

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE C.C. QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



**BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS COMPÓSITOS
BASADOS EN PEROXIDASA. APLICACIÓN A LA
DETERMINACIÓN DE ANALITOS DE INTERÉS EN
ALIMENTOS MEDIANTE ELECTRODOS
BIENZIMÁTICOS Y MULTIENZIMÁTICOS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
POR Nuria Peña García**

Bajo la dirección del Doctor:
José Manuel Pingarrón Carrazón

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1840-X

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS COMPÓSITOS
BASADOS EN PEROXIDASA. APLICACIÓN A LA
DETERMINACIÓN DE ANALITOS DE INTERÉS EN
ALIMENTOS MEDIANTE ELECTRODOS BIENZIMÁTICOS Y
MULTIENZIMÁTICOS**

NURIA PEÑA GARCÍA
MADRID 2002

ÍNDICE

I. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	1
II. INTRODUCCIÓN	3
II.1. Biosensores	4
II.2. Electroodos compósitos	8
II.2.1. Matrices electródicas de grafito-Teflón	12
II.2.2. Matrices electródicas de carbono vítreo reticulado	14
II.3. Biosensores electroquímicos compósitos	16
II.4. Biosensores enzimáticos en medios orgánicos y en medios organizados	20
II.5. Biosensores en el análisis de alimentos	25
II.6. Bibliografía	29
III. ELECTRODOS COMPÓSITOS DE PEROXIDASA	
III.1. Objetivo	39
III.2. Características generales de las peroxidadas	39
III.3. Antecedentes bibliográficos	41
III.4. Parte Experimental	49
III.4.1. Instrumentación	49
III.4.1.1. Aparatos	49
III.4.1.2. Electroodos y células de trabajo	49
III.4.2. Reactivos	50
III.4.3. Procedimiento experimental	51
III.4.3.1. Preparación de disoluciones	51
III.4.3.1.1. Medios de trabajo	51
III.4.3.1.2. Disoluciones patrón de los compuestos empleados como sustratos en las reacciones enzimáticas.....	52
III.4.3.2. Obtención de los amperogramas en discontinuo	52
III.4.3.3. Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica	52
III.5. BIOUSENSORES COMPÓSITOS DE GRAFITO-TEFLÓN-PEROXIDASA	
III.5.1. Introducción	55
III.5.2. Preparación de los biosensores	56
III.5.3. Optimización de variables experimentales	57
III.5.3.1. Composición de la matriz electródica	59
III.5.3.2. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en estado estacionario.....	61
III.5.3.3. Efecto del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario.....	62
III.5.3.4. Disoluciones micelares :elección del tensoactivo y de su concentración	63
III.5.3.5. Emulsiones aceite-agua	65
III.5.3.5.1. Influencia del porcentaje de fase dispersa sobre la intensidad en estado estacionario.....	65
III.5.3.5.2. Influencia del porcentaje de agente emulsificante	66
III.5.3.6. Medio acetonitrilo :disolución reguladora acuosa	67
III.5.3.6.1. Influencia del contenido de fase acuosa sobre la intensidad en estado estacionario	67
III.5.3.6.2. Influencia del potencial aplicado	68
III.5.3.7. Emulsiones agua-aceite o micelas inversas	69
III.5.3.7.1. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario	70
III.5.3.7.2. Elección del tensoactivo	71
III.5.3.7.3. Influencia de la concentración del tensoactivo	71

III.5.3.7.4. Influencia del porcentaje de fase acuosa dispersa	72
III.5.4. Estabilidad de los biosensores en los diferentes medios de trabajo	73
III.5.4.1. Repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica	73
III.5.4.2. Repetibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica por pulido	75
III.5.4.3. Tiempo de utilización del electrodo enzimático	76
III.5.4.4. Reproducibilidad en la fabricación de los electrodos	78
III.5.4.5. Efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre	79
III.5.5. Estudio cinético de la reacción enzimática	80
III.5.5.1. Cálculo de la V_{max} y la K_m	80
III.5.5.2. Velocidad de reacción	85
III.5.6. Curvas de calibrado y características analíticas	88
III.5.7. Inyección en flujo con detección amperométrica	92
III.5.7.1. Influencia del potencial aplicado sobre la señal amperométrica	92
III.5.7.2. Optimización de los parámetros característicos de inyección en flujo	93
III.5.7.2.1. Caudal	93
III.5.7.2.2. Volumen de inyección	95
III.5.7.3. Repetibilidad de las señales amperométricas	96
III.5.7.4. Curvas de calibrado y características analíticas	97

III.6. BIOSENSORES COMPÓSITOS DE CARBONO VÍTREO RETICULADO-RESINA EPOXI-PEROXIDASA

III.6.1. Introducción	103
III.6.2. Preparación de los biosensores	104
III.6.3. Optimización de las variables experimentales	106
III.6.3.1. Composición de la matriz electródica	106
III.6.3.2. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en estado estacionario	111
III.6.3.3. Efecto del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario	111
III.6.3.4. Disoluciones micelares : Elección del tensoactivo y de su concentración.....	112
III.6.3.5. Emulsiones aceite-agua	113
III.6.3.5.1. Influencia del porcentaje de fase dispersa	113
III.6.3.5.2. Influencia del porcentaje de agente emulsificante	114
III.6.3.6. Medio acetonitrilo :disolución reguladora acuosa	114
III.6.3.6.1. Influencia del contenido de fase acuosa	115
III.6.3.6.2. Influencia del potencial aplicado	116
III.6.4. Estabilidad de los biosensores en los distintos medios de trabajo	118
III.6.4.1. Repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica	118
III.6.4.2. Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica por pulido	120
III.6.4.3. Tiempo de vida útil de un biosensor.....	121
III.6.4.4. Reproducibilidad de las señales amperométricas obtenidas con diferentes electrodos	123
III.6.5. Cálculo de las constantes cinéticas de la reacción	124
III.6.6. Curvas de calibrado y características analíticas	128
III.6.7. Electrodo compósito de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno/ ferrocianuro como detectores amperométricos en sistemas en flujo	131
III.6.7.1. Optimización del caudal	131
III.6.7.2. Repetibilidad de las señales amperométricas mediante análisis por inyección en flujo	132
III.6.7.3. Curvas de calibrado y características analíticas	134

III.7. COMPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS COMPÓSITOS ENZIMÁTICOS DE

MATRICES GRAFITO-TEFLÓN Y RVC RESINA EPOXI	139
III.8. BIBLIOGRAFÍA ELECTRODOS COMPÓSITOS DE PEROXIDASA	145
IV. ELECTRODOS BIENZIMÁTICOS	153
IV.1. BIOSENSOR DE GLUCOSA	
IV.1.1. Objetivo	158
IV.1.2. Introducción	158
IV.1.3. Antecedentes bibliográficos	161
IV.1.4. Parte Experimental	169
IV.1.4.1. Instrumentación	169
IV.1.4.1.1. Aparatos	169
IV.1.4.1.2. Electrodos y células de trabajo	169
IV.1.4.2. Reactivos	169
IV.1.4.3. Procedimiento Experimental	170
IV.1.4.3.1. Preparación de disoluciones	170
IV.1.4.3.2. Preparación del electrodo compuesto bienzimático de glucosa	170
IV.1.4.3.3. Obtención de los amperogramas en discontinuo.....	171
IV.1.4.3.4. Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica....	171
IV.1.4.3.5. Determinación de glucosa en mostos y vinos	171
IV.1.4.3.5.1. Preparación de las muestras	171
IV.1.4.3.5.2. Obtención de las señales amperométricas	172
IV.1.4.3.5.2.1. Amperogramas en discontinuo	172
IV.1.4.3.5.2.2. Inyección en flujo con detección amperométrica	172
IV.1.5. ELECTRODO COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN-GLUCOSA OXIDASA- PEROXIDASA-FERROCENO	174
IV.1.5.1. Estabilidad del electrodo bienzimático	174
IV.1.5.2. Curva de calibrado y características analíticas	177
IV.1.5.3. inyección en flujo con detección amperométrica utilizando como detector el electrodo de grafito-teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa-ferroceno	178
IV.1.5.3.1. Repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica	178
IV.1.5.3.2. Características analíticas	179
IV.1.5.4. Determinación de glucosa en muestras de mostos y vinos	180
IV.1.5.4.1. Estudio de interferencias	180
IV.1.5.4.2. Análisis en discontinuo	182
IV.1.5.4.3. Análisis por inyección en flujo	183
IV.1.6. CONCLUSIONES	184
IV.1.7. BIBLIOGRAFÍA. BIOSENSOR DE GLUCOSA	185
IV.2. BIOSENSOR DE HIPOXANTINA	
IV.2.1. Objetivo	192
IV.2.2. Introducción	192
IV.2.3. Antecedentes bibliográficos	193
IV.2.4. Parte Experimental	199
IV.2.4.1. Instrumentación	199
IV. 2.4.1.1. Aparatos	199
IV. 2.4.1.2. Electrodos y células de trabajo	199

IV. 2.4.2. Reactivos	200
IV.2.4.3. Procedimiento Experimental	200
IV.2.4.3.1. Preparación de disoluciones	200
IV.2.4.3.2. Preparación del electrodo compósito bienzimático de hipoxantina	201
IV.2.4.3.3. Obtención de los amperogramas	201
IV.2.4.3.4. Determinación de hipoxantina en tejido muscular de sardinas	202
IV.2.4.3.4.1. Determinación de hipoxantina en tejido muscular de sardinas por el método de referencia.....	202
IV.2.5. ELECTRODOS BIENZIMÁTICOS DE GRAFITO-TEFLÓN-XANTINA OXIDASA- -PEROXIDASA-FERROCENO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIPOXANTINA...	204
IV.2.5.1. Optimización del porcentaje de Teflón en la matriz electródica	204
IV.2.5.2. Elección del sistema enzimático y efecto del potencial aplicado.....	205
IV.2.5.3. Efecto de la temperatura.....	209
IV.2.5.4. Efecto del pH.....	210
IV.2.5.5. Estabilidad del electrodo compósito bienzimático	211
IV.2.5.6. Curva de calibrado y características analíticas	214
IV.2.5.7. Estudio de interferencias	215
IV.2.5.8. Determinación de hipoxantina en tejido muscular de sardinas	216
IV.2.6. CONCLUSIONES	218
IV.2.7. BIBLIOGRAFÍA. BIOSENSOR DE HIPOXANTINA.....	219
IV.3. BIOSENSOR DE COLESTEROL	
IV.3.1. Objetivo	224
IV.3.2. Introducción	224
IV.3.3. Antecedentes bibliográficos	227
IV.3.4. Parte Experimental	231
IV.3.4.1. Instrumentación	231
IV.3.4.1.1. Aparatos	231
IV.3.4.1.2. Electrodo y célula electroquímica	231
IV.3.4.2. Reactivos	231
IV.3.4.3. Procedimiento Experimental	232
IV.3.4.3.1. Preparación de disoluciones	232
IV.3.4.3.2. Preparación del electrodo compósito bienzimático de colesterol.....	233
IV.3.4.3.3. Obtención de los amperogramas	233
IV.3.4.3.4. Determinación de colesterol en mantequilla, manteca de cerdo y yema de huevo	233
IV.3.5. ELECTRODO COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN-COLESTEROL OXIDASA - PEROXIDASA-FERROCIANURO PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN MICELAS INVERSAS	237
IV.3.5.1. Optimización de variables experimentales	237
IV.3.5.1.a. Contenido de colesterol oxidasa en la matriz electródica	237
IV.3.5.1.b. Influencia de la temperatura	237
IV.3.4.1.c. Influencia del potencial aplicado	238
IV.3.5.2. Estabilidad del electrodo compósito bienzimático.....	240
IV.3.5.3. Curva de calibrado y características analíticas	244
IV.3.5.4. Determinación de colesterol libre y total en muestras de alimentos	245
IV.3.5.4.1. Estudio de interferencias.....	245
IV.3.5.4.2. Determinación de colesterol libre y total en mantequilla	247

