad de la señal amperométrica para varios sustratos fenólicos (fenol, 3,4-dimetilfenol y 2,4,6-triclorofenol). Para ello, se realizaron inyecciones sucesivas del compuesto fenólico a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en la disolución portadora que contenía glucosa $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. En la figura 130 se muestran los diagramas obtenidos para 30 inyecciones de fenol. La desviación estándar relativa obtenida para las 30 medidas de disolución de la corriente de pico fue de 4.7%, lo que demuestra la buena repetibilidad de las medidas FIA con el biosensor trienzimático.

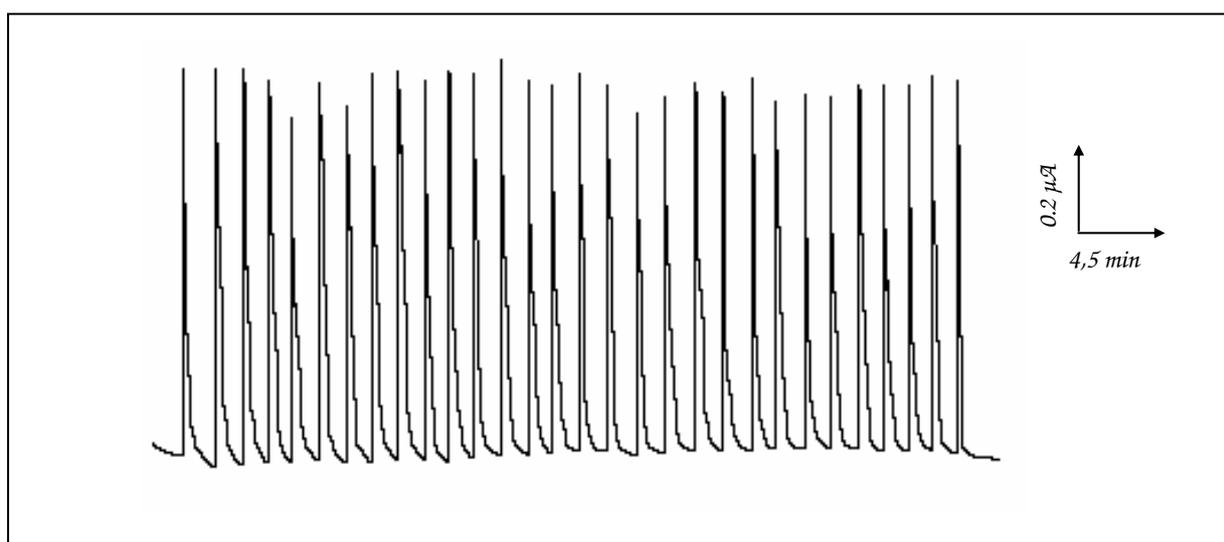


Figura 130. Respuestas amperométricas para inyecciones sucesivas de fenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando un electrodo compuesto de grafito-Teflón-tirosinasa-glucosa oxidasa-peroxidasa; Portador: regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) con $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa; Caudal: 0.3 mL min^{-1} ; $E_{ap}=0.00 \text{ V}$; $V_i=90 \mu\text{L}$.

En la Figura 131a se muestran los picos FIA obtenidos para inyecciones sucesivas de 3,4-dimetilfenol y de 2,4,6-triclorofenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Los valores de RSD obtenidos para las alturas de pico fueron 8.1% para el 2,4,6-triclorofenol, y 2.1% para el 3,4-dimetilfenol. Hay que mencionar que la respuesta del electrodo compuesto trienzimático para el triclorofenol proporciona picos algo más anchos y algo más sensibles que los obtenidos con el electrodo de glucosa oxidasa-peroxidasa. Si en lugar de utilizar un caudal de 0.3 mL min^{-1} , se emplea un caudal de 0.5 mL min^{-1} , las respuestas fueron muy similares a las que se obtuvieron con el electrodo bienzimático (Figura 131b), lo que pone de manifiesto la independencia del sistema glucosa-GOD-HRP del sistema Tyr. Por otro lado, las respuestas obtenidas con el electrodo trienzimático para el 3,4-dimetilfenol son algo menores que con el electrodo de tirosinasa (Figura 131b), si bien los picos son bastantes más estrechos, al igual que ocurre con el fenol.

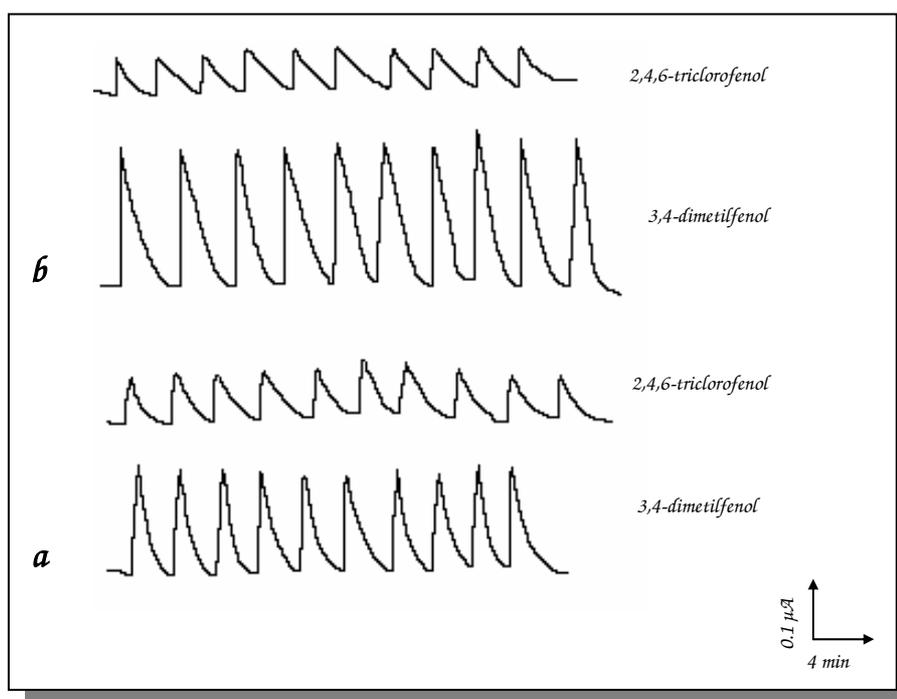


Figura 131. (a) Diagramas obtenidos para inyecciones sucesivas de 2,4,6-triclorofenol y 3,4-dimetilfenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ con un electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP utilizando una disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) que contiene $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa. Caudal: 0.3 mL min^{-1} ; $V_i = 90 \mu\text{L}$ $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.
 (b) Diagrama obtenido para inyecciones sucesivas de 2,4,6-triclorofenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ con un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP utilizando una disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) que contiene $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa. Caudal: 0.5 mL min^{-1} ; $V_i = 90 \mu\text{L}$ $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$, y para inyecciones sucesivas de 3,4-dimetilfenol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ con un electrodo de grafito-Teflón-Tyr utilizando una disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5). Caudal: 0.5 mL min^{-1} ; $V_i = 90 \mu\text{L}$ $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

IV.6.3.3. Curvas de calibrado y características analíticas

Con objeto de comparar las características analíticas que se han obtenido con el electrodo de Tyr-GOD-HRP, con las que se obtuvieron con los electrodos de Tyr y GOD-HRP por separado, se construyeron los calibrados para el fenol, 3,4-dimetilfenol y 2,4,6-triclorofenol que se representan en la Figura 132.

En las Tablas 64 y 65 se resumen las características de los calibrados, así como los valores de los límites de detección y cuantificación calculados para los tres fenoles, comparándose con los que se obtuvieron con los electrodos compósitos de tirosinasa y de glucosa oxidasa-peroxidasa.

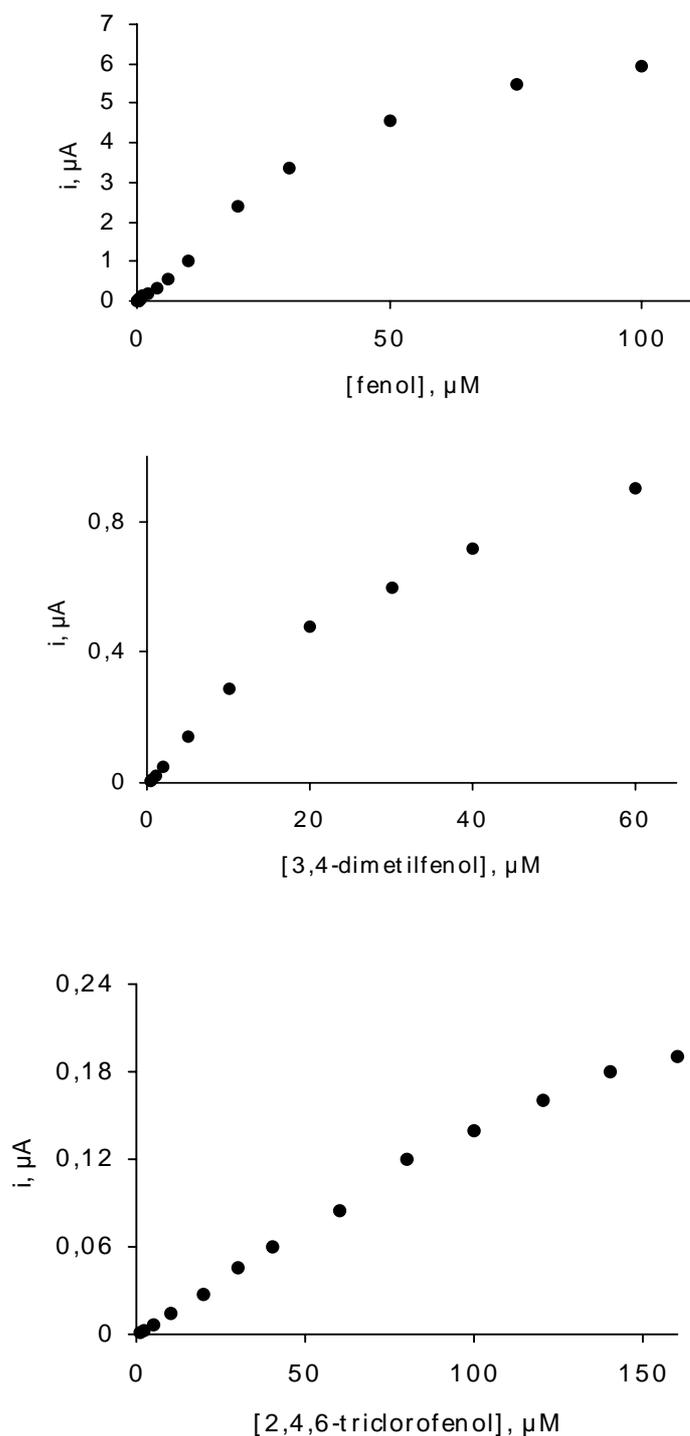


Figura 132. Curvas de calibrado para el fenol, 3,4-dimetilfenol y 2,4,6-triclorofenol obtenidas con un electrodo de grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP como detector en flujo aplicando un potencial constante de 0.00 V. Portador: regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ de pH 6.5 con 2.0x10⁻³ mol L⁻¹ de glucosa; caudal: 0.3 mL min⁻¹; V_i=90 μL.

Como puede apreciarse, con el electrodo trienzimático se obtienen características analíticas iguales o mejores que las obtenidas con los electrodos mono y bienzimático. Por otro lado, se ha comprobado que la coinmovilización de las tres enzimas en la matriz electrodica, permite obtener respuestas para todos los compuestos fenólicos estudiados. Por el contrario, el tiempo de vida útil del biosensor disminuye sensiblemente como consecuencia de la acción del peróxido de hidrógeno sobre la tirosinasa.

Tabla 64. Características de los calibrados obtenidos mediante inyección en flujo con detección amperométrica para distintos sustratos fenólicos, utilizando biosensores de:

- (1) grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP
- (2) grafito-Teflón-Tyr
- (3) grafito-Teflón-GOD-HRP

		INTERVALO LINEAL, mol L ⁻¹	PENDIENTE, μA L mol ⁻¹	O.O., μA	r
Fenol	1	(0.1-30)x10 ⁶	1140000 ± 3000	(4 ± 2)x10 ²	0.9977
	2	(0.1-400)x10 ⁶	85000 ± 2000	(3 ± 3)x10 ²	0.9975
	3	(0.1-1.0)x10 ⁵	1610 ± 20	(6 ± 1)x10 ³	0.9993
2,4,6-triclorofenol	1	(0.5-16)x10 ⁵	1280 ± 20	(2 ± 1)x10 ³	0.9994
	2	--	--	--	--
	3	(0.5-12)x10 ⁵	950 ± 30	(5.0 ± 0.8)x10 ³	0.9993
3,4-dimetilfenol	1	(0.4-10)x10 ⁶	30000 ± 1000	(1 ± 2)x10 ²	0.9999
	2	(0.25-500)x10 ⁶	41800 ± 900	(2 ± 2)x10 ²	0.9981
	3	(0.1-10)x10 ⁵	990 ± 20	(3 ± 1)x10 ³	0.9987

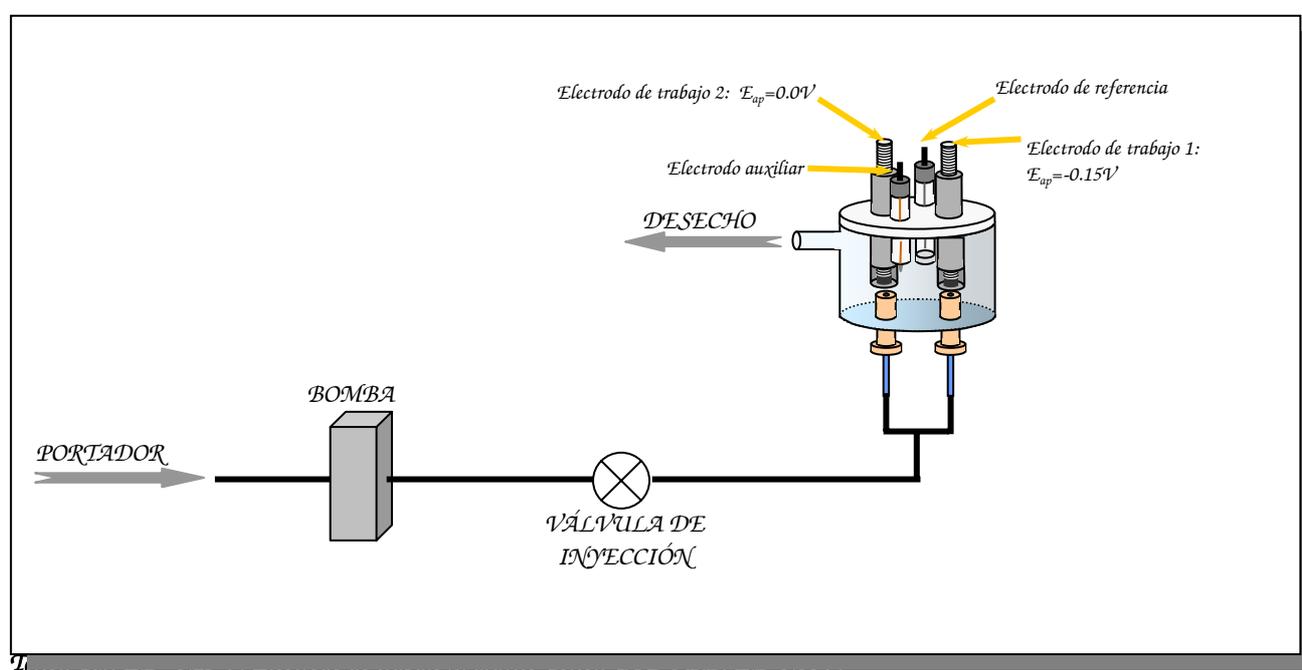
Tabla 65. Valores de los límites de detección y límites de cuantificación obtenidos para distintos sustratos fenólicos mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando biosensores de:

- (1) grafito-Teflón-Tyr-GOD-HRP
- (2) grafito-Teflón-Tyr
- (3) grafito-Teflón-GOD-HRP

		RSD, %	LD, mol L ⁻¹	LQ, mol L ⁻¹
Fenol	1	7.5	5.0x10 ⁸	1.7x10 ⁷
	2	6.6	5.2x10 ⁸	1.7x10 ⁷
	3	11.0	1.5x10 ⁶	5.0x10 ⁶
2,4,6-triclorofenol	1	12.1	9.1x10 ⁷	3.0x10 ⁶
	2	--	--	--
	3	18.2	1.3x10 ⁶	6.3x10 ⁶
3,4-dimetilfenol	1	6.7	8.1x10 ⁸	2.7x10 ⁷
	2	5.6	5.7x10 ⁸	1.9x10 ⁷
	3	8.6	1.4x10 ⁶	4.7x10 ⁶

***IV.7. Electrodos de grafito-Teflón-tirosinasa y
grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa en
paralelo***

En los capítulos precedentes se ha demostrado que la utilización de los biosensores de tirosinasa o de glucosa oxidasa-peroxidasa para la detección y determinación de compuestos fenólicos, presenta ciertas ventajas o inconvenientes dependiendo del electrodo enzimático empleado. Además, se ha visto que la coinmovilización de las tres enzimas en una misma matriz electrodica da lugar a una disminución de la estabilidad del biosensor, limitando su tiempo de vida útil. Se pensó que una manera de aunar las ventajas de ambos sistemas de detección, y al mismo tiempo evitar la pérdida de estabilidad provocada por la acción del peróxido de hidrógeno sobre la tirosinasa, era colocar en paralelo los biosensores de grafito-Teflón-Tyr y grafito-Teflón-GOD-HRP en una célula de flujo (Figura 133), y conectándolos a un detector multicanal (véase Parte Experimental). De esta forma, será posible obtener, con una sola inyección, las respuestas amperométricas correspondientes a cada electrodo enzimático por separado, sin que se produzcan los efectos indeseables de la coinmovilización de las tres enzimas.



Puesto que, con este sistema de detección, se efectuarán medidas con ambos biosensores por separado, las variables experimentales empleadas serán las mismas que las utilizadas con cada electrodo enzimático. Así, el potencial aplicado, la disolución portadora, la concentración de glucosa en dicha disolución, y el pH tendrán los mismos valores que los especificados anteriormente para el biosensor correspondiente. Sin embargo, dado que el sistema de flujo es diferente, puesto que el caudal se divide tras la inyección, fue necesario aumentar el valor del caudal hasta 1.0 mL min^{-1} , para conseguir que su división tuviera lugar de forma reproducible a través de los canales que acceden a los electrodos de trabajo.

Asimismo, para obtener señales FIA de magnitud similar a las que se obtuvieron con los biosensores de forma individual, se tuvo que emplear un bucle de inyección de $180 \mu\text{L}$ en el sistema FIA con los dos electrodos en paralelo.

IV.7.1. Repetibilidad de las señales analíticas

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se procedió a evaluar la repetibilidad de las señales amperométricas en flujo.

Para ello, se realizaron 10 inyecciones sucesivas de 180 μL de disoluciones de fenol, 3,4-dimetilfenol y 2,4,6-triclorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ que contenían también cada una de ellas $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa, en el portador de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 conteniendo glucosa al mismo nivel de concentración. La intensidad de corriente se midió simultáneamente en la superficie del electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa ($E_{ap} = -0.15 \text{ V}$) y del electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP ($E_{ap} = 0.00 \text{ V}$). En la Figura 134 se muestran los diagramas obtenidos para el fenol, y en la Tabla 66 se recogen los valores de intensidad de pico obtenidos en cada ensayo, su valor medio con el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05, y los valores de la desviación estándar relativa correspondientes.

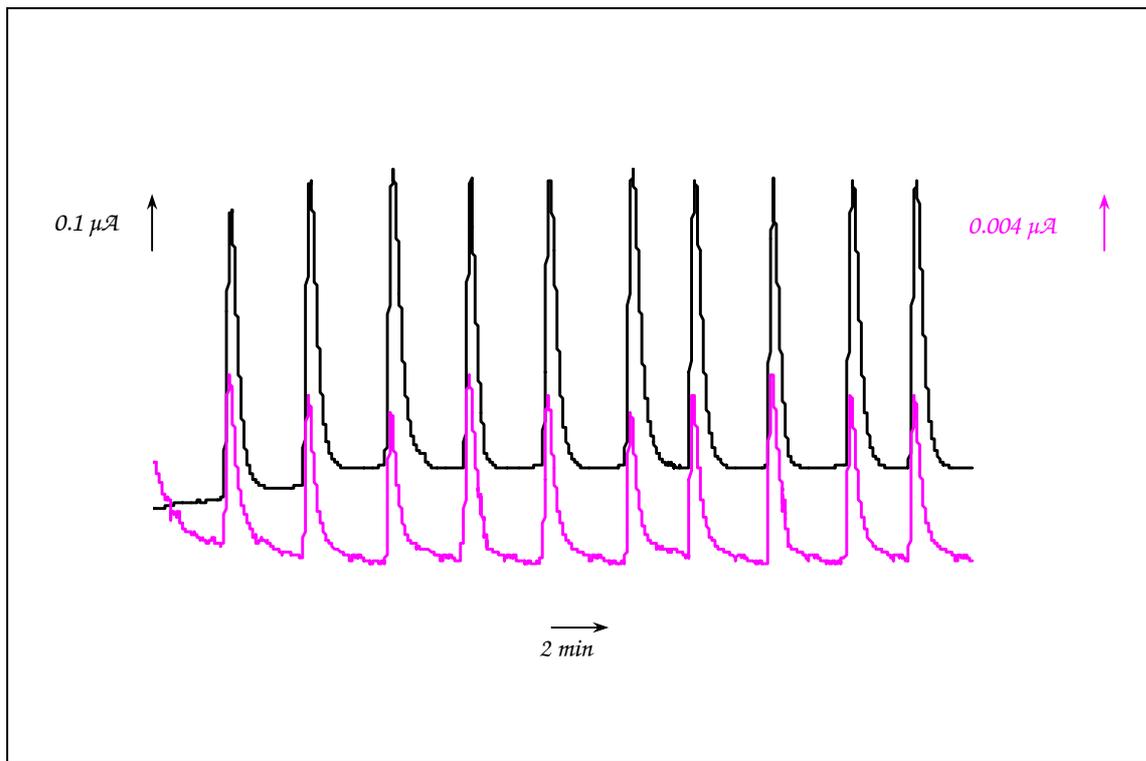


Figura 1. Señales de corriente en flujo con una célula de medida de dos canales. La señal negra es la que se obtiene con el electrodo de grafito-teflón-Tyr a un potencial aplicado de -0.15 V . La señal rosa es la que se obtiene con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP a un potencial aplicado de 0.00 V . Portador: regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 6.5) que contiene $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glucosa. $V_i = 180 \mu\text{L}$; caudal = 1.0 mL min^{-1} .

Como se puede observar, la reproducibilidad de las medidas obtenidas con ambos electrodos en paralelo es aceptable, lo que implica que la división del flujo se produce de forma reproducible.

Tabla 66. Valores de intensidad de pico obtenidos para inyecciones sucesivas de fenol, 3,4-dimetilfenol y 2,4,6-triclorofenol 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ realizadas en la disolución de regulador fosfato 0.05 mol L⁻¹ de pH 6.5 que contiene 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de glucosa. Electrodo de trabajo: grafito-Teflón-Tyr; $E_{ap} = -0.15$ V y grafito-Teflón-GOD-HRP; $E_{ap} = 0.00$ V.

MEDIDA	Grafito-Teflón-tirosinasa			Grafito-Teflón-GOD-HRP		
	fenol	3,4-dimetilfenol	2,4,6-triclorofenol	fenol	3,4-dimetilfenol	2,4,6-triclorofenol
	<i>i</i> , μ A			<i>i</i> , μ A		
1	0.54	0.20	--	0.011	0.0070	0.0066
2	0.57	0.22	--	0.011	0.0074	0.0060
3	0.56	0.19	--	0.0086	0.0071	0.0057
4	0.56	0.24	--	0.012	0.0073	0.0065
5	0.53	0.22	--	0.011	0.0071	0.0062
6	0.56	0.20	--	0.0086	0.0069	0.0060
7	0.54	0.21	--	0.010	0.0071	0.0065
8	0.55	0.19	--	0.012	0.0074	0.0059
9	0.54	0.18	--	0.011	0.0070	0.0062
10	0.55	0.20	--	0.011	0.0071	0.0062
<i>i</i> _{mediar} , μ A	0.55 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	--	0.011 \pm 0.002	0.0071 \pm 0.0001	0.0062 \pm 0.0002
RSD, %	2.2	8.5	--	10.9	2.4	4.7

IV.7.2. Curvas de calibrado y características analíticas

Con objeto de demostrar la validez, desde un punto de vista analítico, de la utilización de los dos biosensores compósitos de grafito-Teflón en paralelo en flujo, se construyeron curvas de calibrado obtenidas con cada electrodo, de forma simultánea. En la Figura 135 se muestran dichas curvas, y en la Tabla 97 se recogen sus características, así como los valores correspondientes de los límites de detección y cuantificación, calculados según los criterios mencionados anteriormente.

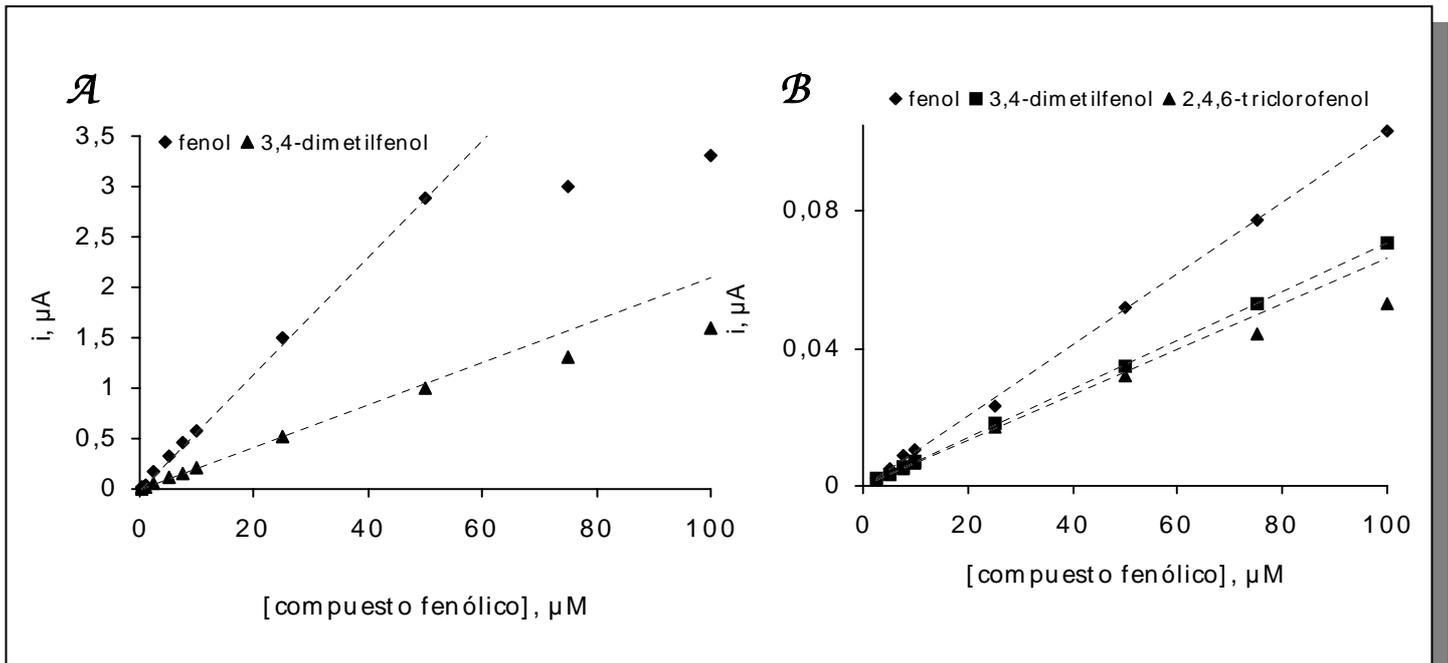


Figura 267. Curvas de calibración obtenidas con los electrodos de (A) grafito-TEFLÓN-TYR ($E_{ap}=0.0\text{ V}$) mediante análisis por inyección en flujo empleando ambos biosensores en paralelo. Portador: 0.05 mol L^{-1} de regulador fosfato a pH 6.5 con $2.0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ de glucosa. Caudal: 1.0 mL min^{-1} . $V_i=180\ \mu\text{L}$.

Aunque las pendientes de los calibrados obtenidos son algo menores, y los límites de detección calculados son ligeramente mayores, empleando esta metodología de medida, que los valores que se obtuvieron mediante inyección en flujo con cada electrodo por separado, puede decirse que las características analíticas para la detección de los fenoles ensayados son del mismo orden de magnitud en los dos casos. Las pequeñas diferencias observadas pueden atribuirse al diferentes sistema FIA utilizado.

Tabla 67. Características de las curvas de calibrado obtenidas mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando los dos biosensores compósitos de tirosinasa y glucosa oxidasa-peroxidasa en paralelo.

GRAFITO-TEFLÓN-TYR			GRAFITO-TEFLÓN-GOD-HRP		
fenol	3,4-dimetilfenol	2,4,6-triclorofenol	fenol	3,4-dimetilfenol	2,4,6-triclorofenol

<i>INTERVALO</i>						
<i>LINEAL,</i> <i>mol L⁻¹</i>	$(0.25-50) \times 10^6$	$(0.25-50) \times 10^6$	---	$(1-100) \times 10^6$	$(2.5-100) \times 10^6$	$(5-60) \times 10^6$
<i>Pte,</i> <i>μA mol⁻¹ L</i>	58000 ± 1000	21000 ± 2500	---	1050 ± 30	702 ± 9	660 ± 10
<i>O.O., μA</i>	$(5 \pm 2) \times 10^2$	$(1 \pm 2) \times 10^2$	---	$(2 \pm 2) \times 10^3$	$(2 \pm 3) \times 10^3$	$(1 \pm 2) \times 10^3$
<i>r</i>	0.9973	0.9994	---	0.9974	0.9992	0.9985
<i>R.S.D., %</i>	5.9	8.9	---	8.3	7.4	9.3
<i>L.D., mol L⁻¹</i>	1.2×10^7	3.2×10^7	---	2.3×10^6	2.1×10^6	3.0×10^6
<i>L.Q., mol L⁻¹</i>	4.0×10^7	1.1×10^6	---	7.7×10^6	7.0×10^6	1.0×10^5

IV.8. Aplicación de los biosensores desarrollados al análisis de muestras reales

Todos los estudios que se han expuesto hasta el momento han demostrado que los biosensores compósitos desarrollados poseen características analíticas que los hacen adecuados para poder ser aplicados en la detección y determinación de compuestos fenólicos en diferentes tipos de muestras. No obstante, el análisis de muestras reales mediante el sistema FIA propuesto, en el cual el bolo de muestra alcanza el detector sin que se haya mezclado prácticamente con el portador, puede dar lugar a una respuesta amperométrica no faradaica debida al cambio de conductividad entre la disolución portadora y la muestra inyectada, si la naturaleza de ambas disoluciones es muy diferente (Figura 136). Esta respuesta no faradaica no puede ser diferenciada de la señal producida por los compuestos fenólicos objeto de análisis. En la metodología desarrollada en discontinuo, este problema no se produce o es despreciable, ya que el volumen de muestra inyectado es muy pequeño en comparación con el volumen de la disolución en la célula de medida, y la concentración de electrólito soporte es lo suficientemente alta como para minimizar o eliminar por completo la influencia de la inyección.

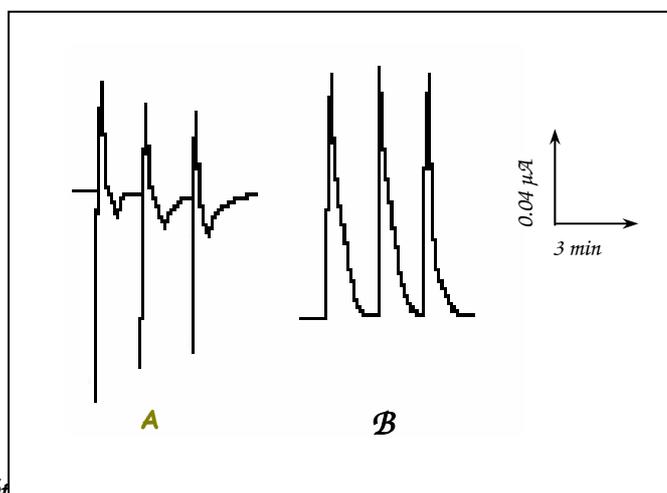


Figura 136. (A) Diagrama obtenido al realizar inyecciones de la misma muestra de agua residual que en (A) sobre portador consistente en el mismo agua residual sin fenoles (véase siguiente párrafo) con un electrodo de grafito-Teflón-Tyr. (B) Diagrama obtenido al realizar inyecciones de la misma muestra de agua residual que en (A) sobre portador de regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5 con un electrodo de grafito-Teflón-Tyr.

El inconveniente observado para el análisis en flujo debido a la distinta naturaleza del portador y la muestra puede ser solucionado modificando el sistema FIA propuesto. Una posibilidad es la incorporación al sistema de un reactor de longitud y geometría adecuadas para que se produzca la dilución de la muestra hasta que la conductividad de ambas disoluciones se iguale, es decir, que la medida en el detector se realice en equilibrio químico. Sin embargo, esta opción tiene dos desventajas, el aumento considerable de los límites de detección del método al producirse la dilución y el aumento del tiempo de residencia del bolo de muestra en el sistema FIA, y por tanto, el aumento en los tiempos de análisis. Otra posibilidad es la eliminación de los compuestos fenólicos de la muestra, para utilizar ésta como portador. De esta forma se consigue una disolución portadora compatible con la muestra, eliminándose el cambio de conductividad que da lugar a la corriente no

faradaica que interfiere en la detección de los compuestos fenólicos. En este segundo caso no es necesario diluir la muestra, por lo que los límites de detección deben ser análogos a los obtenidos anteriormente.

Es importante que dicha eliminación de los compuestos fenólicos de la muestra se lleve a cabo en continuo, con objeto de evitar su manipulación y poder implementar el sistema en flujo para la detección de los analitos "in situ". Esto puede realizarse mediante la colocación de un cartucho relleno con un material adsorbente adecuado para la retención de compuestos fenólicos antes de la válvula de inyección del sistema (Figura 136). Esta solución proporciona la disolución portadora óptima para cualquier muestra, ya que su matriz es la misma, y además permite utilizar el cartucho como sistema de preconcentración para poder realizar análisis cualitativos y cuantitativos posteriores de los compuestos fenólicos, una vez detectada su presencia en la muestra, como se verá más adelante.

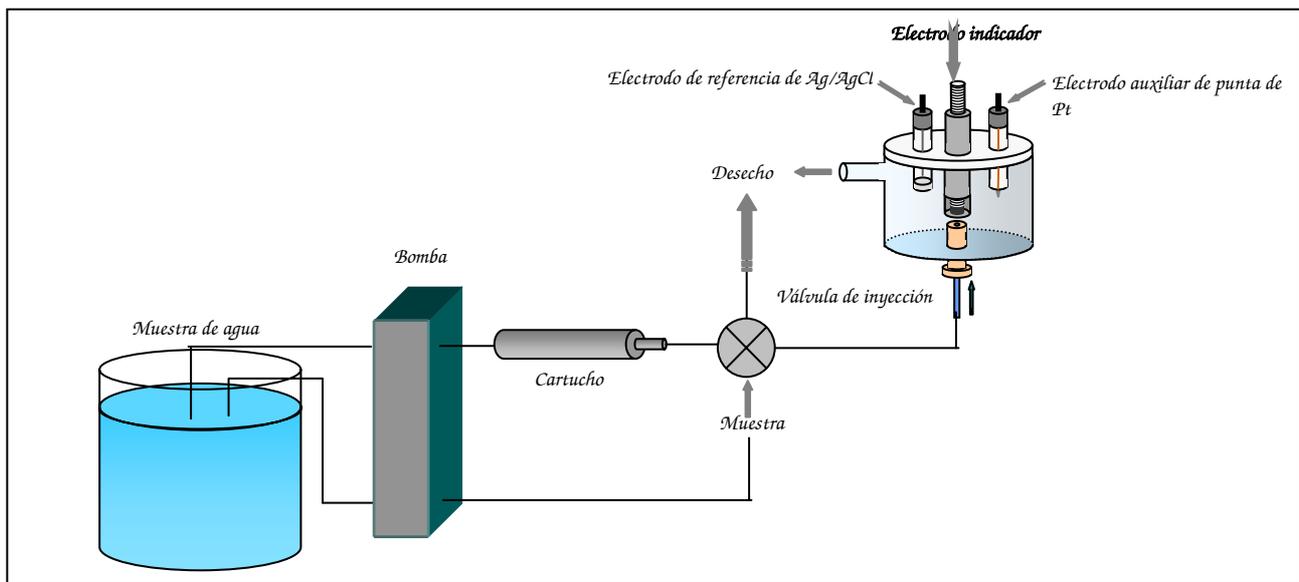


Figura 136. Diseño experimental para el análisis de compuestos fenólicos en aguas mediante análisis por inyección en flujo.

IV.8.1. Elección del material adsorbente para la eliminación en línea de los compuestos fenólicos contenidos en la muestra

Tradicionalmente, los materiales adsorbentes más utilizados para la extracción en fase sólida de fenoles en muestras acuosas han sido fases apolares, como C_8 y C_{18} (Shoup y Mayer, 1982; Nielsen, 1984; Janda y Van Lagenhove, 1989), aunque recientemente ha aumentado el uso de cartuchos poliméricos basados en estireno y divinilbenceno, puesto que proporcionan mayores recuperaciones (Puig y Barceló, 1995; Trochimczuk et al., 2001). Con objeto de verificarlo, se procedió a comparar los adsorbentes de C_{18} y de polímero de estireno y divinilbenceno.

Para ello, se escogió agua de grifo enriquecida con fenol como primera muestra, y agua de grifo enriquecida con 3,4-dimetilfenol como segunda muestra, con objeto de poder comparar la retención de compuestos fenólicos de distinta polaridad. Las muestras se prepararon con una concentración de compuesto fenólico de $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Las medidas se llevaron a cabo empleando el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa como detector, puesto que la retención de los fenoles en el cartucho no depende, lógicamente, del biosensor empleado.

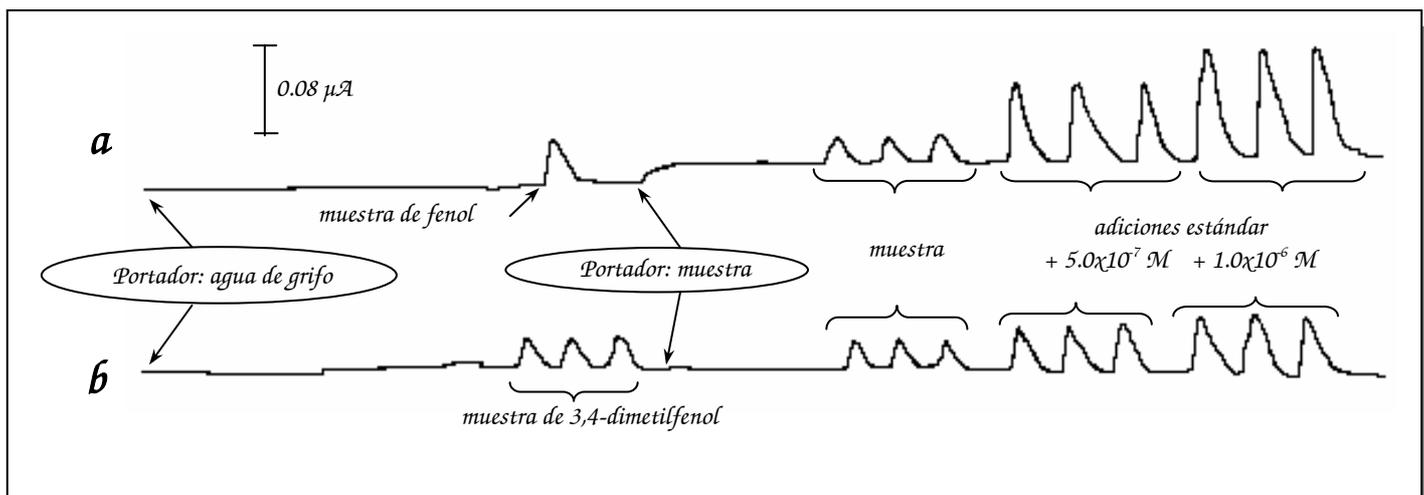
En primer lugar se evaluó la retención de los compuestos fenólicos sobre adsorbentes de C_{18} . Tras proceder al acondicionamiento del cartucho (apartado III.3.16), éste se sitúa en el sistema de FIA como se esquematiza en la Figura 136. Mediante una bomba peristáltica se hace pasar agua de grifo a través del cartucho para llegar posteriormente al detector. A intervalos de tiempo adecuados se realizó una inyección de una muestra sintética constituida por fenol o 3,4-dimetilfenol $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ en el agua de grifo. Una vez obtenidos los picos FIA, se cambió la disolución portadora de agua de grifo por la muestra sintética, se hizo pasar ésta a través del cartucho y se realizaron inyecciones de la misma muestra y de la muestra enriquecida con mayores cantidades de compuesto fenólico (fenol o 3,4-dimetilfenol, según el caso), con el fin de poder llevar a cabo su determinación por el método de adiciones estándar. Estos experimentos se realizaron para las dos muestras mencionadas utilizando dos cantidades diferentes de adsorbente en el cartucho (1.0 y 3.0 g) y caudales que oscilaban entre 0.1

y 0.5 mL min^{-1} . Los resultados que se obtuvieron se recogen en la Tabla 68. En ella, los valores de la concentración que se dan corresponden a los calculados mediante adiciones estándar, cuando se inyecta la muestra empleando la misma (tras pasar por el cartucho) como disolución portadora. A modo de ejemplo, en la Figura 137 se muestran los diagramas de algunos de los experimentos realizados.