IV.3.5.4.3. Determinación de colesterol libre y total en manteca de cerdo	250
IV.3.5.4.4. Determinación de colesterol libre y total en yema de huevo	252
IV.3.6. CONCLUSIONES	255
IV.3.7. BIBLIOGRAFÍA. BIOSENSOR DE COLESTEROL	256
IV.4. BIOSENSORES DE ALCOHOLES	
IV.4.1. Objetivo	260
IV.4.2. Introducción	260
IV.4.3. Antecedentes bibliográficos	264
IV.4.4. Parte Experimental	269
IV.4.4.1. Instrumentación	269
IV.4.4.1.1. Aparatos	269
IV.4.4.1.2. Electrodo y células de trabajo	269
IV.4.4.2. Reactivos	270
IV.4.4.3. Procedimiento Experimental	271
IV.4.4.3.1. Preparación de disoluciones	271
IV.4.4.3.2. Preparación de los electrodos compósitos bienzimáticos para alcoholes	271
IV.4.4.3.2.1. Electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno	271
IV.4.4.3.2.2. Electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno.....	272
IV.4.4.3.3. Obtención de los amperogramas en discontinuo.....	272
IV.4.4.3.4. Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica....	273
IV.4.4.3.5. Obtención de los cromatogramas en HPLC	273
IV.4.4.3.6. Determinación de alcoholes en bebidas.....	273
IV.4.4.3.6.1. Preparación de las muestras	273
IV.4.4.3.6.1.1. Determinación de etanol en cervezas, vinos y aguardientes	273
IV.4.4.3.6.1.2. Determinación de metanol en vinos y aguardientes	274
IV.4.4.3.6.2. Obtención de los amperogramas para la determinación de alcoholes	274
IV.4.4.3.6.2.1. Determinación de etanol en cervezas.....	274
IV.4.4.3.6.2.2. Determinación de etanol en vinos y aguardientes	275
IV.4.4.3.6.2.3. Determinación de metanol en vinos y aguardientes	275
IV.4.4.3.6.2.4. Determinación de etanol en bebidas alcohólicas por un método de referencia.....	275
IV.4.5. ELECTRODO COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN-ALCOHOL OXIDASA- PEROXIDASA.....	278
IV.4.5.1. Optimización de las variables experimentales	278
IV.4.5.1.1. Optimización de la composición del electrodo compósito	278
IV.4.5.1.2. Influencia del pH	279
IV.4.5.1.3. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario	279
IV.4.5.2. Estabilidad del electrodo bienzimático	281
IV.4.5.3. Respuesta del biosensor bienzimático para diferentes alcoholes	284
IV.4.5.3.1. Cálculo de las constantes de velocidad de la reacción enzimática para diferentes alcoholes	285
IV.4.5.4. Curvas de calibrado y características analíticas	290
IV.4.5.5. Análisis por inyección en flujo con detección amperométrica	293
IV.4.5.5.1. Optimización del caudal	293
IV.4.5.5.2. Repetibilidad de las señales amperométricas	294

IV.4.5.5.3. Curvas de calibrado y características analíticas	296
IV.4.5.6. Estudio de interferencias	298
IV.4.5.7. Determinación de etanol en cervezas	299
IV.4.5.8. HPLC con detección amperométrica con el electrodo de grafito- -Teflón-alcohol oxidasa-peroxidasa-ferroceno.....	302
IV.4.5.8.1. Repetibilidad de las medidas	305
IV.4.5.8.2. Curvas de calibrado y características analíticas	306
IV.4.5.8.3. Determinación de metanol y etanol en bebidas alcohólicas	308
IV.4.5.8.3.1. Determinación en vinos	308
IV.4.5.8.3.2. Determinación en aguardientes	312
IV.4.6. ELECTRODO BIENZIMÁTICO DE RVC-RESINA EPOXI-ALCOHOL OXIDASA- PEROXIDASA-FERROCENO	316
IV.4.6.1. Optimización de las condiciones experimentales	316
IV.4.6.1.1. Contenido de alcohol oxidasa en la matriz electródica	316
IV.4.6.1.2. Influencia del pH	317
IV.4.6.1.3. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario	317
IV.4.6.2. Estabilidad del biosensor	318
IV.4.6.3. Curvas de calibrado y características analíticas	321
IV.4.6.4. Inyección en flujo con detección amperométrica	325
IV.4.6.4.1. Optimización de las variables hidrodinámicas	325
IV.4.6.4.2. Repetibilidad de las señales amperométricas	327
IV.4.6.4.3. Curvas de calibrado y características analíticas	328
IV.4.6.5. Determinación de etanol en cervezas	329
IV.4.7. CONCLUSIONES	332
IV.4.8. BIBLIOGRAFÍA. BIOSENSORES DE ALCOHOLES	333
IV.5. BIBLIOGRAFÍA. ELECTRODOS BIENZIMÁTICOS	336
V. ELECTRODOS MULTIENZIMÁTICOS. MULTIDETECCIÓN CON BIOSENSORES	
V.1. Objetivo	341
V.2. Introducción	341
V.3. Antecedentes bibliográficos	342
V.4. Parte Experimental	346
V.4.1. Instrumentación	346
V.4.4.1. Aparatos	346
V.4.4.2. Electrodo y células de trabajo	346
V.4.2. Reactivos	347
V.4.3. Procedimiento Experimental	348
V.4.3.1. Preparación de disoluciones	348
IV.4.3.2. Preparación de los electrodos compósitos enzimáticos.....	348
V.4.3.2.1. Electrodo bienzimático de grafito-Teflón-lactato oxidasa- peroxidasa-ferroceno	348
V.4.3.2.2. Electrodo trienzimático de grafito-Teflón-glucosa oxidasa- -alcohol oxidasa-peroxidasa-ferroceno.....	349
V.4.3.3. Obtención de los amperogramas en discontinuo.....	349
V.4.3.4. Medidas por inyección en flujo.....	350
V.4.3.5. Obtención de los cromatogramas en HPLC	350
V.4.3.6. Análisis de muestras reales	350
V.4.3.6.1. Preparación de las muestras	350
V.4.3.6.2. Obtención de las señales amperométricas	351

V.4.3.6.2.1. Determinación de etanol y glucosa en vino de jerez	351
V.4.3.6.2.2. Determinación de ácido láctico y glucosa en vino tinto	351
V.4.3.6.3. Determinación de los analitos en las muestras mediante métodos de referencia	352
V.5. ELECTRODO TRIENZIMÁTICO DE GRAFITO-TEFLÓN-GLUCOSA OXIDASA-ALCOHOL OXIDASA-PEROXIDASA FERROCENO	353
V.5.1. Estabilidad del electrodo trienzimático	353
V.5.2. Curvas de calibrado y características analíticas	354
V.5.3. Detección amperométrica en HPLC	355
V.5.3.1. Efecto del caudal	355
V.5.3.2. Repetibilidad de las medidas	356
V.5.3.3. Curvas de calibrado y características analíticas	357
V.5.4. Aplicación al análisis de muestras reales	360
V.5.4.1. Determinación de metanol y glucosa en vinos.	360
V.5.4.2. Determinación de etanol y glucosa en vino de Jerez	362
V.6. DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ANALITOS MEDIANTE EL EMPLEO DE ELECTRODOS COMPÓSITOS BIENZIMÁTICOS EN PARALELO	366
V.6.1. Determinación de glucosa y etanol en vino de jerez	366
V.6.2. Determinación de ácido láctico y glucosa en vinos.	368
V.7. CONCLUSIONES	371
V.8. BIBLIOGRAFÍA.ELECTRODOS MULTIENZIMÁTICOS/MULTIDETECCIÓN	372
VI. CONCLUSIONES	377

I. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo de este trabajo, enmarcado dentro de una de las líneas de investigación del grupo de Electroanálisis del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid, es el diseño de matrices electródicas compósitas en las que se pueden inmovilizar enzimas por simple atrapamiento físico, dando así lugar a biosensores amperométricos con características operacionales adecuadas para su aplicación a la resolución de problemas analíticos reales. Dada la amplia gama de posibilidades prácticas que representa la peroxidasa, se ha escogido esta enzima como base para desarrollar biosensores que, mediante el acoplamiento de diversas reacciones enzimáticas, puedan ser utilizados para la determinación rápida y fiable de analitos de interés en la industria alimentaria.

Las matrices electródicas compósitas que se pensaron utilizar en este trabajo son las constituidas por grafito y Teflón y por carbono vítreo reticulado (RVC) y resina epoxi. En ambos casos el diseño del biosensor implica la inmovilización de varias enzimas, usualmente dos, junto con un mediador adecuado para cada medio de trabajo utilizado, en todo el volumen de la matriz. Con este tipo de diseño se debe favorecer un íntimo contacto entre la/s enzima/s, el mediador y la fase conductora del electrodo compósito (grafito o carbono vítreo reticulado dependiendo del tipo de electrodo que se trate) y se conseguirá, además, un depósito tridimensional de elemento de reconocimiento biológico de fácil regeneración superficial y, en principio, compatible tanto con medios acuosos como predominantemente no acuosos.

Con objeto de alcanzar el objetivo planteado, el plan de trabajo efectuado fue el siguiente :

1. Diseño, desarrollo, optimización y evaluación de las características operacionales de matrices electródicas de grafito-Teflón-peroxidasa-mediador y RVC-resina epoxi-peroxidasa-mediador en medios acuosos y predominantemente no acuosos. Establecimiento de las diferentes variables cinéticas de la reacción enzimática en los medios estudiados, y de las características analíticas para la determinación de peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona en discontinuo y del peróxido de hidrógeno en análisis por inyección en flujo.
2. Diseño, desarrollo, optimización y evaluación de las características operacionales y analíticas de biosensores bienzimáticos compósitos para la determinación de glucosa, hipoxantina, colesterol, metanol y etanol. Establecimiento de las metodologías necesarias para la determinación de estos analitos en alimentos de diversas características.
3. Evaluación de la posibilidad de utilizar biosensores compósitos de grafito-Teflón como detectores amperométricos en HPLC y como sistemas para la multidetección de analitos. Se pretende evaluar la posibilidad de coinmovilizar diferentes oxidasas con la peroxidasa en un

mismo electrodo para la determinación simultánea de varios analitos en una misma muestra llevando a cabo una separación cromatográfica, así como el acoplamiento de varios electrodos bienzimáticos en células de detección dual.

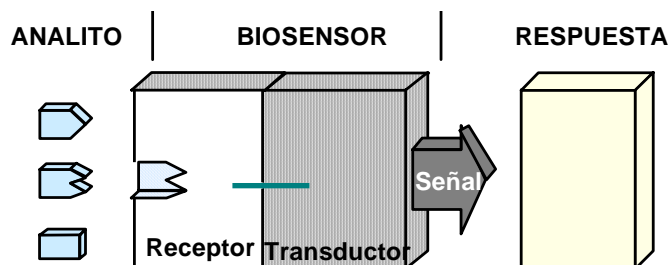
II. INTRODUCCIÓN

La investigación en Ciencia y Tecnología de los alimentos requiere la determinación de la composición y características de éstos, ya que es la manera de determinar el valor nutritivo, características funcionales y aceptabilidad de un alimento. Además, cualquier producto alimentario necesita un análisis como parte de un programa de control de calidad a lo largo del proceso de fabricación y una vez que el producto está en el mercado. Para todo ello, se requieren métodos de análisis rápidos, precisos, exactos, que sean validables y que precisen un tratamiento de muestra mínimo y lo más sencillo posible (Nielsen Aspen Publishers, 1998). Estos requisitos los pueden cumplir los métodos que emplean electrodos amperométricos enzimáticos, los cuales combinan la selectividad que aportan las enzimas con la sensibilidad de la detección amperométrica.

Las enzimas son catalizadores proteicos que poseen una gran selectividad y reactividad. El análisis enzimático consiste en la determinación de analitos con la ayuda de enzimas o en la medida de la actividad enzimática endógena. El hecho de que la catálisis enzimática pueda proceder bajo condiciones suaves, permite la determinación de especies relativamente inestables que no pueden determinarse por otros métodos. Por otro lado, la selectividad de las reacciones enzimáticas puede permitir a veces la medida de componentes en mezclas complejas sin necesidad de recurrir a técnicas de separación. Existen numerosas aplicaciones del análisis enzimático en Ciencia y Tecnología de los alimentos ; en algunas ocasiones, la actividad enzimática es una medida de gran utilidad para verificar si un proceso es adecuado, por ejemplo estudiando la estabilidad térmica de la enzima durante tratamientos a diferentes temperaturas. Otra aplicación, que es la que se ha empleado a lo largo de los trabajos que se recogen esta Memoria, es la determinación de constituyentes o subproductos de un alimento que son sustratos enzimáticos. En este contexto, el empleo de biosensores enzimáticos permite un ahorro de costes y de tiempo, ya que se pueden utilizar repetidamente. Por último, dada la selectividad de las enzimas, la preparación de las muestras que precede al análisis es, por lo general, mínima, ya que usualmente comprende únicamente extracción y eliminación de sólidos por filtración o centrifugación, y en muchos casos la simple dilución de la muestra, lo que supone una gran ventaja a la hora de desarrollar métodos de análisis que tengan amplia aceptación (Nielsen Aspen Publishers, 1998). Por todo ello, es evidente que la utilización de enzimas, y en especial de biosensores enzimáticos, en el análisis de alimentos proporciona una serie de ventajas frente a otras metodologías analíticas que hacen que este tipo de investigaciones resulten de interés prioritario.

II.1. BIOSENSORES

La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un elemento transductor (Esquema 1).



Esquema 1. Esquema de un biosensor

El reconocimiento de moléculas o grupos de moléculas particulares constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos. La naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas o estructuras biomoleculares que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular de una determinada molécula de entre un conjunto o una mezcla de ellas. Este fenómeno de reconocimiento selectivo de especies obviamente puede ser aprovechado con fines analíticos para el diseño y preparación de sensores de dichas especies. El transductor, en el cual se encuentra inmovilizado o retenido el material biológico, debe permitir la conversión de la interacción del analito con el receptor en una respuesta eléctrica, que luego es amplificada o procesada y que estará relacionada con la concentración de ese analito. Dicho transductor, por tanto, determina la eficacia en el procesado de la señal del biosensor, mientras que su selectividad viene principalmente definida por la particularidad de la interacción del componente biológico con el analito. Idealmente, los dispositivos de este tipo deben responder continua y reversiblemente al analito de interés sin perturbar la muestra, eliminando así la necesidad de su pretratamiento e incluso de su recogida (Pingarrón y Batanero, 1999).

La clasificación de los biosensores puede realizarse desde dos puntos de vista diferentes. Una clasificación más general y lógica es aquella basada en *la naturaleza del proceso biológico*. Pueden distinguirse dos grandes grupos (Pingarrón y Sánchez Batanero, 1999) :

- a) Biosensores catalíticos, cuyos receptores pueden ser enzimas, tejidos o microorganismos.
- b) Biosensores de afinidad, entre los que se encuentran los inmunosensores y los basados en quimiorreceptores y los que utilizan ácidos nucleicos.

Una segunda clasificación, es la que se basa en el *fundamento del transductor*. Atendiendo a este criterio, los biosensores pueden clasificarse en :

- a) Electroquímicos, que, a su vez se dividen en potenciométricos, amperométricos y conductimétricos.
- b) Ópticos, que pueden ser espectroscópicos de absorción, fluorimétricos o fosforimétricos y otros.
- c) Térmicos.
- d) De masa.

Por lo que respecta a los biosensores catalíticos, debe decirse que sin duda alguna los más utilizados son los biosensores enzimáticos, tanto que a veces el término genérico de biosensores catalíticos se suele aplicar a estos dispositivos. En las reacciones enzimáticas la molécula transformada se denomina sustrato y usualmente implica el empleo de otro reactivo llamado cofactor, para generar los correspondientes productos. alguna o todas las especies mencionadas pueden ser detectadas por medios fisicoquímicos proporcionando señales que convenientemente tratadas, proporcionan la información requerida del analito en cuestión. La reacción catalítica enzimática es eficiente y además extremadamente selectiva, por lo que se combinan dos factores, de reconocimiento particular y de amplificación, necesarios para la mayoría de las aplicaciones analíticas de estos sensores.

Por otro lado, puede decirse que los dispositivos electroquímicos son los más utilizados como transductores en el desarrollo de biosensores enzimáticos. Esto es debido a que, en general, 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 debido a la naturaleza interfacial de la medida electroquímica. Esto hace que tales dispositivos sean especialmente apropiados para la monitorización "in vivo".
- b) La señal obtenida, obviamente, es 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 suficientes y adecuados para la detección de numerosos analitos de interés.
- d) La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

No obstante, los sensores electroquímicos tienen también dos importantes inconvenientes. 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 selectividad para ciertos analitos. Por otro lado, es necesario utilizar un electrodo de referencia

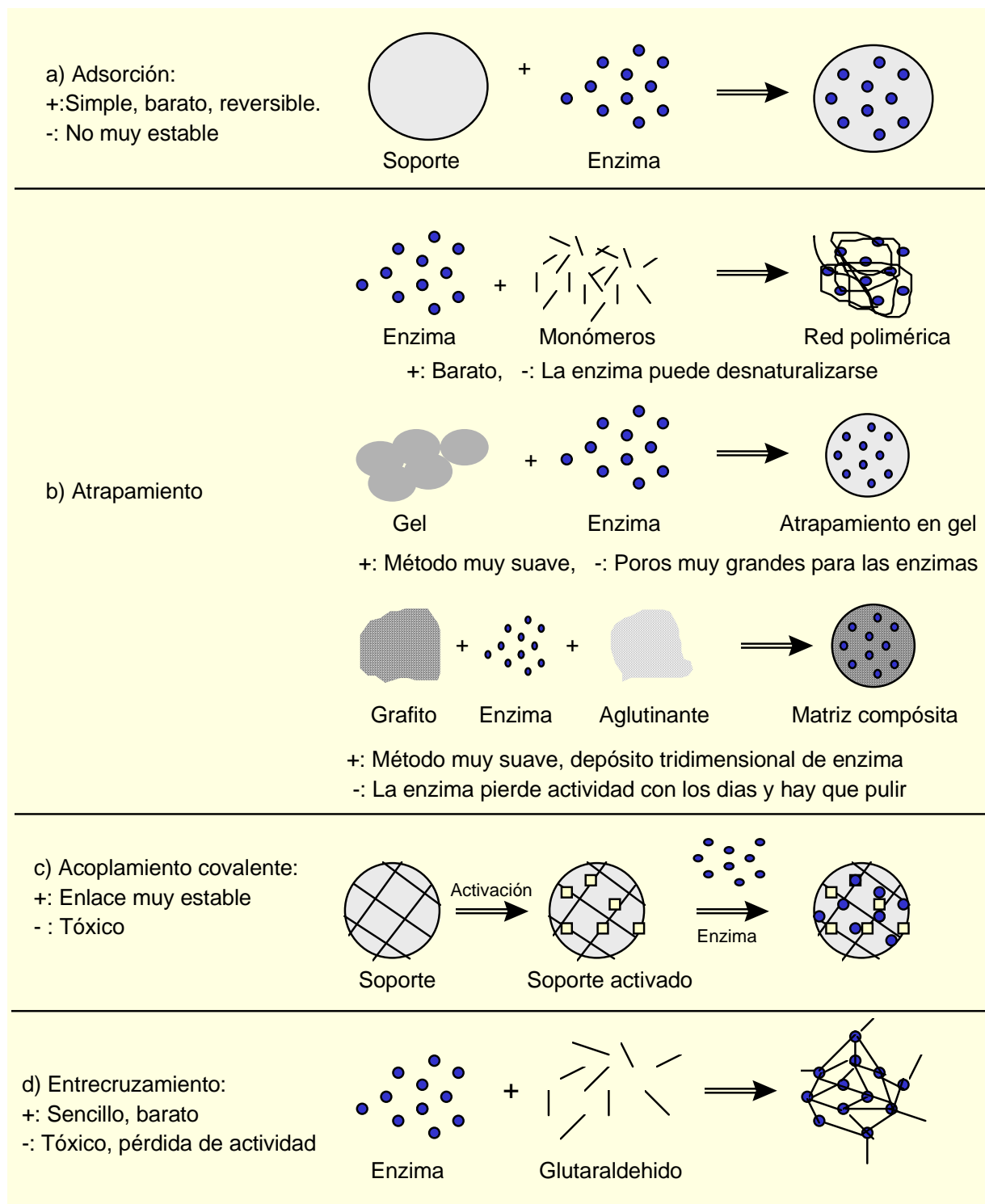
que mantenga constante el potencial durante el transcurso de la medida durante un largo período de tiempo.

Sin duda alguna, en el contexto de los biosensores electroquímicos, los más prometedores, sobre todo en términos de sensibilidad, son los biosensores amperométricos, los cuales monitorizan corrientes faradaicas resultantes de intercambios electrónicos entre el sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante apropiado. De entre los biosensores amperométricos, los más utilizados son los electrodos enzimáticos, que al inmovilizar en las cercanías del material electródico las enzimas, combinan las ventajas de la selectividad enzimática con la transducción directa de la velocidad de reacción en una corriente eléctrica.

El buen funcionamiento de un biosensor depende en gran medida, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. El objetivo fundamental de la inmovilización es permitir un íntimo contacto entre la enzima y el transductor manteniendo inalterable en lo posible la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento biológico. Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento o crosslinking. Dentro de cada uno de estos métodos existen numerosas variantes y además, también es posible utilizar combinaciones de diferentes métodos de inmovilización, pero no profundizaremos en ellos, ya que solo se pretende proporcionar una visión general. En el Esquema 2 se recogen los esquemas correspondientes a los principales métodos de inmovilización y sus principios.

El segundo tipo de inmovilización, es decir, la inclusión de la enzima en la matriz del transductor, se usa principalmente para la fabricación de electrodos enzimáticos compósitos. Así, el procedimiento más sencillo consiste en preparar una mezcla de la enzima y grafito en polvo, que es el transductor, a la que se agrega un aglutinante. Se homogeneiza la mezcla para formar una pasta de carbono modificada y se coloca en un molde con un contacto eléctrico. Con este procedimiento se obtienen biosensores con un depósito tridimensional de enzima, que permite mediante un simple pulido la renovación de la superficie del biosensor. Además, en dicha matriz se pueden incluir otras enzimas, el mediador, etc.

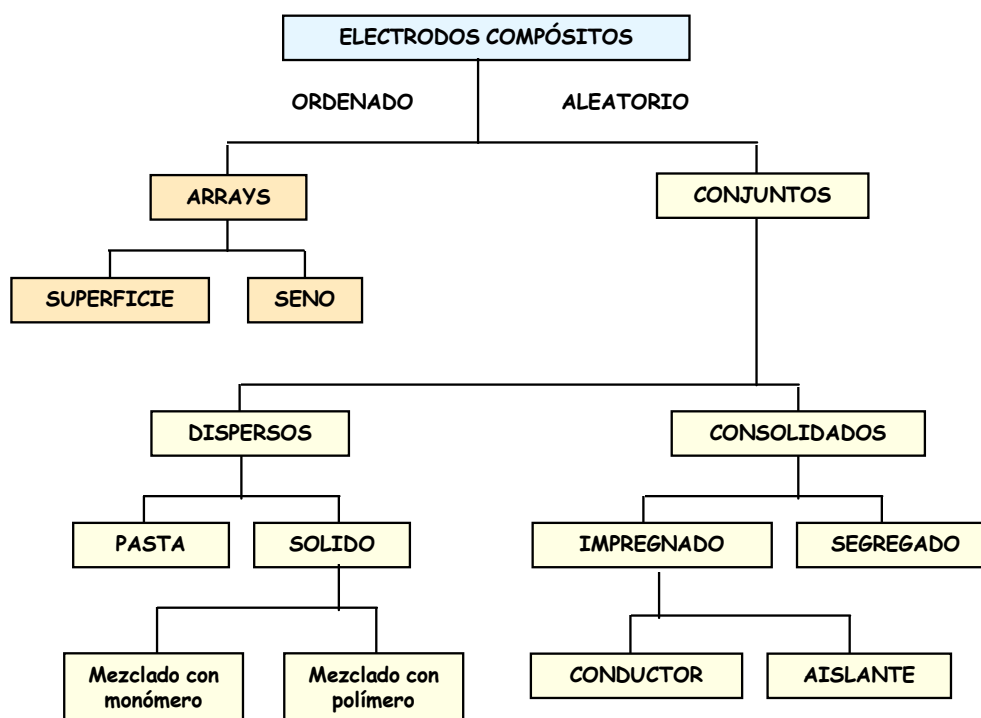




Esquema 2. Esquemas de inmovilización de una biomolécula por adsorción (a), por atrapamiento (b), acoplamiento covalente (c) y entrecruzamiento (d)

II.2. ELECTRODOS COMPOSITOS

Un material compósito es el resultado de la mezcla de dos o más sustancias con características diferentes entre sí que, aunque conservan cada una de ellas su naturaleza original, dan al material compósito propiedades químicas, mecánicas y físicas distintas de las que muestran dichas sustancias por separado. Si el material compósito está formado por una fase conductora y otra aislante, la primera clasificación de estos materiales se puede basar en la distribución de las partículas conductoras y aislantes en el material (Céspedes et al., 1996). Cuando un polímero aislante actúa como agente aglutinante, el material compósito se puede clasificar por la naturaleza del material conductor (platino, oro, carbón, etc.) y también por la distribución de sus partículas, dependiendo de que las partículas conductoras estén dispersadas en la matriz del polímero, o de que estén agrupadas en zonas claramente definidas. La clasificación de los materiales compósitos aceptada más comúnmente atiende a la distribución de la fase conductora en la matriz polimérica, siendo la siguiente:



Esquema 3. Clasificación de los electrodos compósitos

Puesto que, por definición, un electrodo compósito consiste en al menos una fase conductora y al menos una fase aislante entremezcladas de alguna manera, la superficie del electrodo compósito en contacto con la disolución consiste necesariamente en regiones de conductor separadas por regiones de aislante. La primera clasificación está basada en si la disposición del conductor y el aislante está altamente ordenada (un array) o es aleatoria (un conjunto).