En la Figura 137 se observa cómo para el fenol, la línea base aumenta cuando se realiza el cambio de portador de agua de grifo a la muestra sintética, obteniéndose una concentración menor que la real, con errores comprendidos entre el 22% y el 30% dependiendo del caudal y de la cantidad de sorbente empleados. Estos resultados ponen de manifiesto que el cartucho no era capaz de retener el fenol eficazmente, por lo que éste alcanza el detector y provoca el aumento de la línea base, lo que hace que los picos FIA obtenidos para la muestra inyectada sean menores. Los valores de la Tabla 68 permiten deducir que la retención del fenol era ineficaz aun cuando se triplicase la cantidad de adsorbente, por lo que la falta de retención no es consecuencia de una saturación del cartucho. Asimismo, tampoco se obtiene una retención eficaz cuando se utilizó un caudal bajo, por lo que dicha retención no depende de la velocidad de paso de la disolución, sino que está limitada por el reparto del fenol entre ambas fases.

Tabla 68. Análisis de muestras sintéticas de fenol y 3,4-dimetilfenol mediante inyección en flujo con detección amperométrica con el biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa utilizando un cartucho de C_{18} para la eliminación de fenoles del portador.

	[fenol], mol L ⁻¹ (E_r , %)		[3,4-dimetilfenol], mol L ⁻¹ (E_r , %)	
	1 g	3 g	1 g	3 g
0.1 mL min ⁻¹	3.7×10^{-7} (26)	3.8×10^{-7} (24)	4.9×10^{-7} (2)	5.0×10^{-7} (0)
0.25 mL min ⁻¹	3.65×10^{-7} (27)	3.9×10^{-7} (22)	4.85×10^{-7} (3)	5.1×10^{-7} (2)
0.5 mL min ⁻¹	3.5×10^{-7} (30)	3.7×10^{-7} (26)	5.1×10^{-7} (2)	4.9×10^{-7} (2)



mol L⁻¹ y (b) 3,4-dimetilfenol 5.0×10^{-7} mol L⁻¹ en agua de grifo utilizando un cartucho de C_{18} (3.0 g) para la eliminación de fenoles del portador. Caudal: 0.1 mL min^{-1} ; $V_i = 90 \text{ μL}$; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$.

Sin embargo, cuando la muestra analizada contenía 3,4-dimetilfenol, la retención era eficaz en todos los casos. Esta diferencia de comportamiento debe atribuirse a la diferente polaridad de los compuestos fenólicos. Así, el fenol metilado es más apolar, y tiene una mayor afinidad por la fase estacionaria.

Como ya se ha dicho, se evaluó también la capacidad de retención de compuestos fenólicos de los cartuchos comerciales de copolímeros de estireno(divinilbenceno). Para ello, se prepararon muestras sintéticas de fenol y 3,4-dimetilfenol, a niveles de concentración de 5.0×10^{-7} y de 1.0×10^{-5} mol L^{-1} , en agua de grifo. En la Figura 138 se muestran, a modo de ejemplo, los diagramas obtenidos en uno de los ensayos realizados. En la Tabla 69 se recogen los resultados para estas muestras sintéticas empleando cartuchos con 1.0 g de SDB con diferentes caudales. Como puede observarse, este tipo de cartuchos permite retener eficazmente ambos sustratos a los dos niveles de concentración ensayados y a todos los valores de caudal empleados.

Tabla 69. Análisis de muestras sintéticas de fenol y 3,4-dimetilfenol mediante inyección en flujo con detección amperométrica con el biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa utilizando un cartucho de SDB para la eliminación de fenoles del portador.

	[fenol], mol L^{-1} (E_p , %)		[3,4-dimetilfenol], mol L^{-1} (E_p , %)	
	5.0×10^{-7} mol L^{-1}	1.0×10^{-5} mol L^{-1}	5.0×10^{-7} mol L^{-1}	1.0×10^{-5} mol L^{-1}
0.1 mL min^{-1}	4.9×10^{-7} (6)	1.1×10^{-5} (10)	5.1×10^{-7} (2)	0.95×10^{-5} (5)
0.25 mL min^{-1}	5.05×10^{-7} (1)	1.0×10^{-5} (0)	4.9×10^{-7} (2)	0.9×10^{-5} (10)
0.5 mL min^{-1}	5.0×10^{-7} (0)	0.95×10^{-5} (5)	5.0×10^{-7} (0)	1.0×10^{-5} (0)
1.0 mL min^{-1}	5.1×10^{-7} (2)	0.9×10^{-5} (10)	4.95×10^{-7} (1)	1.1×10^{-5} (10)

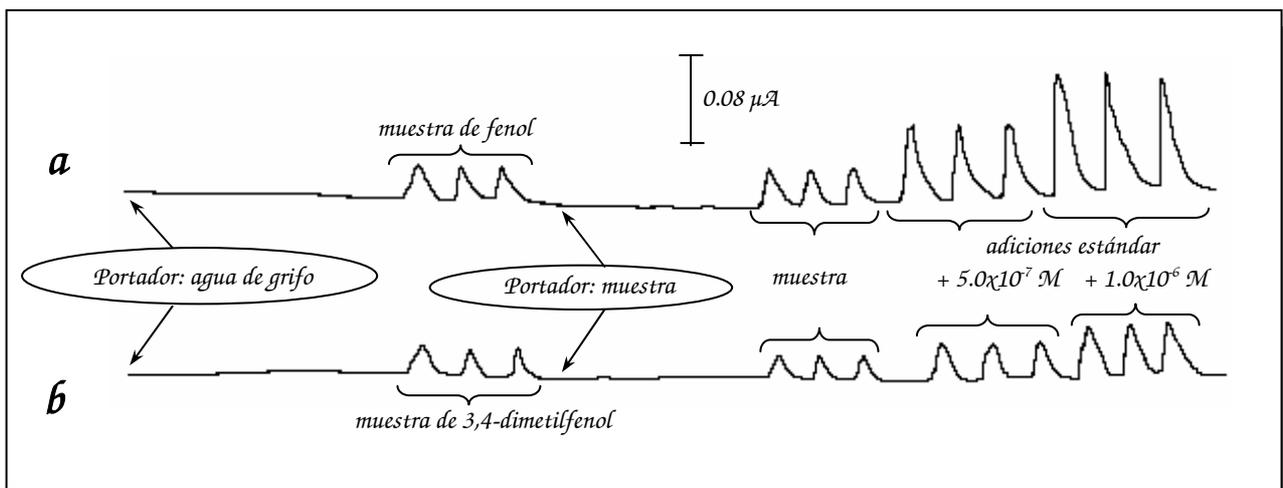


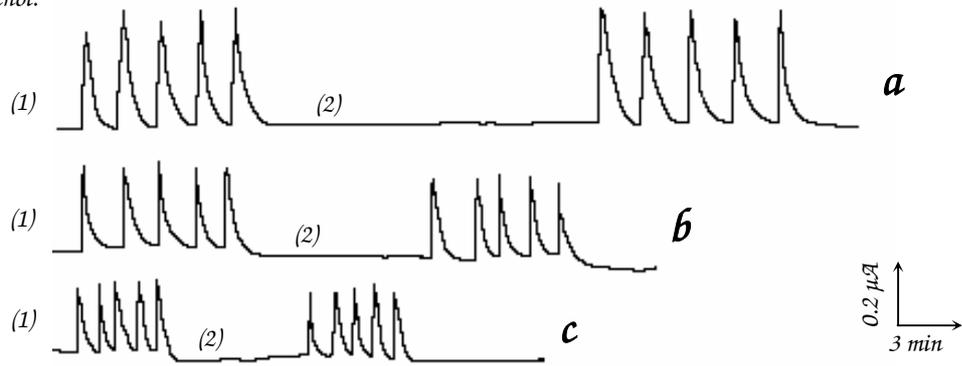
Fig. 138. Diagramas de inyección en flujo amperométrica de (a) fenol 5.0×10^{-7} mol L^{-1} y (b) 3,4-dimetilfenol 5.0×10^{-7} mol L^{-1} en agua de grifo utilizando un cartucho de SDB para la eliminación de fenoles del portador. Caudal: 0.1 mL min^{-1} ; $V_i = 90 \mu L$; $E_{ap} = -0.15 V$.

Es evidente que los cartuchos que contienen adsorbentes apolares, como son los de C_{18} , son apropiados para retener fenoles apolares. En estos casos, la retención de dichos compuestos se produce como consecuencia de interacciones hidrofóbicas débiles debidas a fuerzas de van der Waals. Estas interacciones son mucho más débiles en el caso de fenoles más polares, como el fenol o el catecol, por lo que su retención sobre dicho material adsorbente es menor. Sin embargo, con los cartuchos poliméricos de estireno(divinilbenceno) se producen interacciones π - π entre el polímero y los fenoles (Puig y Barceló, 1995), que son más intensas con los compuestos fenólicos con alta capacidad de resonancia positiva (grupos nitro), o con los que contienen sustituyentes aceptores de electrones (por ejemplo, cloro). Por lo tanto, este tipo de material resulta ser más adecuado para un espectro más amplio de compuestos fenólicos, por lo que se escogió para llevar a cabo los análisis de las muestras reales, en las que, a priori, el tipo de fenoles que contienen es desconocido.

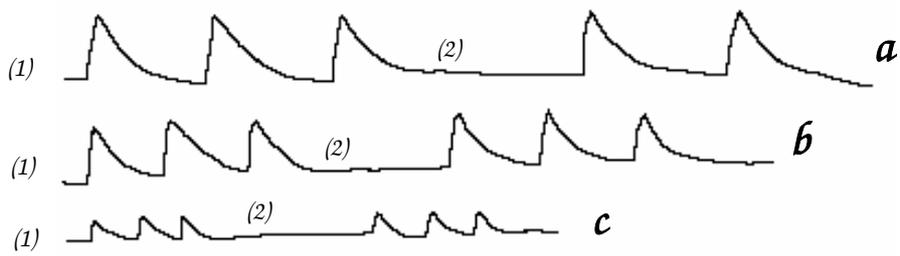
En la Figura 139 se muestran diagramas obtenidos a distintos caudales para inyecciones sucesivas de muestras sintéticas de fenol y de 3,4-dimetilfenol 1.0×10^{-5} mol L^{-1} , cuando se utiliza un cartucho de SDB para su eliminación del portador. Como puede verse, en todos los casos se obtuvo una muy buena estabilidad de la línea base.

La metodología que se ha expuesto anteriormente, consistente en la implementación en el sistema FIA de una columna de copolímero de estirenodivinilbenceno para la retención de compuestos fenólicos, se aplicó, en primer lugar, a muestras sintéticas que no presentaban una matriz complicada, como es el agua de grifo. En segundo lugar, se aplicó al análisis de muestras reales más complejas, como aguas industriales, y, más concretamente, los vertidos de una refinería de petróleo.

Fenol:



3,4- dimetileno:



F
ele

mL min⁻¹; (c) 1.0 mL min⁻¹. Cartucho: SDB, 1.0 g.

do el
0.50

IV.8.2. Evaluación del contenido en compuestos fenólicos en muestras sintéticas de agua de grifo

Con el fin de comprobar si la metodología desarrollada puede ser utilizada para proporcionar información sobre la presencia o ausencia de compuestos fenólicos en una muestra, se prepararon tres muestras sintéticas empleando agua de grifo como matriz. Cada una de las muestras se contaminó con tres compuestos fenólicos diferentes, escogidos por su distinta sensibilidad para cada uno de los biosensores desarrollados, y por su diferente polaridad. Por otra parte, se pretendió evaluar las posibles divergencias entre el valor calculado del contenido total en fenoles y el valor real de las muestras. Cada una de las muestras sintéticas se preparó a niveles de concentración diferentes, con objeto de averiguar la capacidad del cartucho de retener los compuestos fenólicos a esos distintos niveles de concentración. Las muestras que se prepararon fueron:

- Muestra I: 1.0×10^7 mol L^{-1} de fenol, 2.0×10^7 mol L^{-1} de 2,3-dimetilfenol y 5.0×10^7 mol L^{-1} de 3-clorofenol.
- Muestra II: 1.0×10^4 mol L^{-1} de 2,4-dimetilfenol, 1.0×10^5 mol L^{-1} de 4-cloro-3-metilfenol y 1.0×10^5 mol L^{-1} de 2,4,6-triclorofenol.
- Muestra III: 1.0×10^6 mol L^{-1} de fenol, 2.5×10^6 mol L^{-1} de 3,4-dimetilfenol y 1.0×10^6 mol L^{-1} de 4-cloro-2-metilfenol.

Todas las muestras se analizaron mediante el sistema FIA ya comentado, empleando como detector amperométrico cada uno de los biosensores desarrollados en este trabajo, en las condiciones experimentales optimizadas para cada uno de ellos. Sin embargo, la muestra II se analizó empleando la metodología en discontinuo, ya que la concentración de compuestos fenólicos es muy elevada, y, si bien no se produjo saturación del cartucho, era necesario diluir la muestra para que el valor de las concentraciones quedara incluido dentro del intervalo lineal del método FIA. No obstante, se pasó la muestra a través de un cartucho polimérico con el fin de evaluar la retención de los fenoles contenidos en dicha muestra, mediante un análisis posterior por CG-EM de los compuestos retenidos en el material adsorbente.

Midiendo en discontinuo, la muestra se diluye al ser inyectada directamente en la disolución de trabajo (regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5, en presencia o ausencia de glucosa según el caso), no observándose cambios en la línea base del amperograma cuando se inyectó una muestra blanco, esto es, sin compuestos fenólicos.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 70. Puede verse que el contenido total de fenoles estimado con todos los biosensores es siempre menor que el contenido real de las muestras. Esto es lógico, ya que se utilizó el fenol como compuesto de referencia, es decir, se empleó este compuesto como patrón para cuantificar dicho contenido mediante el método de adiciones estándar. El fenol es uno de los compuestos para los que se obtiene una respuesta más intensa con todos los biosensores, proporcionando el resto de fenoles que contienen las muestras respuestas amperométricas mucho menores, exceptuando el 4-cloro-3-metilfenol y el 3,4-dimetilfenol en los biosensores de tirosinasa. También puede apreciarse cómo el electrodo de glucosa oxidasa-peroxidasa proporciona resultados más cercanos al valor real que los obtenidos con los biosensores de tirosinasa, ya que la sensibilidad que se obtiene para los distintos sustratos fenólicos con el biosensor de GOD-HRP es menos variable que con los

de tirosinasa. Como es obvio, cuando el resultado se expresa en mg L^{-1} el error observado es mayor, ya que se multiplica por el peso molecular del fenol, cuyo valor es menor que el de los compuestos fenólicos sustituidos.

Por otra parte, la aplicación del método oficial de la 4-aminoantipirina a las mismas muestras, proporciona una estimación del contenido en fenoles que se aleja incluso más del valor real de las muestras que la dada con los biosensores, fundamentalmente con el de GOD-HRP. Además, con la 4-aminoantipirina, dicha estimación no es siempre menor que el valor real, como se observa con la muestra I. Este método también proporciona respuestas distintas para cada compuesto fenólico, ya que la unión con la 4-aminoantipirina va a ser diferente dependiendo de su estructura. Así, fenoles sustituidos en posición para- no reaccionan, o lo hacen en menor extensión, por tener impedida la posición más activada para la unión con el reactivo derivatizante. Tampoco presentan reacción los fenoles muy desactivados, como son los cloro- o nitrofenoles muy sustituidos (Box, 1983). Esto explica que en la muestra II, el valor estimado sea considerablemente menor que el real, ya que el método de la 4-aminoantipirina no puede detectar el 2,4-dimetilfenol, que es uno de los constituyentes de esta muestra, por tener un sustituyente alquílico en posición para.

Tabla 70. Análisis de muestras sintéticas de agua de grifo con biosensores amperométricos compósitos. $N=3$

Concentración total de fenoles en cada una de las muestras, mol L^{-1} (mg L^{-1})			
	Muestra I	Muestra II	Muestra III
Contenido real	8.0×10^{-7} (0.098)	1.2×10^{-4} (15.6)	4.5×10^{-6} (0.54)
Contenido estimado utilizando los biosensores amperométricos, mol L^{-1} (mg L^{-1})			
Grafito-Teflón-Tyr	$(2.2 \pm 0.5) \times 10^{-7}$ (0.021 ± 0.005)	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ (4.0 ± 0.2)	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ (0.27 ± 0.03)
Grafito-EPD-Tyr	$(3 \pm 1) \times 10^{-7}$ (0.03 ± 0.01)	$(6.1 \pm 0.1) \times 10^{-5}$ (5.73 ± 0.09)	$(4.0 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ (0.38 ± 0.02)
RVC-resina epoxi-Tyr	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-7}$ (0.017 ± 0.004)	$(6.47 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ (6.02 ± 0.007)	$(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-6}$ (0.24 ± 0.01)
Grafito-Teflón-GOD-HRP	$(5.1 \pm 0.8) \times 10^{-7}$ (0.048 ± 0.007)	$(8.6 \pm 0.3) \times 10^{-5}$ (8.1 ± 0.3)	$(4.1 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ (0.39 ± 0.04)
Electrodos en paralelo:			
Grafito-Teflón-Tyr	$(3.3 \pm 0.6) \times 10^{-7}$ (0.031 ± 0.006)	$(5.2 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ (4.9 ± 0.2)	$(3.2 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ (0.30 ± 0.03)
Grafito-Teflón-GOD-HRP	$(5.4 \pm 0.9) \times 10^{-7}$ (0.051 ± 0.008)	$(7.8 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ (7.3 ± 0.2)	$(3.9 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ (0.37 ± 0.05)
Contenido estimado con el método de la 4-AAAP, mol L^{-1} (mg L^{-1})			
	$(1.2 \pm 1.0) \times 10^{-6}$	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(2.5 \pm 0.8) \times 10^{-6}$

(0.18± 0.09)

(2.7±0.3)

(0.24±0.08)

Además, hay que comentar que este método colorimétrico requiere el uso de numerosos reactivos y grandes cantidades de cloroformo para llevar a cabo la extracción líquido-líquido del complejo formado entre la 4-aminoantipirina y los compuestos fenólicos. Asimismo, el tiempo de análisis es elevado y la metodología seguida no puede automatizarse ni adaptarse para la monitorización en línea e "in situ". En el caso de muestras con matrices más complejas que el agua de grifo es necesario destilar grandes volúmenes de muestra, del orden de 1 L, lo que supone, además del empleo de mucho tiempo, el aumento del riesgo de pérdidas de analito en el tratamiento de la muestra.

Por lo que se refiere a características analíticas como precisión y exactitud, en las especificaciones del método oficial se indican una precisión del 30% y una exactitud del 50%. En las muestras sintéticas de agua analizadas se han obtenido precisiones comprendidas entre el 13 y el 60%, y exactitudes entre un 44 y un 76%. Con los biosensores desarrollados se han obtenido valores de la precisión y de la exactitud entre el 1,9 y el 9,2% y el 36 y el 73%, respectivamente, con el electrodo de grafito-Teflón-tirosinasa, entre 0.7 y 14% y entre 11 y 63% con el electrodo de grafito-EPD-tirosinasa, y una precisión entre 0.5 y 9%, y una exactitud entre 44 y 78% para el electrodo de RVC-resina epoxi-tirosinasa. Con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP se obtuvieron valores para la precisión entre 1.4 y 6.3% y para la exactitud de entre 8.9 y 36%. Como puede verse, los valores de exactitud obtenidos con el método oficial y con los métodos desarrollados utilizando los biosensores compósitos resultan ser comparables, mientras que la precisión obtenida con los biosensores es considerablemente mejor.

Aunque, como es obvio, los métodos basados en los biosensores desarrollados sólo son capaces de dar una estimación del contenido en compuestos fenólicos en las muestras, debido a la desigual respuesta de cada fenol, los resultados obtenidos demuestran que dicha estimación es comparable o incluso mejor que la que proporciona el método oficial. Además, puede realizarse para muestras con un contenido total de fenoles que varía en un intervalo muy amplio y cuya composición es muy variable, siendo posible obtenerla en unos pocos minutos, de forma sencilla y económica, lo que demuestra su aplicación potencial al "screening" de este tipo de compuestos "in situ".

Una vez realizado el análisis de las muestras con los diferentes biosensores, los cartuchos de estireno y divinilbenceno que se emplearon se secaron haciendo pasar aire a través, procediéndose después a la desorción de los fenoles retenidos eluyendo con 0.5 mL de diclorometano. La disolución obtenida se inyectó directamente en un cromatógrafo de gases, detectándose los fenoles presentes mediante espectrometría de masas según se describe en el apartado III.3.17. En los cromatogramas obtenidos (anexo II), puede verse cómo todos los fenoles que contenían las muestras están presentes, lo que comprueba la capacidad de retención de los cartuchos empleados, así como la posibilidad de su empleo para llevar a cabo un análisis cualitativo de dichos fenoles una vez obtenida una respuesta positiva con el o los biosensores enzimáticos amperométricos.

IV.8.3. Evaluación del contenido total en compuestos fenólicos en aguas de desecho de una refinería de petróleo

Como se ha comentado en la Introducción, la industria petroquímica es una fuente importante de contaminación medioambiental. Uno de los aspectos relacionados con dicha acción contaminante es la presencia de compuestos fenólicos en sus vertidos. La descarga de estos vertidos en efluentes acuosos es constante, por lo que se hace necesario un control continuo de estas descargas, con objeto de verificar que no se exceden los niveles máximos permitidos para este tipo de compuestos.

Con objeto de demostrar la utilidad de los biosensores desarrollados en este trabajo para el análisis continuo de este tipo de muestra, se evaluó el contenido en compuestos fenólicos en aguas procedentes de una refinería petrolífera. Las muestras se tomaron en diferentes etapas del proceso de purificación de las aguas: antes de ser enviadas al sistema de depuración, después de la salida del decantador físico (salida DAF), y después de la salida del decantador biológico (salida DB). Durante la etapa de purificación en la que el agua que proviene de rechazos de los procesos del crudo permanece en el decantador físico, la muestra sufre un proceso primario de tratamiento físico-químico, y los aceites son eliminados por flotación. En la etapa de tratamiento biológico, la muestra se somete a un tratamiento secundario utilizando microorganismos, plantas y lodos activados, donde se eliminan aceites y materia orgánica. Por lo tanto, los compuestos fenólicos son mayoritariamente eliminados durante esta segunda etapa, ya que en la primera sólo se elimina una pequeña fracción por adsorción sobre la materia sólida que se separa.

Las muestras recibidas en el laboratorio se tomaron a la salida del decantador físico y del decantador biológico en tres días diferentes (DAF 1, DAF 2, DAF 3, DB 1, DB 2 y DB 3). Además, se recibió una séptima muestra tomada antes de que las aguas residuales entraran en el sistema de depuración (SD). Las muestras se analizaron en el momento de ser recibidas, por lo que no fue necesario realizar un tratamiento previo de estabilización. Las muestras se analizaron mediante FIA, empleando como detectores tanto el electrodo de grafito-Teflón-Tyr, por ser el más estable de todos los desarrollados, como el de grafito-Teflón-GOD-HRP, por ser el que responde a un mayor número de fenoles. Los análisis se llevaron a cabo aplicando el método de adiciones estándar. Al igual que se hizo con las muestras sintéticas, se empleó en todos los casos fenol como el sustrato al que se refieren los contenidos del resto de compuestos. En la figura 140 se muestran los diagramas obtenidos para la muestra DB 3 utilizando como detector el biosensor de tirosinasa.

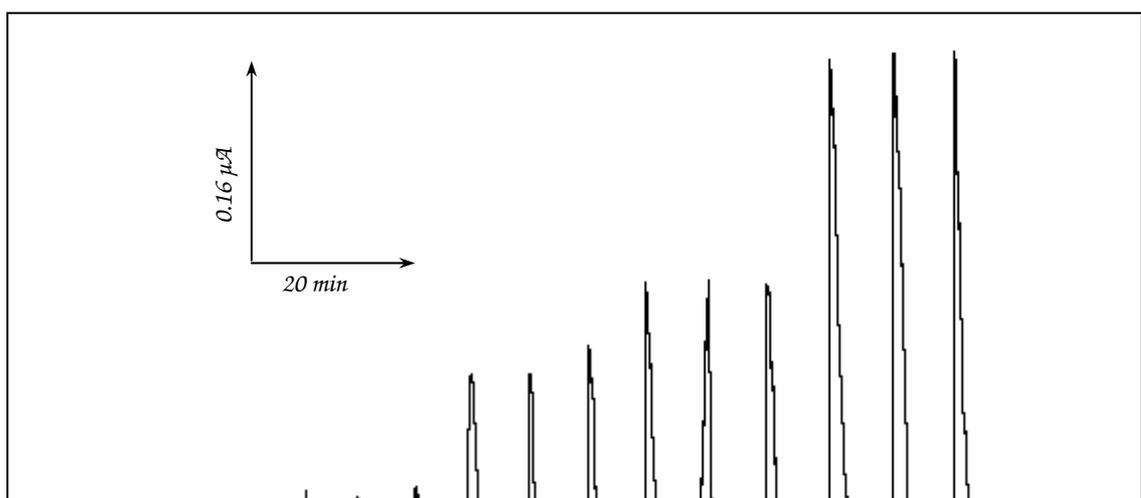


Figura 140. Diagramas obtenidos en el análisis de la muestra DB 3 utilizando como detector un electrodo compuesto de grafito-Teflón-tirosinasa y un cartucho de SDB para la eliminación de los compuestos fenólicos del portador. $E_{ap} = -0.15$ V; Caudal = 0.25 mL min^{-1} ; $V_i = 180$ μL .

Las muestras que contenían una mayor concentración de compuestos fenólicos (DAF 1, DAF 2 y SD) se analizaron en discontinuo mediante adiciones estándar. Esto se debe a que el contenido en compuestos fenólicos de dichas muestras es tan grande que la concentración total queda por encima del límite superior del intervalo de linealidad de la curva de calibrado obtenida por FIA. Obviamente, este problema puede resolverse mediante una dilución apropiada. Sin embargo, la utilización de la metodología en discontinuo permite un análisis directo de la muestra, simplemente inyectando con una micropipeta una alícuota en la célula electroquímica, lo que hace que dicho análisis sea más rápido. En la Figura 141 se muestra, a modo de ejemplo, una de las series de amperogramas obtenidos para la muestra SD.

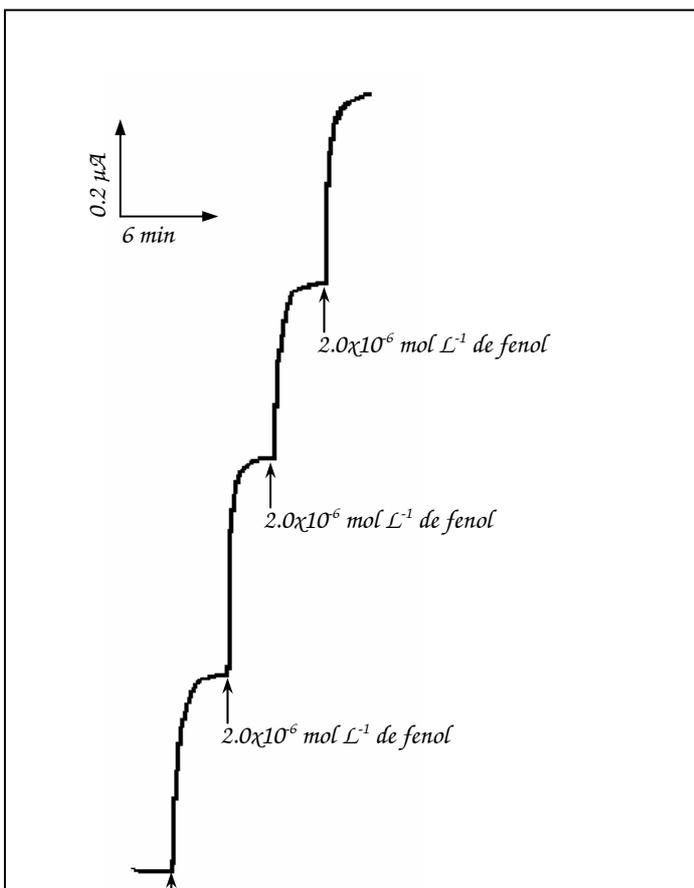


Figura 141. Registros intensidad-tiempo obtenidos en el análisis de la muestra de agua procedente de una refinería de petróleo antes de entrar en la depuradora, empleando un electrodo de grafito-Teflón-Tyr en regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 6.5. $E_{ap} = -0.15$ V.

En la Tabla 71 se recogen los resultados obtenidos cuando se analizan las muestras utilizando como detector los biosensores indicados, y se comparan con los resultados del método oficial de la 4-AAO. El contenido total de fenoles se expresa como concentración de fenol. Además, los fenoles retenidos en los cartuchos fueron extraídos siguiendo la metodología expuesta en el apartado III.3.18, y se procedió a su análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, con el fin de identificar los compuestos presentes en cada una de las muestras. Los cromatogramas, así como los espectros de masas, se muestran en el Anexo II.

En el caso de la muestra DAF 2, el contenido en compuestos fenólicos es intermedio, por lo que se realizó el análisis con el biosensor de tirosinasa y el de glucosa oxidasa-peroxidasa tanto en discontinuo y por inyección en flujo. Los resultados entre ambos análisis fueron comparables, si bien hay que señalar que el análisis en flujo se veía limitado por la capacidad del cartucho, ya que el contenido en grasas y compuestos aromáticos de esta muestra era tan elevado que a los pocos minutos el cartucho se saturaba, y perdía su capacidad de retención de fenoles (Figura 142). Esto no ocurre con ninguna de las otras muestras analizadas en flujo, a pesar de que las muestras estuvieron continuamente atravesando el cartucho durante horas. Por otro lado, la capacidad de carga de estos cartuchos es muy elevada, y experimentalmente hemos comprobado que el cartucho no se satura tras cinco horas haciéndose pasar una concentración de $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de fenol a un caudal de 0.5 mL min^{-1} , por lo que, nuevamente hay que recalcar la validez de estos cartuchos para este tipo de muestras.

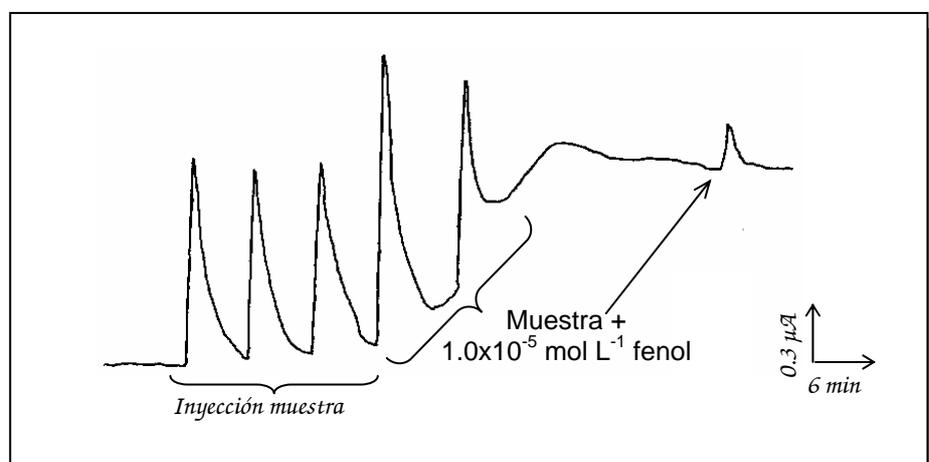


Figura 142. Registro intensidad-tiempo obtenido en el análisis de la muestra DAF 2 por inyección en flujo con detección amperométrica utilizando como electrodo de trabajo un biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa. Caudal: 0.25 mL min^{-1} ; $V_i = 90 \text{ µL}$; $E_{ap} = -0.15 \text{ V}$. Cartucho polimérico de SDB para la eliminación en línea de los compuestos fenólicos de la muestra.

Tabla 71. Contenido total de compuestos fenólicos en muestras de refinería de petróleo determinado con un biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa y con el método oficial. Se incluye los compuestos fenólicos identificados con el método de cromatografía de gases y espectrometría de masas. n=3.

	[fenoles], mol L ⁻¹ Biosensor de GOD- <i>H</i> RP	[fenoles], mol L ⁻¹ Biosensor de Tyr	[fenoles], mol L ⁻¹ Método oficial	Fenoles identificados con CG-EM
Muestra antes de entrar en refinería SD	(1.5±0.2)×10 ⁻³	(1.0±0.2)×10 ⁻³	(2±1)×10 ⁻³	Fenol, 2,6-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol
Muestra salida DAF 1	(2.0±0.1)×10 ⁻⁴	(2.1±0.1)×10 ⁻⁴	(3.5±1)×10 ⁻⁴	Fenol, 2-metilfenol, 4-metilfenol, 2-etilfenol, 3,4-dimetilfenol, 3,5-dimetilfenol
Muestra salida DAF 2	(2.6±0.1)×10 ⁻⁵ ** (2.7±0.1)×10 ⁻⁵ ***	(1.4±0.8)×10 ⁻⁵ ** (1.8±0.5)×10 ⁻⁵ ***	(2.5±0.8)×10 ⁻⁵	2,4-dimetilfenol, 2,5-dimetilfenol
Muestra salida DAF 3	(4.1±0.1)×10 ⁻⁶	(3.8±0.1)×10 ⁻⁶	(5.4±0.6)×10 ⁻⁶	3-etilfenol, 3-propilfenol, 4-isopropilfenol, 2-naftalenol, 4-alilfenol, 2,4-dimetilfenol, 2,6-dimetilfenol, 4-etil-3-metilfenol, 2-(1-metiletil)-5-metilfenol, 2,6-bis(1,1-dimetil)-4-metilfenol
Muestra salida DB 1	<l.d.	(5.3±0.9)×10 ⁻⁸	<l.d.	2,3-dimetilfenol
Muestra salida DB 2	<l.d.	<l.d.	<l.d.	2,6-dimetilfenol
Muestra salida DB 3	(1.8±0.1)×10 ⁻⁶	(1.4±0.1)×10 ⁻⁶	(5±1)×10 ⁻⁶	2-etilfenol, 3-etilfenol, 4-propilfenol, 4-alilfenol, 2,4-dimetilfenol, 2,6-dimetilfenol, 4-etil-2-metilfenol, 2-etil-5-metilfenol

* Contenido total de fenoles expresado como concentración de fenol.

** Análisis en discontinuo; *** Análisis en flujo.

En la figura 143 se muestra la comparación de los resultados obtenidos con los sensores de grafito-Teflón-Tyr y grafito-Teflón-GOD-*H*RP, con los que proporciona el método oficial de la 4-*AA*P. Como ya se ha mencionado, tanto el método oficial como los métodos desarrollados con los biosensores proporcionan en realidad un índice de fenoles, siendo las respuestas de cada compuesto fenólico diferentes en cada método. Por ello, dicho índice no puede ser igual, lo que lleva a valores de las pendientes distintos de 1. se observa que el método oficial proporciona un índice de fenoles mayor que el que se obtiene con ambos biosensores compósitos, ya que las pendientes son en ambos casos menores que la unidad.

A

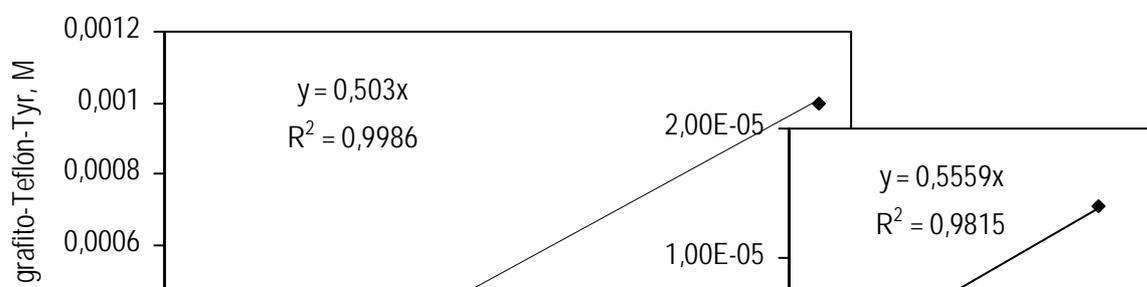


Figura 143. Comparación de los resultados de los análisis de las muestras de aguas procedentes de refinería obtenidos con (A) el biosensor de grafito-Teflón-Tyr, o (B) el biosensor de grafito-Teflón-GOD-HRP con los que proporciona el método colorimétrico oficial de la 4-aminoantipirina.

Por otro lado, se observa una buena correlación entre las estimaciones obtenidas con los dos biosensores y con el método oficial, lo que demuestra que los biosensores compósitos enzimáticos desarrollados proporcionan una estimación del contenido de fenoles comparable a la que proporciona el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina, siendo, por tanto, útil para la evaluación del contenido total de compuestos fenólicos en este tipo de muestras.

Puede concluirse, por tanto, que aunque sólo sea posible una estimación del contenido real de compuestos fenólicos en la muestra, dicha es una herramienta útil para el control de descargas de aguas residuales que contengan este tipo de compuestos en el medio ambiente. Los métodos desarrollados en este trabajo presentan numerosas ventajas con respecto al método oficial, ya que el método basado en la reacción con la 4-aminoantipirina no puede aplicarse in situ ni en tiempo real,

siendo además necesario un complicado tratamiento de la muestra, que incluye la destilación de grandes volúmenes de agua, el empleo de cantidades elevadas de cloroformo y un tiempo largo de análisis. Utilizando detección amperométrica con los biosensores compósitos, el tiempo de análisis se ve sensiblemente reducido, pudiéndose llevar a cabo en tan sólo 15-40 minutos.

V. Conclusiones

Los resultados que se han expuesto en esta Memoria han permitido alcanzar las siguientes conclusiones.

Todos los biosensores compósitos enzimáticos desarrollados para la detección de compuestos fenólicos han demostrado poseer las ventajas que a priori se suponían para este tipo de biosensores, como son su capacidad de regeneración superficial por pulido y una buena relación señal/ruido. Además, su proceso de fabricación es sencillo, así como su manejo, permitiendo obtener respuestas estables y repetibles tanto mediante amperometría en discontinuo como en inyección en flujo con detección amperométrica. Las características analíticas que se obtienen con dichos biosensores son adecuadas para la detección de compuestos fenólicos en aguas residuales.

La comparación de los resultados obtenidos con los tres biosensores compósitos de tirosinasa en medio acuoso demuestra que la matriz electródica de grafito-Teflón es la que proporciona un período de vida útil del biosensor mayor. Este hecho, dado que el resto de las características analíticas que se obtienen con los tres bioelectrodos son similares, hace que sea el más adecuado para su aplicación a muestras reales.

Por otro lado, se ha comprobado que el tiempo de vida útil de este biosensor es considerablemente mayor cuando se emplean micelas inversas como medio de trabajo, lo que demuestra un efecto beneficioso del medio predominantemente no acuoso formado con acetato de etilo sobre la estabilidad de la enzima. Sin embargo, los límites de detección obtenidos en este medio son sensiblemente mayores que en disolución acuosa, como consecuencia del reparto de los compuestos fenólicos que se produce entre las dos fases que constituyen las micelas inversas.

La capacidad de "screening" del biosensor de grafito-Teflón-peroxidasa ha resultado ser muy superior a la del biosensor de tirosinasa, ya que con la enzima peroxidasa aumenta considerablemente el número de compuestos fenólicos que pueden ser detectados. En particular, la mayor capacidad del electrodo de peroxidasa para detectar compuestos fenólicos clorados, entre los que se incluye el pentaclorofenol, hace de este biosensor una herramienta especialmente interesante, ya que dichos fenoles son los que presentan una mayor toxicidad. Por el contrario, los límites de detección que se consiguen con el biosensor de HRP son algo peores que los obtenidos con el biosensor de grafito-Teflón-tirosinasa.

La incorporación de la enzima glucosa oxidasa a la matriz de grafito-Teflón-HRP produce una mejora notable en la repetibilidad y estabilidad de las respuestas amperométricas de los compuestos fenólicos, así como un aumento de la vida útil del biosensor. Ello se debe a la eliminación de la presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno en disolución que se requiere cuando no se utiliza glucosa oxidasa inmovilizada en la matriz electródica.

La inclusión conjunta de las enzimas tirosinasa, peroxidasa y glucosa oxidasa en la matriz de grafito-Teflón da lugar a un biosensor con una sensibilidad similar a la conseguida con el electrodo de tirosinasa y con una capacidad de detección

igual a la del biosensor de peroxidasa. Sin embargo, el período de vida útil de este electrodo trienzimático es sensiblemente menor que el de los electrodos de tirosinasa y glucosa oxidasa-peroxidasa, debido, probablemente, a la acción del peróxido de hidrógeno generado durante la medida sobre la tirosinasa.

La utilización de una célula de flujo de gran volumen con una disposición en paralelo de un electrodo de grafito-Teflón-Tyr y de un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP, conectados a un detector amperométrico dual, permite obtener la respuesta individual de ambos biosensores para los compuestos fenólicos en un solo análisis. De esta forma, es posible tener las ventajas propias del electrodo trienzimático, pero manteniendo el tiempo de vida útil de los biosensores de tirosinasa y GOD-HRP.

Los resultados de los análisis de muestras reales de aguas procedentes de una refinería han demostrado que los biosensores amperométricos compósitos diseñados son una buena alternativa al método oficial colorimétrico de la 4-aminoantipirina para la detección de compuestos fenólicos, ya que el tratamiento de la muestra es mínimo y el tiempo requerido para el análisis es mucho menor que el que se necesita con el método oficial, evitándose la destilación de la muestra y el empleo de cloroformo y de otros reactivos.

El empleo de cartuchos adsorbentes de polímero de estireno y divinilbenceno con objeto de eliminar los compuestos fenólicos del efluente, y así obtener un portador adecuado, sugiere la posibilidad de aplicar los biosensores "in situ" como dispositivos de alarma a la salida de efluentes industriales, empleando un sistema automatizado que lleve a cabo inyecciones de muestra en el flujo cada ciertos períodos de tiempo.

El bajo coste de los materiales necesarios para la construcción de los biosensores y la simplicidad del proceso de fabricación, hacen factible la misma a escala industrial, de modo que puedan dejar de ser prototipos de laboratorio para convertirse en dispositivos comercializables.

Estas consideraciones permiten concluir que se ha demostrado la capacidad de los bioelectrodos compósitos para monitorizar el nivel de compuestos fenólicos en muestras reales "in situ" y en tiempo real, habiéndose cumplido, por tanto, el objetivo principal de la Tesis.