Los *electrodos de array* pueden clasificarse posteriormente dependiendo de si el conductor está confinado en la superficie de un aislante (o de un aislante en la superficie de un

conductor) o el conductor ordenado penetra en el seno del material. La mayoría de los electrodos de array utilizados en electroanálisis son superficiales y pueden encontrarse algunos ejemplos en la revisión de Tallman y Petersen (Tallman and Petersen, 1990). Estos arrays tienen geometrías bien definidas pero, sin embargo, sus superficies a menudo no son planas y pueden ser también bastante delicadas de pulir, requiriéndose otra forma de regeneración superficial.

Por lo que se refiere a los *electrodos compósitos de conjunto*, estos se pueden clasificar dependiendo de la distribución del conductor a través de la matriz del compósito. Los materiales en los que las partículas del conductor están distribuidas aleatoriamente por todo el aislante se denominan compósitos dispersos. Una partícula de conductor (o un agregado de partículas) tiene una probabilidad idéntica de ocupar cualquier punto en la matriz. En contraposición, los compósitos consolidados están formados de tal manera que el conductor se extiende a través del compósito de un modo reticulado, aleatorio, con regiones de aislante puro y de conductor puro que no están entremezcladas. Los compósitos dispersos pueden fabricarse en forma de pasta o bien sólidos. Dentro del primer grupo pueden incluirse los electrodos de pasta de carbono, que consisten en una mezcla íntima de polvo de carbono o grafito con una cantidad apropiada de líquido orgánico viscoso no conductor o un aglutinante que sea líquido a temperaturas mayores de 45 °C. Los compósitos dispersos sólidos pueden prepararse de dos formas. El método más común (mezclado con monómeros) implica la dispersión uniforme de un conductor en un monómero que es subsiguientemente polimerizado (Tallman and Petersen, 1990). Alternativamente, el conductor puede dispersarse en un polímero o una cera fundidos o disueltos (mezclado con polímeros) y permitir que la mezcla se endurezca.

Los compósitos consolidados se pueden fabricar también de dos maneras generales. Una implica la impregnación de, o bien un conductor poroso con un aislante, o bien de un aislante poroso con un conductor, denominándose tales materiales compósitos impregnados. En este caso la consolidación del conductor dentro del compósito (y por tanto en la superficie del electrodo) está predeterminada por la estructura porosa del conductor o del aislante.

La segunda manera de formar electrodos consolidados implica la mezcla de un conductor en polvo con un polímero en polvo y el moldeado por compresión de la mezcla. Dentro de este grupo se sitúan los electrodos compósitos de grafito y teflón, que se utilizarán en nuestros trabajos experimentales. Estos materiales se llaman compósitos segregados. Los compósitos consolidados en general y los compósitos segregados en particular, presentan frecuentemente ventajas en electroanálisis en comparación con los compósitos dispersos.

Los electrodos de array y los electrodos compósitos impregnados conducen a través de regiones bastante continuas de conductor mayoritariamente puro y homogéneo. Por otra parte, los electrodos compósitos segregados y los dispersos conducen a través de regiones bastante discontinuas, altamente heterogéneas, de conductor y aislante entremezclados, un proceso

descrito a menudo por modelos de percolación (Tallman and Petersen, 1990). Para tener una conductividad adecuada para su uso en electroanálisis, un material compósito segregado o disperso debe tener una fracción de volumen de conductor (f) algo por encima de la composición crítica o umbral de percolación (f_c). Esta composición crítica es significativamente menor para compósitos segregados que para compósitos dispersos. Para ambos tipos de materiales la mayor fracción de volumen utilizable de conductor está a menudo determinada por la estabilidad mecánica requerida para el material y varía fuertemente con la naturaleza del aislante y del conductor.

La superficie de un electrodo compósito puede asemejarse a un conjunto de microelectrodos. Es ese aspecto el que da lugar a las mejoras en la relación señal/ruido para muchos electrodos compósitos cuando se les compara con sus correspondientes fases conductoras puras. Un electrodo compósito es capaz de producir una corriente mayor por unidad de área activa que la del correspondiente macroelectrodo conductor puro, tanto en disoluciones quiescentes como bajo condiciones hidrodinámicas. Puesto que el ruido y la corriente de fondo (por unidad de área activa) deben ser similares para ambos tipos de electrodos, el electrodo compósito presumiblemente muestra la mayor relación señal/ruido. A medida que el recubrimiento fraccional de la superficie geométrica del compósito por el conductor aumenta, la relación señal/ruido tiende a disminuir, aproximándose en el límite a la del electrodo conductor puro. Es por esta razón por la que los compósitos consolidados, que poseen buena conductividad a un bajo valor de f , que muestren presumiblemente una relación señal/ruido superior a la de los compósitos dispersos.

Algunos ejemplos de materiales aislantes utilizados para la fabricación de electrodos compósitos son : aceite mineral, parafina, resina epoxi, silicona, poliuretano, poliestireno, metacrilato o teflón. Estos polímeros dan al biosensor una cierta estabilidad física, química o biológica. Los materiales de carbon son fases conductoras ideales para compósitos usados como sensores amperométricos. Estos materiales tienen una elevada inercia química y muestran un amplio intervalo de potenciales de trabajo. También tienen una baja resistencia eléctrica y una estructura cristalina responsable de corrientes residuales bajas (Céspedes et al., 1996).

Una ventaja importantísima que proporciona un electrodo compósito son los buenos límites de detección asociados a las altas relaciones señal/ruido que se consiguen. La corriente residual y el ruido de un macrosensor fabricado con una fase conductora pura dependen del área, lo que significa que una disminución del área proporciona una disminución del ruido. Esto podría implicar una disminución de la sensibilidad también, pero si el área del electrodo es muy pequeña, como en los microelectrodos, el perímetro de la superficie tiene un significado más importante en el transporte de masa que en el área. Ya que se establece una difusión no lineal, se genera una corriente en estado estacionario que aumenta la relación señal/ruido y, por

tanto, permite una mejor sensibilidad (Piñeiro-Avila et al., 1998). Los electrodos compósitos pueden visualizarse como macroelectrodos formados por arrays o agrupaciones de microelectrodos. Estos microelectrodos están formados por una fase no conductora, y conectados en paralelo, y la señal producida sería la suma de las corrientes individuales generadas por cada microelectrodo. El resultado es un sensor con una señal tan fuerte como un macroelectrodo, pero que presenta una señal/ruido de un microelectrodo, lo que conlleva una mejor respuesta electroquímica, límites de detección bajos y tiempos de respuesta rápidos. Por otro lado, los electrodos compósitos pueden fabricarse con gran flexibilidad en cuanto al tamaño y forma del material, permitiendo una fácil adaptación a una gran variedad de configuraciones electrónicas. Finalmente, uno de los aspectos más importantes de los electrodos compósitos es su versatilidad, ya que permiten incorporar especies que mejoren la selectividad y/o sensibilidad en el propio material electrónico, bien mediante modificación química del conductor y/o aislante antes de la fabricación del compósito, o bien mediante la incorporación física de un modificador (químico o bioquímico) dentro de la propia matriz del compósito. A diferencia de los electrodos modificados superficialmente, estos electrodos compósitos modificados pueden ser regenerados en su superficie sin pérdida de modificador.

Muchas de las primeras aplicaciones de los electrodos compósitos se hicieron en voltamperometría de redisolución anódica. Anderson y Tallman (Anderson and Tallman, 1976) describieron un electrodo de película fina de mercurio sobre un compósito de grafito/epoxi. Por otro lado, se describieron varias aplicaciones de electrodos compósitos en cromatografía líquida, Fenn y col. (Fenn et al., 1978) estudiaron la aplicación de un electrodo de cera/grafito a la determinación de catecolaminas en extractos de cerebro de ratón y en extracto de plasma. Armentrout y col. (Armentrout et al., 1979) emplearon un electrodo de polietileno/negro de carbono para la determinación de compuestos fenólicos en agua de drenaje superficial. Más recientemente, la investigación con materiales compósitos ha encontrado una aplicación importantísima en la fabricación de baterías de litio recargables (Hjelm et al., 2001 ; Rom et al. 2001) y hay también trabajos publicados que emplean como fase aislante/aglutinante, polímeros impresos molecularmente (MIP) (Andrea et al., 2001). Existen también trabajos que, en lugar de utilizar nuevos materiales aislantes, desarrollan materiales compósitos electrónicos ensayando diferentes fases conductoras. Tal es el caso de matrices desarrolladas a partir de pasta de carbono vitrificado (Wang et al., 2001), o de mezclas de metales como níquel (Khoroshilov et al. 2000) o cobre (Khoroshilov et al. 2000b) con poliestireno.

II.2.1. MATRICES ELECTRÓNICAS DE GRAFITO-TEFLÓN

Como ya se ha comentado, los electrodos de grafito-Teflón pueden considerarse como materiales compósitos segregados que se construyen mezclando cantidades conocidas de ambos componentes en polvo, para posteriormente prensar mecánicamente la mezcla

homogeneizada en forma de pastillas con las dimensiones requeridas. Normalmente, en un material compuesto segregado, el diámetro medio de las partículas conductoras es pequeño en relación con las dimensiones de las partículas de polímero. Después del proceso de mezcla y de homogeneización las partículas conductoras ocupan los intersticios entre las partículas de polímero más grandes.

En estos electrodos compósitos de grafito y Teflón la fase conductora utilizada presenta, obviamente, una buena estabilidad electroquímica y tiene una alta disponibilidad y un bajo coste. Por lo que respecta a la fase aislante, las propiedades físico-químicas del material resultante dependen fundamentalmente del polímero escogido, principalmente por lo que se refiere a la resistencia mecánica, carácter hidrofóbico y resistencia al hinchamiento en disolventes no acuosos. Este último aspecto es especialmente interesante desde un punto de vista práctico, dado que la afinidad de la matriz polimérica por los disolventes orgánicos es la causa de la inestabilidad dimensional de algunos electrodos en medios no acuosos. El hinchamiento de la fase aislante origina un crecimiento de la superficie del electrodo y, por tanto, una mayor corriente de carga. Los electrodos compósitos basados en teflón, Kel-F, polietileno y polipropileno presentan una buena resistencia a algunos disolventes orgánicos (Park y Shaw B.R., 1994). Sin embargo, por otra parte, los materiales compósitos de grafito-polietileno y grafito-polipropileno poseen escasa dureza, por lo que resultan difíciles de manejar y pulir. Por consiguiente, entre los materiales aislantes mencionados anteriormente, el Teflón constituye una de las matrices poliméricas más atractivas para su utilización en medios no acuosos, puesto que es prácticamente inerte al hinchamiento y presenta buenas propiedades mecánicas.

En la Tabla I se recogen algunos antecedentes bibliográficos en los que se emplean electrodos de grafito-Teflón con fines analíticos.

En 1975, Klatt y colaboradores (Klatt et al., 1975) evaluaron el comportamiento voltamperométrico, mediante voltamperometría cíclica, de electrodos de grafito y teflón de diferente composición, comparando la resistencia mecánica de las pastillas, la conductividad del electrodo y la forma de los voltamperogramas obtenidos con ferrocianuro. Estos autores examinaron, asimismo, la reproducibilidad de la superficie electródica y la reproducibilidad entre diferentes electrodos, concluyendo que presentan excelentes características para su empleo en estudios electroquímicos. Además, demostraron su estabilidad física en medios hidroalcohólicos y fuertemente ácidos.