No obstante, los biosensores desarrollados presentan la limitación de proporcionar una respuesta desigual para cada compuesto fenólico, dependiendo de los sustituyentes del anillo aromático y de la posición de los mismos. Además, debido a que estos compuestos son sustratos competitivos de las enzimas empleadas, la respuesta de los biosensores desarrollados a una mezcla de fenoles es menor que la suma algebraica de las respuestas para cada fenol individualmente. Estos dos hechos hacen que el índice del contenido en compuestos fenólicos proporcionado por los biosensores sea siempre menor que el contenido real

de la muestra. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que la estimación de dicho contenido, mediante el empleo de los biosensores enzimáticos amperométricos será siempre un "mínimo", problema éste, por otra parte, común a otros métodos existentes para la obtención de un índice de fenoles.

VI. Bibliografía

- Alarcón de Pablo, P. (1989). "Determinación de fenoles en agua mediante el empleo combinado de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG) y cromatografía de permeación en gel (CPG)". Tesis doctoral. Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas. UCM
- Achilli, G.; Cellerino, G.P.; Eril G.M.; Bird, S. (1995). *J. Chromatogr. A.* 697: 357
- Adeyolu, O.; Iwuoha, E.I.; Smyth, M.R.; Leech, D. (1996). "High-performance Liquid Chromatographic determination of phenols using a tyrosinase-based amperometric biosensor detection system". *Analyst* 121: 1885-1889
- Aguilar, M.; Farran, A.; Martí, V. (1993). *Sci. Total Environ.*, 132: 133
- Albareda Sirvent, M.; Merkoçi, A.; Alegret, S. (2001). "Thick-film biosensors for pesticides produced by screen-printing of graphite-epoxy composite and biocomposite pastes". *Sens. Actuators B* 79: 48-57
- Alegret, S. (1996). "Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review". *Analyst* 121: 1751-1758
- Allan, A.C.; Walker, J.R.I. (1988). "The selective inhibition of catechol oxidases by salicyl-hydroxamine acid". *Phytochemistry* 27: 3075-3076
- Alonso, L.; Parrado, C.; Pedrero, M.; Agüí, L.; Pingarrón, J.M. (1999). "Graphite-ethylene/propylene/diene terpolymer composite electrodes. A new electrode material for electrochemical detection". *Electroanalysis* 11(3): 161-166
- Andreasson, L.E.; Reinhammar, B. (1979). "The mechanism of electron transfer in laccase catalyzed reactions". *Biochim. Biophys. Acta* 558: 145-156
- Anni H.; Yonetani T. (1992). "Mechanism of action of peroxidases". En: H. Siegel and A. Siegel (eds): *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, Nueva York, 219-241.
- APHA (1981). "Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water". American Public Health Association. Washington, DC. 15th edn., 1134.
- APHA (1985) "Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water". American Public Health Association. Washington, DC. 16th edn., part 510.
- Arnao, M.B.; Acosta, M.; Río, J (1990). *Biochem. Biophys. Acta* 1038: 85
- Arundell, N.; Whalley, P.D.; Manz, A. (2000). *Fresenius* 367: 686-691
- ASC Commetee in Environmental Improvement. (1983). "Principles of environmental analysis". *Anal. Chem.* 55: 2210
- Banerjee, S. et al. (1984). "Development of a general kinetic model for biodegradation and its application to chlorophenols and related compounds". *Environ. Sci. Technol.*, 19(4): 374-375
- Bard, A.J.; Faulkner, L.R. (2001). *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*. 2^a ed. John Wiley & Sons, Inc, Nueva York,
- Barman, T.E. (1992). *Enzyme handbook Vol. 1*. Ed. Spriger Verlag, Berlín. 234-235
- Bartos, J.; Pesez, M. (1984). "Practique de l'Analyse Organique Colorimétrique et Fluorimétrique". Ed. Masson (Paris)
- Beltrame, P. et al. (1985). *Environ. Sci. Technol.*, 19(4): 374-375

- Besomes, J.-L.; Cosnier, S.; Labbe, P. (1997). "Improvement of poly(amphiphilic pyrrole) enzyme electrodes via the incorporation of synthetic laponite-clay-nanoparticles". *Talanta* 44: 2209-2215
- Besomes, J.L; Cosnier, S.; Labbe, P.; Reverdy, G. (1995). "A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides". *Anal. Chim. Acta* 311: 255-263
- Bier, F.F.; Ehrentreich-Foerster, E.; Scheller, F.W.; Makowec, A.; Eremenko, A.V.; Wollenberger, U.; Bauer, C.G.; Pfeiffer, D.; Michael, N. (1996). "Ultrasensitive biosensors". *Sens. Actuators B* B33(1-3): 5-12
- Bogdanovskaya, V.A.; Fridman, V.A.; Tarasevich, M.R.; Scheller, F. (1994). "Bioelectrocatalysis by immobilized peroxidase: the reaction mechanism and the possibility of electroanalytical detection of both inhibitors and activators of enzyme". *Anal. Lett.* 27(15): 2823-2847
- Box, J.D. (1983). "Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters". *Water Res.*, 17(5): 511-525
- Brace, L.; Daros, J.; La Guardia, M. (1992). *Anal. Chem.* 64: 129
- Buikema, Jr., A.L.; McGinnis, M.J.; Cairns, Jr., J. (1979). "Phenolics in aquatic ecosystems: A selected review of recent literature". *Marine Environ. Res.*, 2: 87-181
- Burestedt, G.; Narváez, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Ennéus, J.; Domínguez, E.; Marko Varga, G. (1996). "Rate-limiting steps of tyrosinase-modified electrodes for the detection of catechol". *Anal. Chem.* 68: 1605-1611
- Campanella, L.; Fortuney, A.; Sammartino, M.P.; Tomassetti, M. (1994). "Tyrosinase biosensor response as a function of physical properties of organic solvents". *Talanta* 41(8): 1397-1404
- Capannesi, C.; Palchetti, I.; Mascini, M.; Parenti, A. (2000). "Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils". *Food Chem.* 71(4): 553-562
- Castillo, M.; Puig, D.; Barceló, D. (1997). "Determination of priority phenolic compounds in water and industrial effluents by polymeric liquid-solid extraction cartridges using automated sample preparation with extraction columns and liquid chromatography. Use of liquid-solid extraction cartridges for stabilization of phenols". *J. Chromatogr. A* 778: 301-311
- Cayuela, G.; Peña, N.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (1998). *Analyst* 123: 371
- CEE (1983). "Resolución del Consejo de 7 de febrero de 1983 relativa a la lucha contra la contaminación de las aguas". *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 15/Vol 04, C46/17:99 (17-02-1983)
- Cenas, N.K.; Kulys, J.J. (1988). *Fermentacijai perenos electrona. Mokslas*, Vilnius
- Céspedes, F.; Martínez Fábregas, E.; Algret, S. (1996). "New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites". *Trends Anal. Chem.* 15(7): 296-303
- Clark, L.C.; Lyons, C. (1962). "Electrode systems for continuous monitoring un cardiovascular surgery". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102: 29
- Coche Guerente, L.; Labbé, P.; Mengueaud, V. (2001). "Amplification of amperometric biosensor responses by electrochemical substrate recycling. 3. Theoretical and experimental study of the phenol-polyphenol oxidase system immobilized in laponite hydrogels and layer-by-layer self-assembled structures". *Anal. Chem.* 73: 3206-3218

- Connor, M.P.; Sánchez, J.; Wang, J.; Smyth, M.R.; Mannino, S. (1989). "Silicone grease-based immobilisation method for the preparation of enzyme electrodes". *Analyst* 114: 1427-1429
- Cori, J.G.; Frieden, E. (1967). "Differential reactivities of tyrosine residues of proteins to tyrosinase" *Biochemistry* 6: 121-126
- Cornish-Bowder, A.; Wharton, C.W. (1988). *Enzyme kinetics*. (Rickwood, D.; Male, D., ed), IRL Press, Oxford, 1-18.
- Cosnier, S.; Fombon, J.J.; Labbe, P.; Limosin, D. (1999). "Development of a PPO-poly(amphiphilic pyrrole) electrode for on site monitoring of phenols in aqueous effluents". *Sens. Actuators B* B59(2-3): 134-139
- Cosnier, S.; Lepellec, A.; Guidetti, B.; Rico-Lattes, I. (1998). "Enhancement of biosensor sensitivity in aqueous and organic solvents using a combination of poly(pyrrol-ammonium) and poly(pyrrol-lactobionamide) films as host matrices". *J. Electroanal. Chem.* 449: 165-171
- Cosnier, S.; Popescu, I.C. (1996). "Poly(amphiphilic pyrrole)-tyrosinase-peroxidase electrode for amplified flow-injection amperometric detection of phenol". *Anal. Chim. Acta* 319: 145-151
- Csőregi, E.; Jönsson-Pettersson, G.; Gorton, L. (1993). *J. Biotechnol.* 30:315
- Curran, D.J.; Tougas, T.P. (1984). *Anal. Chem.* 56: 672
- Chaplin, M.F.; Bucke, C. (1990). *Enzyme technology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Dahms, A.; Metzner, W. (1979). "Analysis of pentachlorophenol and tertachlorophenol in the air and in urine". *Holz Roh-Werkst* 37: 341-344
- Daigle, F.; Leech, D. (1997). "Reagentless tyrosinase enzyme electrodes: effects of enzyme loading, electrolyte pH, ionic strength, and temperature". *Anal. Chem.* 69: 4108-4112
- Del Cerro, M.A.; Cayuela, G.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M.; Wang, J. (1997). *Electroanalysis* 9: 1113
- Deng, Q.; Dong, S. (1995). "Construction of a tyrosinase-based biosensor in pure organic phase". *Anal. Chem.* 67: 1357-1360
- Deng, Q.; Dong, S. (1996). "Amperometric biosensor for tyrosinase inhibitors in pure organic phase". *Analyst* 121: 1979-1982
- Deng, Q.; Dong, S. (1997). "The effect of substrate and solvent properties on the response of an organic phase tyrosinase electrode". *J. Electroanal. Chem.* 435(1-2): 11-15
- Deng, Q.; Guo, Y.Z.; Dong, S.J. (1996). "Cryo-hydrogel for the construction of a tyrosinase based biosensor". *Anal. Chim. Acta* 319(1-2): 71-77
- Di Corcia, A. Marchese, S.; Samperi, R. (1993). *J. Chromatogr.* 642(47): 175
- Domínguez, R.; Serra, B.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (2001). "Chiral analysis of amino acids using electrochemical composite bienzyme biosensors". *Anal. Biochem.* 298: 275-282
- Dixon, M.; Webb, E.C. (1979). *Enzymes*. Academic Press
- Ducey Jr., M.W.; Meyerhoff; M.E. (1998). "Microporous gold electrodes as combined biosensor/electrochemical detectors in flowing streams". *Electroanalysis* 10(3): 157-162

- Dunford, B.; Adeniran, A.J. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 536
- Eickman, N.C.; Solomon, E.I.; Larrabee, J.A.; Spiro, T.G.; Lerch, K. (1978). *J. Am. Chem. Soc.* 100: 6529
- Eggins, B.R.; Hickey, C.; Toft, S.A.; Zhou, D.M. (1997). "Determination of flavanols in beers with tissue biosensors". *Anal. Chim. Acta* 347: 281-288
- EPA method 1081, Phenols by Gas Chromatography: Capillary Column Technique, Washington DC. (1995), 1-28
- EPA method 604, Phenols in Federal Register, Friday October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136, 58-66
- EPA method 625, Base/neutral and acids in Federal Register, Friday October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136, 143-17
- Everett, W.R.; Rechnitz, G.A. (1998). "Mediated bioelectrocatalytic determination of organophosphorus pesticides with a tyrosinase-based oxygen biosensor". *Anal. Chem.* 70: 807-810
- Everse, J.; Everse, K.E.; Grisham, M.B. (1991). *Peroxi-dases in Chemistry and Biology; Vol. 1 and 2.* CRC Press, Boca Raton.
- Fernández, C.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (1995). *Anal. Chim. Acta* 314: 13
- Fernández, C.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (1996). *Talanta* 43: 1341
- Folke, J.; Birklund, J. (1986). "Danish coastal levels of 2,3,4,6-tetrachlorophenol, pentachlorophenol, and total organohalogen in blue mussels (*Mytilus edulis*)". *Chemosphere* 15(7): 895-900
- Forzani, E.S.; Rivas, G.A.; Solís, V.M. (1997). "Amperometric determination of dopamine on vegetal tissue enzymatic electrodes. Analysis of interferents and enzymatic selectivity". *J. Electroanal. Chem.* 435: 77-84
- Frank, R.; Clegg, B.S.; Ripley, B.D.; Braun, H.E. (1987). "Investigations of pesticide contaminations in rural Wells, 1979-1984, Ontario, Canada". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16(1): 9-22
- Frew, J.E.; Harmer, M.A.; Hill, H.A.O.; Libor, S.I. (1986). *J. Electroanal. Chem.* 201: 1
- Gaitonde, C.D.; Pathak, P.V. (1994). *J. Chromatogr. A.* 663: 229
- Galcerán, M.T.; Jáuregui, O. (1995). *Anal. Chim. Acta* 304: 75
- Gegeshidze, L.V.; Efremov, B.N.; Zhutaeva, G.V.; Tarasevich, M.R. (1999). "Electrochemical behaviour of the phenol-hydrogen peroxide system on a peroxidase modified carbon black electrode". *Russian Journal of Electrochemistry* 35(11): 1202-1209
- Ghindilis, A.L.; Everse, K.E.; Grisham, M.B. (Ed.) (1991). *Peroxi-dases in chemistry and biology. Vol. 1 y 2.* CRC Press, Boca Raton
- Ghindilis, A.L.; Makower, A.; Bauer, C.G.; Bier, F.F.; Scheller, F.W. (1995). "Determination of p-aminophenol and catecholamines at picomolar concentrations based on recycling enzyme amplification". *Anal. Chim. Acta* 304: 25-31

- Goerlitz, D.F.; Troutman, D.E.; Godsy, E.M.; Frank, S.B.J. (1985). "Migration of wood-preserving chemicals in contaminated groundwater in a sand aquifer at Pensacola, Florida". *Environ. Sci. Technol.* 19(10): 955-961
- Gorton, L.; Jönsson-Pettersson, G.; Csöregi, E.; Johansson, K.; Domínguez, E.; Marko-Varga, G. (1992). *Analyst* 117: 1235
- Götz, P.; Boman, H.G. (1985). "Insect immunity", en: G.A. Kerfüt y L.I. Gilbert (eds.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. 3. Pergamon Press, Oxford, 453-485
- Grimmet, G. (1989). *Percolation*. Springer, Munich. Pá. 12
- Guo, Y.; Dong, S. (1997). "Organic phase enzyme electrodes based on organohydrogel". *Anal. Chem.* 69: 1904-1908
- Guzmán Vázquez de Prada, A.; Peña, N.; Mena, M.L.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. "Graphite-Teflon composite bienzyme amperometric biosensors for the monitoring of alcohols". *Biosens. Bioelec.*, en prensa
- Hall, G.; Best, D.; Turner, A.F. (1988). *Anal. Chim. Acta* 213: 113
- Hall, G.; Turner, A.P. (1991). *Anal. Lett.* 24: 1375
- Hanazato, M.; Nakako, M.; Shiono, S.; Maeda, M. (1989). "Integrates multi-biosensors based on an ISFET using photolithographic techniques". *IEEE Trans. Elec. Dev.* 36: 1303
- Hasebe, Y.; Oshima, K.; Takise, O.; Uchiyama, S. (1995). "Chemically amplified kojic acid responses of tyrosinase-based biosensor based on inhibitory effect to substrate recycling driven by tyrosinase and L-ascorbic acid". *Talanta* 42: 2079-2085
- Hasebe, K.; Osteryoung, J. (1975). *J. Anal. Chem.* 47: 2412
- Hasebe, Y.; Takamori, K.; Uchiyama, S. (1993). "Enzyme-based chemically amplified flow-injection determination of catechol and catecholamines using an immobilised tyrosinase reactor". *Anal. Chim. Acta* 282: 363-367
- He, Y.M.; Zhang, W.C.; Wang, Z.R. (1999). "A tyrosinase-mediated glassy carbon electrode for the determination of phenols". *Fenxi Ceshi Xuebao* 18(4): 76-78
- Hedenmo, M.; Narváez, A.; Domínguez, E.; Katakis, I. (1997). "Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes". *J. Electroanal. Chem.* 425: 1-11
- Heineman, W.R.; Kissinger, P.T. (1988). *Anal. Chem.* 52: 138R
- Hottenstein, C.S.; Jourdan, S.W.; Hayes, M.C.; Rubio, F.M.; Herzog, D.P.; Lauruk, T.S. (1995). *Environ. Sci. Technol.* 29: 2754
- Hutchins, S.R.; Tomson, M.B.; Bedient, P.B.; Ward, C.M. (1985). "Fate of trace organics and application of municipal waste water". *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, 15: 355-416
- ISO 6439. *Water Quality* (1990). "Determination of phenol index, 4-aminoantipyrine spectrometric methods after distillation".
- ISO 8165-1. *Water Quality* (1992). "Determination of selected monovalent phenols".

- Ito, S.; Kato, T.; Shinpo, K.; Fujita, K. (1984). "Oxidation of tyrosine residues in proteins by tyrosinase-formation of protein-bonded 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine". *Biochem. J.* 222: 407-411
- Ito, S.; Yamazaki, S.; Kano, K.; Ikeda, T. (2000). "Highly sensitive electrochemical detection of alkaline phosphatase". *Anal. Chim. Acta* 424(1): 57-63
- Iwuoha, E.I.; Adeyoju, O.; Dempsey, E.; Smyth, M.R. (1995). "Investigation of the effect of polar organic solvents on the activity of tyrosinase entrapped in a poly(ester-sulphonic acid) polymer". *Biosens. Bioelectron.* 10(8): 661-667
- Janda, V.; Van Lagenhove, H. (1989). "Determination of chlorophenols in water by direct acetylation and solid phase extraction". *J. Chromatog.* 472(1): 327-330
- Jin, W.; Wollenberger, U.; Bier, F.F.; Makower, A.; Scheller, F. (1996). "Electron transfer between cytochrome c and laccase". *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39: 221-225
- Job, D.; Dunford, B. (1976). *Eur. J. Biochem.* 66: 607
- Jolley, R.L. Jr.; Evans, L.H.; Makino, N.; Mason, H.S. (1974). "Oxytyrosinase". *J. Biol. Chem.* 249(2): 335-345
- Kahn, V.; Andrawis, A. (1985). "Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone". *Phytochemistry* 24: 905-908
- Kaisheva, A.; Iliev, I.; Christov, S.; Kazareva, R. (1997). "Electrochemical gas sensor for phenol". *Sens. Actuators B* B44(1-3): 571-577
- Kane, S.A.; Iwuoha, E.I.; Smyth, M.R. (1998). "Development of a sol-gel based amperometric biosensor for the determination of phenolics". *Analyst* 123: 2001-2006
- Kotte, H.; Gründig, B.; Vorlop, K.-D.; Strehlitz, B.; Stottmeister, U. (1995). "Methylphenazonium-modified enzyme sensor based on polymer thick films for subnanomolar detection of phenols". *Anal. Chem.* 67: 65-70
- Kranz, C.; Wohlschlaeger, H.; Schmidt, H.L.; Schuhmann, W. (1998). "Controlled electrochemical preparation of amperometric biosensors based on conducting polymers". *Electroanalysis* 10(8): 546-552
- Kulovaara, M.; Kronberg, L.; Pensar, G. (1987). "Recoveries of some chlorophenolics and resin acids from humic water". *Sci. Total Environ.*, 62: 291-296
- Kulys, J.; Bilitewski, U.; Schmid, R.D. (1991). "The kinetics of simultaneous conversion of hydrogen peroxide and aromatic compounds at peroxidase electrodes". *Bioelectrochem. Bioenerg.* 26: 277-286
- Kulys, J.; Samalius, A.; Svirmickas, G.-J. (1980). *FEBS Lett.* 104: 7
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veerger, C. (1987). *Biosens. Bioelec.* 30:81
- Lamprecht, G.; Huber, J.F.K. (1994). *J. Chromatogr. A.* 667: 47
- Langone, J.J.; Van Vanakis, H. (1982). "Methods in enzymology, vol. 73, Immunochemical Techniques, part D". Academic Press, Nueva York
- Lechuga, L.M.; Calle, A. (1995). "Biosensores. Los dispositivos analíticos del futuro I y II". *Revista de plásticos modernos* 470: 132-140 y 471: 232-242

- León González, M.E.; Pérez Arribas, L.V.; Polo Díez, L.M.; Silva Vargas, M.E. (2000). *Fresenius* 367: 93-95
- Lerch, K. (1978). "Amino acid sequence of tyrosinase from *Neurospora crassa*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3635-3639
- Lerch, K. (1983). "*Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties". *Mol. Cell. Biochem.* 52: 125-138
- Leuenberger, Ch.; Ligocki, M.P.; Pankow, J.F. (1985). "Trace organic compounds in rain. 4. Identities, concentrations and scavenging mechanisms for phenols in urban air and rain". *Sci. Technol.*, 19: 1053-1058
- Li, J.; Chia, L.S.; Goh, N.K.; Tan, S.N. (1998). "Silica sol-gel immobilised amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds". *Anal. Chim. Acta* 362(2-3): 203-211
- Li, Q.X.; Zhao, M.S.; Gee, S.G.; Kurth, M.; Seiber, J.N.; Hammok, B.D. (1991). *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1685
- Lindgren, B.; Emneus, J.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. (1997). "Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes". *Anal. Chim. Acta* 347: 51-62
- Liu, F.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M.; Wang, J. (1994a). *Talanta* 41: 455
- Liu, F.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M.; Wang, J. (1994b). *J. Electroanal. Chem.* 374: 133
- Liu, Z.J.; Deng, J.Q.; Li, D. (2000). "A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of aluminium oxide sol-gel to co-immobilise tyrosinase and the mediator". *Anal. Chim. Acta* 407(1-2): 87-96
- Liu, Z.L.; Liu, B.H.; Kong, J.; Deng, J.Q. (2000). "Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel-derived tyrosinase biosensor". *Anal. Chem.* 72(19): 4707-4712
- Luque, M.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (1999). "Validation of PVC-graphite composite electrodes for routine analytical work". *Electroanalysis* 11(15): 1116-1123
- Lutz, E.S.M.; Domínguez, E. (1996). "Development and optimisation of solid composite tyrosinase biosensor for phenol detection in flow-injection systems". *Electroanalysis* 8(2): 117-123
- Marko-Varga, G.; Burestedt, E.; Svensson, C.J.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Lutz, M.; Unger, K.K. (1996). "Effect of HY-Zeolites on the performance of tyrosinase-modified carbon paste electrodes". *Electroanalysis* 8(12): 1121-1126
- Marko-Varga, G.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T. (1995). "Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds". *Trends Anal. Chem.* 14(7): 319-328
- Martinek, K.; Klyachko, N.L.; Kabanov, A.V.; Kfelnitsky, Y.L.; Levastov, A.V. (1989). *Biochim. Biophys. Acta* 981: 161
- Martínez, D.; Pocerull, E.; Marcé, R.M.; Borrull, F.; Calull, M. (1996). "Comparative study of the use of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for determination of phenolic compounds in water samples". *Chromatogr.*, 43: 619-624
- Mazurek, M.A.; Simoneit, B.R.T. (1986). "Organic components in bulk and wet-only precipitation". *CRC Critical Reviews in Environmental Control* 16: 1-140
- Merck (1983) *Merck Index* 10th Edition. Ed. Windholz, M.; Merck and Co., Inc. (Rahway, N.J., EE.UU.)

- Moressi, M.B.; Zon, A.; Fernández, H.; Rivas, G.; Solís, V. (1999). "Amperometric quantification of *Alternaria* mycotoxins with a mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode". *Electrochemistry Communications* 1(10): 472-476
- Muino, M.A.F.; Gandara, J.S.; Lozano, J.S. (1991). *Chromatographia* 32: 238-240
- Munteanu, F.-D.; Lindgren, A.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Ciucu, A.; van Huystee, R.B.; Gazaryan, I.G.; Lagrimini, L. (1998). "Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases". *Anal. Chem.* 70: 2596-2600
- Nakajima, R.; Yamazaki, I. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 2067
- Narváez, A.; Guinea, M.; Ortega, F.; Domínguez, E. (1996). "Characterisation and optimisation of tyrosinase solid graphite electrodes for the detection of phenolic compounds". *Química Analítica* 15: 83-90
- Navarro Laboulais, J.; Trijueque, J.; Vicente, F.; Scholl, H. (1994). "Voltammetric determination of optimal conductive load proportion in graphite-epoxy composite electrodes". *J. Electroanal. Chem.* 379: 159-163
- Navarro Villoslada, F. (1997). "Calibración multivariante para la determinación de clorofenoles, contaminantes prioritarios, mediante espectrometría de diodos integrados en FIA". Tesis doctoral. Madrid
- Nielsen, P.G. (1984). *Chromatographia* 18(6): 323-325
- Nistor, C.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ciucu, A. (1999). "Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for the detection of phenolic compounds". *Anal. Chim. Acta* 387: 309-326
- Odham, K.B. (1981). *Electroanal. Chem.* 122: 1
- Oikari, A.; Anas, E. (1985). "Chlorinated phenolics and their conjugates in the bile of trout (*Salmo gairdneri*) exposed to contaminated waters". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 35(6): 802-809
- Ong, C.P.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y. (1990). *Anal. Chem.* 62: 1389-1391
- Onnerfjord, P.; Emneus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Ortega, F.; Domínguez, E. (1995). "Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for the detection of phenols". *Biosens. Bioelectron.* 10(6-7): 607-619
- Ortega, L.; Domínguez, E.; Burestedt, E.; Emneus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. (1994). "Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds". *J. Chromatogr. A* 675(1-2): 65-78
- Ortiz, G.; González, M.C.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (1997). *Anal. Chem.* 69: 3521
- Paasivirta, J. et al. (1985). "Polychlorinated phenols, guaiacols and catechols in the environment". *Chemosphere* 14(5): 469-491
- Parellada, J.; Narváez, A.; López, M.A.; Domínguez, E.; Pavlov, V.; Katakis, I. (1998). "Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications". *Anal. Chim. Acta* 362: 42-57
- Peña, N.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (2001). "Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes". *Talanta* 55: 179-187

- Peña, N.; Ruiz, G.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (2001). "Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of cholesterol in reversed micelles. Application to food samples". *Anal. Chem.* 73: 1190-1195
- Peña, N.; Romero, M.; Manuel de Villena, F.J.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (1999). *Electroanalysis* 11(2): 85
- Peter, M.G. (1993). "Die molekulare architektur des exoskelts von insekten". *Chem. uns. Zeit* 27: 189-197
- Pérez, M.T.; Reviejo, A.J.; Manuel de Villena, F.J.; Pingarrón, J.M. (1997). *Anal. Chim. Acta* 340(1-3): 89-97
- Petit, C.; González-Cortés, A.; Kauffmann, J.-M. (1995). "Preparation and characterisation of a new enzyme electrode based on solid paraffin and activated graphite particles". *Talanta* 42: 1783-1789
- Poulos, T.L.; Freer, S.T.; Alden, R.A.; Edwards, S.L.; Skoglund, U.; Takjo, K.; Eriksson, B.; Young, N.-H.; Yonetani, T.; Kraut, J. (1980). "The crystal structure of cytochrome c peroxidase". *J. Biol. Chem.* 255: 575-580.
- Praus, P.; Donbek, V. (1993). *Anal. Chim. Acta* 283: 917
- Primo Yufera, E.; Carrascon Dorrien, J.M. (1980). *Química agrícola. Vol (II)*. Ed. Alhambra, Madrid
- Prota, G. (1995). "The chemistry of melanins and melanogenesis". *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.* 64: 93-148
- Puig, C.; Ruzgas, T.; Emneus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; Barceló, D. (1996). "Characterisation of tyrosinase-Teflon/graphite composite electrodes for the determination of catechol in environmental analysis". *Electroanalysis* 8(10): 885-890
- Puig, D.; Barceló, D. (1995). "Off-line and On-line Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography for the Determination of Priority Phenols in Natural Waters". *Chromatographia* 40 (7/8): 435-444
- Puig, D.; Barceló, D. (1996a). "Determination of phenolic compounds in water and waste water". *Trends Anal. Chem.*, 15(8): 362-375
- Puig, D.; Barceló, D. (1996b). *J. Chromatogr. A.* 733: 371
- Puig, D.; Silgoner, I.; Grasserbauer, M.; Barceló, D. (1996). "Comparison of three different liquid-chromatography-mass spectrometry interfacing techniques for the determination of priority phenolic compounds in water". *J. Mass Spectrom.*, 31(11): 1297-1307
- Rennie, P.J.; Mitchell, S.F. (1987). *Chromatographia*, 24: 319
- Reviejo, A.J.; Fernández, C.; Liu, F.; Pingarrón, J.M.; Wang, J. (1995). *Anal. Chim. Acta* 315: 93-99
- Rodier, J. (1990) "Análisis de aguas: Aguas naturales, aguas residuales, agua de mar". Ed. Omega
- Rogers, K.R.; Becker, J.Y.; Wang, J.; Lu, F. (1999). "Determination of phenols in environmentally relevant matrices with the use of liquid chromatography with an enzyme electrode detector". *Field Analytical Chemistry and Technology* 3(3): 161-169
- Rosatto, S.S.; Kubota, L.T.; de Oliveira Neto, G. (1999). "Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium". *Anal. Chim. Acta* 390: 65-72
- Ruiter, C.; Bohle, J.F.; de Jong, G.J.; Brinkman U.A.Th.; Frei, R.W. (1988). *Anal. Chem.*, 60: 666

- Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Markó-Varga, G. (1996). "Peroxidase modified electrodes: fundamentals and application". *Anal. Chim. Acta* 330: 123-138
- Ruzgas, T.; Emneus, J.; Gorton, L.; Markó-Varga, G. (1995). "The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds". *Anal. Chim. Acta* 311: 245-253
- Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emnéus, J.; Markó-Varga, G. (1995). "Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds". *Trends Anal. Chem.* 14: 319-328.
- Ryan, O.; Smyth, M.R.; O'Fagain, C. (1994). "Horseradish peroxidase: the analyst's friend". *Essay in Biochemistry* 28: 129-146.
- Saby, C.; Luong, J.H.T. (1998). "A biosensor system for chlorophenols using chloroperoxidase and a glucose oxidase based amperometric electrode". *Electroanalysis* 10(1): 7-11
- Saby, C.; Male, K.B.; Luong, J.H.T. (1997). "A combined chemical and electrochemical approach using bis(trifluoroacetoxy)iodobenzene and glucose oxidases for the detection of chlorinated phenols". *Anal. Chem.* 69: 4324-4330
- Saini, S.; Hall, G.; Downs, M.; Turner, A.F. (1991). *Anal. Chim. Acta* 249: 1
- Salas Villanueva, P. (2000). "Electrodos compósitos de grafito-Teflón y de grafito-EPD modificados con Ru y dióxido de rutenio. Detección amperométrica en flujo de metionina". Tesis de licenciatura. Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense
- Sánchez Ferrer, A.; Rodríguez López, J.N.; García Cánovas, F.; García Carmona, F. (1995). "Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism". *Biochim. Biophys. Acta* 1047: 1-11
- Schaffner, C.; Ahel, M.; Giger, W. (1987). "Field studies of the behaviour of organic micropollutants during infiltration of river water to ground water". *Water Sci. Technol.*, 19(7): 1195-1196
- Scheller, F.W.; Schubert F.; Fedrowitz J. (Eds.) (1997). "Frontiers in Biosensorics I, Fundamental Aspects". Birkhäuser Verlag Basel, Suiza
- Schmidt, J.C. (1998). "Enzyme based electrodes for environmental monitoring applications". *Field Analytical Chemistry and Technology* 2(6): 351-361
- Schulzt, T.W.; Riggan, G.W. (1985). "Predictive correlations for the toxicity of alkyl- and halogen-substituted phenols". *Toxicol. Lett.*, 25(1): 47-54
- Serra, B.; Mateo, E.; Pedrero, M.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (1999). "Graphite-Teflon-tyrosinase composite electrodes for the monitoring of phenolic compounds in predominantly nonaqueous media" *Analisis* 27(7): 592
- Serra, B.; Reviejo, A.J.; Parrado, C.; Pingarrón, J.M. (1999). "Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: application to food samples". *Biosens. Bioelec.* 14: 505
- Shoup, R.E.; Mayer, G.S. (1982). "Determination of environmental phenols by LC/electrochemical detection". *Anal. Chem.* 54(7): 1164-1169
- Smith, M.H.; Cass, A.E.G. (1990). *Anal. Chem.* 62: 2429

- Streffer, K.; Kaatz, H.; Bauer, C.G.; Makower, A.; Scholmeister, T.; Scheller, F.W.; Peter, M.G.; Wollenberger, U. (1998). "Application of a sensitive catechol detection for determination of tyrosinase inhibitors". *Anal. Chim. Acta* 362: 81-90
- Strohl, A.N.; Curran, D.J. (1980). *Anal. Chim. Acta* 108: 379
- Svitel, J.; Miertus, S. (1998). "Development of tyrosinase-based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds". *Environ. Sci. Tech.* 32(6): 828-832
- Szczepińska, M.; Trojanowicz, M. (2000). "Amperometric enzymatic detection of phenols for HPLC". *Chemia Analityczna* 45(5): 667-679
- Trochimczuk, A.W.; Streat M.; Kolarz, B.N. (2001). "Highly polar polymeric sorbents. Characterization and sorptive properties towards phenol and its derivatives", *Reactive & Functional Polymers* 46: 259-271
- Trojanowicz, M.; Jagielska, A.; Rotkiewicz, P.; Kierkeż, A. (1999). "Flow-injection determination of phenols with tyrosinase amperometric biosensor and data processing by neural network". *Chemia Analityczna* 44(5): 865-878
- Turner, A.P.F.; Karube I.; Wilson G.S. (Eds.) (1986). "Biosensors: Fundamentals and Applications". Oxford University Press, Oxford
- Uchiyama, S.; Hasebe, Y.; Shimizu, H.; Ishihara, H. (1993). "Enzyme-based catechol sensor based on the cyclic reaction between catechol and 1,2-benzoquinone using L-ascorbate and tyrosinase". *Anal. Chim. Acta* 276 341-345
- Uchiyama, S.; Itoi, N.; Hasebe, Y. (1995). "Chemically amplified detection of catecholamines by liquid chromatography using an L-ascorbic acid carrier". *Electroanalysis* 7(8): 731-733
- Ventura, F.; Rivera, J. (1986). "Potential formation of bromophenols in Barcelona tap's water due to daily salt mine discharges and occasional phenol spills". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36(2): 219-225
- Wang, B.; Zhang, J.; Dong, S. (2000). "Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor". *Biosens. And Bioelectron.* 15(7-9): 397-402
- Wang, J.; Chen, L. (1995). "Hydrazine detection using a tyrosinase-based inhibition biosensor". *Anal. Chem.* 67(20): 1824-3827
- Wang, J.; Cheng, Q. (1995a). "Microfabricated phenol biosensors based on screen printing of tyrosinase containing carbon ink". *Anal. Lett.* 28(7): 1131-1142
- Wang, J.; Cheng, Q. (1995b). "Remote electrochemical biosensor for field monitoring of phenolic compounds". *Anal. Chim. Acta* 312: 39-44
- Wang, J.; Dempsey, E.; Eremenko, A.; Smyth, M.R. (1993a). *Anal. Chim. Acta* 279: 203
- Wang, J.; Dewald, H.D. (1983). *Anal. Chem.* 55: 933
- Wang, J.; Lin, M.S. (1988). "Mixed plant tissue-carbon paste bioelectrode". *Anal. Chem.* 60: 1545-1548
- Wang, J.; Lin, Y. (1992). *Anal. Chim. Acta* 271: 53
- Wang, J.; Lin, Y.; Cheng, Q. (1993b). *Electroanalysis* 5: 23

- Wang, J.; Lu, F.; Kane, S.A.; Choi, Y.-K.; Smyth, M.R.; Rogers, K. (1997). "Hydrocarbons pasting liquids for improved tyrosinase-based carbon-paste phenol biosensors". *Electroanalysis* 9(14): 1102-1106
- Wang, J.; Lu, F.; López, D. (1994a). "Amperometric biosensor for phenols based on a tyrosinase-graphite-epoxy biocomposite". *Analyst* 119: 455-458
- Wang, J.; Lu, F.; López, D. (1994b). "Tyrosinase-based ruthenium dispersed carbon paste biosensor for phenols". *Biosens. And Bioelectron.* 9: 9-15
- Wang, J.; Reviejo, A.J.; Agnes, L. (1993c). *Electroanalysis* 5: 575
- Wang, J.; Reviejo, A.J.; Mannino, S. (1992). "Organic-phase enzyme electrode for the determination of phenols in olive oils". *Anal. Lett.* 25(8): 1399-1409
- Wang, J.; Varughese, K. (1990). *Anal. Chem.* 62: 318
- Wang, J.; Wu, L.; Agnes, L. (1991). *Anal. Chem.* 63: 2993
- Wang, J.; Wu, L.; Lu, Z.; Li, R.; Sánchez, J. (1990). *Anal. Chim. Acta* 228: 251
- Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R. (1985). "Brominated phenols and anisoles in river and marine sediments in Japan". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 35(2): 272-278
- Wegman, R.C.; Van der Broek, H.H. (1983). "Chlorophenols in river sediments in the Netherlands". *Water res.*, 17: 227-230
- Wilcox, D.E.; Porras, A.G.; Hwang, Y.T.; Lerch, K.; Winkler, M.E.; Solomon, E.I. (1985). "Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper binding site in tyrosinase". *J. Am.Chem. Soc.* 107: 4015-4027
- Wollenberger, U.; Neumann, B. (1997). "Quinoprotein glucose dehydrogenase modified carbon paste electrode for the detection of phenolic compounds". *Electroanalysis* 9(5): 366-371
- Wood, B.J.B.; Ingraham, L.L. (1965). "Labelled tyrosinase from labelled substrate" *Nature* 205: 291-292
- Xie, B.; Tang, X.; Wollenberger, U.; Johansson, G.; Gorton, L.; Scheller, F.; Danielsson, B. (1997). "Hybrid biosensor for simultaneous electrochemical and thermometric detection". *Anal. Lett.* 30(12): 2141-2158
- Xie, T.; Abrahamsson, K.; Fogelqvist, E.; Josefsson, B. (1986). "Distribution of chlorophenolics in a marine environment". *Environ. Sci. Technol.*, 20(5): 457-463
- Yaropolov, A.I.; Kharybin, A.N.; Emneus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L. (1995). "Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with coimmobilised laccase and tyrosinase". *Anal. Chim. Acta* 308: 137-144
- Zaks, A.; Klibanov, A.M. (1988). *J. Biolog. Chem.* 263: 3194
- Zhang, J.; Li, B.; Xu, G.; Cheng, G.; Dong, S. (1999). "Self-gelatinizable graft copolymer of poly(vinyl alcohol) with 4-vinylpyridine as an immobilisation matrix for the construction of a tyrosinase-based amperometric biosensor". *Analyst* 124: 699-703
- Zhang, S.; Zhao, H.; John, R. (2001). "A dual-phase biosensing system for the determination of phenols in both aqueous and organic media". *Anal. Chim. Acta* 441: 95-105

Zollner, H. (1993). *Handbook of enzyme inhibitors. Part A.* VCH, Weinheim, 367-368

Anexo I: Tablas de las señales de referencia de los electrodos compósitos de tirosinasa en medio acuoso

Grafito-Teflón-tirosinasa

	lotes	pastilla	electrodo	dia	pulido	medida	intensidad
1	1	1	1	1	1	1	2,26
2	1	1	1	1	1	2	2,12
3	1	1	1	1	1	3	2,02
4	1	1	1	2	2	1	2,2
5	1	1	1	2	2	2	2
6	1	1	1	2	2	3	1,9
7	1	1	1	2	2	4	2,04
8	1	1	1	2	2	5	2,01
9	1	1	1	2	2	6	2,03
10	1	1	1	2	2	7	2
11	1	1	1	2	2	8	2,05
12	1	1	1	2	2	9	1,96
13	1	1	1	2	2	10	1,98
14	1	1	1	2	2	11	1,99
15	1	1	1	2	2	12	1,95
16	1	1	1	2	2	13	1,94
17	1	1	1	2	2	14	2
18	1	1	1	2	2	15	1,9
19	1	1	1	4	2	1	2,04
20	1	1	1	4	2	2	2,06
21	1	1	1	4	2	3	2,1
22	1	1	1	4	2	4	2,14
23	1	1	1	4	2	5	2,26
24	1	1	1	4	2	6	2,2
25	1	1	1	4	2	7	1,98
26	1	1	1	4	2	8	1,94
27	1	1	1	4	2	9	2,02
28	1	1	1	4	2	10	2,18
29	1	1	1	5	3	1	2,24
30	1	1	1	5	3	2	1,98
31	1	1	1	5	3	3	2,22
32	1	1	1	7	4	1	2,2
33	1	1	1	7	4	2	2,24
34	1	1	1	7	4	3	2,22
35	1	1	2	1	1	1	2,12
36	1	1	2	1	1	2	2,12
37	1	1	2	1	1	3	2
38	1	1	2	2	1	1	2,12
39	1	1	2	2	1	2	2,2
40	1	1	2	2	1	3	2,18
41	1	1	2	2	1	4	2,2
42	1	1	2	2	1	5	2,18
43	1	1	2	2	1	6	2,05
44	1	1	2	2	1	7	2,18
45	1	1	2	2	1	8	2,24
46	1	1	2	2	1	9	2,08
47	1	1	2	2	1	10	2,18
48	1	1	2	2	1	11	2,18
49	1	1	2	2	1	12	2,08
50	1	1	2	2	1	13	2,08
51	1	1	2	2	1	14	2,2
52	1	1	2	2	1	15	2,01
53	1	1	2	2	1	16	2,18
54	1	1	2	3	1	1	2,22
55	1	1	3	1	1	1	2,2
56	1	1	3	1	1	2	2,1
57	1	1	3	1	1	3	2,15
58	1	1	3	1	1	4	2,08
59	1	1	3	1	1	5	2,26
60	1	1	3	2	2	1	1,88
61	1	1	3	2	2	2	1,84
62	1	1	3	3	3	1	1,76
63	1	1	3	4	4	1	1,88
64	1	1	3	5	5	1	1,92
65	1	1	3	5	5	2	2,04
66	1	1	3	5	5	3	2,08
67	1	1	3	6	6	1	2,1
68	1	1	3	6	6	2	2,04
69	1	1	3	6	6	3	2,02
70	1	1	3	7	7	1	1,96
71	1	1	3	7	7	2	1,94
72	1	1	3	7	7	3	1,98
73	1	1	3	8	8	1	1,8
74	1	1	3	8	8	2	1,9
75	1	1	3	9	9	1	1,96
76	1	1	3	9	9	2	1,94
77	1	1	3	9	9	3	1,96

Grafito-Teflón-tirosinasa

		pastilla	electrodo	dia	pulido	medida	transmitancia
80	1	1	3	11	10	1	1,84
81	1	1	3	11	10	2	1,8
82	1	1	3	14	11	1	1,72
83	1	1	3	14	11	2	1,96
84	1	1	3	14	11	3	2,04
85	1	1	3	15	12	1	2,02
86	1	1	3	15	12	2	1,98
87	1	1	3	15	12	3	2,1
88	1	1	3	18	13	1	2
89	1	1	3	18	13	2	2,12
90	1	1	3	18	13	3	1,86
91	1	1	3	22	14	1	1,76
92	1	1	3	22	14	2	1,98
93	1	1	3	22	14	3	2,04
94	1	1	3	24	15	1	1,7
95	1	1	3	24	15	2	2
96	1	1	3	24	15	3	2,12
97	1	1	3	25	16	1	1,94
98	1	1	3	25	16	2	1,9
99	1	1	3	25	16	3	1,9
100	1	1	3	28	17	1	1,84
101	1	1	3	28	17	2	2
102	1	1	3	28	17	3	1,98
103	1	1	3	29	18	1	1,76
104	1	1	3	29	18	2	1,92
105	1	1	3	29	18	3	1,92
106	1	2	1	1	1	1	2,04
107	1	2	1	2	1	1	2,2
108	1	2	1	2	1	1	2,16
109	1	2	1	2	1	2	2,06
110	1	2	1	5	2	1	2,26
111	1	2	1	6	2	1	2,26
112	1	2	1	8	3	1	1,92
113	1	2	1	8	3	1	1,88
114	1	2	1	8	3	2	1,88
115	1	2	1	8	3	3	2,08
116	1	2	1	10	4	1	1,82
117	1	2	1	10	4	1	1,94
118	1	2	1	10	4	2	1,94
119	1	2	1	10	4	3	2,2
120	1	2	2	1	1	1	1,94
121	1	2	2	1	1	1	1,86
122	1	2	2	1	1	2	1,84
123	1	2	2	1	1	3	1,84
124	1	2	2	1	1	4	1,84
125	1	2	2	1	1	5	1,84
126	1	2	2	1	1	6	1,94
127	2	1	1	1	1	7	2,18
128	2	1	1	1	1	8	2,22
129	2	1	1	1	1	9	2,26
130	2	1	1	2	2	1	2,26
131	2	1	1	2	2	2	1,72
132	2	1	1	2	2	3	2,12
133	2	1	1	2	2	4	2,26
134	2	1	1	2	2	5	2,26
135	2	1	1	3	3	1	1,8
136	2	1	2	1	1	2	1,96
137	2	1	2	1	1	3	1,92
138	2	1	2	1	1	4	2,2
139	2	1	2	1	1	5	2,2
140	2	1	2	1	1	6	1,84
141	2	1	2	5	2	1	1,88
142	2	1	2	5	2	2	1,88
143	2	2	1	1	1	1	2,08
144	2	2	1	1	1	2	2,04
145	2	2	1	2	1	1	2,26
146	2	2	1	2	1	1	2,26
147	2	2	1	3	1	1	2,24
148	2	2	1	3	1	1	2,24
149	2	2	1	3	1	2	2,1
150	2	2	1	3	1	3	2,08
151	2	2	1	7	1	1	2,2
152	2	2	1	7	1	2	2,1
153	2	2	2	7	1	3	2,16
154	2	2	2	1	1	1	2,26
		2	2	2	2	2	2,08
		2	2	2	2	1	2,26
		2	2	2	2	2	2,26

Grafito-Teflón-tirosinasa

lote	pastilla	electrodo	dia	pulido	medida	intensidad
155	2	2	2	2	3	2,26
156	2	2	3	3	1	2,12
157	2	2	3	3	2	2,2
158	2	2	3	3	3	2,24
159	2	2	6	3	1	2,1
160	2	2	6	3	2	1,88
161	2	2	6	3	3	2,04
162	2	2	8	3	1	1,76
163	2	2	8	3	2	1,76
164	2	2	8	3	3	1,72
165	2	3	1	1	1	2,3
166	2	3	1	1	2	2,2
167	2	3	1	1	3	2,24
168	2	3	2	1	1	2,2
169	2	3	2	1	2	1,85
170	2	3	2	1	3	1,77
171	2	4	1	1	1	2,3
172	2	4	1	1	2	2,2
173	2	4	1	1	3	2,2
174	2	4	2	1	1	1,96
175	2	4	3	2	1	1,8
176	2	4	3	2	2	2,1
177	2	4	3	2	3	2,1
178	3	1	1	1	1	2,22
179	3	1	1	1	2	2,2
180	3	1	2	2	1	2,18
181	3	1	2	2	2	2,26
182	3	2	1	1	1	2,19
183	3	2	1	1	2	2,28
184	3	2	1	1	3	2,2
185	3	2	1	1	4	2,08
186	3	2	1	1	5	2,16
187	3	2	1	1	6	2
188	3	2	2	2	1	2
189	3	2	2	2	2	1,96
190	3	2	3	3	1	2
191	3	2	3	3	2	1,84
192	3	3	1	1	1	2,28
193	3	1	1	1	1	2,2
194	3	2	1	1	2	2,18
195	3	1	1	1	3	2,08
196	3	1	1	1	4	2,16
197	3	2	1	1	5	2,14
198	3	2	1	1	6	2,14
199	3	2	1	1	7	2,12
200	3	1	2	1	1	2,2
201	3	1	2	2	2	2,16
202	3	2	3	3	1	2,18
203	3	2	2	1	2	2,29
204	3	2	1	1	3	2,2
205	3	2	4	1	1	2
206	3	2	4	1	2	2,05
207	3	2	4	1	3	2,1
208	3	2	6	2	1	2
209	3	2	6	2	2	1,94
210	3	2	6	2	3	1,96
211	3	2	8	3	1	1,88
212	3	2	8	3	2	2
213	3	3	1	1	1	2,25
214	3	3	1	1	2	2,19
215	3	3	2	1	1	2
216	3	3	2	1	2	2
217	3	3	3	2	1	2
218	3	3	3	2	2	2

Grafito-EPD-tirosinasa

	1	pastilla	electrodo	dia	medida	intensidad
1	1	1	1	6	1	0,56
2	1	1	1	7	1	0,54
3	1	1	2	3	1	0,64
4	1	1	2	3	2	0,58
5	1	1	2	3	3	0,54
6	1	1	2	3	4	0,6
7	1	1	3	1	1	0,94
8	1	1	3	2	1	0,64
9	1	1	3	2	2	0,7
10	1	1	3	3	1	0,62
11	1	1	3	4	1	0,64
12	1	1	3	4	2	0,56
13	1	1	3	4	3	0,6
14	1	1	3	4	4	0,66
15	1	1	3	4	5	0,58
16	1	1	3	4	6	0,66
17	1	1	3	4	7	0,64
18	1	1	3	5	1	0,62
19	1	1	3	5	2	0,68
20	1	1	3	5	3	0,64
21	1	1	3	6	1	0,56
22	1	1	3	6	2	0,56
23	1	1	3	6	3	0,68
24	1	1	3	7	1	0,58
25	1	1	3	7	2	0,58
26	1	1	3	7	3	0,58
27	1	1	3	8	1	0,56
28	1	1	3	8	2	0,58
29	1	1	3	8	3	0,58
30	1	1	4	1	1	0,94
31	1	1	4	1	2	0,88
32	1	1	4	1	3	0,94
33	1	1	4	1	4	0,92
34	1	1	4	1	5	0,88
35	1	1	4	2	1	0,68
36	1	1	4	2	2	0,62
37	1	1	5	1	1	1,26
38	1	1	5	1	2	1,2
39	1	1	5	1	3	1,12
40	1	1	5	1	1	0,8
41	1	1	5	1	2	0,82
42	1	1	5	2	1	0,78
43	1	1	5	2	2	0,75
44	1	1	5	2	3	0,45
45	1	1	5	3	1	0,68
46	1	1	5	4	1	0,66
47	1	1	5	4	2	0,68
48	1	1	5	5	1	0,64
49	1	1	5	5	2	0,7
50	1	1	5	6	1	0,62
51	1	1	5	6	2	0,64
52	1	1	5	6	3	0,66
53	1	1	6	1	1	1,18
54	1	1	6	1	2	1,1
55	1	1	6	1	6	1,1
56	1	1	6	1	4	1,14
57	1	1	6	1	5	1,08
58	1	1	6	1	6	1,1
59	1	1	6	2	1	0,66
60	1	1	6	2	2	0,66
61	1	1	6	2	3	0,7
62	1	1	6	2	4	0,66
63	1	1	6	2	5	0,68
64	1	1	6	2	6	0,64
65	1	1	6	2	7	0,68
66	1	1	6	2	8	0,66
67	1	1	6	2	9	0,66
68	1	1	6	3	1	0,66
69	1	1	6	3	2	0,64
70	1	1	6	3	3	0,66
71	1	1	6	4	1	0,62
72	1	1	6	4	2	0,64
73	1	1	6	5	1	0,64
74	1	1	7	1	1	1,16
75	1	1	7	1	2	1,04
76	1	1	7	1	3	1
77	1	1	7	1	4	1,04

Grafito-EPD-tirosinasa

		partilla	electrodo	dia	medida	inter
80	1	1	7	1	5	1
81	1	1	7	2	1	0,64
82	1	1	7	2	2	0,62
83	1	1	7	2	3	0,68
84	1	1	7	3	1	0,74
85	1	1	7	3	2	0,72
86	1	1	7	3	3	0,64
87	1	1	7	3	4	0,6
88	1	1	7	3	5	0,62
89	1	1	7	4	6	0,64
90	1	1	7	4	1	0,58
91	1	1	7	4	2	0,66
92	1	1	7	4	3	0,5
93	1	1	7	5	4	0,66
94	1	1	8	1	1	0,6
95	1	1	8	1	2	1
96	1	1	8	1	3	0,82
97	1	1	8	1	4	0,82
98	1	1	8	2	4	0,94
99	1	1	8	2	1	0,78
100	1	1	8	2	2	0,78
101	1	1	8	2	3	0,78
102	1	1	8	2	4	0,8
103	1	1	8	2	5	0,78
104	1	1	8	3	6	0,78
105	1	1	8	3	1	0,62
106	1	1	8	3	2	0,64
107	1	1	8	4	3	0,6
108	1	1	8	4	4	0,58
109	1	2	1	1	2	0,6
110	1	2	1	1	3	1,22
111	1	2	1	1	4	1,16
112	1	2	1	2	1	1,24
113	1	2	1	2	2	0,68
114	1	2	1	2	3	0,68
115	1	2	1	3	1	0,74
116	1	2	1	4	1	0,68
117	1	2	1	4	2	0,64
118	1	2	1	4	3	0,66
119	1	2	1	5	1	0,64
120	1	2	1	5	2	0,64
121	1	2	1	5	3	0,62
122	1	2	1	6	1	0,6
123	1	2	1	6	2	0,6
124	1	2	1	6	3	0,58
125	1	2	1	7	1	0,58
126	1	2	1	7	2	0,6
127	1	2	1	7	3	0,62
128	1	2	2	1	1	0,94
129	1	2	2	1	2	0,92
130	1	2	2	1	3	0,98
131	1	2	2	1	4	0,96
132	1	2	2	2	1	0,68
133	1	2	2	2	2	0,6
134	1	2	2	2	3	0,6
135	1	2	2	2	4	0,58
136	1	2	2	2	5	0,58
137	1	2	2	2	6	0,64
138	1	2	2	2	7	0,66
139	1	2	2	2	8	0,64
140	1	2	2	2	9	0,66
141	1	2	2	2	10	0,64
142	1	2	2	3	1	0,52
143	1	2	2	3	2	0,56
144	1	2	2	3	3	0,56
145	1	2	2	4	1	0,58
146	1	2	2	4	2	0,54
147	1	2	3	1	1	1,1
148	1	2	3	1	2	1,02
149	1	2	3	1	3	1,04
150	1	2	3	1	4	0,98
151	1	2	3	1	5	0,96
152	1	2	3	1	6	0,94
153	1	2	3	1	7	0,96
154	1	2	3	1	8	0,94

Grafito-EPD-tirosinasa

	no	putilla	electrodo	día	medida	intensidad
180	1	2	3	1	9	0,94
181	1	2	3	1	10	0,88
182	1	2	3	2	1	0,68
183	1	2	3	2	2	0,64
184	1	2	3	2	3	0,62
185	1	2	3	2	4	0,66
186	1	2	3	2	5	0,56
187	1	2	3	2	6	0,54
188	1	2	3	2	7	0,5
189	1	2	3	2	8	0,6
190	1	2	3	3	1	0,54
191	1	2	3	3	2	0,52
192	1	2	3	3	3	0,6
193	1	2	3	4	1	0,52
194	1	2	3	4	2	0,52
195	1	2	3	4	3	0,54
196	1	2	3	4	4	0,52
197	3	1	1	1	1	1,2
198	3	1	1	1	2	1,16
199	3	1	2	1	1	0,92
200	3	1	2	3	1	0,68
201	3	1	2	3	2	0,68
202	3	1	3	1	1	1,16
203	3	1	4	1	1	1,24
204	3	1	4	1	2	1,2
205	3	1	4	1	3	1,19
206	3	1	4	2	1	0,78
207	3	1	4	2	2	0,72
208	3	1	4	2	3	0,72
209	3	2	1	1	1	1,12
210	3	2	1	1	2	1,04
211	3	2	1	1	3	1,02
212	3	2	1	2	1	0,7
213	3	2	1	2	2	0,68
214	3	2	1	3	1	0,68
215	3	2	1	3	2	0,6
216	3	2	1	3	3	0,6
217	3	2	2	1	1	1,2
218	3	2	2	1	2	1,25
219	3	2	2	2	1	0,84
220	3	2	2	2	2	0,75
221	3	2	2	2	3	0,74
222	3	2	2	3	1	0,66
223	3	2	2	3	2	0,66
224	3	2	2	3	3	0,68
225	3	2	3	1	1	1
226	3	2	3	1	2	1,02
227	3	2	3	1	3	1,07
228	3	2	3	2	1	0,8
229	3	2	3	2	2	0,88
230	3	2	3	3	1	0,74
231	3	2	3	3	2	0,76
232	3	2	3	3	3	0,7
233	3	2	3	4	1	0,62
234	3	2	3	4	2	0,66
235	3	2	3	4	3	0,62
236	3	2	3	4	4	0,6
237	3	2	3	4	5	0,63
238	3	2	3	4	6	0,66
239	3	2	3	5	1	0,6
240	3	2	3	5	2	0,56
241	3	2	3	6	1	0,52
242	3	2	3	6	2	0,56
243	3	2	3	7	1	0,55
244	3	2	3	7	2	0,52
245	3	2	3	8	1	0,52
246	3	2	4	1	1	1,27
247	3	2	4	1	2	1,22
248	3	2	4	2	1	0,8
249	3	2	4	2	2	0,78
250	3	2	4	2	3	0,76
251	3	2	4	3	1	0,66
252	3	2	4	3	2	0,63
253	3	2	4	3	3	0,6

RVC-resina epoxi-tirosinasa

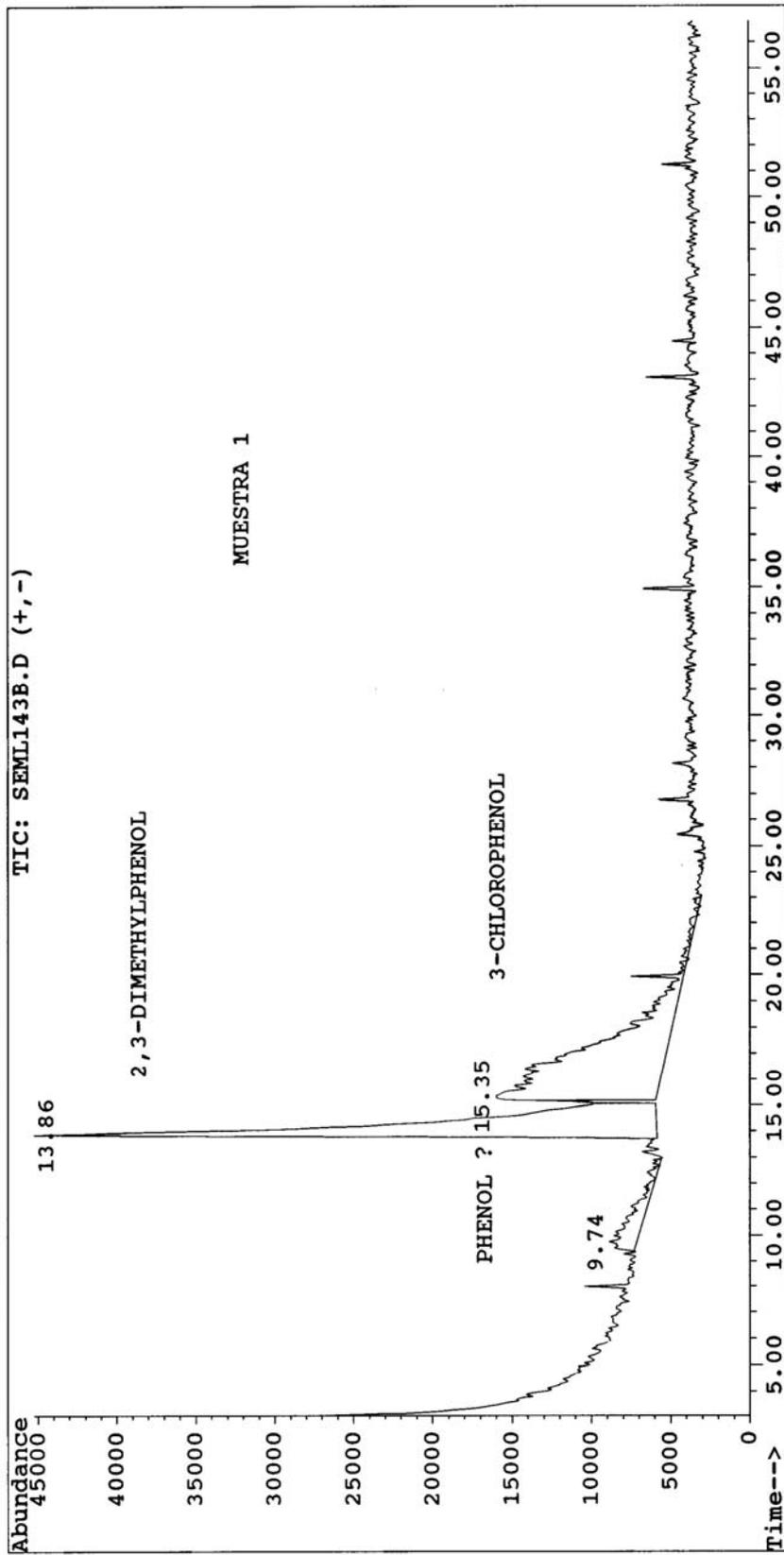
	electrodo	dia	medida	intensidad	Col_6
	1	1	1	0,04	
	1	1	2	0,045	
	1	1	3	0,042	
	1	3	1	0,041	
	1	6	1	0,045	
	1	6	2	0,044	
	1	6	3	0,039	
	1	8	1	0,03	
	1	8	2	0,03	
	1	8	3	0,028	
	2	1	1	0,009	
	2	1	2	0,01	
	2	1	3	0,011	
	3	1	1	0,055	
	3	1	2	0,066	
	3	1	3	0,055	
	3	2	1	0,038	
	3	3	1	0,038	
	1	1	1	0,054	
	1	1	2	0,056	
	3	1	3	0,056	
	2	1	4	0,048	
	2	1	5	0,05	
	2	1	6	0,048	
	2	1	7	0,047	
	2	1	8	0,047	
	2	1	9	0,046	
	2	1	10	0,044	
	1	2	1	0,05	
	2	2	2	0,048	
	2	2	3	0,048	
	1	3	1	0,043	
	2	3	2	0,054	
	2	3	3	0,054	
	2	3	4	0,051	
	2	3	5	0,051	
	2	3	6	0,052	
	2	3	7	0,05	
	2	3	8	0,049	
	2	3	9	0,049	
	2	3	10	0,046	
	2	3	11	0,052	
	2	3	12	0,05	
	2	3	13	0,046	
	2	3	14	0,048	
	2	3	15	0,05	
	2	3	16	0,049	
	2	3	17	0,048	
	2	4	1	0,045	
	2	4	2	0,048	
	2	4	3	0,052	
	2	5	1	0,052	
	2	5	2	0,05	
	2	5	3	0,048	
	2	6	1	0,048	
	2	6	2	0,048	
	2	6	3	0,044	
	2	7	1	0,042	
	2	7	2	0,045	
	2	7	3	0,048	
	2	8	1	0,041	
	2	8	2	0,041	
	2	8	3	0,042	
	2	9	1	0,044	
	2	9	2	0,044	
	2	9	3	0,044	
	2	10	1	0,040	
	2	11	1	0,042	
	2	1	1	0,045	
	2	1	2	0,042	
	2	1	3	0,043	
	3	1	1	0,043	
	3	1	2	0,038	
	3	2	3	0,045	
	3	2	1	0,035	
	3	2	2	0,039	
	2	2	3	0,045	

RVC-resina epoxi-tirosinasa

	date	electrodo	dia	medida	intensidad	Col_6
101	2	3	3	1	0,038	
102	2	3	3	2	0,039	
103	2	3	3	3	0,04	
104	2	4	1	1	0,043	
105	2	4	1	2	0,04	
106	2	4	1	3	0,04	
107	2	4	1	4	0,043	
108	2	4	1	5	0,045	
109	2	4	1	6	0,038	
110	2	4	1	7	0,043	
111	2	4	1	8	0,037	
112	2	4	1	9	0,046	
113	2	4	1	10	0,043	
114	2	4	2	1	0,042	
115	2	4	2	2	0,04	
116	2	4	2	3	0,04	
117	2	4	3	1	0,045	
118	2	4	3	2	0,044	
119	2	4	3	3	0,044	
120	2	4	4	1	0,046	
121	2	4	4	2	0,047	
122	2	4	5	1	0,04	
123	2	4	5	2	0,04	
124	3	4	5	3	0,04	
125	3	5	1	1	0,044	
126	3	5	1	2	0,037	
127	3	5	1	3	0,038	
128	3	5	1	4	0,039	
129	3	5	1	5	0,04	
130	3	5	1	6	0,04	
131	3	5	1	7	0,04	
132	3	5	1	8	0,041	
133	3	5	1	9	0,039	
134	3	5	1	10	0,042	
135	3	6	1	1	0,01	
136	3	6	1	2	0,015	
137	3	6	1	3	0,008	
138	3	1	1	1	0,049	
139	3	1	1	2	0,048	
140	3	1	1	3	0,05	
141	3	1	2	1	0,044	
142	3	1	2	2	0,048	
143	3	1	3	1	0,04	
144	3	1	4	1	0,045	
145	3	1	4	2	0,043	
146	3	1	4	3	0,04	
147	3	1	4	4	0,042	
148	3	1	5	1	0,054	
149	3	1	6	1	0,042	
150	3	1	7	1	0,046	
151	3	1	7	2	0,045	
152	3	1	8	1	0,042	
153	3	1	9	1	0,046	
154	3	1	9	2	0,039	
155	3	1	9	3	0,04	
156	3	2	1	1	0,045	
157	3	2	2	1	0,038	
158	3	2	3	1	0,04	
159	3	2	4	1	0,039	

***Anexo II: Cromatogramas y espectros de masas obtenidos
en el análisis de muestras***

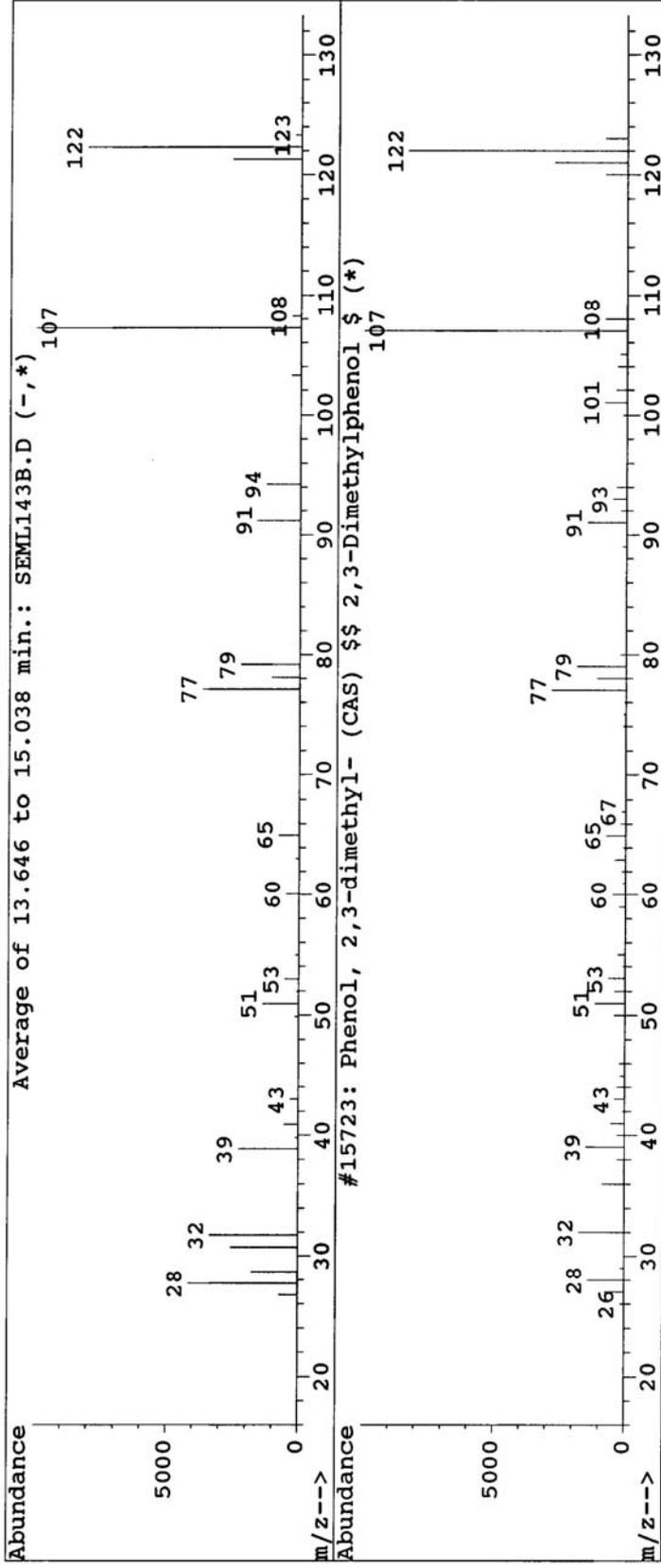
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT\1\JULIO\SEML143B.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 9 Apr 102 1:09 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: MUES1 2 INY0402/SEMLI/143 PHENOLES BEA 3 U
Misc Info : CLINICO; 1 min SPLITLESS; VA-5;HEADTUNE
Vial Number: 1



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

Quality : 87

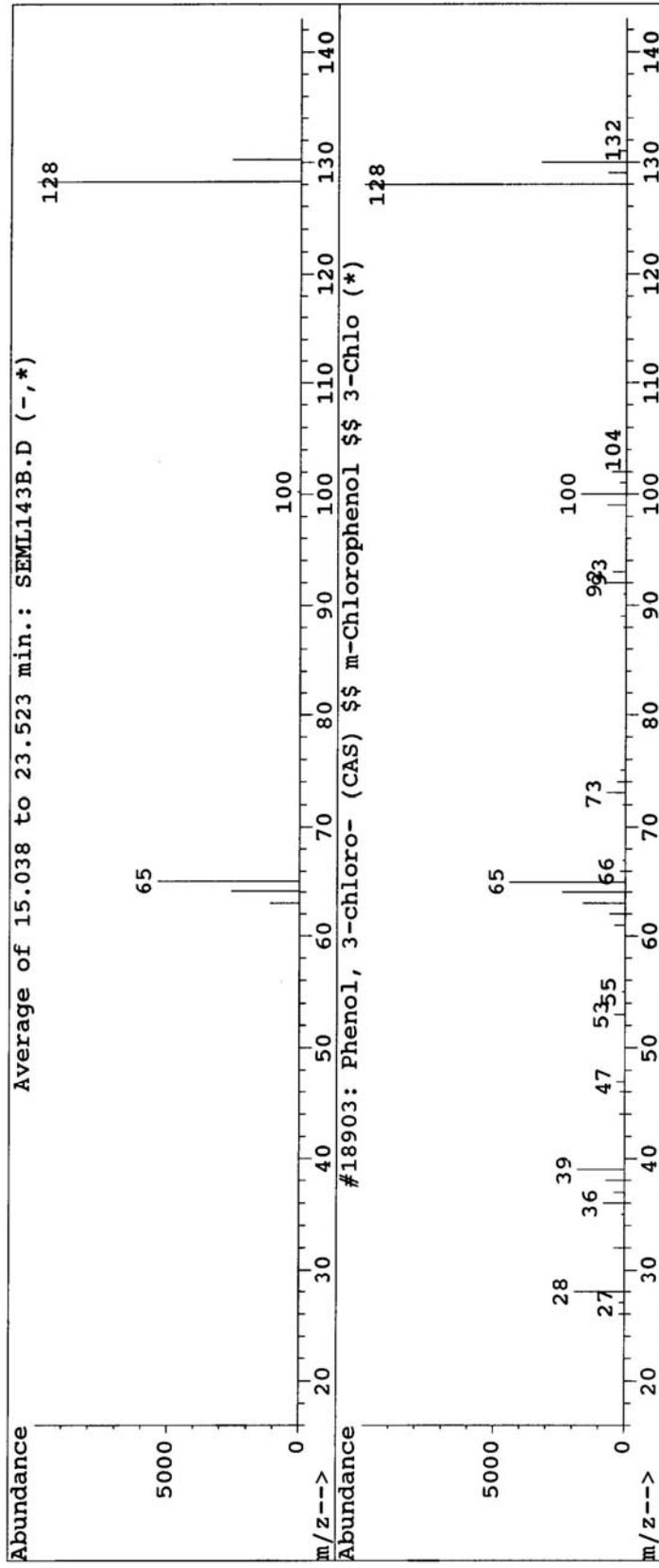
ID : Phenol, 2,3-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,3-Dimethylphenol \$\$ o-Xylenol \$\$ 2,3-Xylenol \$\$ 1-Hydroxy-2,3-dimethylbenzene \$\$ 1-HYDROXY-2,3-DIME



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

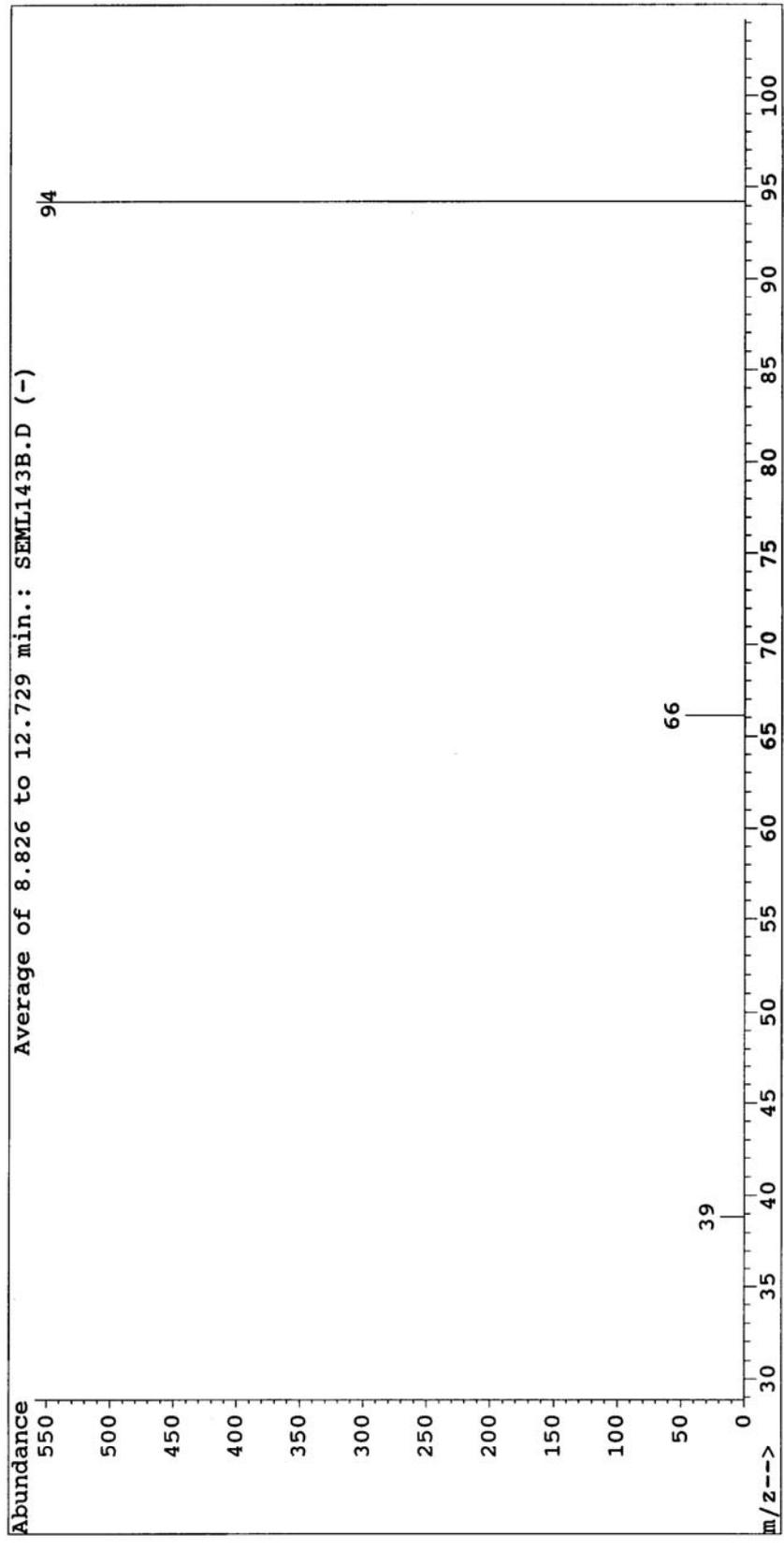
Quality : 64

ID : Phenol, 3-chloro- (CAS) \$\$ m-Chlorophenol \$\$ 3-Chlorophenol \$\$ Phenol, m-chloro- \$\$ 3-Hydroxychlorobenzene \$\$ meta-Chlorophenol \$\$ U



File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT\1\JULIO\SEML143B.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 9 Apr 102 1:09 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: MUES1 2 INY0402/SEMLI/143 PHENOLES BEA 3 U
Misc Info : CLINICO; 1 min SPLITLESS; VA-5;HEADTUNE
Vial Number: 1

12.729 min

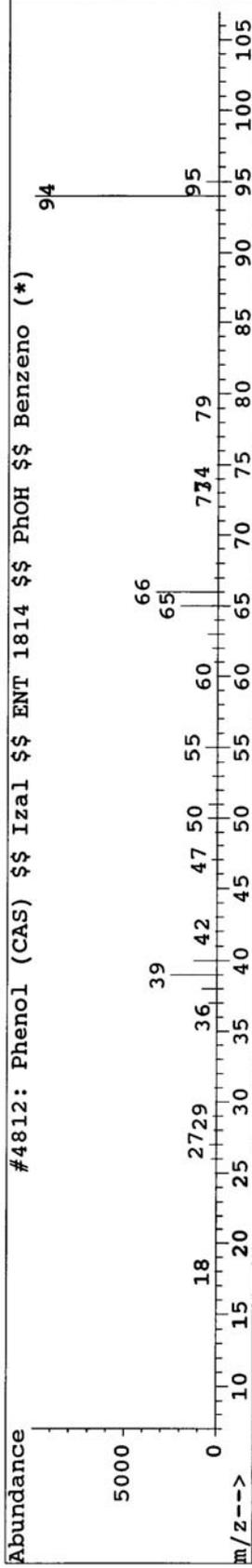


Phenol (CAS) \$\$ Izal \$\$ ENT 1814 \$\$ PhOH \$\$ Benzenol \$\$ Oxybenzene \$\$ Monophenol \$\$ Phenic acid \$\$ Carboic acid \$\$ Phenylic acid \$\$ Hydroxybenzene \$\$ Phenyl hydrate \$\$ Phenyl alcohol \$\$ Phenylic alcohol \$\$ Phenyl hydroxide \$\$ Monohydroxybenzene \$\$ Baker's P and S Liquid and Ointment \$\$ Benzene, h

Entry Number 4812 from C:\DATABASE\WILEY275.L
CAS 000108-95-2
Melting Point -300
Boiling Point -300
Retention Index 0
Mol Formula C6H6O
Mol Weight 94.042
Company ID 68449