Tabla I. Electrodos compósitos basados en matrices de grafito-Teflón

Composición matriz	Tipo de detección	Modo de medida	Analito	Referencia
Grafito-PTFE	Amperométrica	Discontinuo	Ferro/ferricianuro	Klatt et al., 1975

Grafito-PTFE	Amperométrica	HPLC	Compuestos fenólicos	Shah y Honingberg, 1983
Grafito-PTFE	Voltamperométrica	Discontinuo	Herbicidas thiram y disulfiram	Fernández et al., 1995a
Grafito-PTFE	Amperométrica	FIA	Herbicidas thiram y disulfiram	Fernández et al., 1995b
Grafito-PTFE	Amperométrica	HPLC	Herbicidas thiram y disulfiram	Fernández et al., 1996
Grafito-PTFE-Buckminsterfullereno (C-60)	Voltamperometría cíclica	Discontinuo en acetoniitrilo	Perclorato de tetra-n-butilamonio	Kutner, 1996
Grafito-PTFE + Hg, Co ó Cu electrodepositados	Voltamperometría cíclica	Discontinuo	Evaluación del recubrimiento	Xu et al., 1997
Comparación pasta de C con Grafito-PTFE	Voltamperom.cíclica y amperometría	Discontinuo y flujo	Antioxidantes	Diego et al., 1998
Grafito-PTFE	Potenciometría	Discontinuo	Tensioactivos catiónicos	Matesic-puac et al., 2000
Grafito-PTFE y grafito-EPD modificados con Ru y RuO ₂	Amperometría	FIA	Metionina	Pedrero et al., 2001

PTFE= Politetrafluoroetileno (Teflón)
EPD= Etilenpropilendieno

Por otra parte, Shah y Honigberg (Shah y Honingberg, 1983) evaluaron el comportamiento de un electrodo de grafito-Teflón como detector en HPLC, demostrando su utilidad para la detección electroquímica de distintos compuestos fenólicos y discutiendo un aspecto práctico tan importante como es la pasivación de la superficie del electrodo por dichos compuestos. Sin embargo, desde 1983 hasta los estudios realizados por nuestro Grupo de Investigación (Fernández et al., 1995a) en 1995, sólo se publicó un trabajo más con este tipo de matriz electródica compósita.

II.2.2. MATRICES ELECTRÓDICAS DE CARBONO VÍTREO RETICULADO

El carbono vítreo reticulado (RVC) es una forma relativamente impermeable del carbono, muy parecida al carbono vitrificado, que está formada por una estructura rígida tridimensional en forma de panal de abeja. Las principales ventajas de este material en el campo de la electroquímica son (Heineman y Kissinger, 1980) : superficie microscópica muy

pequeña comparada con la del grafito poroso convencional, matriz rígida, bajo precio comparado con el carbono vitrificado, fácilmente manejable, disponibilidad comercial de diferentes tamaños de retícula, y combinación de las propiedades electroquímicas del carbono vitrificado no poroso con sus ventajas hidrodinámicas y estructurales.

Todas estas características del RVC permiten pensar que este material debe suponer una alternativa muy interesante al carbono convencional para la construcción de matrices compósitas. Gracias a su estructura tridimensional, se consigue tener una interconexión de la fase conductora a lo largo de la matriz, que raramente se podría obtener con carbono convencional, con el que se necesitaría mucha más cantidad para que al mezclarlo con la fase aislante, existiera contacto. Esto supone que haya menos fase conductora por unidad de área y, por tanto, una mayor relación señal :ruido que se traducirá en menores límites de detección.

Las posibilidades de aplicación del RVC en Química Analítica son muchas, habiéndose acoplado a equipos de ICP para preconcentrar electroquímicamente (Snook, 1985) o como electrodo ópticamente transparente (Norvell y Mamantov, 1977 ; Sorrels y Dewald, 1990) como ejemplos diferentes de las aplicaciones propiamente electroanalíticas.

Por lo que se refiere a las aplicaciones electroquímicas, se ha aprovechado su gran área superficial para electrosíntesis (Szanto et al., 1998), y coulombimetrías (Torabi et al., 1999). Recientemente, se ha utilizado para la eliminación de metales del agua (Lanza y Bertazzoli, 1999 ; Fisk y Boyle, 2000 ; Carreno et al., 1999) También se ha empleado como electrodo para técnicas voltamperométricas de redisolución (Armalis et al., 1999 ; Armalis y Kubiliene, 2001) y para la deposición de películas de Hg (Blaedel y Wang, 1979 ; Berrettoni et al., 1986) y de otros metales I (Czerwinski et al. 1999 ; Dado et al., 1999). Además, se ha modificado con polímeros como el polipirrol (Rodriguez et al., 2000). Aprovechando su estructura porosa, se ha empleado en multitud de aplicaciones en sistemas de flujo utilizando el RVC vacío para que la disolución portadora pase a su través (Widner ET AL., 1998 ; Zhu Y Curran, 1991), o como reactor, bien para eliminar interferencias (Yao et al., 1983) o con enzimas inmovilizadas acoplado a detectores térmicos (Xien et al., 1993). También se ha llegado a emplear como fase estacionaria en cromatografía aprovechando su porosidad (Wang y Dewald, 1984) o utilizando partículas de RVC como relleno de columnas (Ge y Wallace, 1989 ; Ge y Wallace 1990).

Finalmente mencionar que se ha empleado como electrodo compósito para la determinación de analitos por diferentes técnicas electroanalíticas. En la Tabla II se recogen los artículos de electrodos compósitos de RVC encontrados en la Bibliografía.

Tabla II. Electrodos compósitos basados en matrices de RVC

Composición matriz	Tipo de detección	Modo de medida	Analito	Referencia
---------------------------	--------------------------	-----------------------	----------------	-------------------

RVC-Resina epoxi	Voltamperometría cíclica	Discontinuo	Ferrocianuro	Sleszynski, 1984
RVC-Resina epoxi	Voltamperometría de onda cuadrada	Discontinuo	Ferroceno	O'Dea, 1985
RVC-Resina epoxi	Amperometría	HPLC	Epinefrina, dopamina, acetaminofeno y ferrocianuro potásico	Wang y Freiha, 1984
RVC-Polianilina-acido p-estirenosulfónico	Amperometría	Discontinuo	Respuesta de PANI en carbonato de propileno	Tsutsumi et al., 1997

Para desarrollar la matriz compósita de RVC que se utiliza en esta Memoria fue necesario escoger una fase aislante que se pudiera introducir sin problemas en la estructura tridimensional del carbono, y que proporcionara al electrodo la rigidez suficiente para que la disolución de trabajo no se introdujera en la matriz electródica. Se eligió una **resina epoxi**, que pertenece a una familia de polímeros ampliamente utilizados por sus excelentes propiedades químicas, su buena adhesión a otros materiales, y sus características aislantes. Además son muy fáciles de preparar, baratos y se dispone de ellos comercialmente (Dekker M. 2ª Ed.). En la tabla II de electrodos compósitos de RVC se recogen algunas publicaciones en las que se utilizan electrodos de RVC-Resina Epoxi.

II.3. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS COMPÓSITOS

El empleo de matrices electródicas compósitas puede considerarse como una eficiente estrategia para diseñar biosensores electroquímicos robustos, siendo la versatilidad que ofrecen probablemente una de sus más importantes características. Así, es posible incorporar en el seno de la matriz electródica diferentes especies, tales como biomoléculas, cofactores, mediadores, capaces de mejorar la selectividad y/o sensibilidad. De esta forma, es posible

fabricar depósitos tridimensionales de biocomponentes cuya superficie puede regenerarse muy fácilmente mediante un procedimiento tan simple como es un suave pulido. Además, pueden esperarse rápidas respuestas hacia los correspondientes sustratos implicados debido a la ausencia de barreras difusivas en forma de membranas sobre la superficie del electrodo, así como a la cercanía de las biomoléculas (y de otros componentes) al material electródico.

Si bien el grupo utilizado más ampliamente como bioelectrodos compósitos es sin duda alguna el de los electrodos de pasta de carbono (Byfield et al., 1994 ; Gorton, 1995 ; Kalcher, 1995), varios inconvenientes asociados con su falta de estabilidad prolongada, principalmente en condiciones en flujo, así como de capacidad de mecanización y compatibilidad con medios no acuosos, han conducido al empleo de matrices compósitas rígidas como las que se han utilizado en esta Memoria.

El primer trabajo de un biosensor enzimático de pasta de carbono data de 1988 (Matuszewski y Trojanowicz, 1988), y en el se incluía la enzima glucosa oxidasa directamente en una fase orgánica constituida por un polvo de grafito y un aceite de silicona. Desde entonces, se han utilizado multitud de aglutinantes : aceite de parafina (Hale et al. 1990), aceite mineral (Wang, 1991), aceite de fenilmetilsilicona (Gorton et al., 1992), Nujol (Pandey et al., 1992), etc.

En la Tabla III se recogen algunos trabajos sobre biosensores basados en electrodos compósitos de pasta de carbono publicados en los últimos años.

Tal y como refleja la Tabla, dada la escasa estabilidad de este tipo de electrodos en otros medios, la mayoría de los trabajos publicados basados en electrodos de pasta de carbono se llevan a cabo en medios acuosos en los que, por otra parte, hay que destacar los cortos tiempos de vida operacional. Además de los inconvenientes mencionados, se ha recogido en varios artículos que la fabricación de la pasta de carbono puede afectar enormemente las propiedades finales del electrodo (Gorton, 1995) y, teniendo en cuenta que la mayoría de las pastas se fabrican a mano con un mortero, es además bastante difícil reproducir el proceso de fabricación.

Tabla III. Biosensores electroquímicos compósitos de pasta de carbono

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Composición electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E_{ap}	Tiempo de vida	Muestra	Referencias
HRP / H_2O_2 y peróxido de 2-butanona	Atrapamiento físico	Amperométrica PC modificada con lactilol	Mezclas acetoni-trilo-agua	---	---	---	Popescu et al. 1996
Peroxidasa (batata) /	Atrapamiento físico	Amperométrica PC (grafito y parafina)	Mezcla metanol / tampón fosfato	$E = -0.22V$ (vs)	---	Cosméticos	Vieira et al., 2000

Hidroqui- nona		con batata		Ag/AgCl)		(crema)	
Polifenol oxidasa / Flavanoles	Tejidos de plantas inclui- dos en la pasta. Atrapa- miento físico	Amperométrica PC con platano, patata y manzana	Acuoso Discontinuo	---	---	Cerveza	Eggins et al. 1997
LOD, HRP / Lactato y H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Amperométrica PC con estabi-lizador operacional : fenilendia- mina	Acuoso FIA		Mejor estabilidad operacio- nal con fenilendia- mina		Spohn, et al. 1997
D-FDH / Fructosa	Atrapamiento físico	Amperométrica PC modificado con polímero de Os	Acuoso Discontinuo FIA	Os +0.1V (vs Ag/AgCl)	---	Alimen- tos	Paredes et al., 1997
Tirosinasa / Fenoles	Atrapamiento físico	Amperométrica PC obtenida con hidrocarburos de cadena corta como aglutinantes líquidos	Acuoso FIA	---	---	Agua de río	Wang et al., 1997
PyrOD, AOD / Monosacá- ridos y etanol	Atrapamiento físico	Amperométrica Dos electrodos de PC. Cada uno con una de las enzimas	Acuoso Cromatografía líquida	-50 mV vs Ag/AgCl	16 horas de monitoriza- ción	Proce- sos de fermen- tación	Liden et al., 1998
Ph-A, Ph-Glu, GPDH / Fosfatos inorgánicos	Atrapamiento físico	Amperométrica PC con mediador de Os y NAD ⁺ y cubierta con hidrogeles forma- dos "in situ".	Acuoso Discontinuo	Os	---	---	Fernández et al., 1998
GluDH / L-glutamato	Atrapamiento físico	Amperométrica PC con NADP y azul de toluidina O polime- rizado. Pruebas con tricloruro de hexami- narutenio	Acuoso FIA	Polímero de azul de tolui- dina O	---	---	Pasco et al., 1999
Polifenol oxidasa / Epinefrina, dopamina	Atrapamiento físico de raíz de <i>Dioscorea bulbifera</i>	Voltamperométrica PC con la raíz productora de la enzima	Acuoso Discontinuo	E= -0.14 V	Mejor estabilidad que con enzima pura	Produc- tos farma- céuticos	Caruso et al., 1999
HBH, Lacasa / NADPH	Atrapamiento físico	Amperométrica PC con las enzimas	Disolución reguladora de fosfato pH 6.2	E= - 50 mV vs Ag/AgCl	7 horas	Medidas de GPDH en sangre	Huang et al., 1999
Colineste- rasa / Pesticidas	Inmovilización en membra- nas reempla- zables	Adsorción del pesti- cida a la membrana según hidrofobici- dades y medida con electrodo de PC y pH	Acuoso y con tensoactivos. Discontinuo y flujo	---	---	---	Budnikiv et al., 1999