Miscellaneous Information
QI=994, Source=PG-1982-1494-0, WLN=QR

Espectro bibliografico del Phenol



No structure available for 000108-95-2

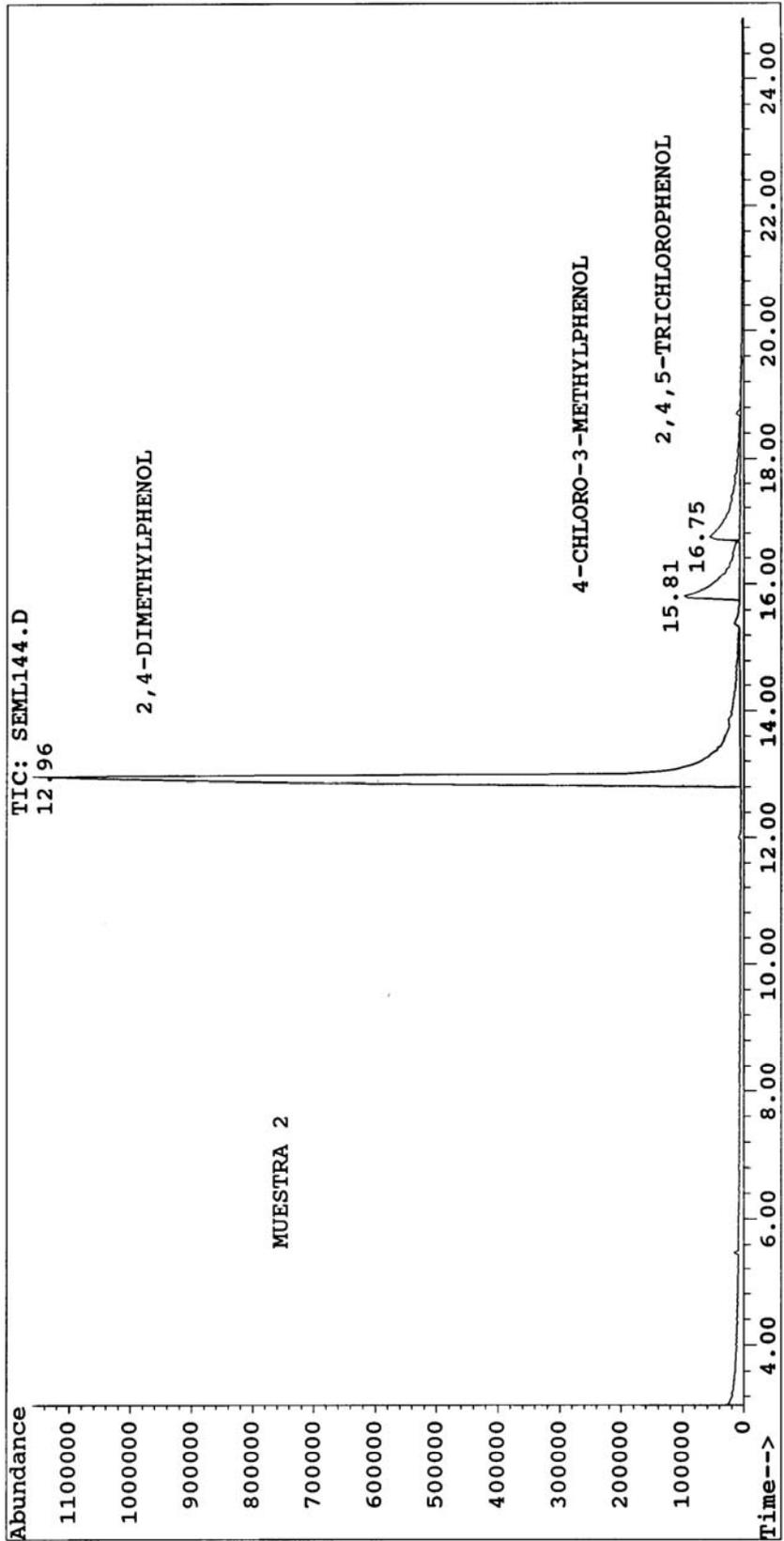
C:\DATABASE\WILEY275.L

Tue Apr 09 14:27:14 2002

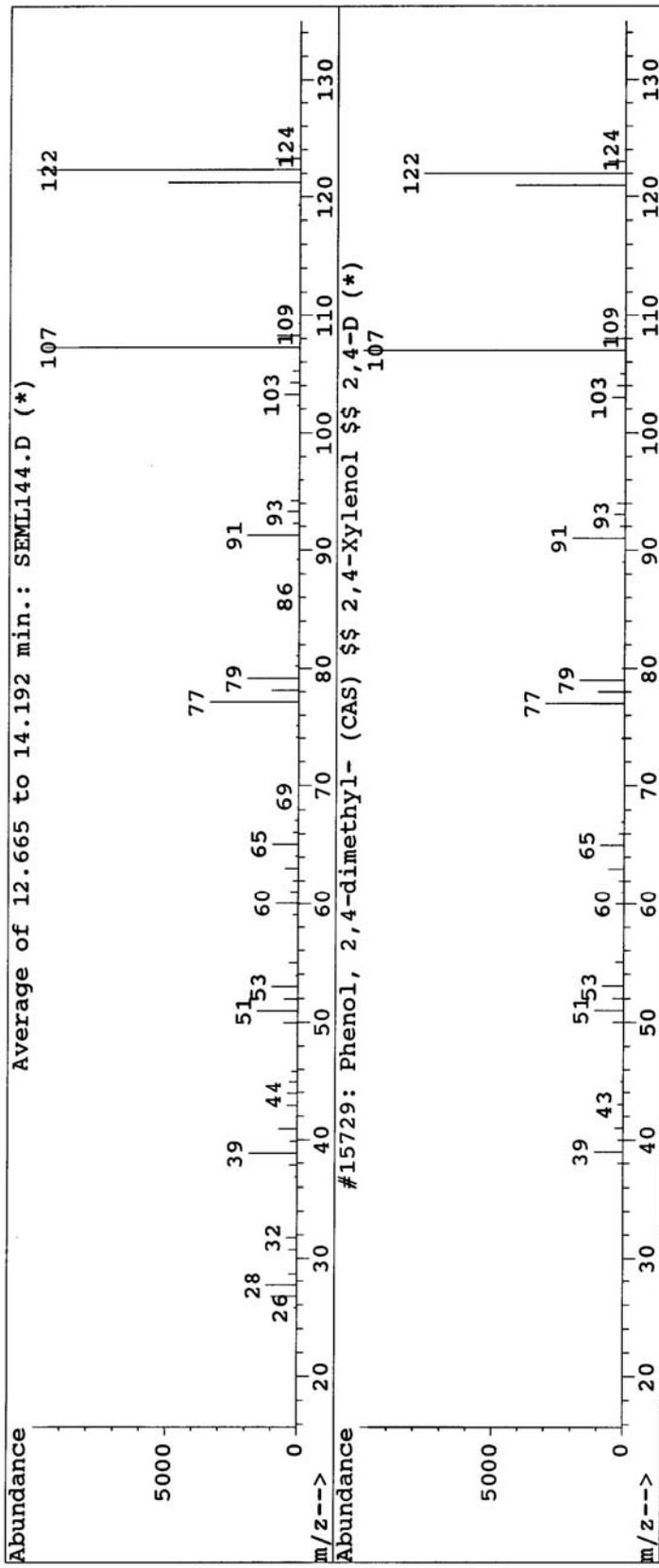
Page 1

Muestra 2

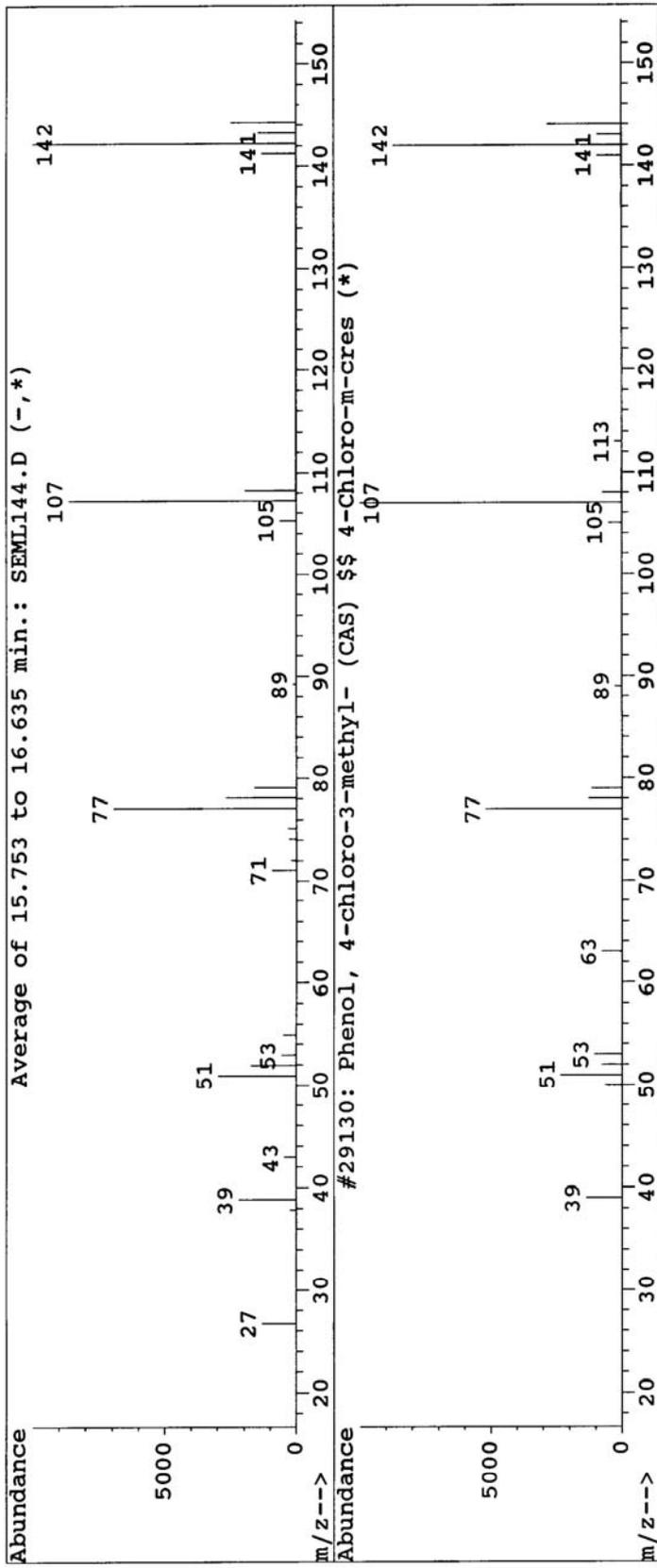
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT\1\JULIO\SEML144.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 9 Apr 102 2:18 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: MUESTRA 2 0402/SEMLI/144 PHENOLES BEA 1UL
Misc Info : CLINICO; 1 min SPLITLESS; VA-5;HEADTUNE
Vial Number: 1



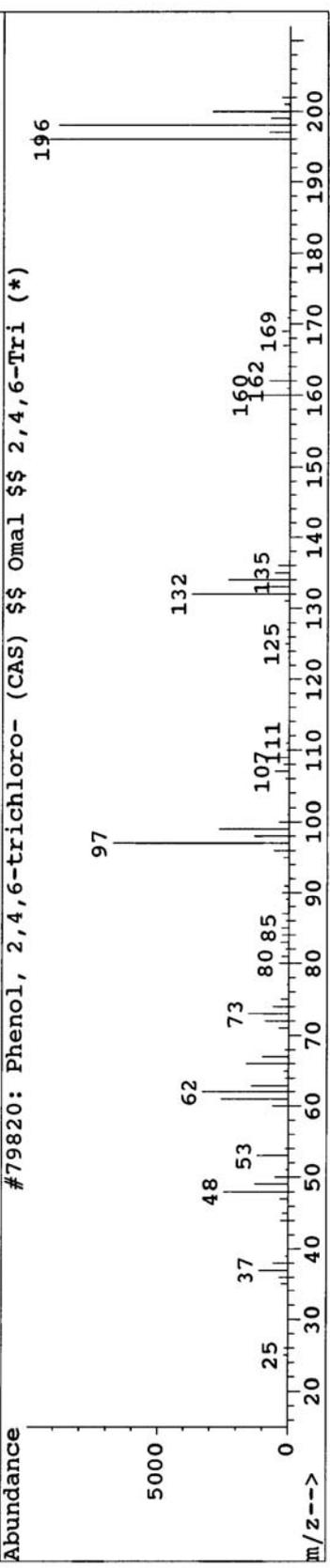
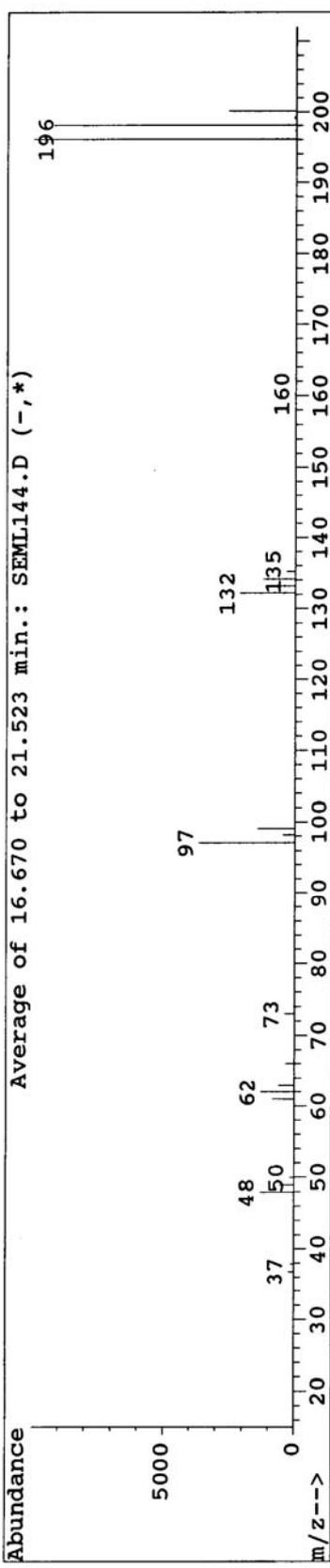
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
 Quality : 96
 ID : Phenol, 2,4-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,4-Xylenol \$\$ 2,4-Dimethylphenol \$\$ m-Xylenol \$\$ 4,6-Dimethylphenol \$\$ 4-Hydroxy-1,3-dimethylbenzene



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 86
ID : Phenol, 4-chloro-3-methyl- (CAS) \$\$ 4-Chloro-m-cresol \$\$ PCMC \$\$ 4-Chloro-3-methylphenol \$\$ Aptal \$\$ Parol \$\$ Baktol \$\$ Raschit \$\$ O

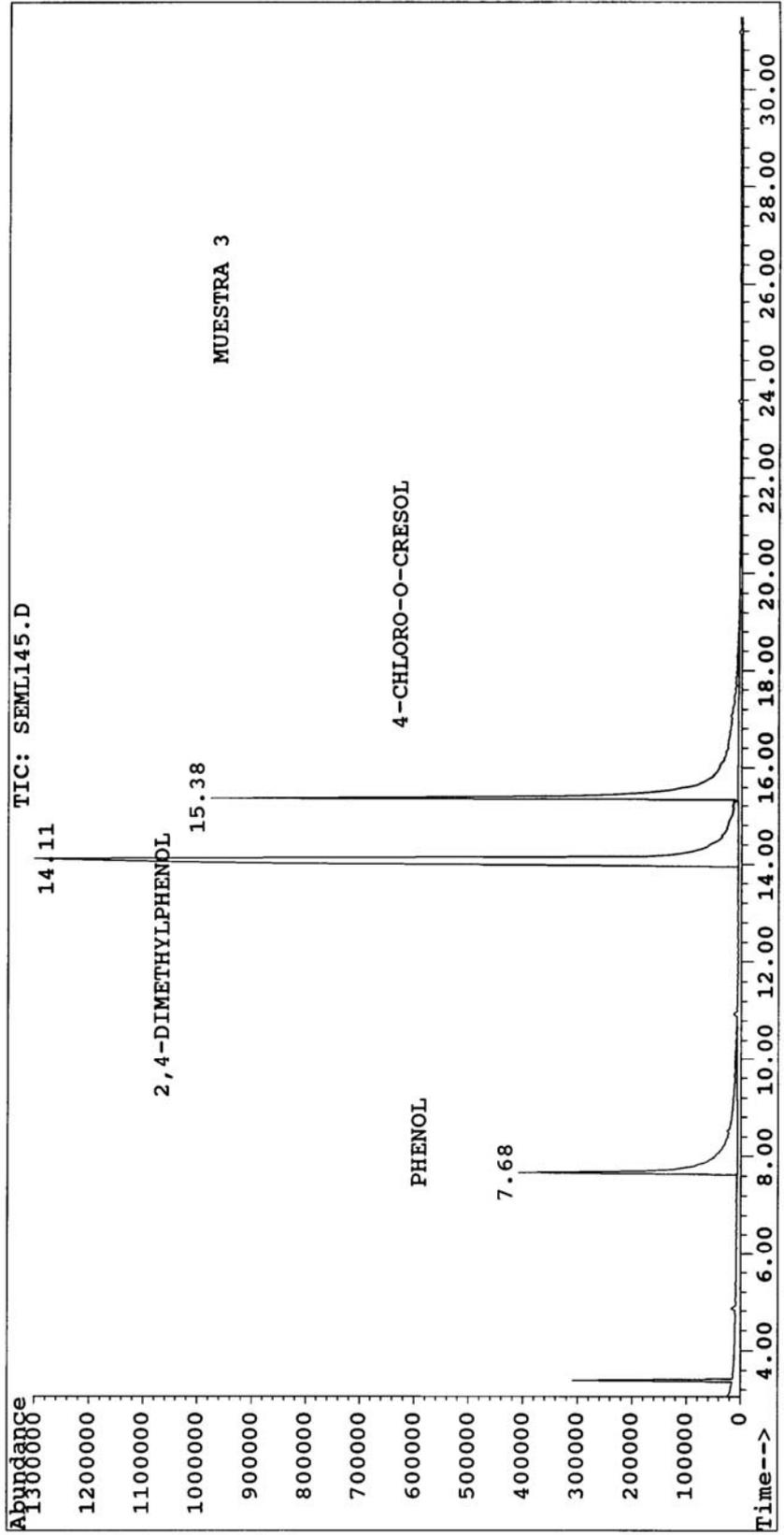


Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
 Quality : 94
 ID : Phenol, 2,4,6-trichloro- (CAS) \$\$ Omal \$\$ 2,4,6-Trichlorophenol \$\$ Phenachlor \$\$ Dowic
 ide 2S \$\$ 1,3,5-Trichloro-2-hydroxybenzene \$\$

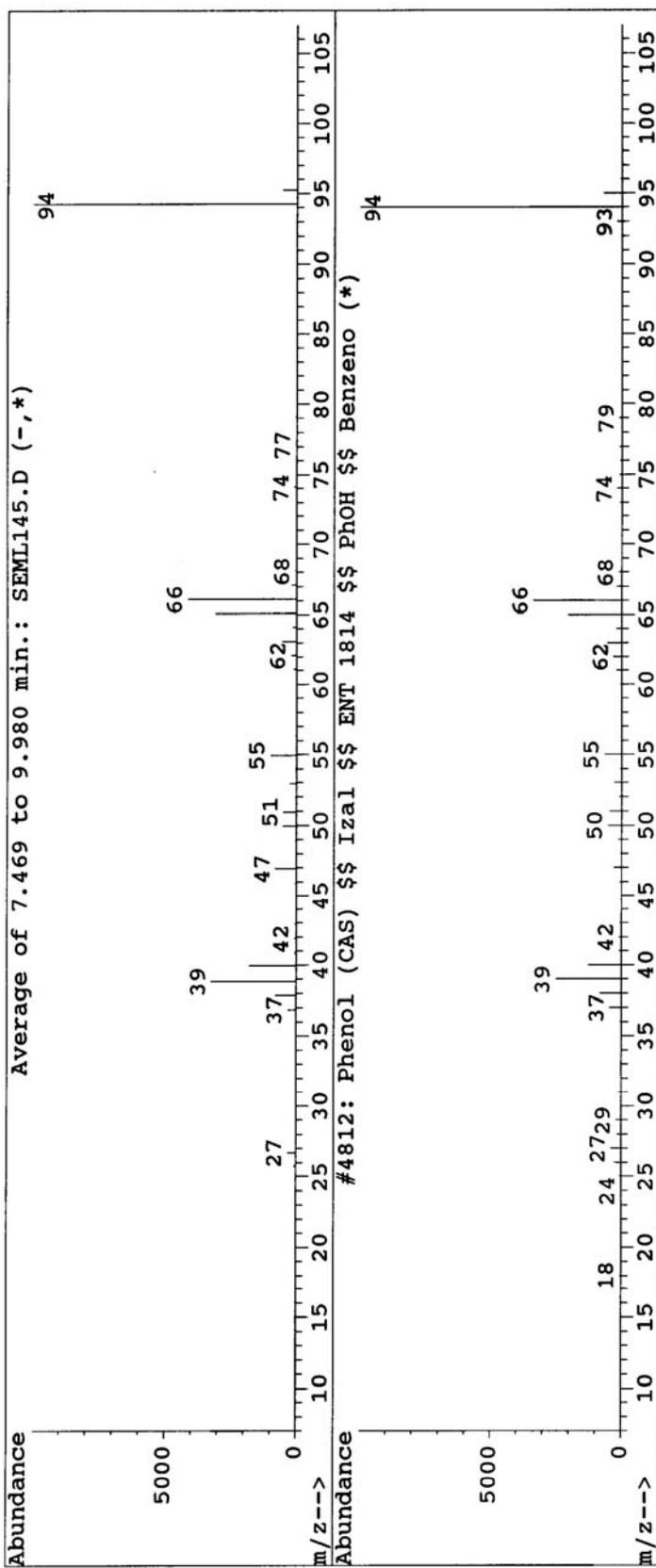


Muestra 3

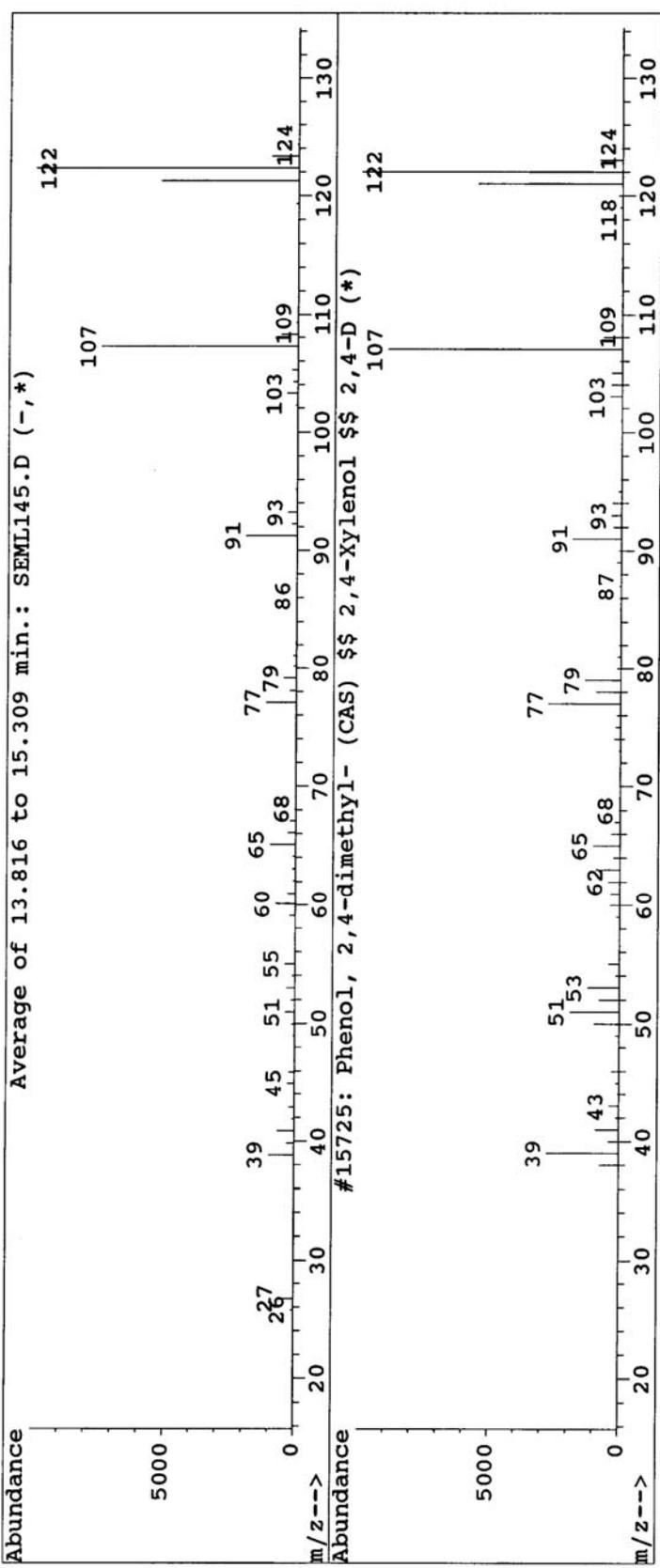
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT\1\JULIO\SEML145.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 9 Apr 102 3:13 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: MUESTRA 3 0402/SEMLI/145 PHENOL'S BEA 1UL
Misc Info : CLINICO; 1 min SPLITLESS; VA-5;HEADTUNE
Vial Number: 1



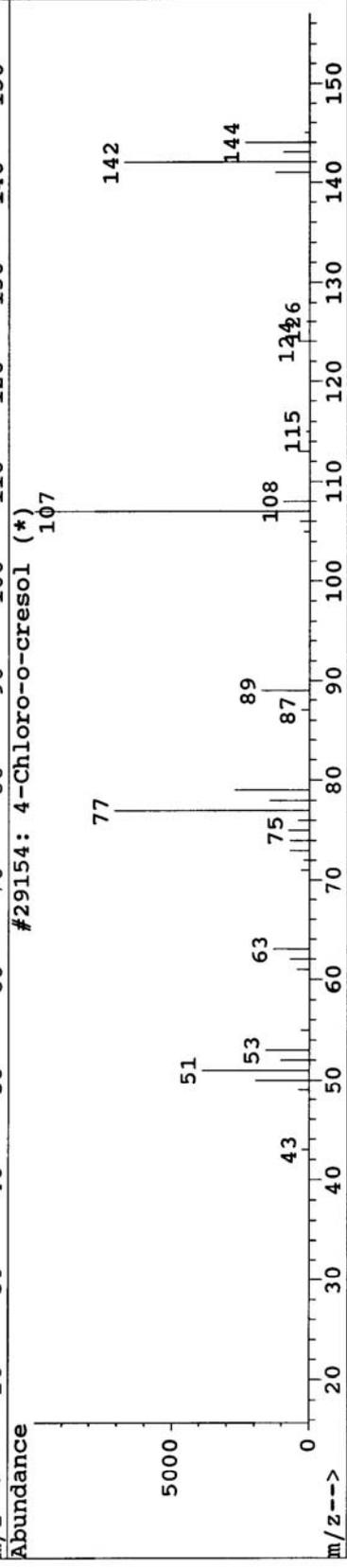
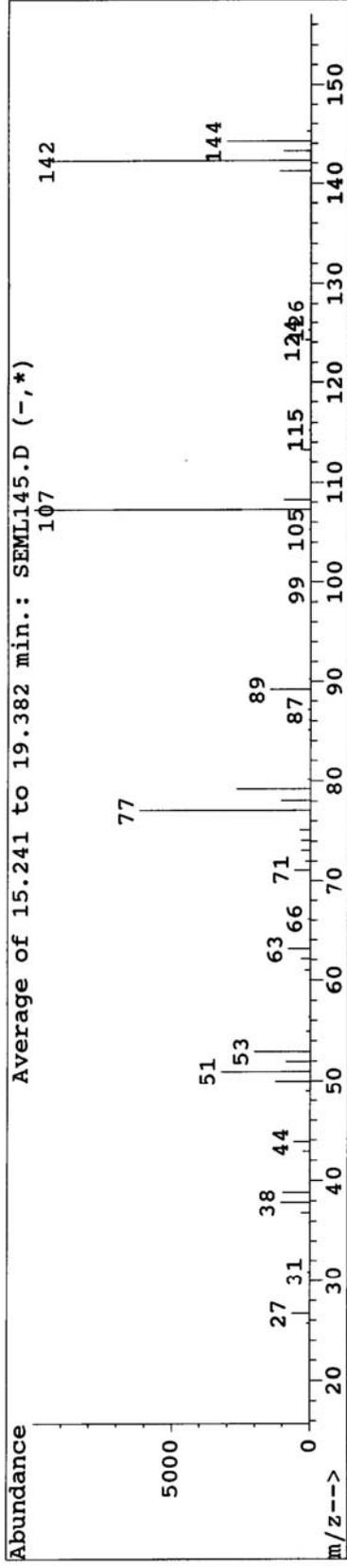
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
 Quality : 91
 ID : Phenol (CAS) \$\$ Izal \$\$ ENT 1814 \$\$ PhOH \$\$ Benzenol \$\$ Oxybenzene \$\$ Monophenol \$\$ Ph
 enic acid \$\$ Carbollic acid \$\$ Phenylic acid \$\$



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
 Quality : 87
 ID : Phenol, 2,4-dimethyl- (CAS) 2,4-Xylenol 2,4-Dimethylphenol m-Xylenol 4,6-Dimethylphenol 4-Hydroxy-1,3-dimethylbenzene

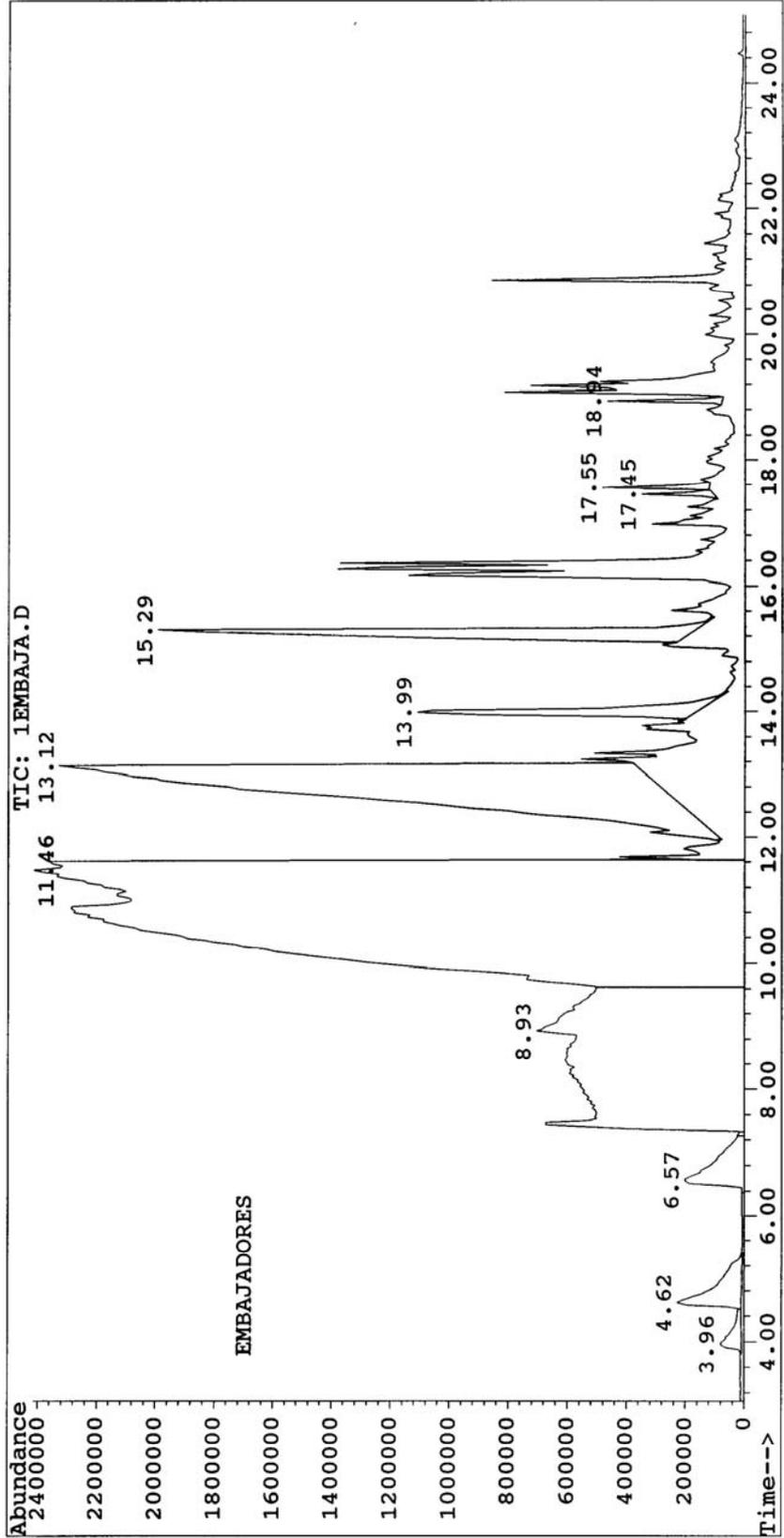


Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 93
ID : 4-Chloro-o-cresol



Muestra SD

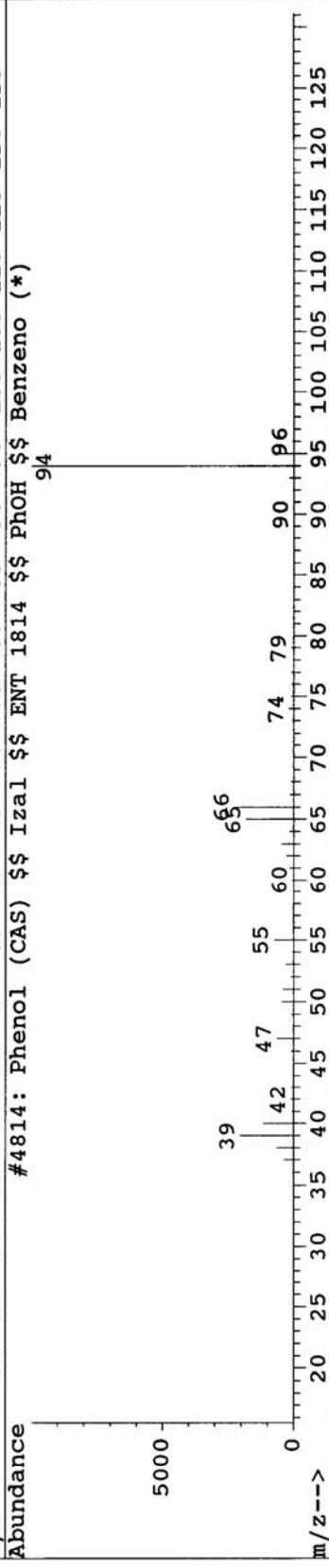
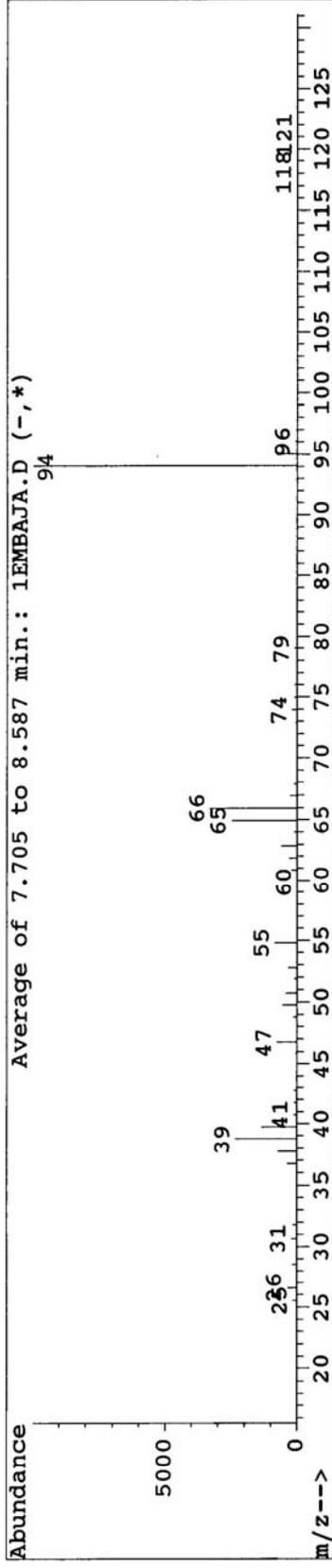
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT\1\JULIO\1EMBAJA.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 4 Jul 101 12:36 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: EMBAJADORES; ANALISIS FENOLES
Misc Info : MET CLINICO; 1 MIN SPLITLESS; VA-5 ; 2 ul IN
Vial Number: 1



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

Quality : 95

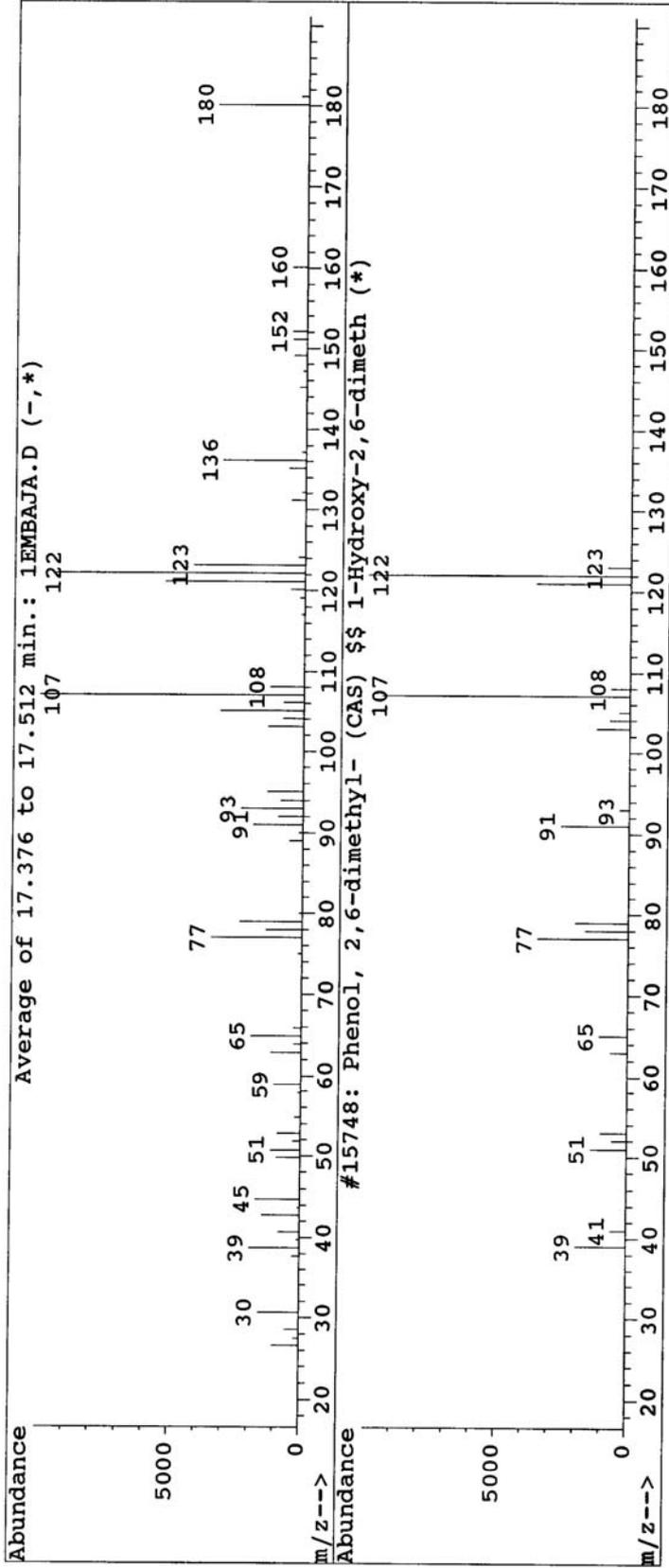
ID : Phenol (CAS) \$\$ Izal \$\$ ENT 1814 \$\$ PhOH \$\$ Benzenol \$\$ Oxybenzene \$\$ Monophenol \$\$ Phenolic acid \$\$ Carbolic acid \$\$ Phenylic acid \$\$



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

Quality : 91

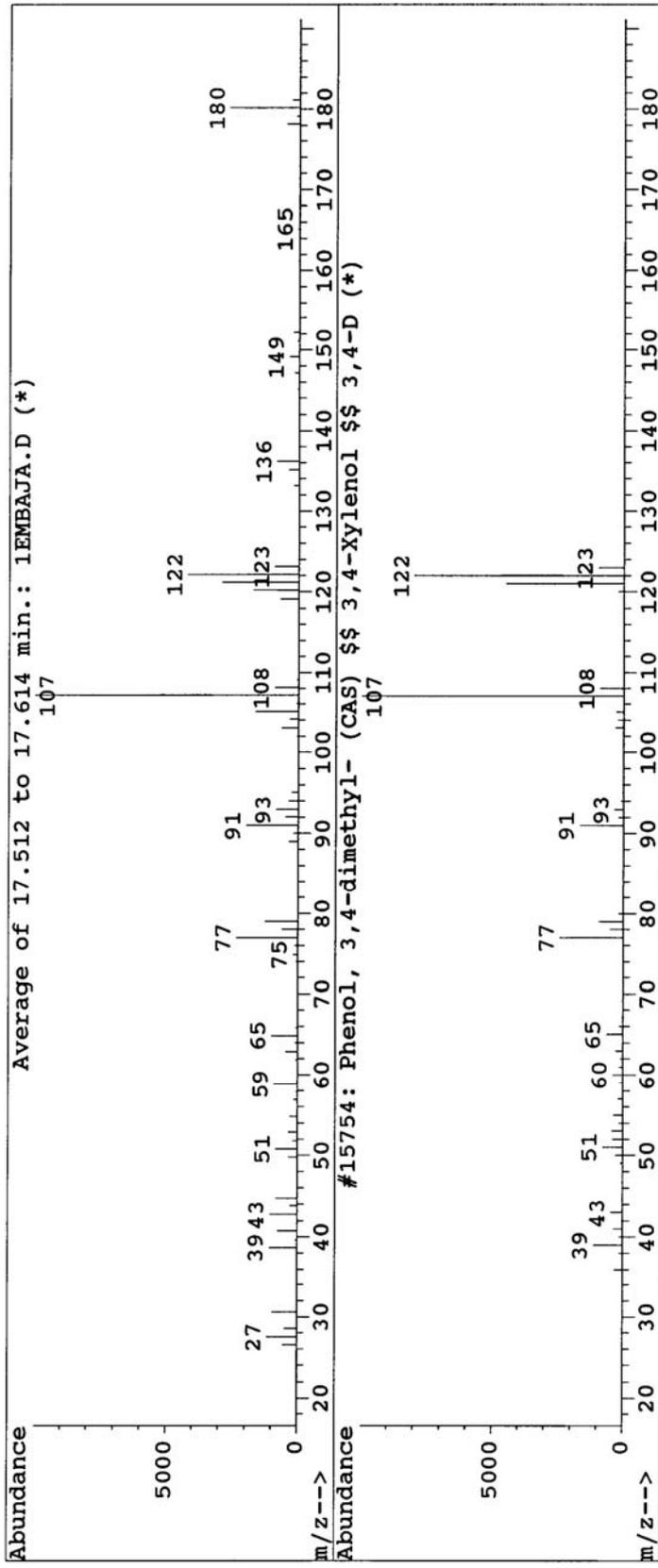
ID : Phenol, 2,6-dimethyl- (CAS) \$\$ 1-Hydroxy-2,6-dimethylbenzene \$\$ 2,6-Dimethylphenol \$\$
2,6-Xylenol \$\$ 2,6-Dimethyl-phenol \$\$ 2,6-Dime



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

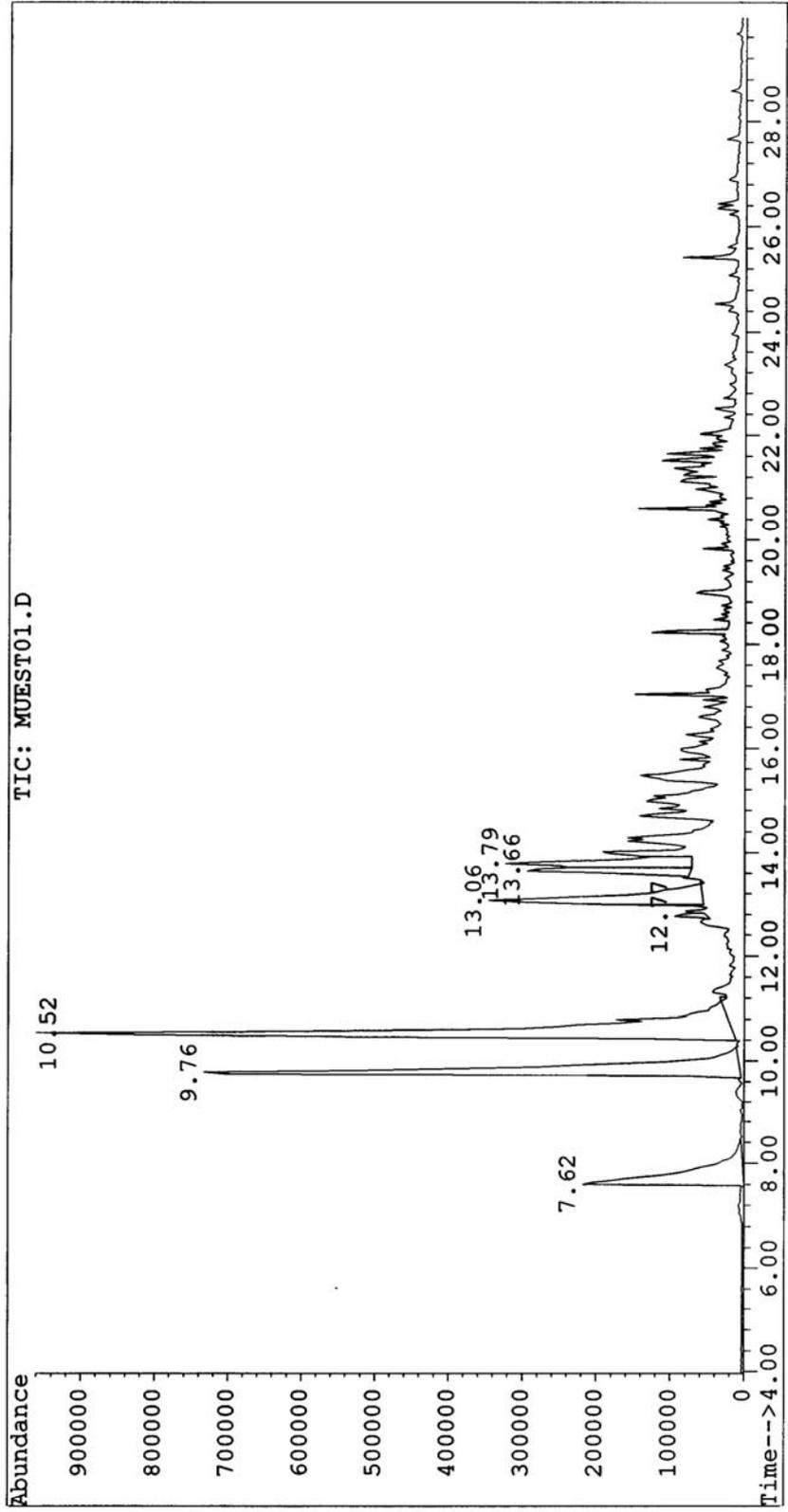
Quality : 74

ID : Phenol, 3,4-dimethyl- (CAS) 3,4-Xylenol 3,4-Dimethylphenol 1,3,4-Xylenol 5,5-Dimethylphenol 1-Hydroxy-3,4-dimethylben



Muestra DAF 1

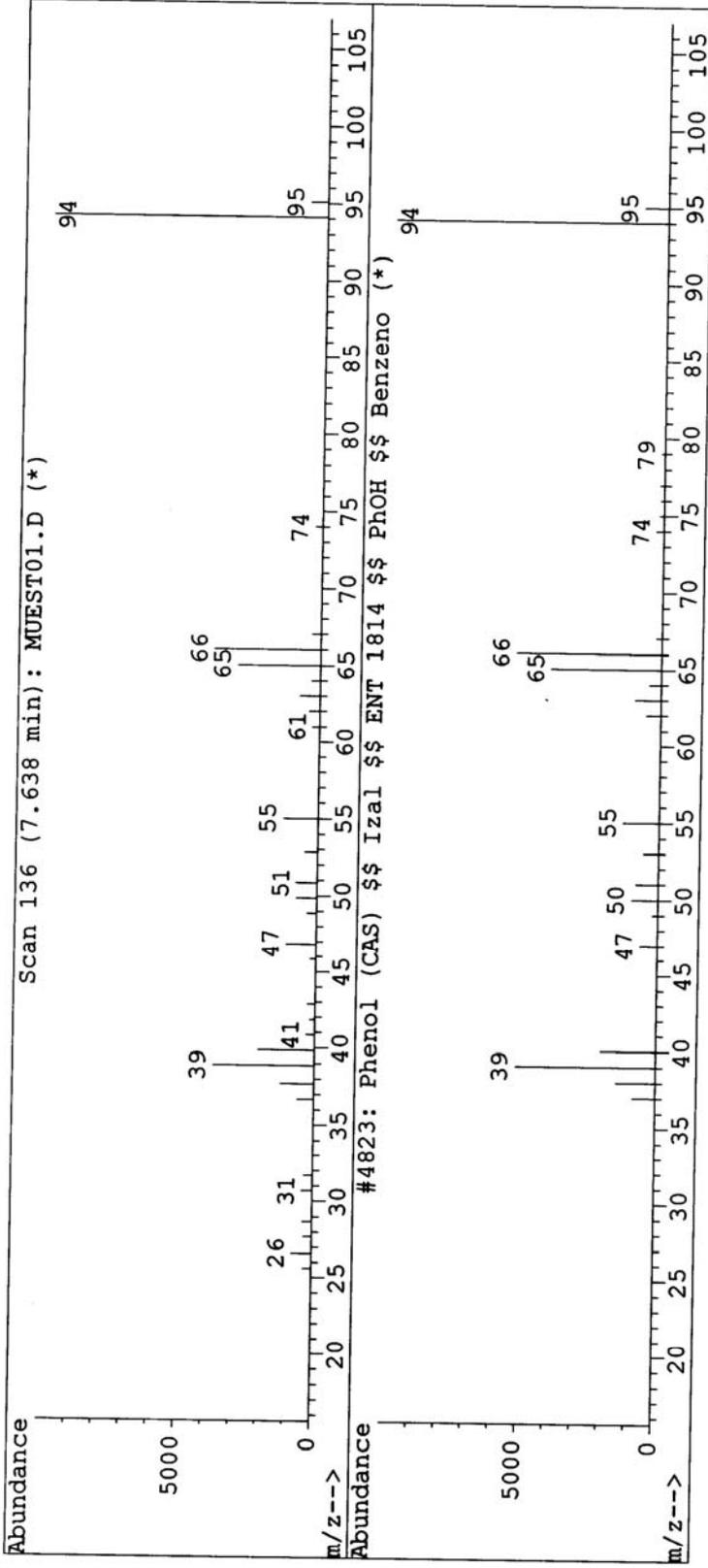
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT~1\PINGAR~1\JULIO\MUEST01.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 20 Jun 100 10:57 am using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: MUESTRA DE AGUA RESIDUAL SIN PRECONCENTRACIÓ
Misc Info :
Vial Number: 1



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

Quality : 97

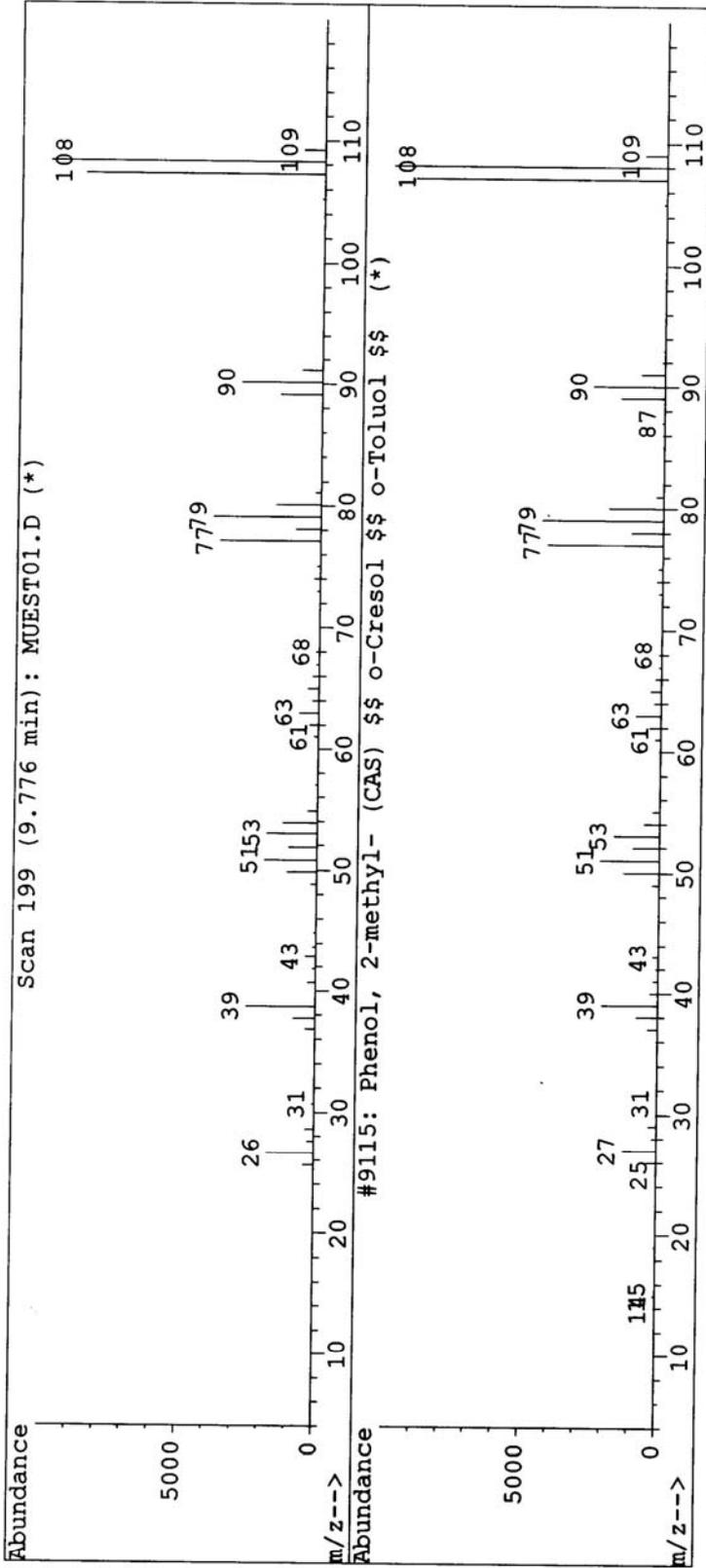
ID : Phenol (CAS) \$\$ Izal \$\$ ENT 1814 \$\$ PhOH \$\$ Benzenol \$\$ Oxybenzene \$\$ Monophenol \$\$
Phenic acid \$\$ Carboic acid \$\$ Phenylic acid \$\$



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

Quality : 98

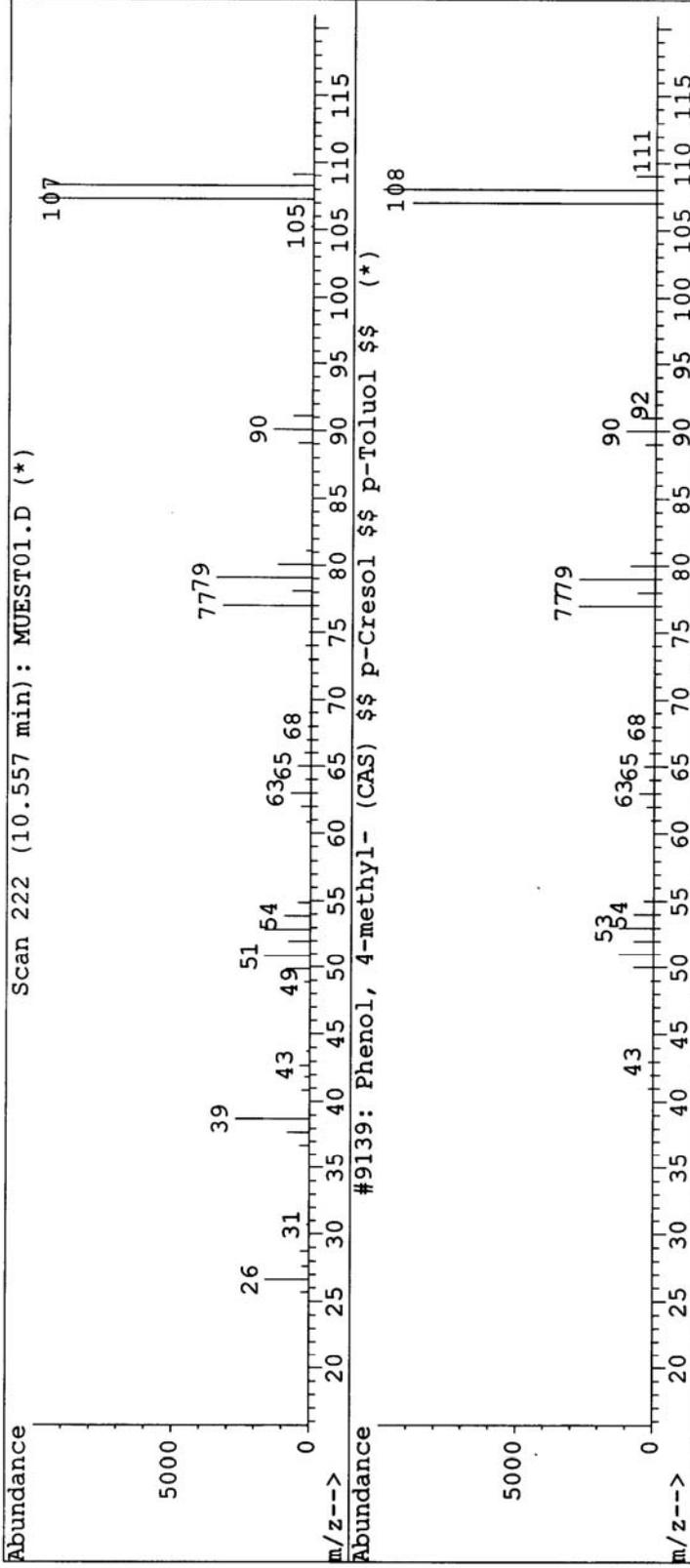
ID : Phenol, 2-methyl- (CAS) o-Cresol o-Toluol 2-Cresol o-Oxytoluene o-Me
thylphenol 2-Methylphenol o-Hydroxytoluene



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

Quality : 96

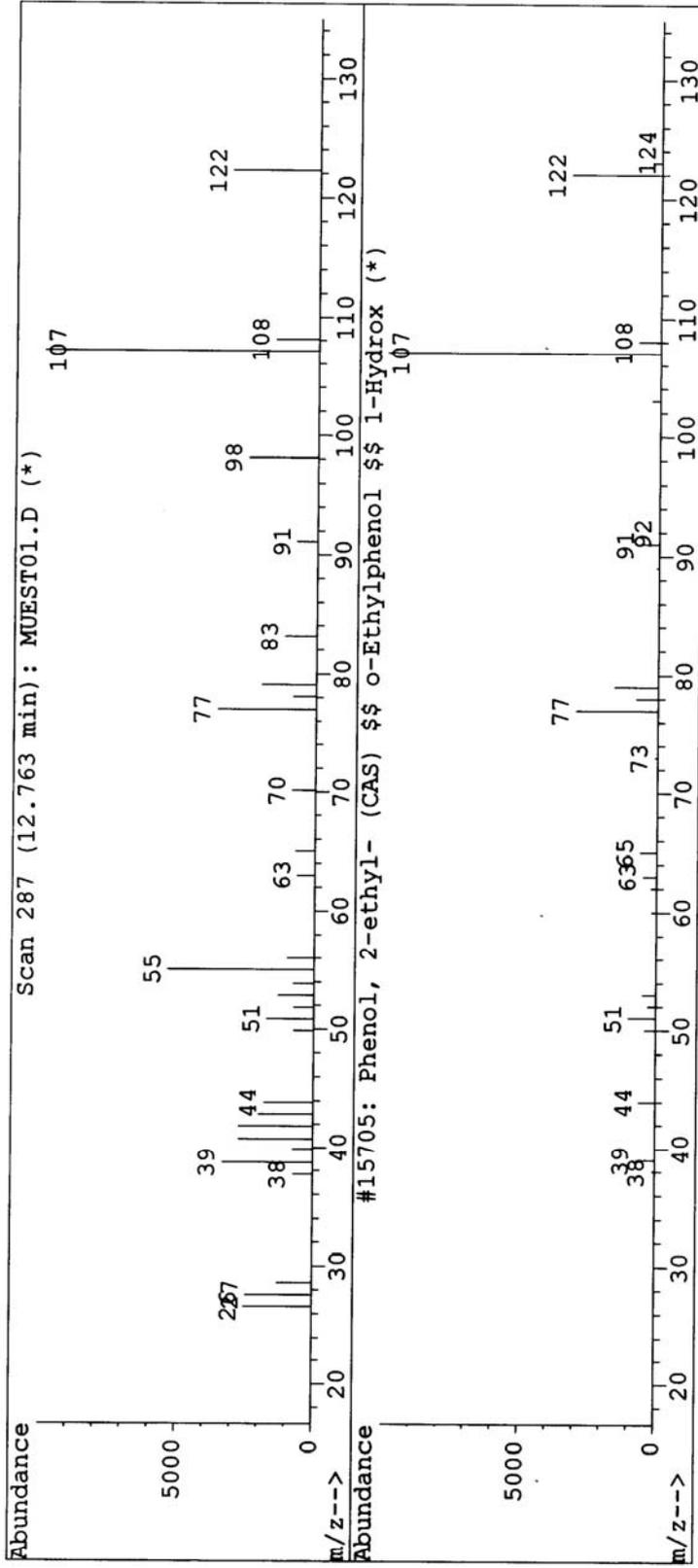
ID : Phenol, 4-methyl- (CAS) \$\$ p-Cresol \$\$ p-Toluol \$\$ 4-Cresol \$\$ p-Kresol \$\$ p-Oxytol
uene \$\$ p-Methylphenol \$\$ p-Cresylic acid \$\$ p-To



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

Quality : 68

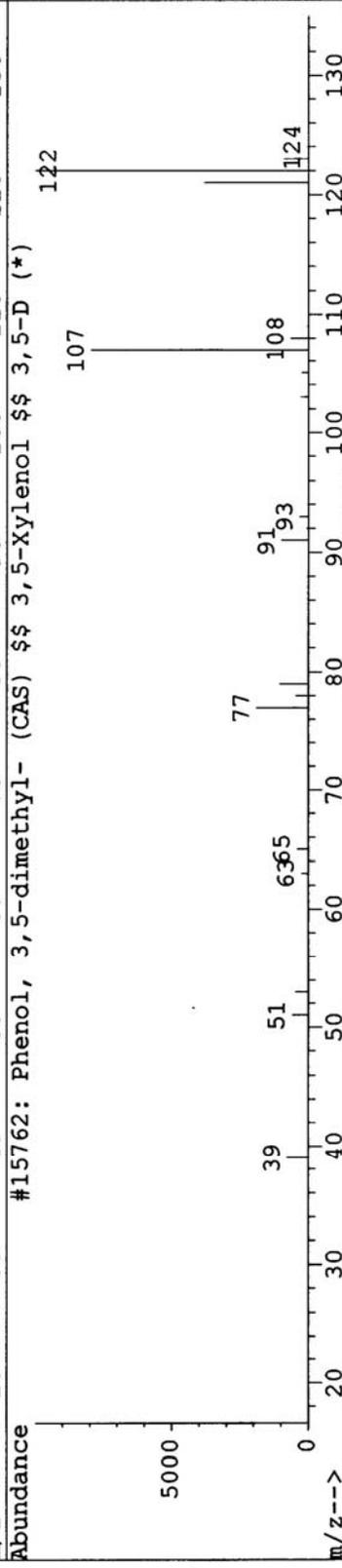
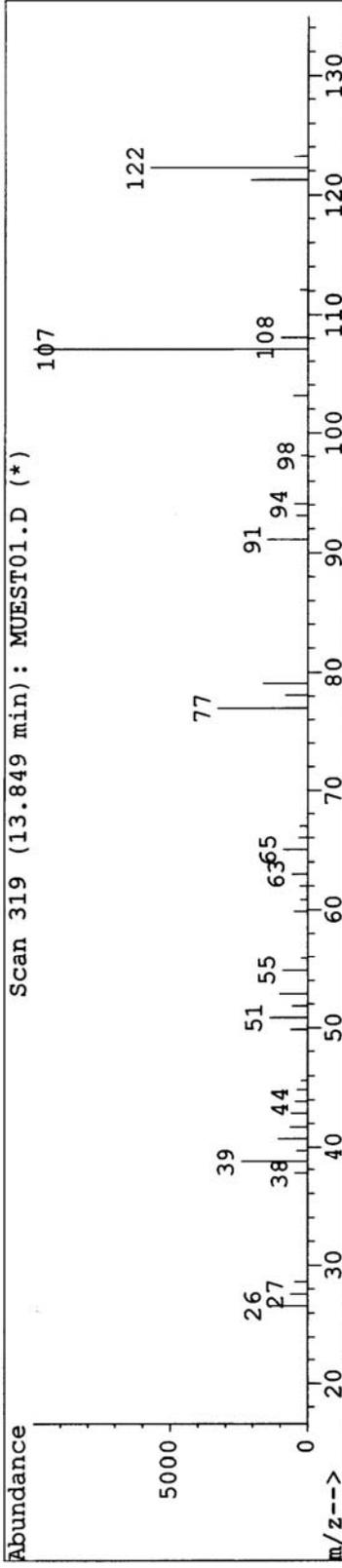
ID : Phenol, 2-ethyl- (CAS) \$\$ o-Ethylphenol \$\$ 1-Hydroxy-2-ethylbenzene \$\$ ORTHO-ETHYLP
HENOL \$\$ Phlorol \$\$ 2-Ethylphenol \$\$ Phenol, o-et



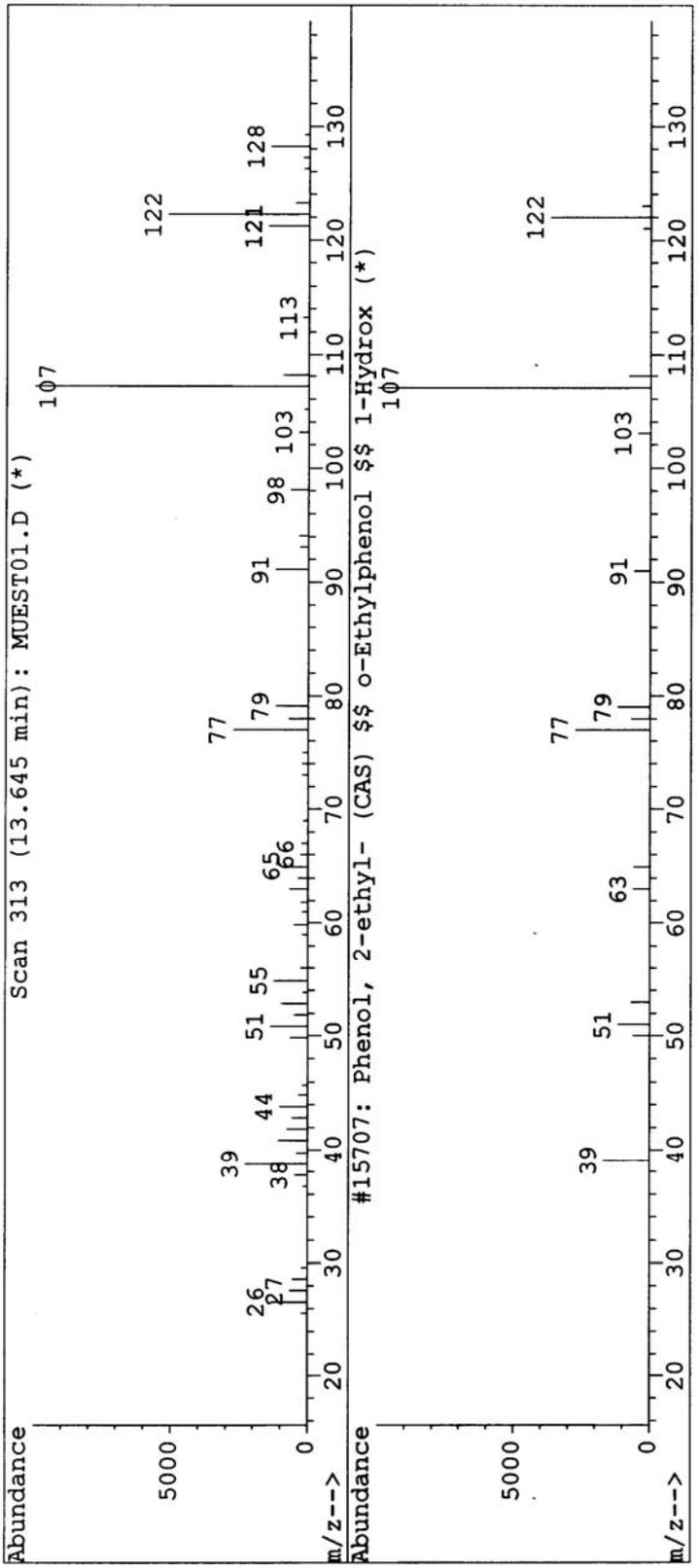
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

Quality : 94

ID : Phenol, 3,5-dimethyl- (CAS) 3,5-Xylenol 3,5-Dimethylphenol 1,3,5-Xylenol 1-Hydroxy-3,5-dimethylbenzene 1,3-Dimethyl-5



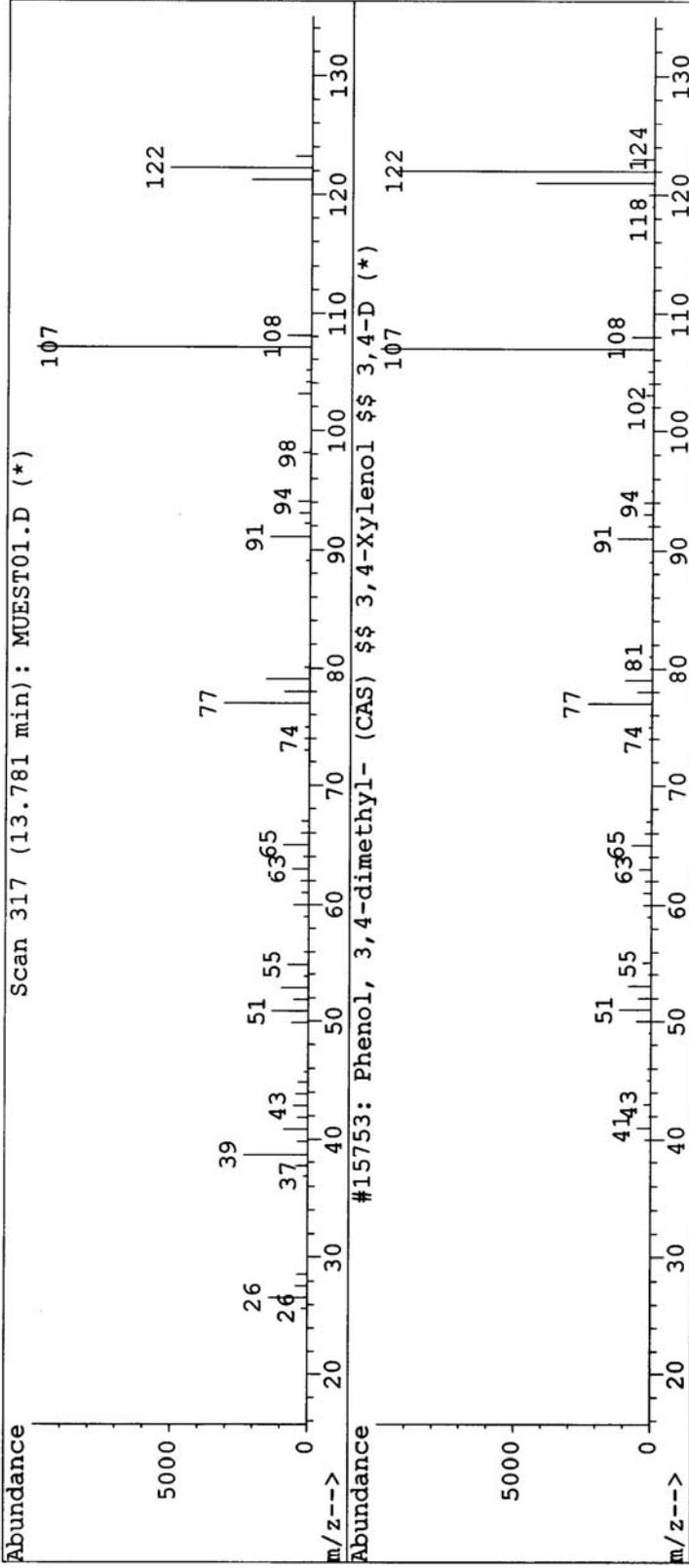
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
 Quality : 90
 ID : Phenol, 2-ethyl- (CAS) \$\$ o-Ethylphenol \$\$ 1-Hydroxy-2-ethylbenzene \$\$ ORTHO-ETHYLP
 HENOL \$\$ Phlorol \$\$ 2-Ethylphenol \$\$ Phenol, o-et



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

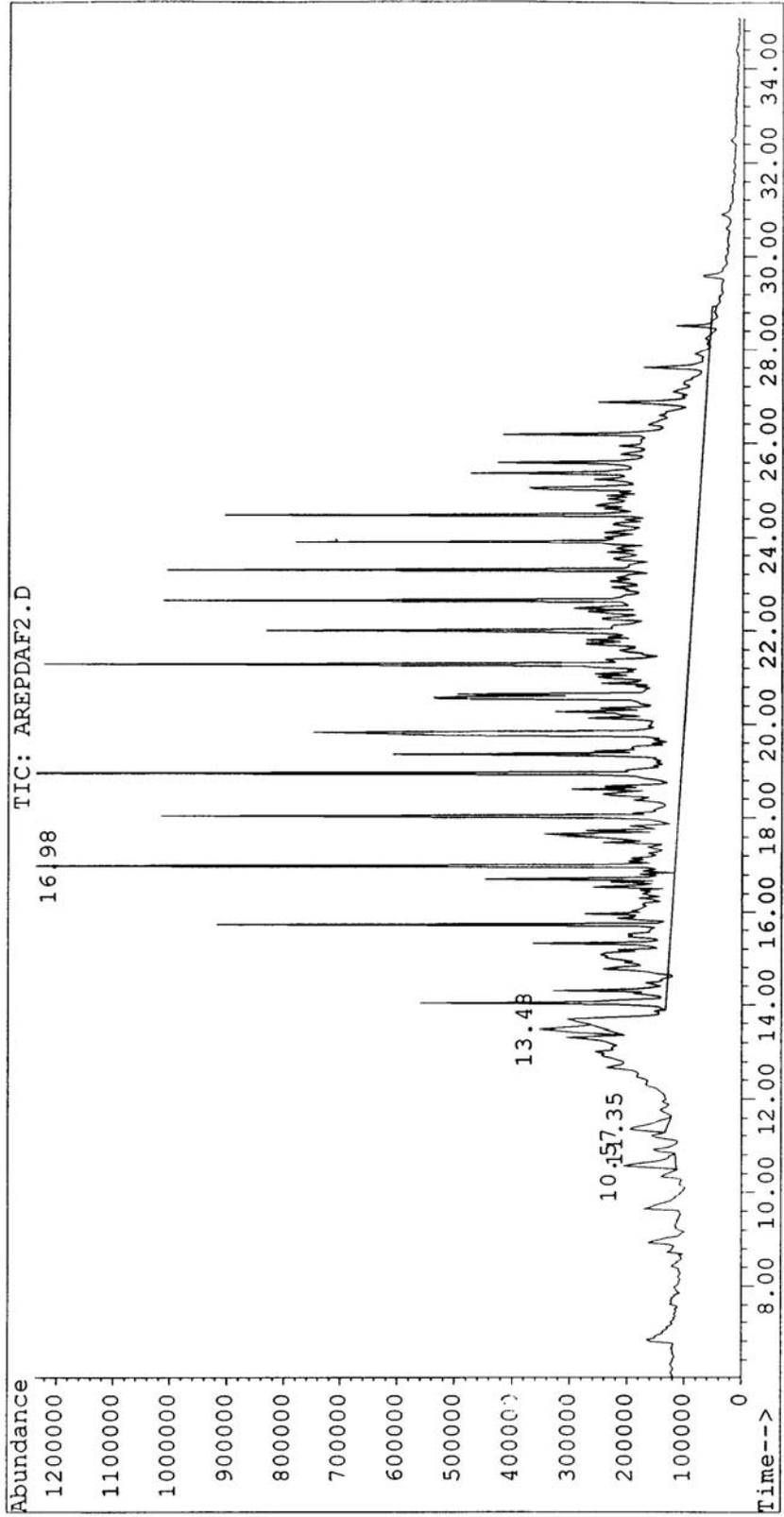
Quality : 95

ID : Phenol, 3,4-dimethyl- (CAS) \$\$ 3,4-Xylenol \$\$ 3,4-Dimethylphenol \$\$ 1,3,4-Xylenol \$
\$ 4,5-Dimethylphenol \$\$ 1-Hydroxy-3,4-dimethylben

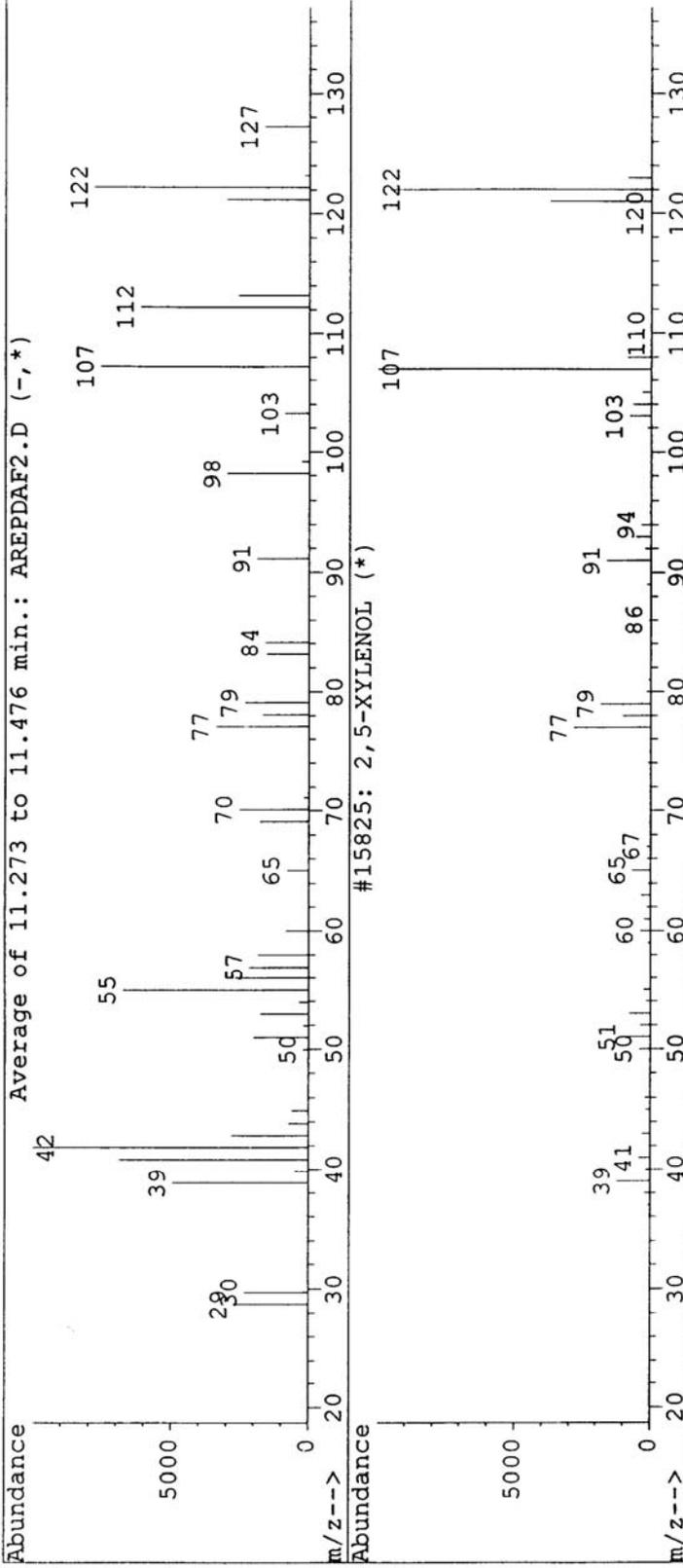


Muestra DAF 2

File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT~1\JULIO\AREPDAF2.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 29 Mar 101 5:55 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: AGUA REPSOL SALIDA DAF 2*INYECCIÓN
Misc Info : MET CLÍNICO; 0.75 SPLITLESS; VA-5 ; 1,5 INYE
Vial Number: 1



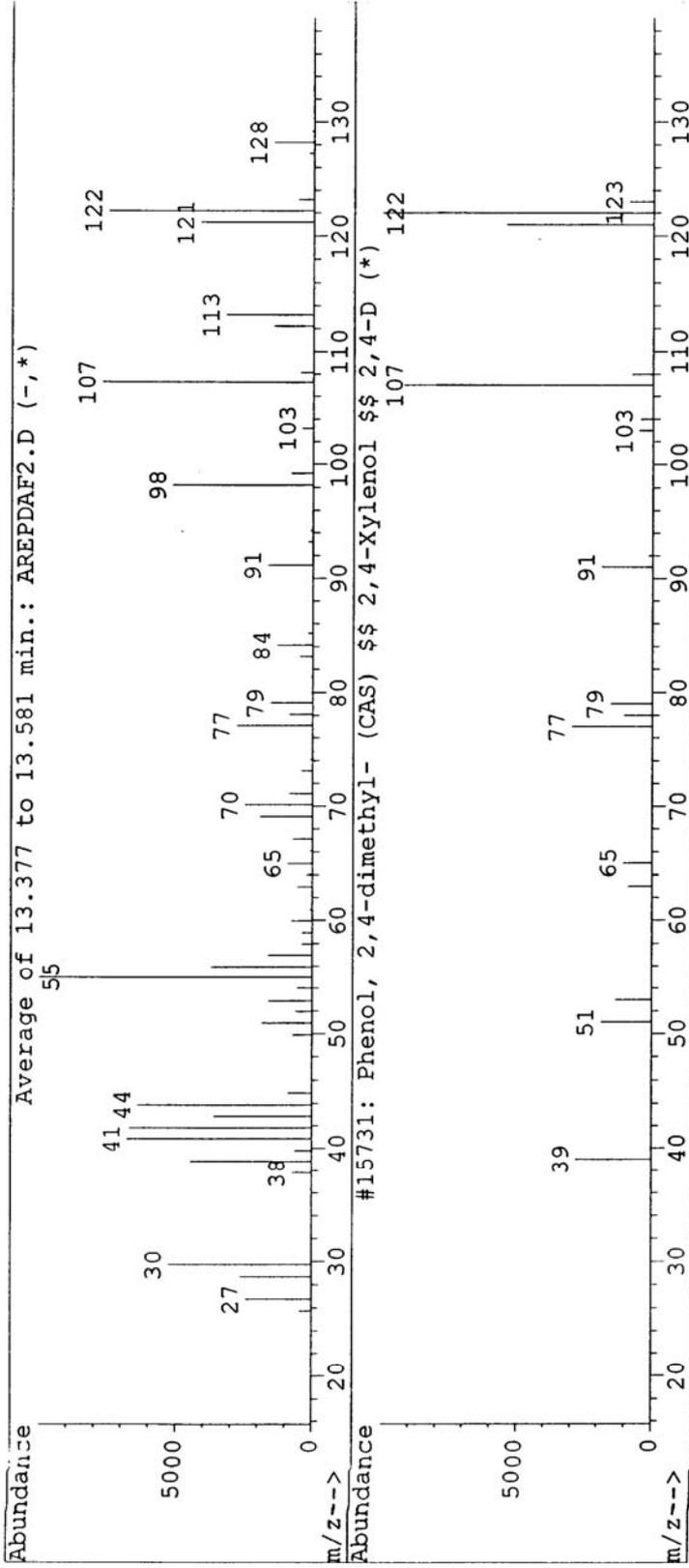
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 50
ID : 2,5-XYLENOL



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

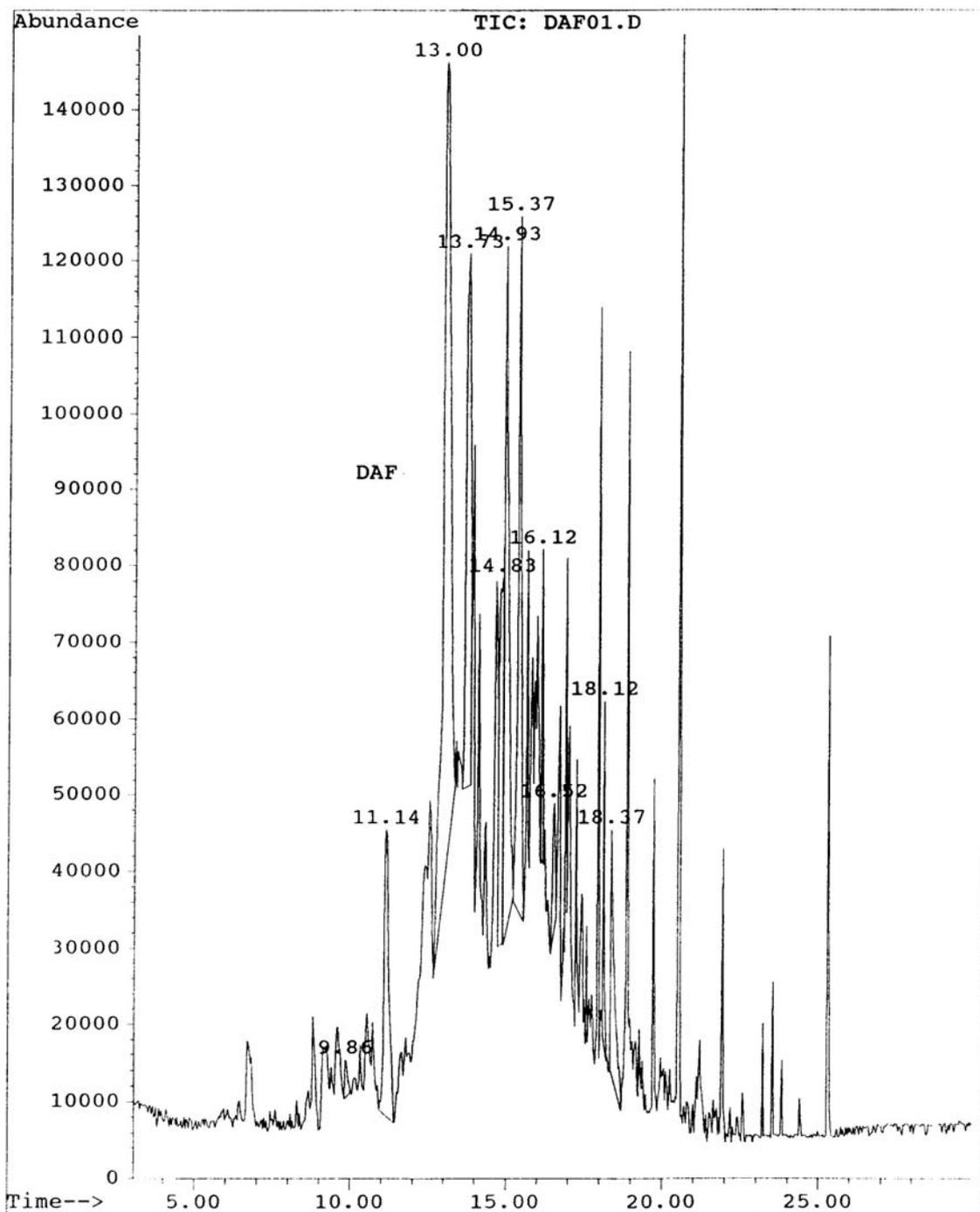
Quality : 64

ID : Phenol, 2,4-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,4-Xylenol \$\$ 2,4-Dimethylphenol \$\$ m-Xylenol \$\$ 4,6-Dimethylphenol \$\$ 4-Hydroxy-1,3-dimethylbenzene