Tabla III. Biosensores electroquímicos compósitos de pasta de carbono (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Composición electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Tiempo de vida	Muestra	Referencias
PyrOD(LP), PyrOD(PS), HRP / Piruvato	Atrapamiento físico	Amperométrica PC orgánica modifi- cada con tri-halosa o lactilol solos o con poli-L- aminoácidos catióni- cos. Con la PyrOD(PS) hay que	Acuoso FIA	E= 0.0 V vs Ag/AgCl	Estabilidad operaciona l aumenta coimovili- zando poli- L-arginina y cubrien-	Medios de culti- vo de células de ma- míferos	Bergmann et al., 1999

		incluir piro-fosfato de tiamina y Mg (II)			do el electrodo con membrana de dialisis		
ADH / Etanol	Atrapamiento físico	Amperométrica PC modificada con un complejo de Re	Acuoso Discontinuo	E= 0.0 V vs SCE	8 días almacenado a 4 °C	---	Tobalina et al., 1999
Tirosinasa / Fenoles	Atrapamiento físico	Amperométrica PC con la enzima	HPLC	Tyr-CPE : E=-0.20V CPE : E=+1.0 ó +1.2 V	Disminución de señal en 10 inyecciones : CPE : 65% Tyr-CPE : 5%	Muestras acuosas de suelo contaminadas y extracto orgánico de suelo y fangos	Rogers et al., 1999

PC : Pasta de carbono

HRP : Peroxidasa

LOD : Lactato oxidasa

FIA : Análisis por inyección en flujo

D-FDH : D-Fructosa deshidrogenasa

PyrOD : Piranosa oxidasa

AOD : Alcohol oxidasa

Ph-A : Fosforilasa A

Ph-Glu : Fosfoglucosutasa

GPDH : Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

GluDH : Glutamato deshidrogenasa

HBH : p-hidroxibenzoato hidroxilasa

NADPH : ácido de nicotinamida adenin dinucleótido fosfórico

PyrOD(LP) : Piruvato oxidasa de *Lactobacillus plantarum*

PyrOD(PS) : Piruvato oxidasa de *Pediococcus sp.*

NAD⁺ : Nicotinamida adenin dinucleótico

SCE : Electrodo de calomelanos saturado

CPE : Electrodo de pasta de carbono

Ya hemos visto anteriormente que, dentro de los distintos materiales rígidos compósitos utilizados para la fabricación de biosensores, la utilización de resina epoxi como material aglutinante proporciona características mecánicas y físicas muy atractivas para la fabricación de biosensores. En la Tabla IV, se resumen diversas publicaciones sobre biosensores enzimáticos compósitos fabricados con resina epoxi.

Los trabajos sobre biosensores fabricados con resina epoxi son menos abundantes que los que utilizan pasta de carbono, pero dentro de ellos hay bastantes en los que se emplean medios orgánicos. Tal y como se observa en la Tabla IV, los tiempos de vida operacionales con biosensores compósitos de este tipo son más largos que para los electrodos de pasta de carbono (ya se empieza a hablar de meses) aunque sea necesario pulir a menudo. En cuanto a las enzimas y aplicaciones con los que se suelen utilizar este tipo de matrices, difiere en poco del resto de matrices compósitas.

Tabla IV. Biosensores electroquímicos compósitos fabricados con resina epoxi

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Composición electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Tiempo de vida	Muestras	Referencias
AOD / Etanol	Atrapamiento físico	Amperométrica Grafito en polvo, resina epoxi y la enzima AOD	Acuoso (Fosfato 0.1 M y KCl 0.1 M, pH 7.0) Discontinuo	E=1.1 V vs Ag/AgCl	Enzima estable en la matriz bio-compósita tres meses	---	Morales et al., 1998

AChE ó BChE / Pesticidas organofosforados y carbamatos	Partículas de sílice aminado	Amperométrica Grafito en polvo, resina epoxi, TCNQ y las partículas con la enzima empleada en cada caso	Acuoso (Fosfato 0.1 M y KCl 0.1 M, pH 7.0) Discontinuo	TCNQ E=0.3 V vs Ag/AgCl	Uso prolongado si se puede de vez en cuando	---	Martorell, et al., 1997
GOD / Glucosa	Atrapamiento en membrana de polímero de poliuretano acrilado fotocurable	Amperométrica Grafito con epoxi y membrana adherida a la superficie	Acuoso Discontinuo	---	1 mes Membrana estable hasta tres meses	---	Puig et al., 2001
GOD / Glucosa	Atrapamiento físico	Amperométrica Grafito+resina La mezcla se emplea para imprimirla sobre fibra de vidrio	---	---	---	---	Galan et al., 1998
Tirosinasa / Fenol y catecol	Atrapamiento físico	Voltamperometría cíclica y amperométrica Grafito+resina epoxi. Prueban modificaciones con metales	Acuoso (Fosfato 0.1 M, pH 6.0) y acetonitrilo/fosfato y metanol / fosfato FIA	E=-0.1 V vs Ag/AgCl	---	---	Mareike et al., 1996
BOX, HRP /Bilirrubina	Atrapamiento físico	Amperométrica Mezcla de grafito+resina comercial	Acuoso (Fosfato 0.05 M, pH 7.4+ ferrocianuro)	Fe(CN) ₆ ²⁻ E=-0.2 V vs Ag/AgCl	Pulido necesario tras cada medida	---	Wang y Ossoz, et al., 1990
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Amperométrica Mezcla comercial grafito+resina	Acuoso (Fosfato 0.05 M, pH 7.4)	E=-0.025 V vs Ag/AgCl	---	---	Santandreu et al., 1997
HRP / Peróxido de lauroilo	Atrapamiento físico	Voltamperometría cíclica Grafito-epoxi y comparan con silicona, poliéster y poliuretano	Acetona, acetonitrilo, etanol, cloroformo y tetrahydrofurano	Ferroceno	---	---	Ramírez, et al., 2001
HRP / Peróxidos orgánicos	Atrapamiento físico	Amperométrica Grafito y resina epoxi (Comparación con pasta de carbono)	Acuoso (Fosfato 0.05 M, pH 7.4) y mezclas acetonitrilo/ agua	o-fenilendiamina E= -0.2 V vs Ag/AgCl	---	Aguas de bebida	Wang et al., 1991
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Potenciométrica Grafito y resina epoxi	Acuoso (Fosfato 0.05 M, pH 7.0) FIA	---	5 meses de uso intermitente	Bebidas y suero	Zulfikar et al., 1995
ADH / Alcoholes	Atrapamiento físico	Amperométrica Mezcla de grafito+resina epoxi+NAD ⁺	Acuoso (Fosfato 0.05 M, pH 7.4)	E=+0.1 V vs Ag/AgCl	Pulido diario Caída paulatina	---	Wang et al., 1992

AOD : Alcohol oxidasa

AChE : Acetilcolinesterasa

BCE : Butirilcolinesterasa

TCNQ : 7,7,8,8,-tetracianoquinodimetano

GOD : Glucosa oxidasa

BOX : Bilirrubina oxidasa

HRP : Peroxidasa

ADH : Alcohol deshidrogenasa

En cada una de las introducciones de los capítulos de esta Memoria, se recogen más referencias de biosensores compósitos fabricados con distintas matrices electrónicas, que demuestran la aplicabilidad de los materiales compósitos en el diseño y construcción de biosensores.

III.4. BIOSENSORES ENZIMÁTICOS EN MEDIOS ORGÁNICOS Y EN MEDIOS ORGANIZADOS

Es un hecho bien conocido que la utilización analítica de las reacciones enzimáticas ha estado hasta hace poco tiempo restringida a los medios acuosos. Sin embargo, a partir de los trabajos de Hall y col (Hall et al. 1988a ; Hall et al. 1988b) ha quedado claro que es posible desarrollar biosensores enzimáticos en fase orgánica con prestaciones que incluso pueden mejorar las conseguidas en medio acuoso, tales como la posibilidad de monitorización de analitos en muestras hasta ese momento inaccesibles, sin necesidad de un exhaustivo tratamiento de muestra.

Los disolventes orgánicos pueden producir grandes cambios en la actividad y especificidad de las enzimas, dado que estas propiedades dependen de diferentes interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, iónicos o interacciones de Van der Waals. Es obvio que los disolventes orgánicos pueden perturbar estas interacciones y con ello producir cambios cinéticos y termodinámicos en el comportamiento de las enzimas. Es por ello, por lo que muchos de los trabajos de investigación llevados a cabo en este campo se han dedicado a estudiar el efecto del disolvente empleado sobre la eficiencia de la reacción catalítica, así como sobre la estabilidad y especificidad de los biosensores desarrollados. Con objeto de correlacionar la actividad catalítica en diferentes disolventes, Laane, Boeren y Vos (Laane, et al., 1987) propusieron la utilización del parámetro $\log P$, donde P es el coeficiente de reparto del disolvente en el sistema de dos fases octanol-agua. A medida que $\log P$ aumenta la hidrofobicidad del disolvente orgánico también aumenta. Se ha establecido que, en general, los disolventes con mayor hidrofobicidad permiten una mayor actividad enzimática y una mejor termoestabilidad y estabilidad operacional que los disolventes menos hidrofóbicos. Así mismo, se ha establecido que es necesaria la presencia de una capa de agua que rodee la enzima para que pueda existir actividad catalítica. Esta cantidad de agua esencial se precisa para mantener la hidratación que proporcione la flexibilidad y polaridad necesarias al microambiente que rodea la parte activa de la enzima. Se ha sugerido (Saini et al., 1991) que disolventes con $\log P < 2$ no son apropiados para la biocatálisis, ya que provocan una fuerte distorsión sobre la interacción agua-enzima, llegando a producir la eliminación de la capa de agua esencial.

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 sustratos escasamente solubles en agua, lo cual amplía la gama de especies que pueden ser sensorizadas con dispositivos de este tipo. Estos analitos hidrofóbicos acceden al microentorno de la enzima a través del disolvente orgánico. Puede conseguirse, además, una mejora de la estabilidad operacional del sensor y muchas veces es posible emplear un esquema de inmovilización de la enzima muy simplificado.

Ciñéndonos en particular a los biosensores enzimáticos electroquímicos, a las ventajas ya mencionadas pueden añadirse otras. Por un lado, especies electroactivas en medio acuoso

tendrán ahora una baja solubilidad, lo que da lugar a una menor interferencia por parte de dichas especies iónicas hidrofílicas. Además, se ha demostrado que es posible utilizar mediadores redox 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. Por último, debe indicarse la facilidad para la inmovilización de las enzimas en la superficie del electrodo, siendo posible su adsorción sobre materiales de soporte inertes o directamente sobre los electrodos. Con este método de inmovilización, simple y rápida, normalmente se consiguen mayores cantidades de enzima activa que con los métodos de inmovilización covalente. Sin embargo, la adsorción sufre cuando el contenido de agua en el disolvente orgánico es elevado.

En el desarrollo de electrodos enzimáticos en fase orgánica se han empleado tanto disolventes orgánicos polares y no polares como mezclas, así como sistemas microacuosos, mezclas disolvente orgánico/agua, sistemas bifásicos agua-disolvente orgánico inmiscible y micelas inversas como se verá a continuación (Chatterjee y Russel, 1992). A pesar de sus ventajas, la relativa novedad de este área de trabajo hace que el número de publicaciones no sea muy elevado. Un aspecto que merece la pena ser destacado es el empleo de hidrogeles para atrapar la enzima y a la vez mantener el nivel de hidratación necesario de la misma, si bien soportes muy polares pueden limitar la velocidad de transferencia de masa de sustratos hidrofóbicos (Campanella et al., 2001). También se ha reportado que el empleo de disolventes orgánicos provoca un aumento de sensibilidad con respecto al mismo tipo de biosensor en medio acuoso (Iwuoha et al., 1997 ; Bachmann et al., 1998). Por otro lado, se ha aprovechado la amplificación de la señal que produce el agua en la actividad enzimática en fase orgánica para monitorizar trazas de agua en disolventes orgánicos, manteniendo fija una concentración de sustrato (Mannino et al., 1994).