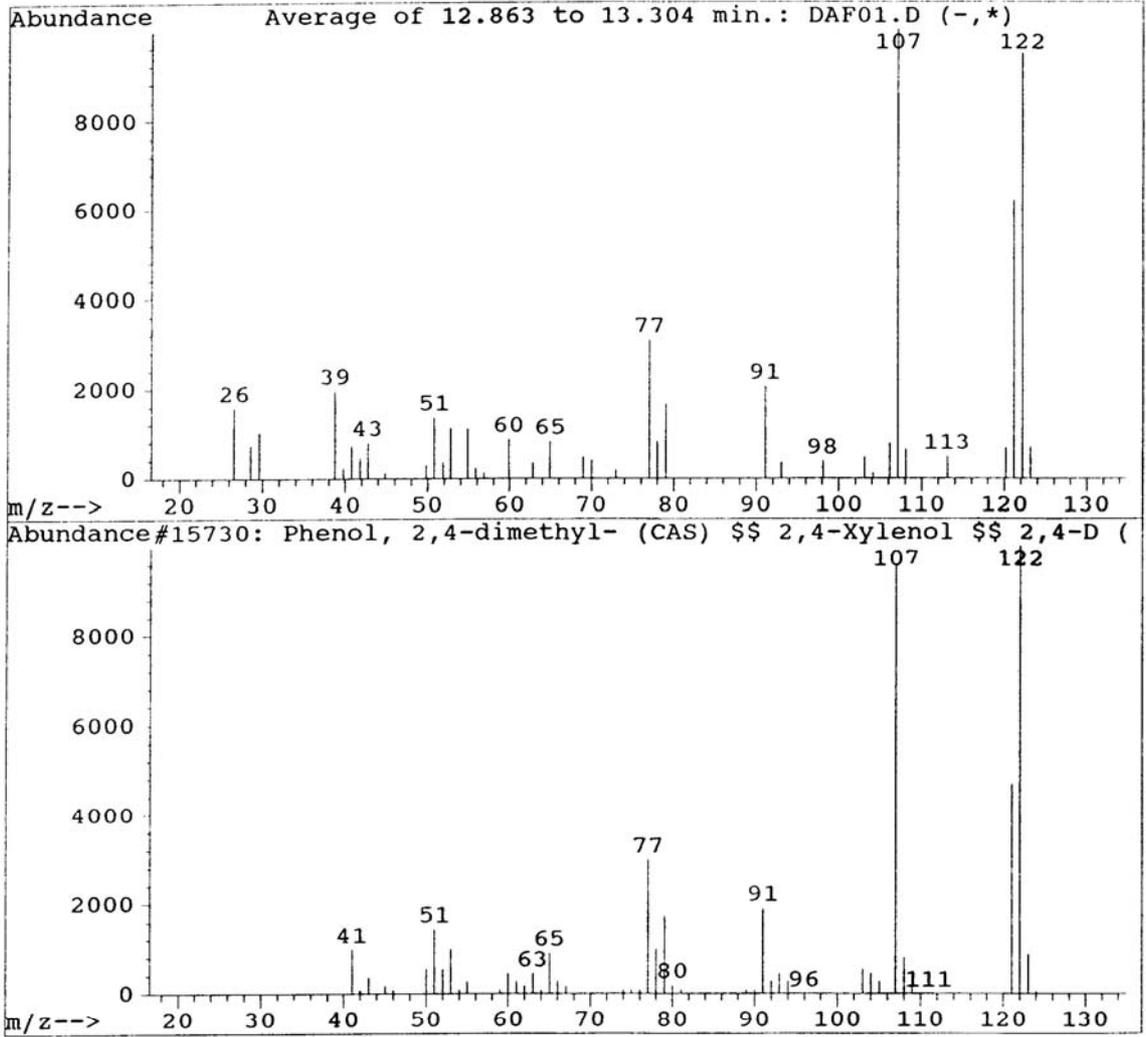


Muestra DAF 3

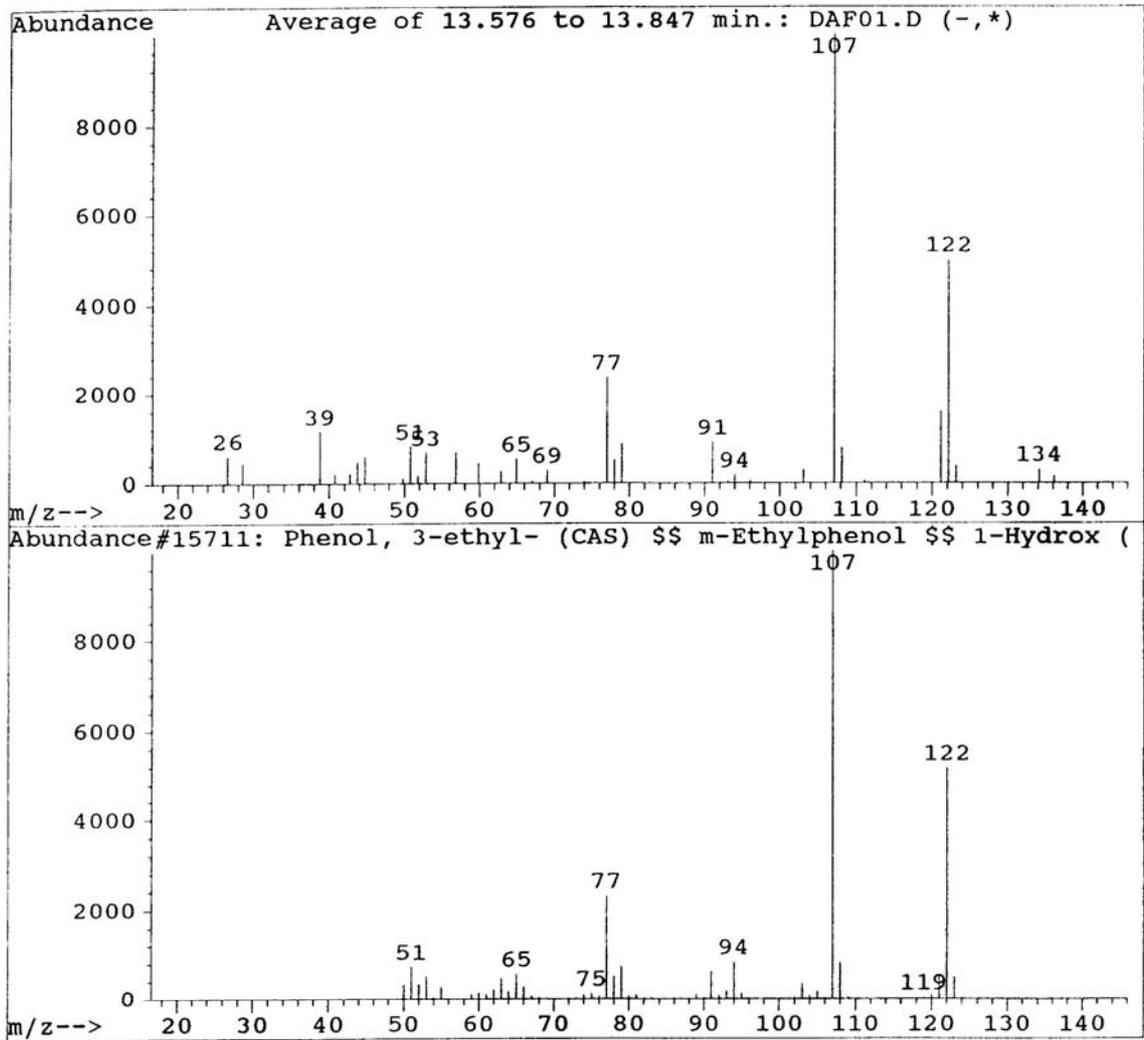
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT-1\JULIO\DAF01.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 25 Jul 101 6:34 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: DAF 1 UL DE INYECCION
Misc Info : MET CLÍNICO;0.5 MIN SPLITLESS; VA-5
Vial Number: 1



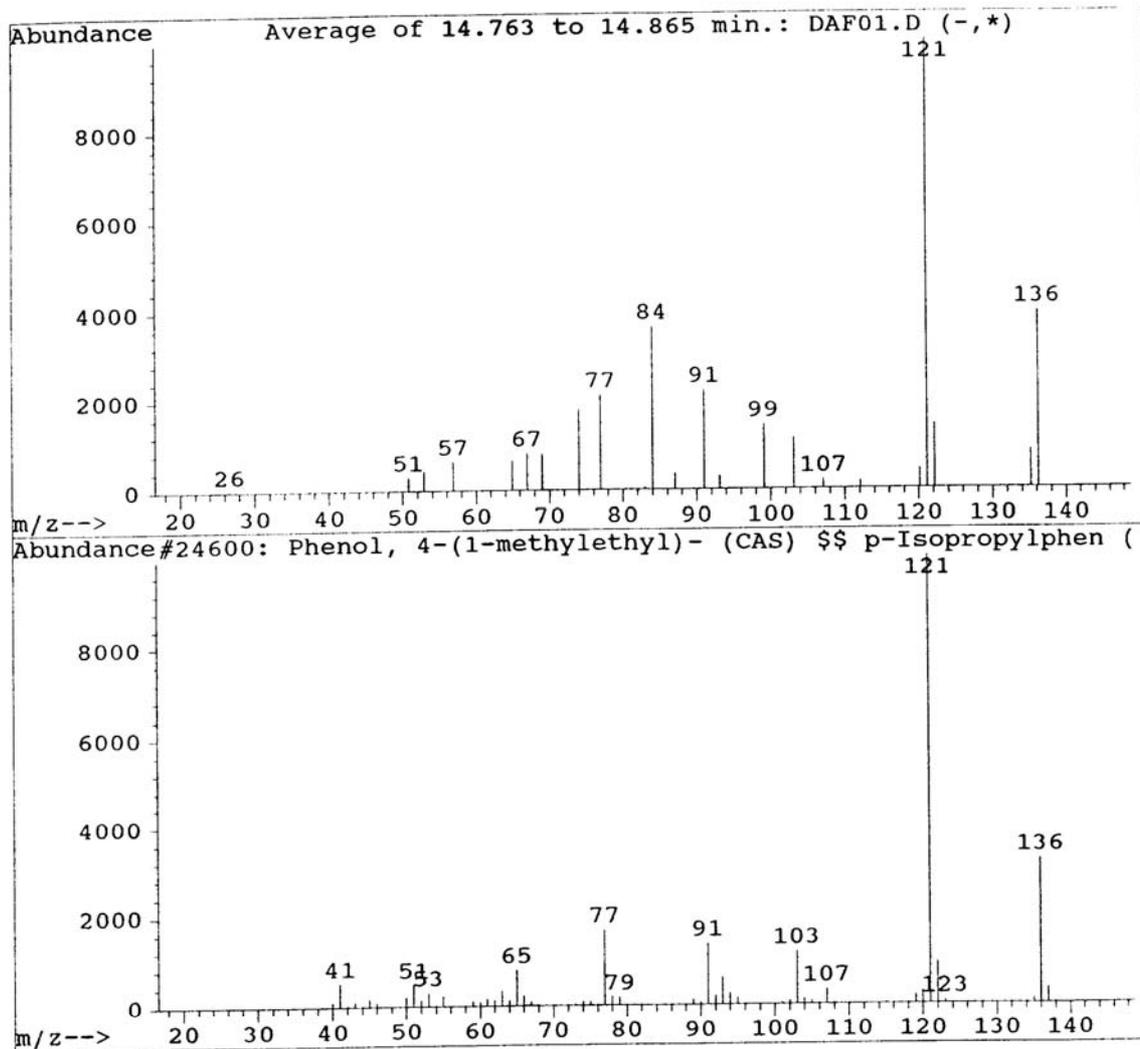
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 93
ID : Phenol, 2,4-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,4-Xylenol \$\$ 2,4-Di
methylphenol \$\$ m-Xylenol \$\$ 4,6-Dimethylphenol \$\$ 4
-Hydroxy-1,3-dimethylbenzene



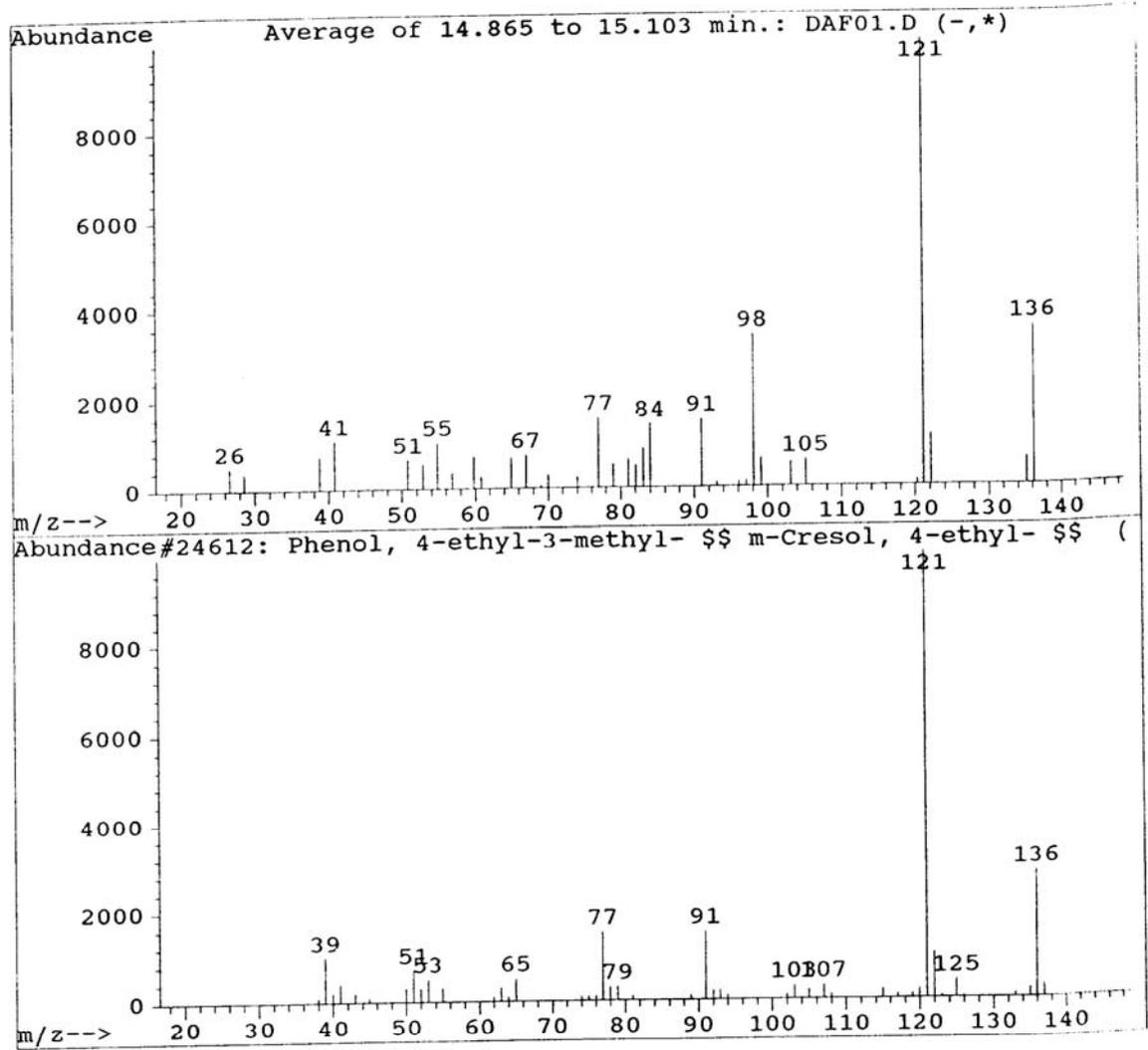
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 90
ID : Phenol, 3-ethyl- (CAS) \$\$ m-Ethylphenol \$\$ 1-Hydroxy
-3-ethylbenzene \$\$ 3-Ethylphenol \$\$ Phenol, m-ethyl-
\$\$ 1-Ethyl-3-hydroxybenzene



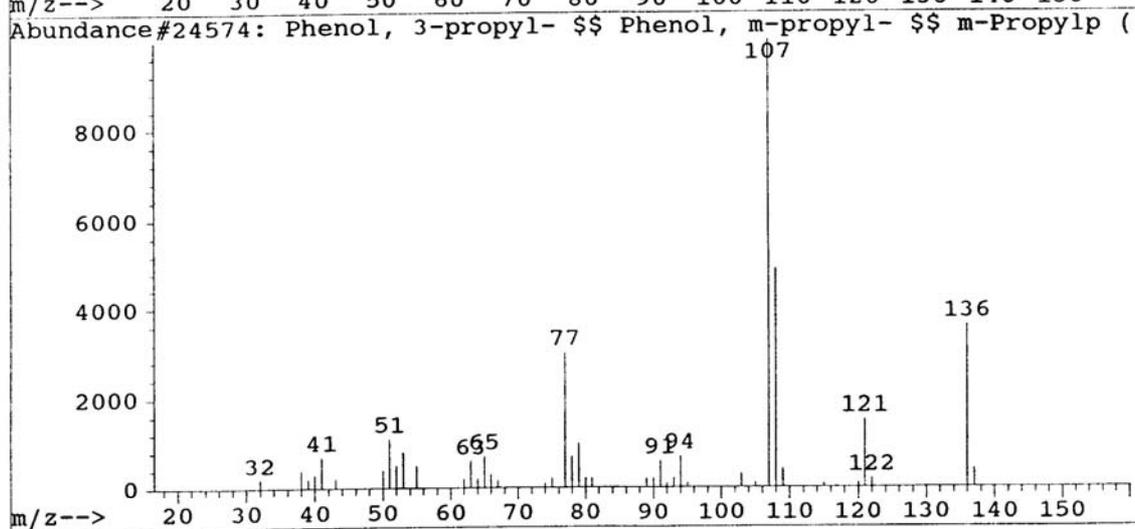
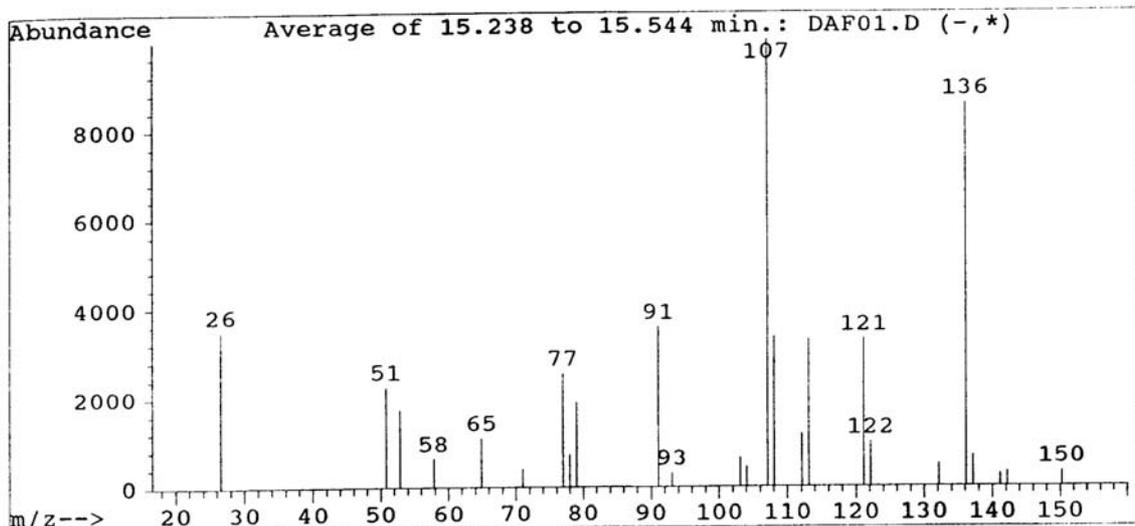
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 64
ID : Phenol, 4-(1-methylethyl)- (CAS) \$\$ p-Isopropylpheno
l \$\$ 4-Isopropylphenol \$\$ Australol \$\$ p-Cumenol \$\$
Phenol, p-isopropyl- \$\$ 4-(1



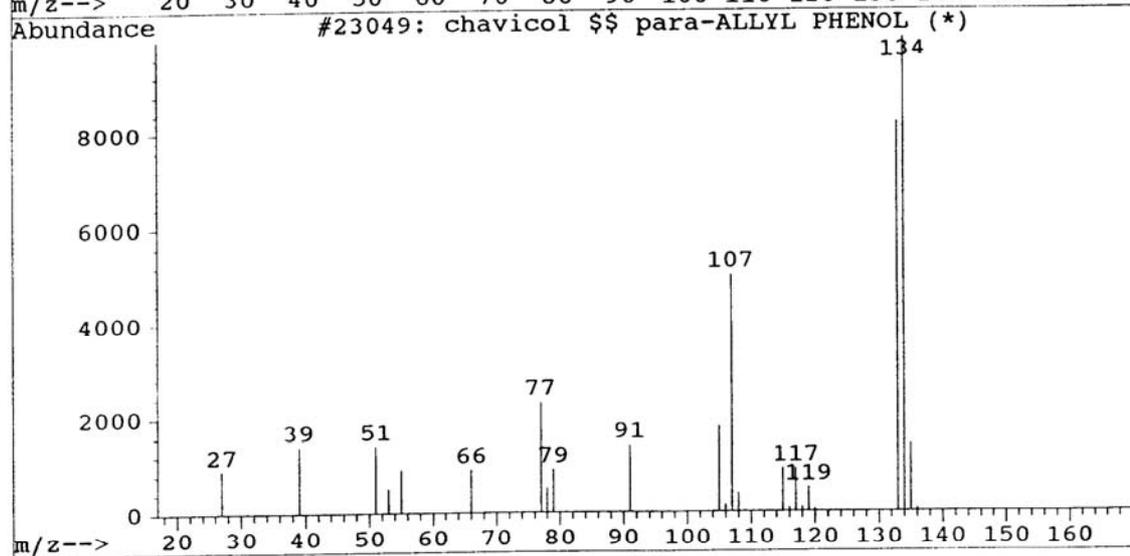
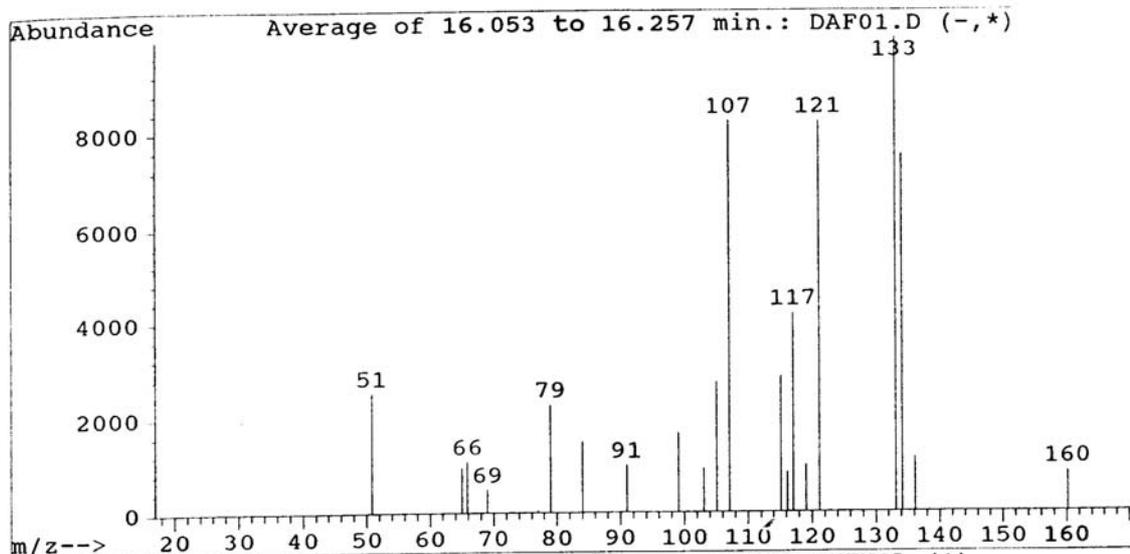
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 68
ID : Phenol, 4-ethyl-3-methyl- \$\$ m-Cresol, 4-ethyl- \$\$ 3
-Methyl-4-ethylphenol \$\$ 4-Ethyl-m-cresol \$\$ 4-Ethyl
-3-methylphenol



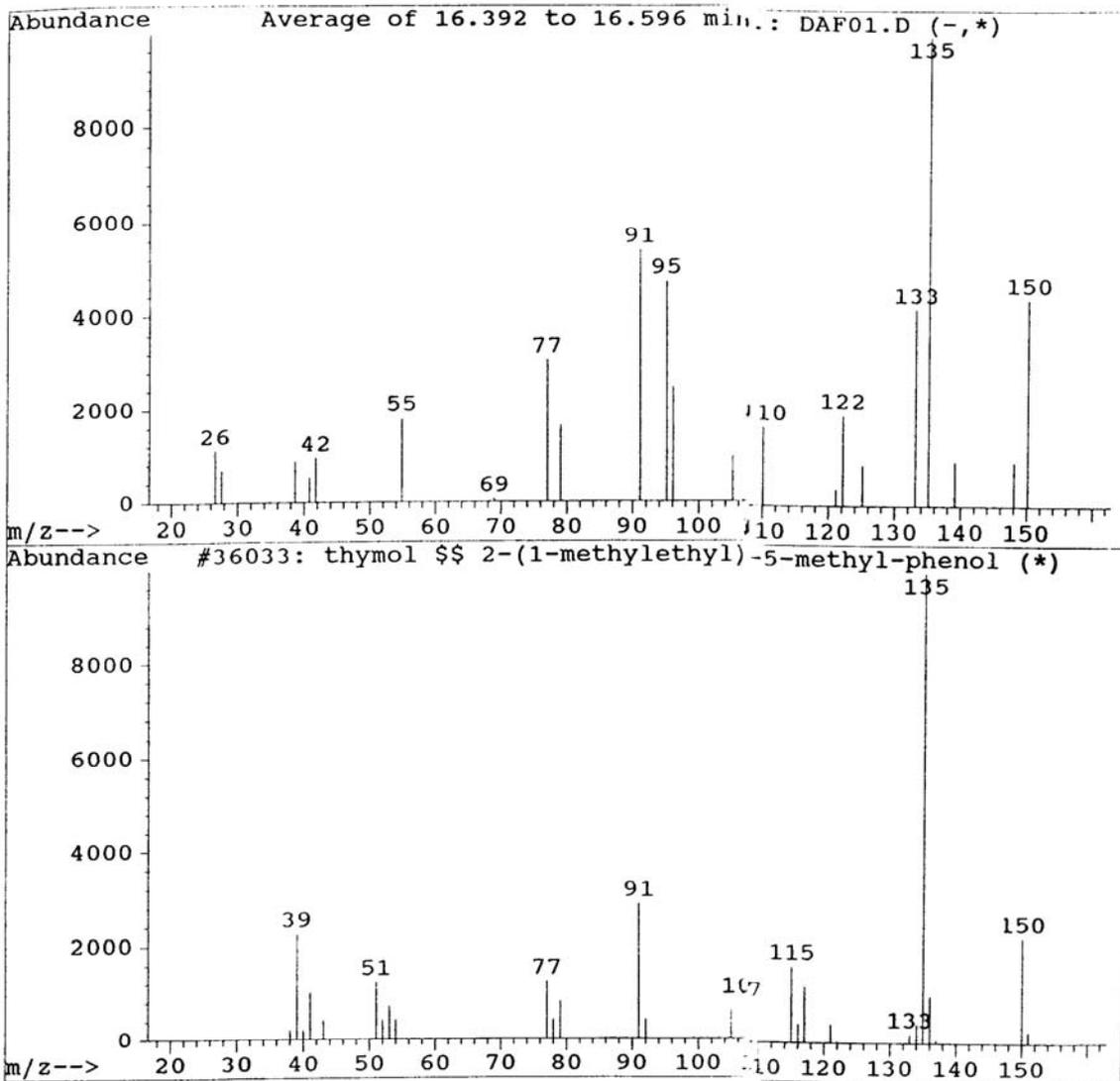
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 50
ID : Phenol, 3-propyl- \$\$ Phenol, m-propyl- \$\$ m-Propylphenol \$\$ 3-n-Propylphenol \$\$ 3-Propylphenol \$\$ 1-Hydroxy-3-n-propylbenzene



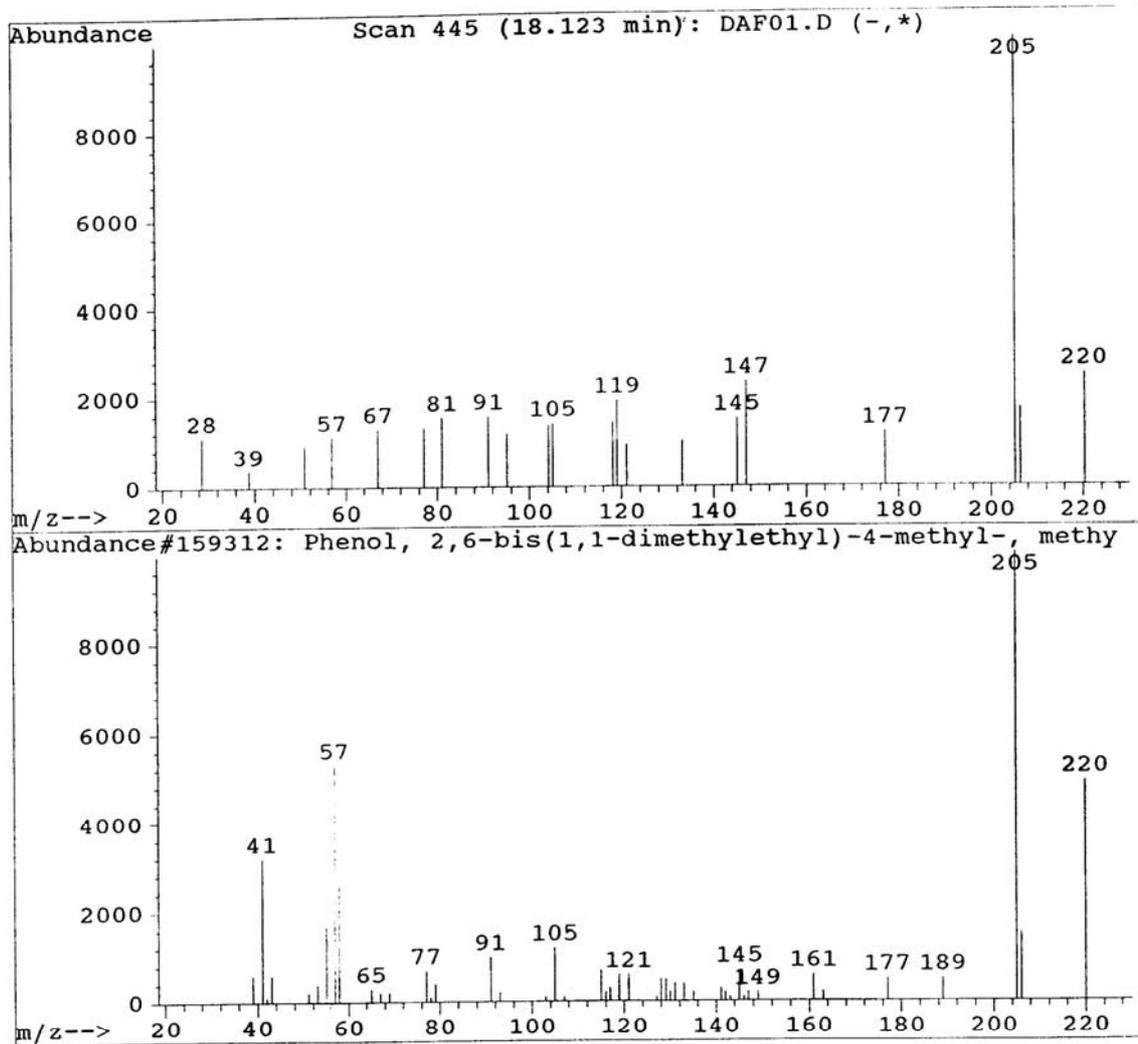
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 43
ID : chavicol \$\$ para-ALLYL PHENOL



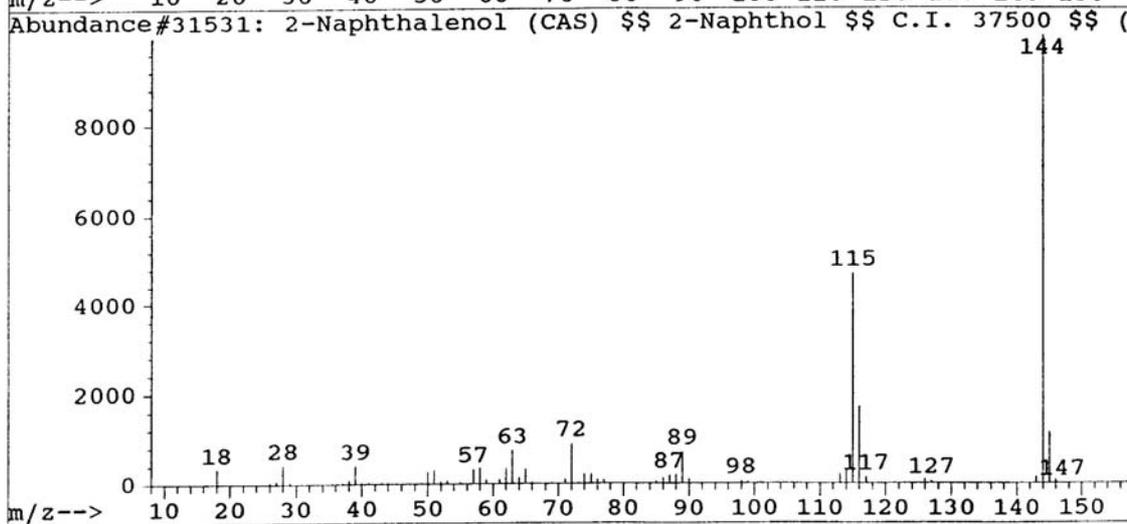
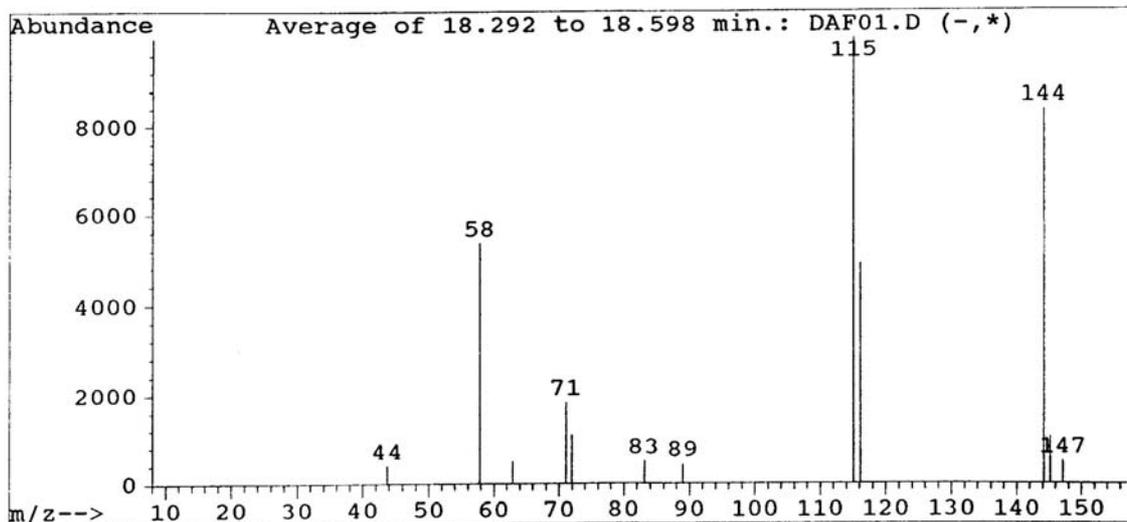
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 9
ID : thymol \$\$ 2-(1-methylethyl)-5-methyl-phenol



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 45
ID : Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-, methyl
carbamate (CAS) \$\$ 2,6-DI-TERT-BUTYL-4-METHYLPHENYL-
N-METHYL CARBAMATE \$\$ Azak \$

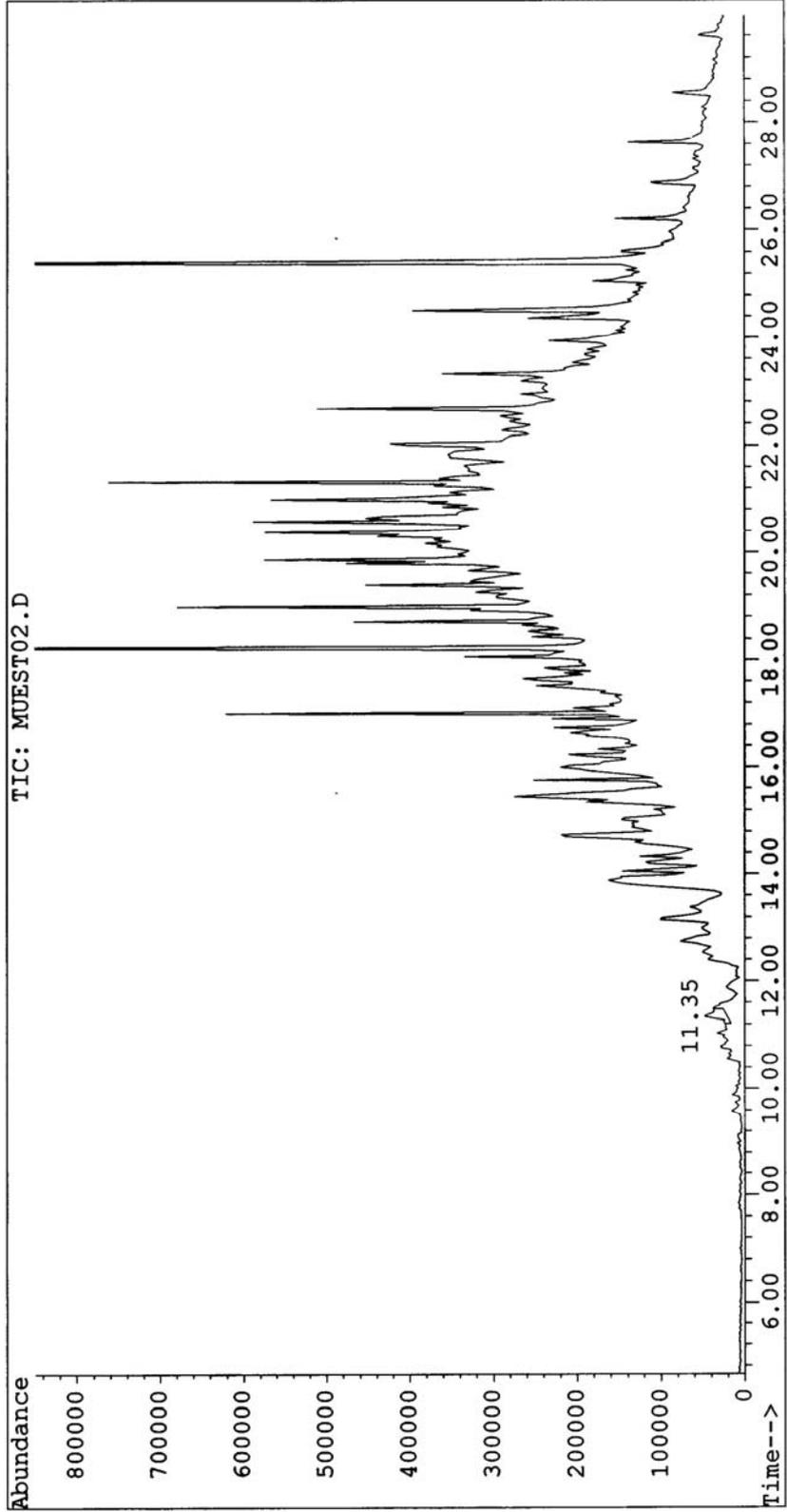


Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 64
ID : 2-Naphthalenol (CAS) \$\$ 2-Naphthol \$\$ C.I. 37500 \$\$
NAPHTHOL-(2) \$\$ Naphthol B \$\$ Developer A \$\$ Isonaph
thol \$\$ Betanaphthol \$\$ Deve



Muestra DB 1

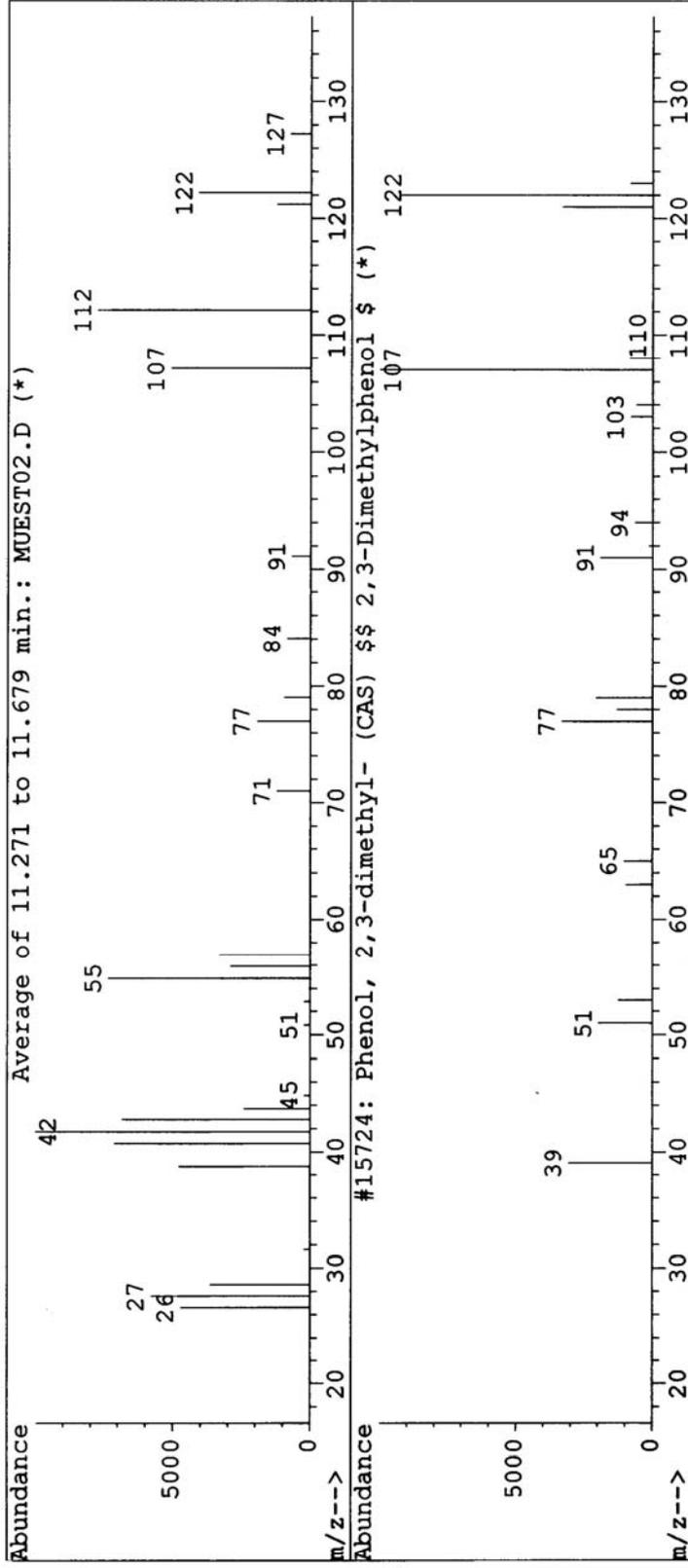
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT~1\PINGAR~1\JULIO\MUEST02.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 20 Jun 100 12:30 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: MUESTRA DE AGUA RESIDUAL (DESPUES)
Misc Info :
Vial Number: 1



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L

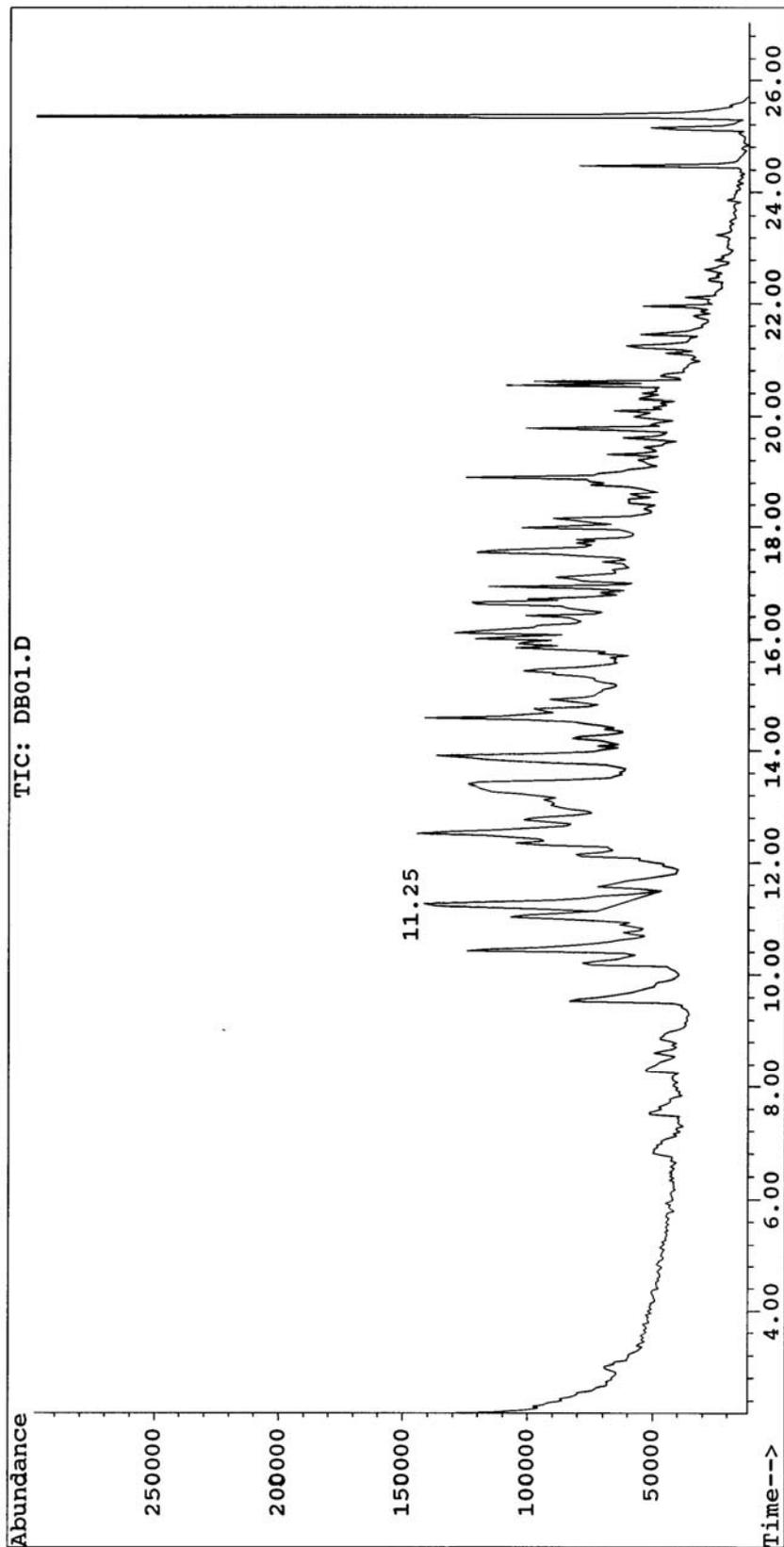
Quality : 18

ID : Phenol, 2,3-dimethyl- (CAS) 2,3-Dimethylphenol 2,3-Xylenol 2,3-Xylenol 1-Hydroxy-2,3-dimethylbenzene 1-HYDROXY-2,3-DIME

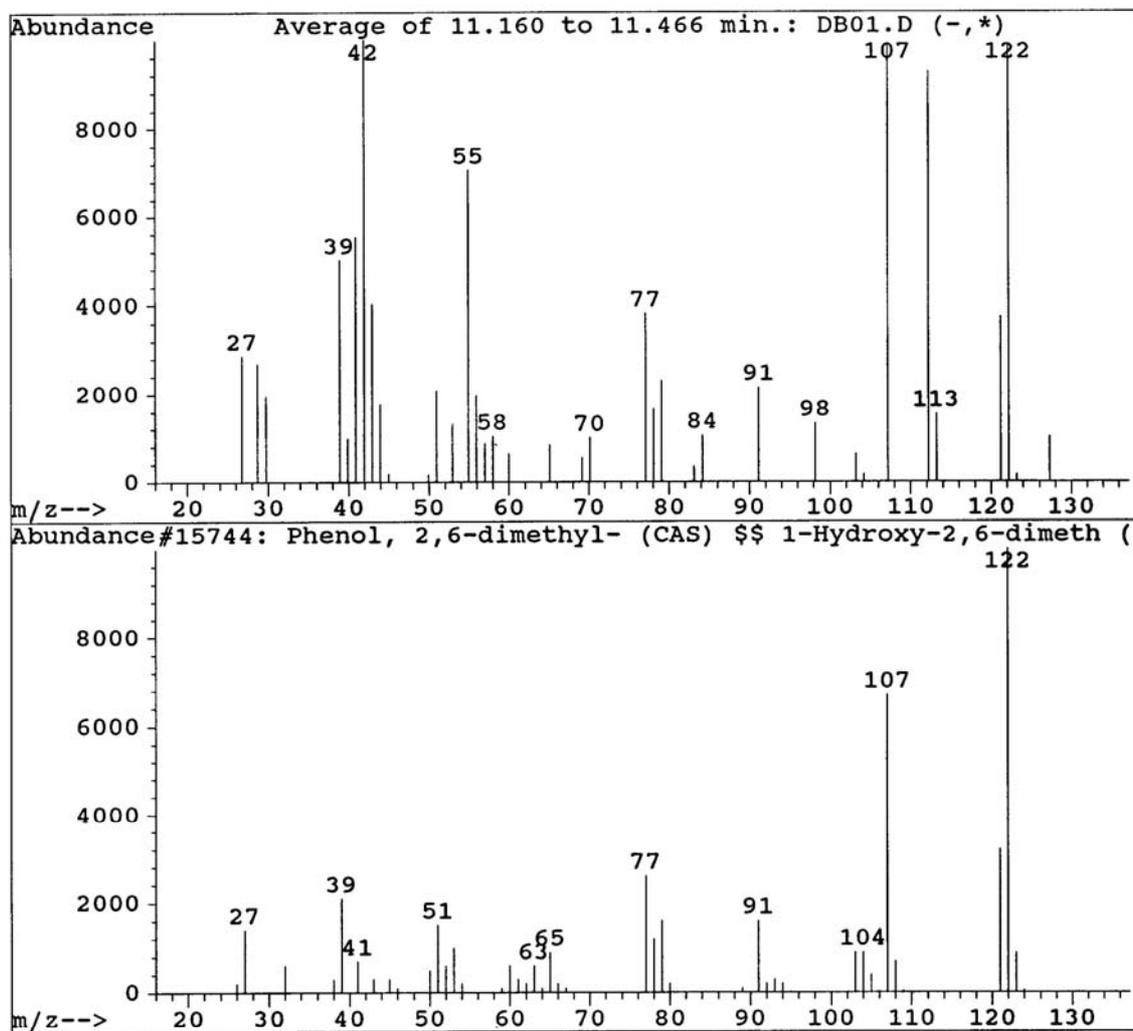


Muestra DB 2

File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT\1\JULIO\DB01.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 26 Apr 101 1:23 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: MUESTRA SALIDA DB 1.5 UL INYECCIÓN
Misc Info : MET CLÍNICO ; 1.00 SPLITLESS; VA-5
Vial Number: 1

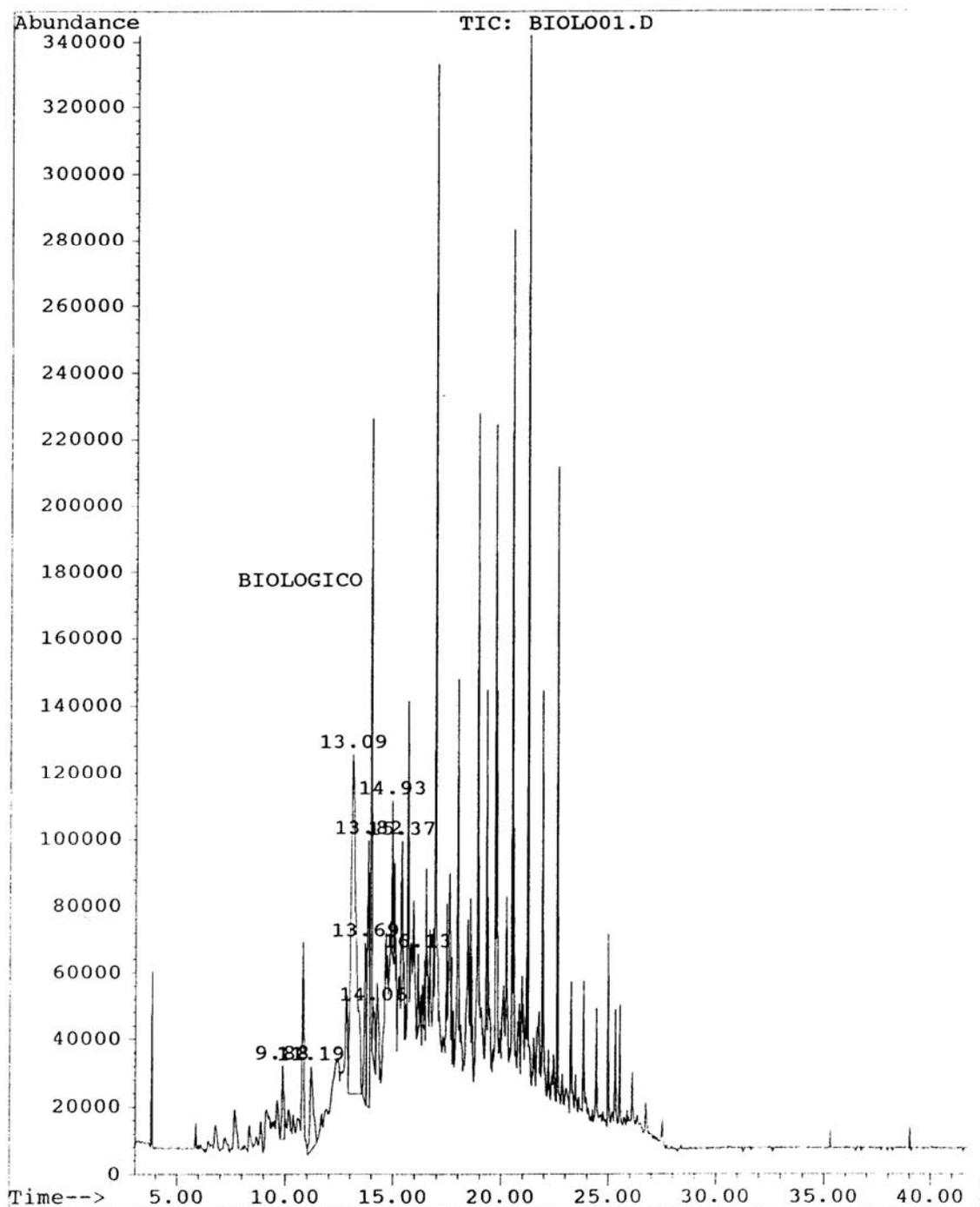


Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 46
ID : Phenol, 2,6-dimethyl- (CAS) \$\$ 1-Hydroxy-2,6-dimethy
lbenzene \$\$ 2,6-Dimethylphenol \$\$ 2,6-Xylenol \$\$ 2,6
-Dimethyl-phenol \$\$ 2,6-Dime

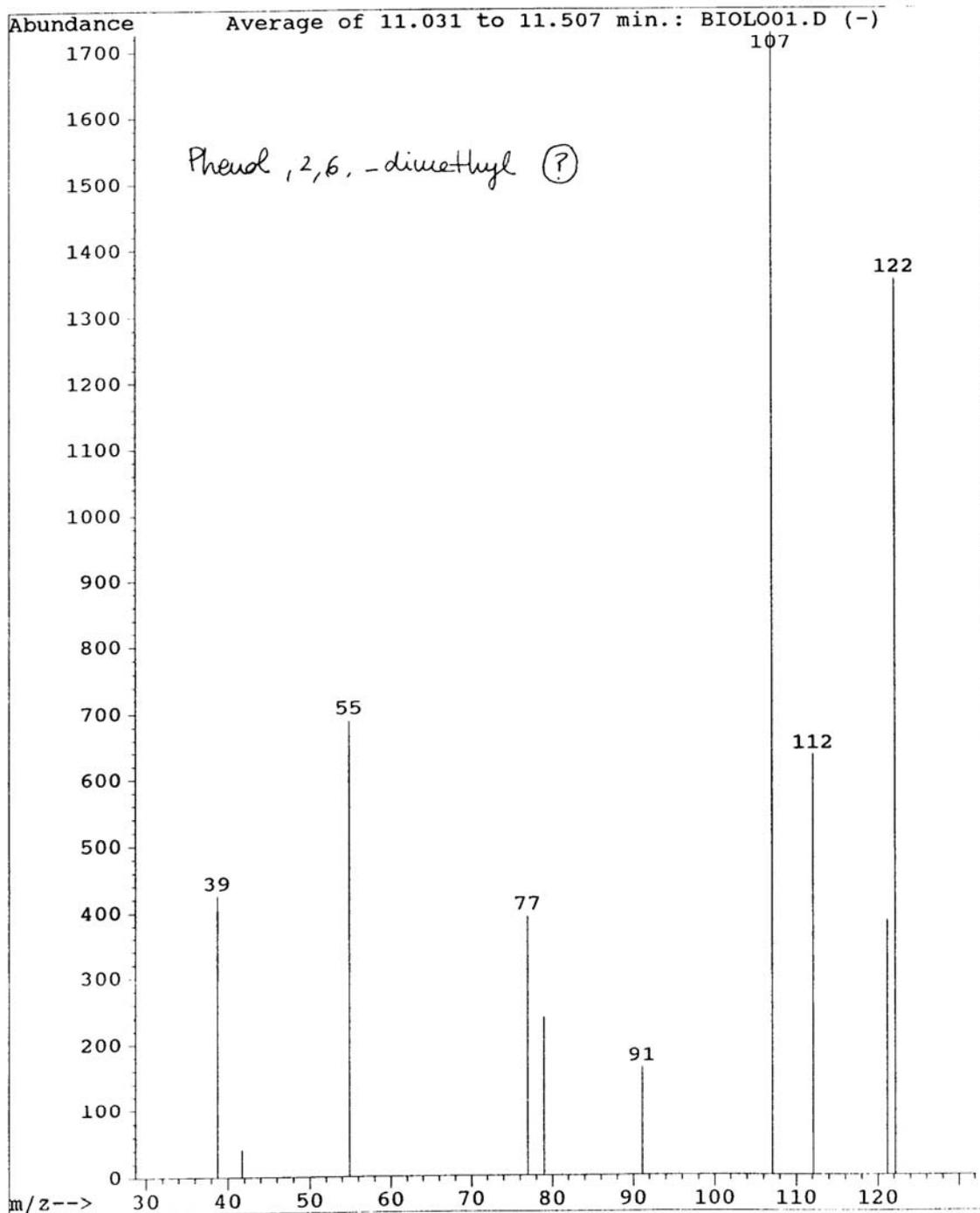


Muestra DB 3

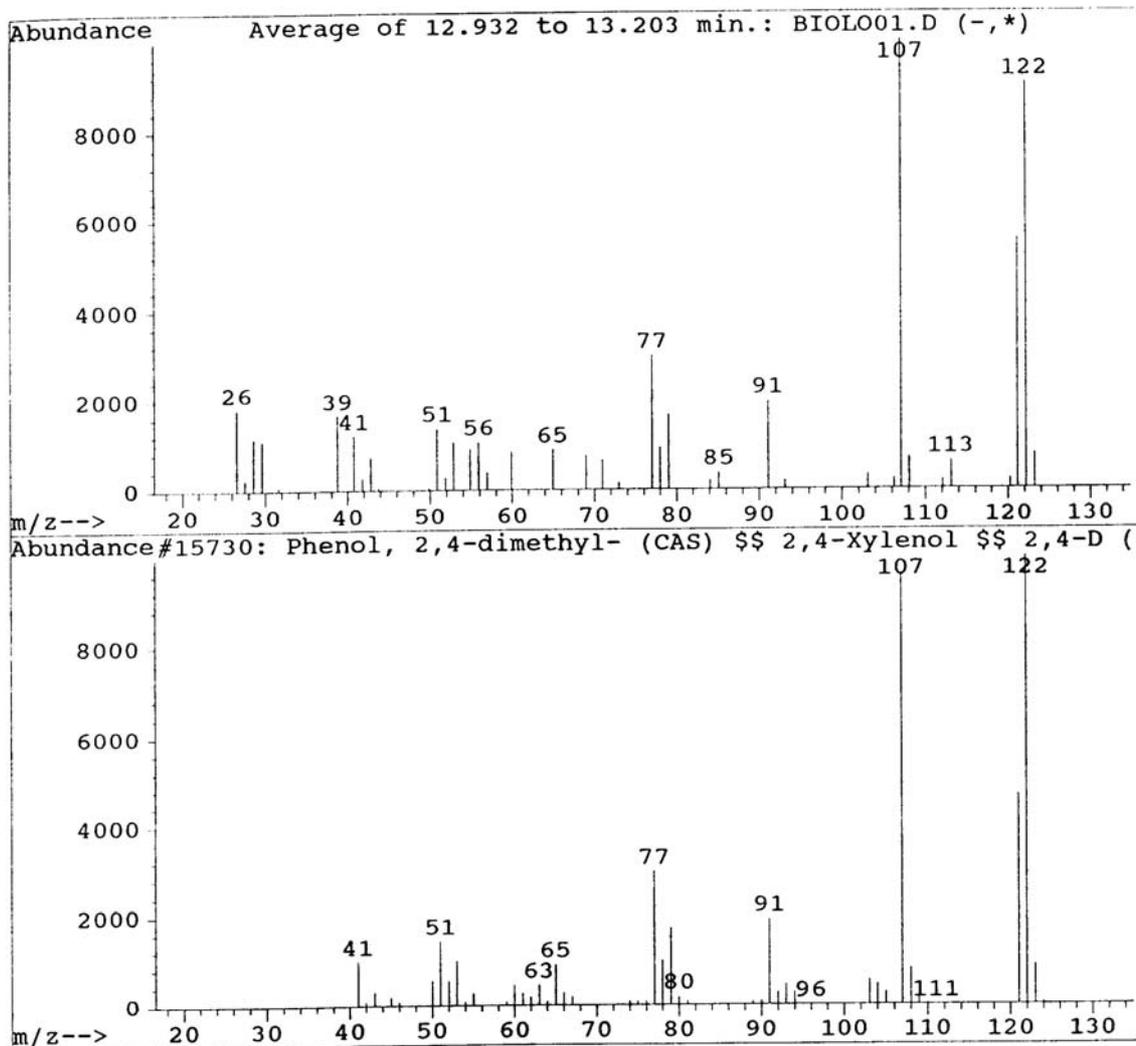
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT~1\JULIO\BIOLO01.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 25 Jul 101 5:27 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: BIOLOGICA 0.5 UL DE INYECCION
Misc Info : MET CLÍNICO;0.5 MIN SPLITLESS; VA-5
Vial Number: 1



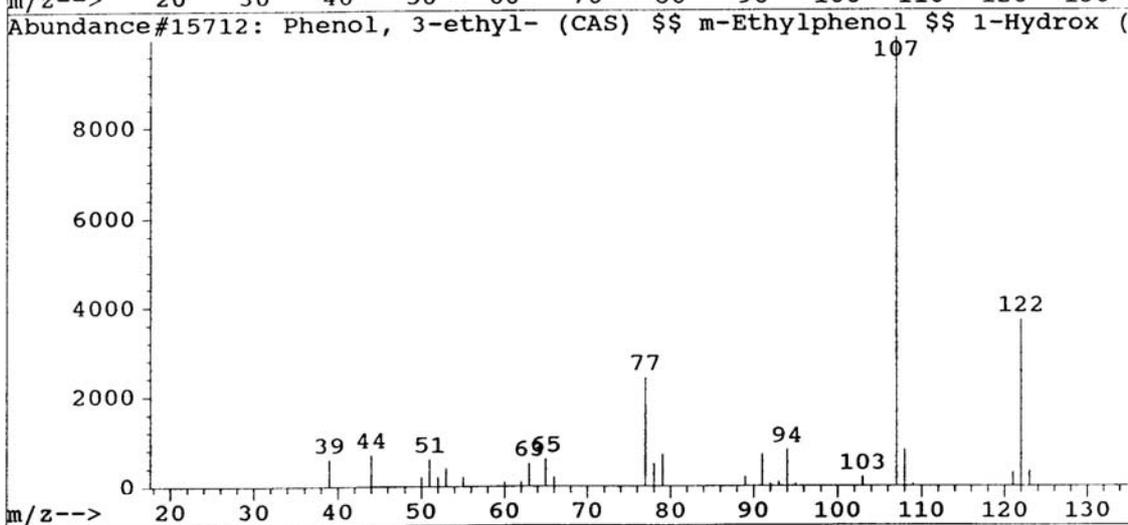
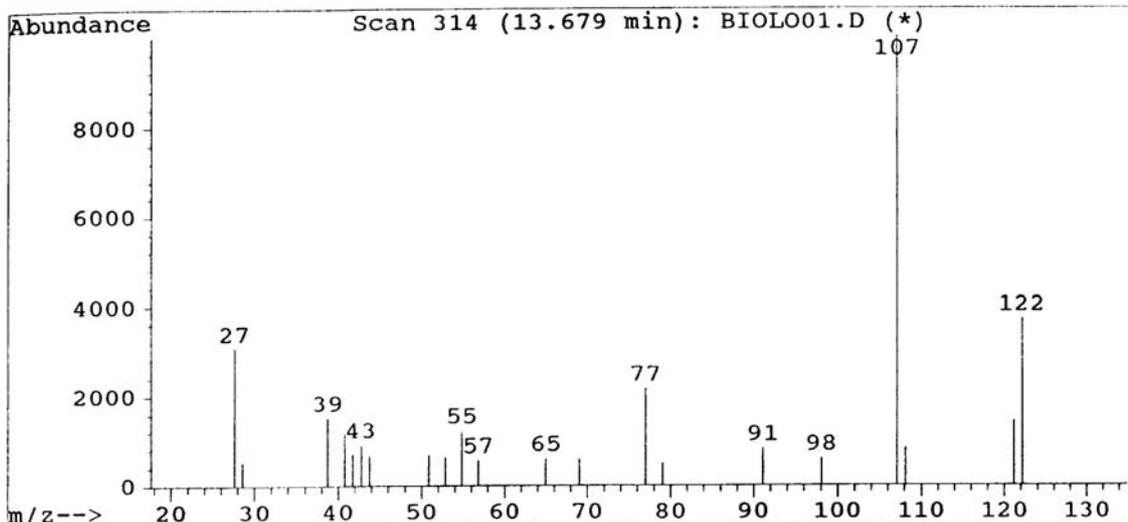
File : C:\HPCHEM\1\DATA\UCM\ANALIT-1\JULIO\BIOLO01.D
Operator : NOUR KAYALI
Acquired : 25 Jul 101 5:27 pm using AcqMethod CLINICO
Instrument : 5989 - In
Sample Name: BIOLOGICA 0.5 UL DE INYECCION
Misc Info : MET CLÍNICO;0.5 MIN SPLITLESS; VA-5
Vial Number: 1



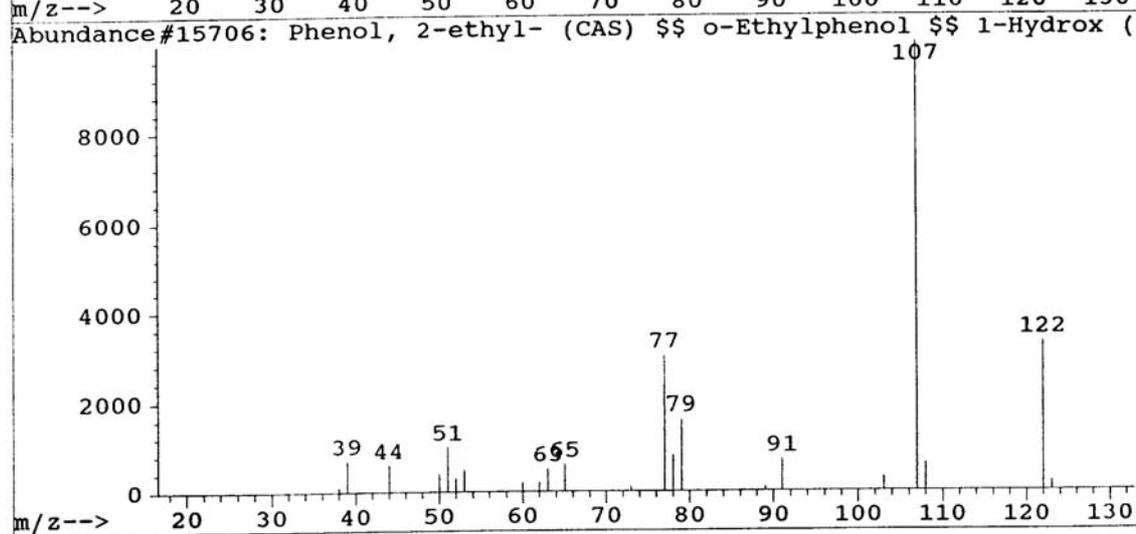
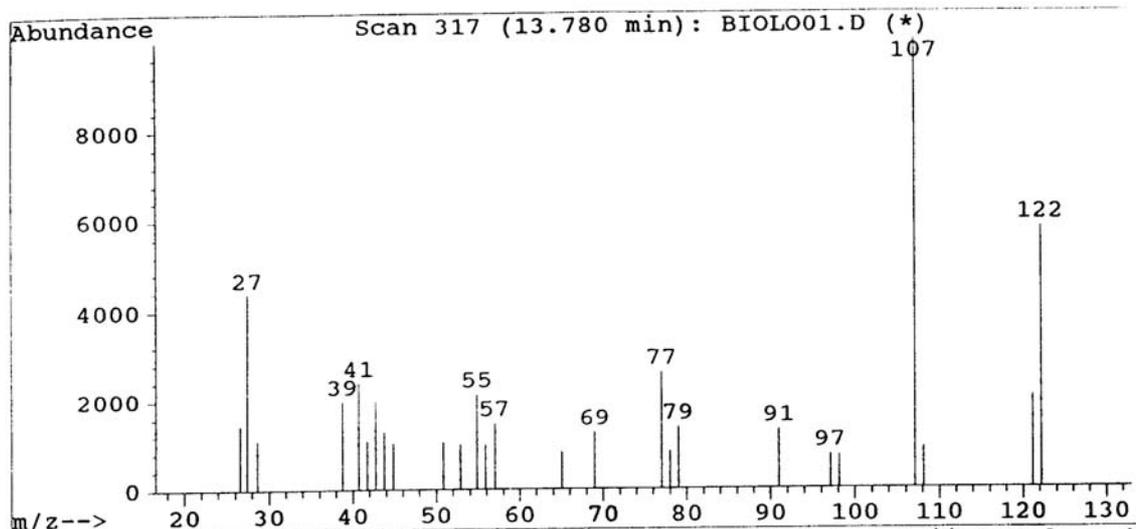
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 93
ID : Phenol, 2,4-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,4-Xylenol \$\$ 2,4-Di
methylphenol \$\$ m-Xylenol \$\$ 4,6-Dimethylphenol \$\$ 4
-Hydroxy-1,3-dimethylbenzene



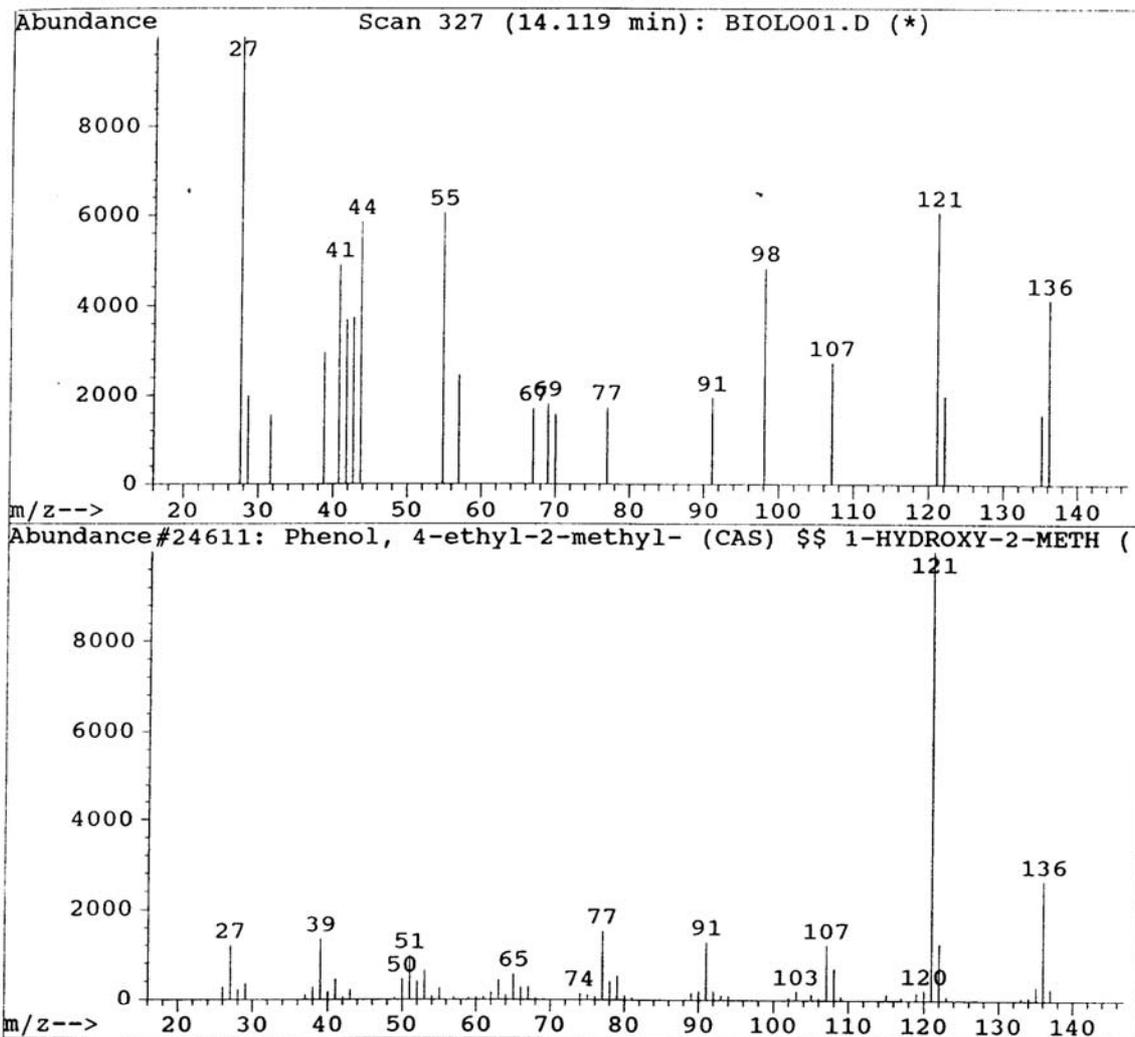
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 80
ID : Phenol, 3-ethyl- (CAS) \$\$ m-Ethylphenol \$\$ 1-Hydroxy
-3-ethylbenzene \$\$ 3-Ethylphenol \$\$ Phenol, m-ethyl-
\$\$ 1-Ethyl-3-hydroxybenzene



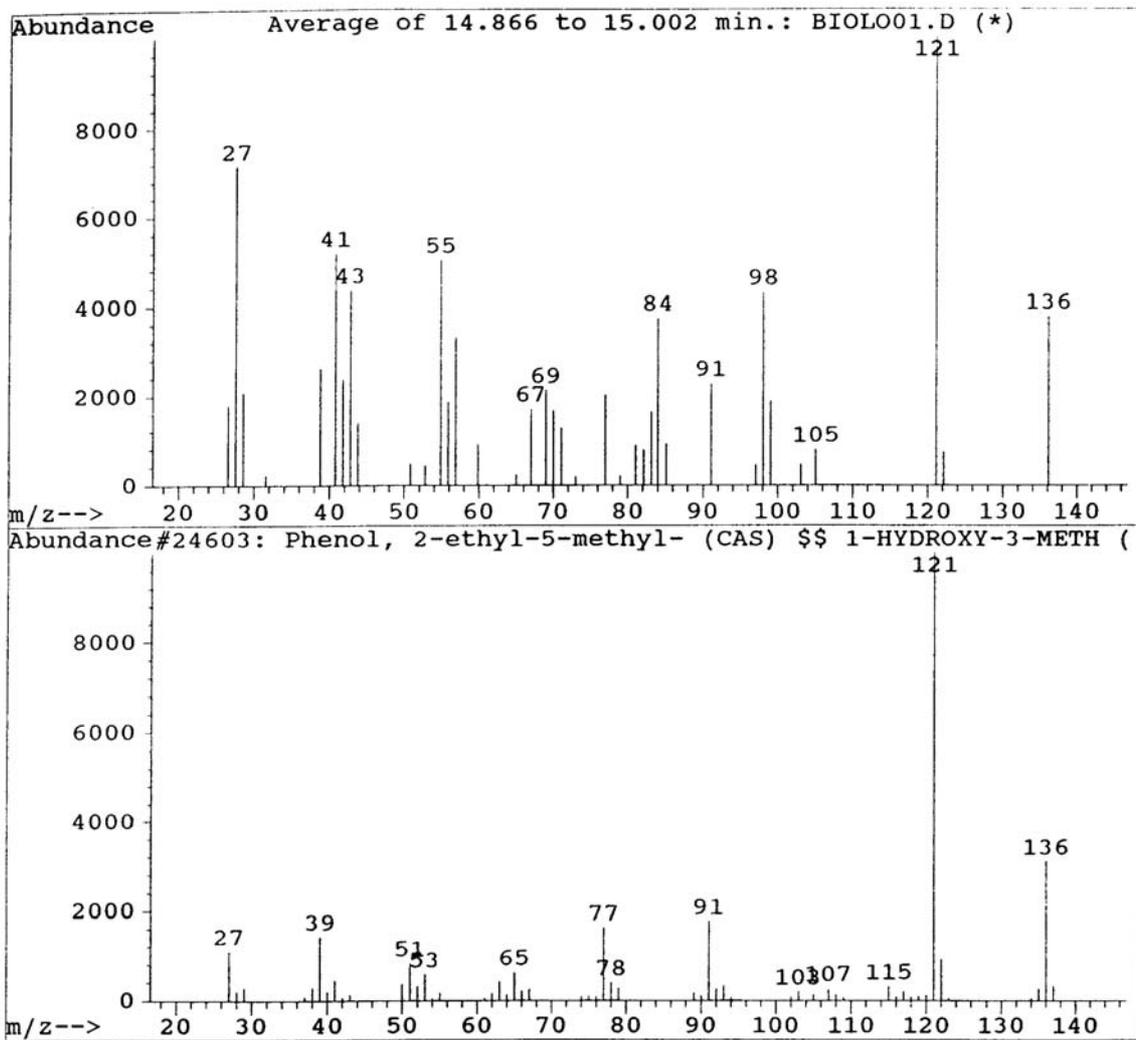
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 78
ID : Phenol, 2-ethyl- (CAS) \$\$ o-Ethylphenol \$\$ 1-Hydroxy
-2-ethylbenzene \$\$ ORTHO-ETHYLPHENOL \$\$ Phlorol \$\$ 2
-Ethylphenol \$\$ Phenol, o-et



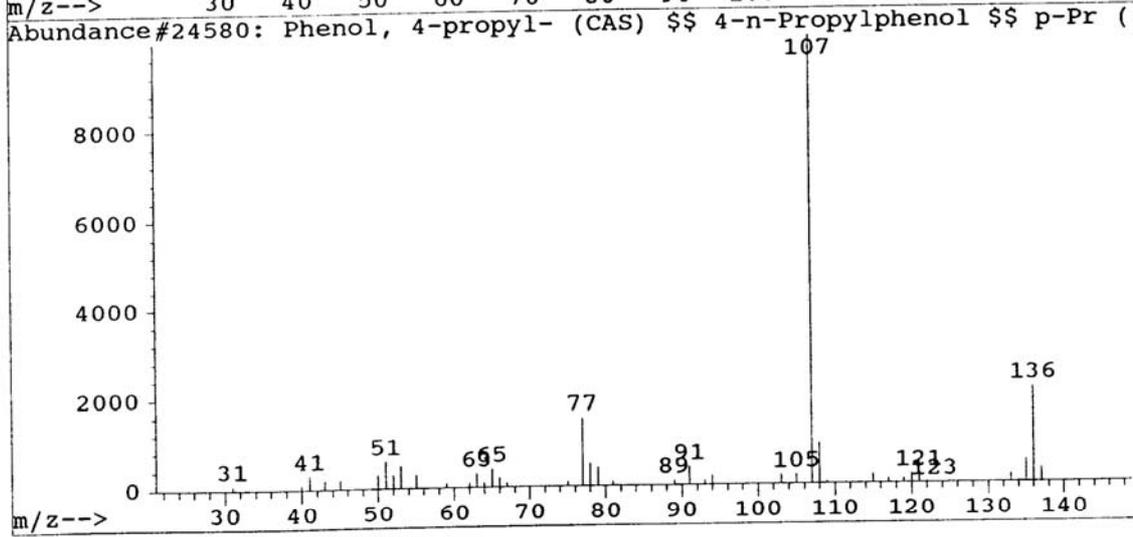
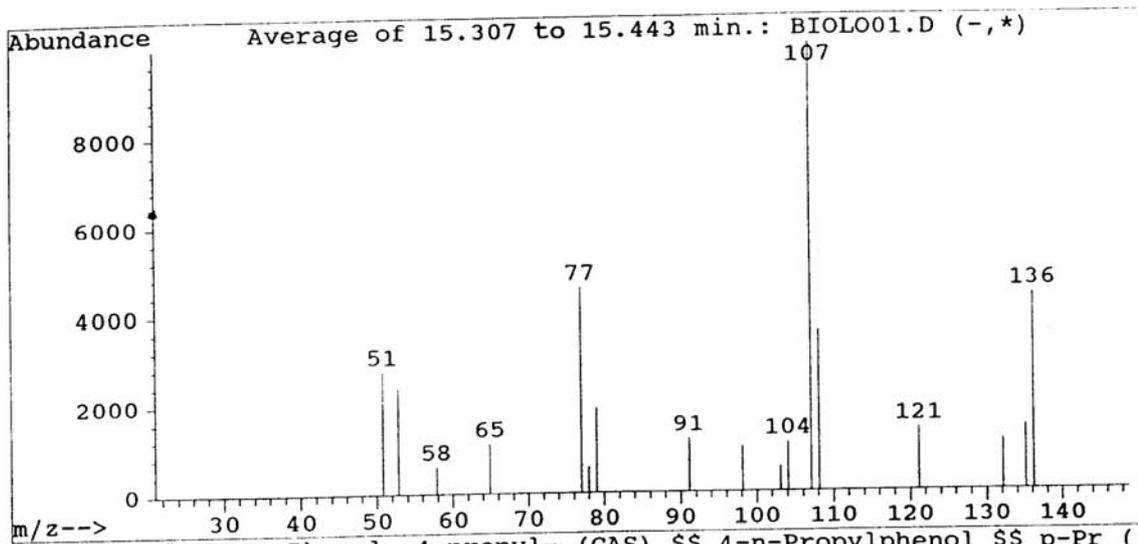
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 38
ID : Phenol, 4-ethyl-2-methyl- (CAS) \$\$ 1-HYDROXY-2-METHY
L-4-ETHYLBENZENE \$\$ 2-Methyl-4-ethylphenol \$\$ 4-Ethy
l-o-cresol \$\$ o-Cresol, 4-et



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 43
ID : Phenol, 2-ethyl-5-methyl- (CAS) \$\$ 1-HYDROXY-3-METHY
L-6-ETHYLBENZENE \$\$ 3-METHYL-6-ETHYLPHENOL \$\$ m-Cres
ol, 6-ethyl- \$\$ 2-Ethyl-5-me



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 42
ID : Phenol, 4-propyl- (CAS) \$\$ 4-n-Propylphenol \$\$ p-Propylphenol \$\$ 4-Propylphenol \$\$ Dihydrochavicol \$\$ Phenol, p-propyl- \$\$ p-Hydroxy



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 38
ID : chavicol \$\$ para-ALLYL PHENOL