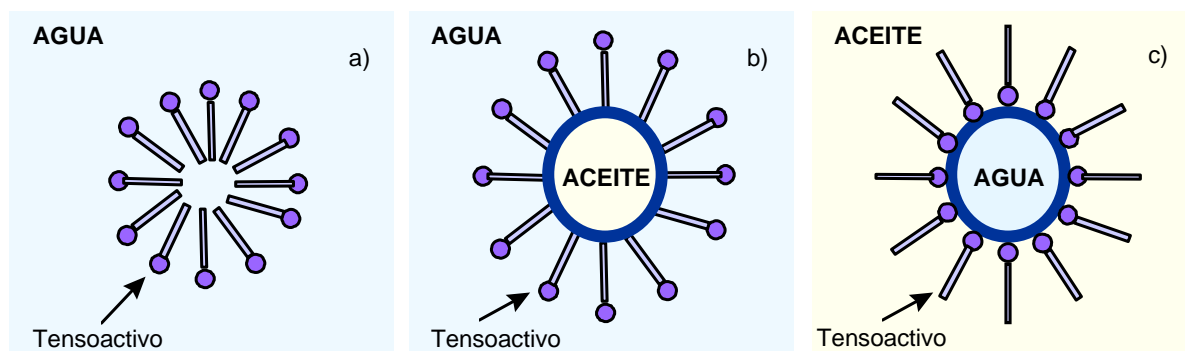
Pasando a los medios organizados, los que se van a utilizar en los trabajos descritos en esta Memoria son disoluciones micelares, emulsiones aceite/agua y emulsiones agua/aceite, también llamadas micelas inversas. Estos sistemas pueden considerarse como medios universales de solubilización tanto de compuestos hidrofóbicos como hidrofílicos y se caracterizan por contener tensoactivos que actúan como agentes emulsificantes en las emulsiones o como formadores de las micelas en los medios micelares directos. Los tensoactivos son sustancias orgánicas de cadena esencialmente lineal cuyas moléculas presentan una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. La parte hidrofílica o polar puede llevar una carga positiva o negativa, dando lugar a los llamados tensoactivos catiónicos o aniónicos respectivamente, o bien puede estar formada por cadenas de polioxietileno, dando lugar a los denominados tensoactivos no iónicos. Existen también los tensoactivos anfólicos, los cuales se comportan como catiónicos, aniónicos o no iónicos dependiendo del pH de la disolución. La

parte no polar o hidrofóbica de la molécula está normalmente compuesta por una cadena alifática hidrocarbonada flexible, si bien hay un gran número de tensoactivos con grupos hidrofóbicos aromáticos. Esta naturaleza dual, parte polar-parte no polar, es la responsable de la formación de las micelas y emulsiones (Attwood y Florence, 1983).

Se obtienen **disoluciones micelares**, micelas o sistemas micelares, de apariencia translúcida o transparente, cuando la concentración del tensoactivo es superior a un cierto valor denominado concentración micelar crítica, CMC (Lissant, 1979 ; Robb, 1982). En estas disoluciones, las moléculas de tensoactivo forman agregados moleculares de dimensiones coloidales, denominados micelas, cuyos diámetros varían de 50 a 150 Å, en equilibrio con sus respectivos monómeros. Desde un punto de vista analítico, la utilización del medio micelar conlleva como factores importantes la ya comentada solubilización de sustancias insolubles en el disolvente utilizado y la alteración de las propiedades microscópicas de la disolución (Esquema 4a).

La propiedad más versátil de los agentes tensoactivos es probablemente la emulsificación, es decir, la formación de emulsiones a partir de dos fases líquidas inmiscibles. Así pues, una **emulsión** es una suspensión “significativamente estable” de partículas de un cierto tamaño de un líquido dispersas dentro un segundo líquido inmiscible. Pueden considerarse dos tipos de emulsión según el tamaño de las partículas dispersas : macroemulsiones y microemulsiones. En las macroemulsiones el diámetro de las “gotas” dispersas se encuentra comprendido entre 10^6 y 2×10^3 Å, mientras que en las microemulsiones se sitúa entre 2×10^3 y 10^3 Å. La apariencia de una emulsión a simple vista viene determinada por el tamaño de las partículas dispersas. Si el diámetro de éstas es de 1 µm, la emulsión tiene una apariencia lechosa, entre 1 y 0.1 µm es blanca-azulada, y entre 0.1 y 0.05 µm aparece de un gris semitransparente. Por consiguiente, las macroemulsiones son opacas y las microemulsiones son transparentes o semitransparentes (Attwood y Florence, 1983). Por otra parte, dependiendo de la naturaleza de la fase dispersa se distinguen dos tipos de emulsiones : aceite-agua (O/W) (Esquema 4b) y agua-aceite (W/O) (Esquema 4c). El tipo O/W es una dispersión de un líquido inmiscible en agua en una fase acuosa, el aceite (disolvente orgánico) es en este caso la fase dispersa y la fase acuosa es la fase continua. En general, las emulsiones O/W se forman mediante agentes emulsificantes que son más solubles en fase “agua” que en fase “aceite”, mientras que las emulsiones W/O se forman por agentes emulsificantes más solubles en la fase “aceite” (Rosen, 1978). Dos líquidos puros inmiscibles no pueden formar por si solos una emulsión, sino que para que una suspensión de un líquido en otro sea estable debe estar presente un tercer componente, llamado agente emulsificante, cuya misión es precisamente la de estabilizar el sistema, en principio, termodinámicamente inestable. Los tensoactivos, debido a las características particulares de su molécula, se han

venido utilizando en este sentido como agentes emulsificantes, que actúan adsorbiéndose en la interfase líquido-líquido, formando una película interfacial orientada.



Esquema 4. Estructura de una micela directa (a), de una emulsión aceite-agua (b) y de una emulsión agua-aceite (c)

En los medios de micelas directas y de las emulsiones aceite/agua, al ser predominantemente acuosos, se pueden hacer las mismas consideraciones cinéticas que en los medios acuosos. Por lo que respecta a compuestos escasamente solubles en agua, se deberá tener en cuenta la constante de reparto entre la micela y la fase acuosa, o entre la fase orgánica y la fase acuosa en el caso de las emulsiones. Si esta constante de reparto es significativamente menor que la constante de velocidad de la reacción enzimática, no habrá variaciones en la cinética de la reacción catalizada por la enzima, pero si la constante de reparto es similar o mayor, sí influirá sobre la velocidad de la reacción enzimática, ralentizándola. Aunque estos medios organizados predominantemente acuosos han sido bastante utilizados en electroanálisis (Pingarrón Carrazón et al., 1990 ; Reviejo et al., 1992 ; Pedrero et al., 1995 ; Gálvez et al., 2000), su empleo en el desarrollo de métodos electroquímicos que impliquen reacciones enzimáticas son escasos. Wang et al. (Wang y Reviejo, 1993) desarrollaron un método para la determinación de peróxidos orgánicos, escasamente solubles en agua, en microemulsiones de acetato de etilo/agua, utilizando los tensoactivos CTAB o Triton X-100 como agentes emulsificantes ; en estos medios se obtuvieron mejores sensibilidades que en disoluciones acuosas.

Por otro lado, el estudio y aprovechamiento de las reacciones enzimáticas en las emulsiones agua/aceite es bastante reciente pero muy intenso. De hecho, la catálisis por enzimas atrapadas en micelas inversas hidratadas, esto es la enzimología micelar, se ha convertido en una nueva tendencia de la biología molecular, debido a su utilidad para la comprensión del funcionamiento de las enzimas en sistemas lípidos naturales (Martinek, et al., 1989). No hay que olvidar que en las células vivas las enzimas actúan principalmente en, o cerca de, la interfase "agua/medio orgánico" (es decir, en la superficie de las membranas biológicas o dentro de ellas, o en complejos móviles con componentes macromoleculares de la célula, tales como proteínas o polisacáridos). Existen tres consideraciones importantes en

cuanto a las reacciones enzimáticas en micelas inversas : a) la reacción enzimática siempre tiene lugar en el medio acuoso ; b) las propiedades catalíticas de la enzima permanecen inalteradas y c) el reparto del sustrato entre la fase acuosa y la fase orgánica puede ser descrito por una constante de partición.

Las ventajas más importantes que pueden esperarse de la utilización de micelas inversas como medios de trabajo para las reacciones enzimáticas son tres. La primera es que en este tipo de sistemas es posible la solubilización tanto de sustancias hidrofóbicas como hidrofílicas, por lo que es posible variar la naturaleza molecular de los sustratos objeto de investigación. Con otras palabras, la enzima puede interaccionar tanto con sustancias solubles en agua como con sustancias escasamente solubles en medio acuoso, teniendo de este modo un medio universal para llevar a cabo las reacciones enzimáticas. La segunda ventaja es 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 orgánica, puede esperarse una relativa facilidad para la inmovilización de la enzima en la superficie del electrodo si se trabaja en sistemas micelares inversos en los que las enzimas sean casi insolubles.

Las posibilidades de los electrodos enzimáticos amperométricos en medio de micelas inversas han sido puestas de manifiesto con la determinación de varios compuestos fenólicos incluidos en la relación de contaminantes prioritarios de la E.P.A. La reacción enzimática empleada en este trabajo implica la oxidación de los compuestos fenólicos por el oxígeno catalizada por la tirosinasa, empleando un electrodo de grafito en la que la enzima se inmovilizó por adsorción sobre su superficie (Liu et al., 1994). Así mismo, nuestro grupo de investigación (Reviejo et al., 1994), realizó un estudio sistemático acerca de las variables propias de las micelas inversas sobre el comportamiento de un biosensor amperométrico de peroxidasa. Se utilizaron sistemas micelares inversos formados con hexano, cloroformo y acetato de etilo como disolventes orgánicos, concluyéndose que, contrariamente a las recomendaciones encontradas en la bibliografía para las reacciones enzimáticas en fase orgánica, el disolvente más apropiado con fines analíticos era el acetato de etilo (a pesar de tener el valor más bajo de log P de los tres disolventes ensayados). La baja conductividad de las micelas inversas formadas con n-hexano daba lugar a la obtención de señales amperométricas muy pequeñas, que hacen a estos sistemas inadecuados para el desarrollo de biosensores amperométricos. En este trabajo se demostró asimismo, que las características del tensoactivo utilizado como agente emulsificante afectan a la operación del biosensor, y que, para todos los sistemas micelares inversos, la hidratación óptima de la enzima es un aspecto esencial del funcionamiento de los biosensores amperométricos en estos medios.

II.5. BIOSENSORES EN EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Al comienzo de este capítulo de introducción, ya se han comentado una serie de características de los biosensores que los hacen especialmente atractivos para su empleo dentro de la industria alimentaria. Como ya se ha puesto de manifiesto, los alimentos requieren en la actualidad un control muy amplio de sus constituyentes mayoritarios y minoritarios, como pueden ser edulcorantes y aromatizantes artificiales, agentes antimicrobianos y alergénicos, glucosa en azúcares y siropes, alcoholes en vino, peróxido de hidrógeno y sulfitos como conservantes, antibióticos en leche, colesterol, glutamato y vitaminas por poner algunos ejemplos. En la bibliografía se encuentran biosensores que abarcan prácticamente cualquier tipo de análisis que requiere un alimento para que pueda garantizarse su calidad. En la Tabla V se recogen biosensores alternativos a métodos convencionales de análisis genéricos que se suelen realizar en alimentos (Wagner y Guilbault, 1994). Las referencias corresponden a trabajos pioneros en las aplicaciones de biosensores a este tipo de determinaciones.

Como se puede apreciar en la Tabla, las posibilidades que ofrecen las enzimas en este tipo de análisis son múltiples, pero también hay que tener en cuenta que es en realidad el elemento transductor del biosensor el que va a hacer posible la aplicabilidad del sensor. En la Tabla VI se recogen algunas aplicaciones de biosensores basados en diferentes tipos de transducción, así como las ventajas y desventajas que presentan cada uno de ellos (Luong et al., 1997).

Tabla V. Biosensores alternativos a métodos convencionales en el análisis de alimentos

Análisis	Método convencional	Biosensor
Porcentaje de agua	Pérdida de peso tras secado en estufa a vacío a 70 °C	- Aumento de la actividad enzimática con el aumento del porcentaje de agua (Campanella et al., 2001).
Proteínas	Métodos Kjeldahl, Biuret o Bradford	- Hidrólisis a L-aminoácidos y posterior determinación con un biosensor de L-aminoácido oxidasa (Guilbault et al., 1974). - Determinación de NH_4^+ con un biosensor de NH_3 (Guilbault et al., 1969) o de glutamato deshidrogenasa (Kirsten et al. 1963).
Lípidos	Extracción con disolvente orgánico de la muestra seca bajo reflujo y determinación por pesada tras la eliminación del disolvente orgánico o pérdida	Hidrólisis de los lípidos con lipasa y posterior determinación con : - ácidos grasos peroxidasa (Martin y Stumpf, 1959),

	de peso de la muestra seca.	<ul style="list-style-type: none"> - butirilo-CoA sintetasa (Mahler et al., 1953), - acilo-CoA sintetasa (Kornberg y Pricer, 1953)
Hidratos de carbono (azúcares)	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de una disolución alcalina de cobre y posterior determinación del óxido cuproso. - Determinación de la actividad óptica. 	Hidrólisis a monosacáridos con carbohidrasas adecuadas y posterior determinación de glucosa con biosensores de glucosa oxidasa.
Vitaminas	Derivatizaciones para determinación espectrofotométrica o fluorimétrica.	Muchos complejos vitamínicos-B son cofactores para algunas enzimas, sin los cuales son inactivas. Se puede relacionar la actividad de la enzima con la concentración de cofactor. (Whitaker, 1985 ; Warburg y Christian, 1938 ; Schreiber et al., 1964)
Ácidos grasos	Extracción de la fracción lipídica con éter, éter de petróleo o éter de petróleo/ cloroformo. Se hidrolizan los triglicéridos con lipasas, ácido o álcali y se separan y cuantifican con GLC ó HPLC	Existen enzimas específicas para diferentes ácidos grasos : <ul style="list-style-type: none"> - Linoleato isomerasa para determinar ácido linoleico (Kepler y Tove, 1967), - Araquidonato ciclooxygenasa para el ácido araquidónico (Kinsella, 1987), etc.
Aminoácidos esenciales	Hidrólisis de proteínas por HCl o ácido metilsulfónico o hidróxido bórico y posterior determinación por cromatografía de intercambio iónico.	<ul style="list-style-type: none"> - Biosensor de metionina descarboxilasa (Hagino y Nakayama, 1968), - Biosensor de lisil-tRNA sintetasa (Stern y Mehler, 1965)
Residuos de pesticidas	Extracción del alimento, concentración y determinación por GLC-masas	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por varios pesticidas (Guilbault et al, 1962 ; Michel, 1949, Giang y Hall, 1951). - Ensayo ELISA
Contaminación y destrucción microbiana	24-72 horas de incubación, preparación de gran cantidad de medios de cultivo e identificación de organismos específicos con microscopio	Biosensores basados en la hibridación de DNA (Jones, 1991 ; Ramsey et al. 1986 ; Wu, et al, 1990 ; Mirhabibollahi et al., 1991 ; Tuley, 1991).

GLC : Cromatografía gas-líquido.

HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución

ELISA (enzyme-linked specific antibody) : unión específica enzima-anticuerpo.

Tabla VI. Ventajas y desventajas de diferentes tipos de biosensores utilizados en el análisis de alimentos

Transductor	Aplicaciones	Ventajas/desventajas (+/-)
Electrodo selectivo de iones (ESI)	ESI basados en <u>medidas de pH</u> : Glutamato, urea, nitritos, aminoácidos, penicilina, DNA, RNA y glucosa. ESI basados en <u>medidas de yoduro</u> : glucosa, aminoácidos, colesterol y alcoholes. ESI basados en <u>medidas de cianuro</u> : Amigdalina	(+) Sencillo, exacto (-) Respuestas lentas, necesidad de un electrodo de referencia estable, susceptible de ruido electrónico
Electrodo O ₂	Principalmente desarrollados para glucosa, sulfito, glutamato, etanol, oxalato, L-aminoácidos, tirosina, monoamina, sucrosa, lactato, colesterol, aspartamo, nucleótidos, galactosa, ácido acético, lisina, demanda	(+) Sencillo, muy selectivo. (-) Poca sensibilidad

	bioquímica de oxígeno, etc.	
Electrodo H ₂ O ₂	Sulfito, glucosa, colesterol, glutamato, nucleótidos, putrescina, cadaverina, histamina, L-aminoácidos, aspartamo, lactato, glutamina, alcoholes, etc.	(+) Sencillo, muy selectivo. (-) Poca sensibilidad
Sistemas ópticos	Acetaldehído, alanina, malato, lactato, nitrato, glucosa, glicerol, etanol, xilitol, isocitrato, glutamato, sorbitol, galactosa.	(+) Detección remota, libre de interferencias eléctricas. (-) Requiere fuentes de alta energía, solo se puede aplicar a un pequeño intervalo de concentración, la luz ambiental interfiere.
Piezoeléctrico	Glucosa, atrazina, propazina, simazina, salmonella, escherichia choli, candida y otros microorganismos y toxinas microbianas.	(+) Respuesta rápida, sencillo, bajo coste del equipo detector, no necesita un tratamiento de muestra especial. (-) Baja sensibilidad en aplicaciones en disolución e interferencias debidas a uniones no específicas.
Calorimétrico	Multitud de compuestos como ácido ascórbico, glucosa, lactato, triglicéridos, colesterol, galactosa, etanol, sucrosa, penicilina G, oxalato, lípidos, xantina e hipoxantina.	(+) versatilidad, libre de interferencias ópticas como color y turbidez. (-) caro, requiere una gran cantidad de enzima.
ISFET (ion-sensitive-field-effect transistor)	Glucosa, lactato, urea y varios iones.	(+) bajo coste, requiere una cantidad pequeña de material biológico, monitoriza varios analitos simultáneamente. (-) Sensible a la temperatura, la fabricación no ha sido perfeccionada.

Los biosensores amperométricos (como el de O₂ o el de peróxido de hidrógeno) y los potenciométricos (pH y dióxido de carbono) son los que poseen un campo de aplicaciones más amplio y, dentro de ellos, los que combinan oxidorreductasas y electrodos amperométricos son los que proporcionan mejores resultados, ya que la reacción de la enzima con el sustrato puede medirse de forma sencilla, sensible y selectiva. La principal ventaja de la detección de peróxido de hidrógeno frente a la de oxígeno es que posee mayor sensibilidad, si bien hay que decir que el electrodo de oxígeno es la única opción posible cuando se emplean como componentes biológicos células, plantas o tejidos animales.

En la actualidad, son todavía muy pocos los biosensores que se emplean realmente en la industria alimentaria y éstos son aplicados “off-line”, aunque en principio pueden combinarse con sistemas de análisis en flujo para poder monitorizar en línea. Estos sensores comercializados están basados tanto en electrodos de oxígeno como de peróxido de hidrógeno combinados con una oxidasa inmovilizada. Están disponibles en diferentes formas: como autoanalizadores, instrumentos para laboratorio y aparatos portátiles. Los sustratos más analizados en la industria con biosensores comerciales son glucosa, lactato y etanol (Luong et al, 1997).

Aunque el uso de biosensores todavía no esté muy extendido dentro de la industria alimentaria, se puede llegar a crear un amplio mercado, sobre todo si se consigue desarrollar

métodos para la detección rápida de microorganismos y de toxinas. Por otro lado, ya que los biosensores deben competir en este campo principalmente con técnicas cromatográficas, deben ser diseñados para poder determinar varios analitos a la vez, empleando un analizador sencillo y sin necesidad de cambiar ningún componente del biosensor. Además, deben construirse de tal manera que permitan combinarlos con otros sistemas analíticos y poder realizar así análisis múltiples.

II.6. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, J.E. and Tallman, D.E. (1976). *Analytical Chemistry*, 48, 209.

Andrea, P., Miroslav, S., Silvia, S., Stanislav, M. (2001). *Sensors and Actuators B Chemical*. 76 (1-3) : 286-294.

Armalis, S., Kriksciuniene, I., Kubiliene, E., Djane, NK., Ndungu, K., Mathiasson, L. (1999). "Stripping analysis of trace metals at a flow-through reticulated vitreous carbon electrode after the preconcentration by supported liquid membrane technique". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 74 (1-4) 233-242.

- Armalis, S., Kubiliene, E. (2001) "Mercury film deposition ad anodic stripping using the reticulated vitreous carbon flow-through electrodes for analysis of trace metals". *Chemia Analityczna*. 46(5) :715-723.
- Armentrout D.N., McLean, J.D., Long, M.W. (1979) *Analytical Chemistry*, 51, 1039.
- Attwood, D., Florence A.T. (1983). "Surfactant Systems. Their Chemistry, Pharmacy and Biology". Chapman & Hall. London .
- Bachmann, T.T., Bilitewski, U., Schmid, R.D. (1998). "A microbial sensor based on *Pseudomonas putida* for phenol, benzoic acid and their monochlorinated derivatives which can be used in water ad n-hexane". *Analytical Letters*, 31(14) 2361-2373.
- Berrettoni, M., Zamponi, S., Marassi, R., Czerwinski, A. (1986). "Staircase voltammetric stripping analysis from mercury plated reticulated vitreous carbon (RVC) electrodes". *Annali di Chimica*, 76, 171-178
- Blaedel, W.J., Wang, J. (1979). "Anodic Stripping voltammetry at a reticulated mercury vitreous carbon electrode". *Analytical Chemistry*, vol. 51, No. 11.
- Bergmann, W., Rudolph R., Spohn, U. (1999). "A bienzyme modified carbon paste electrode for amperometric detection of pyruvate". *Analytica Chimica Acta*. 394(2-3) :233-241.
- Budnikiv, G.K., Evtuyugin G.A., Rizaeva E.P., Ivanov A.N., Latypova, V.Z. (1994). "Comparative assessment of electrochemical biosensors for determining inhibitors. Environmental pollutants". *Journal of Analytical Chemistry*. 54(9) : 864 -871.
- Byfield, M.P., Abuknestra, R.A. (1994). "Biochemical aspects of biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 373-399.
- Campanella, L., De Santis, G., Favero G., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (2001). "Two OPEEs (organic phase enzyme electrodes) used to check the percentage water content in hydrophobic foods and drugs". *Analyst*, 126 (11) :1923-1928.
- Carreno G., Sosa. E., González, I., Ponce de Leon, Batina, N., Oropeza M.T. (1999). "Anion influence in lead removal from aqueous solution by deposition onto a vitreous carbon electrode" *Electrochimica Acta*, 1999, 44 (15) 2633-2643).
- Caruso, C., Vieira, C.S., Fatibello, E.D., Filho O. (1999). "Determination of epinephrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of cara root (*Dioscorea bulbifera*). *Analytical Letters*. 32(1) : 39-50.
- Céspedes, F., Martínez-Fábregas, E., Alegret, S. (1996). "New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites". *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 15, 7.
- Chatterjee, S., Russell, A. (1992). "Determination of equilibrium and individual rate constants for subtilisin-catalyzed transesterification in anhydrous environments". *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1069-1077.
- Czerwinski, A., Dmochowska, M., Grden, M., Kopczyk, M., Wojcik, G., Mlynarek, G., Kolata J. (1999). "Electrochemical behavior of nickel deposited on reticulated vitreous carbon" *Journal of power sources*. 77 (1) 28-33.
- Dado, P., Cyr, A., Lessard, J., Brossard, L., Menard, H. (1999). "Electrocatalytic hydrogenation of 4-phenozyphenol on active powders highly dispersed in a reticulated vitreous carbon". *Canadian Journal of Chemistry. Revue canadienne de chimie*. 77 (7) 1225-1229.

- Dekker, M. "Epoxy Resins, Chemistry and Technology". C.A. May (Editor), New York, 2^a Ed.
- Diego, E., Agüi, L., González Cortés, A., Yañez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., Kauffmann, J.M. (1998). "Critical comparison of paraffin carbon paste and graphite-poly(tetrafluoroethylene) composite electrodes concerning the electroanalytical behavior of various antioxidants of different hydrophobicity". *Electroanalysis*, 10(1) :33-38.
- Eggin-BR, Hickey, C., Toft, S.A., Zhou DM. (1997). "Determination of flavanols in beers with tissue biosensors". *Analytica Chimica Acta*, 347(3) : 281-288.
- Fenn, R.J., Siglla, S., Curran, D.J. (1978). *Analytical Chemistry*, 50, 1067.
- Fernández, J.J., López J.R., Correig X., Katakis I. (1998). "Reagentless carbon paste phosphate biosensors :preliminary studies". *Sensors and Actuators B Chemical*. 47 (1-3) : 13-20.
- Fernández, C., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (1995a). "Development of graphite-poly(tetrafluoroethylene) composite electrodes. Voltammetric determination of the herbicides thiram and disulfiram". *Analytica Chimica Acta*, 305, 192-199.
- Fernández, C., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (1995b). "Graphite-poly(tetrafluoroethylene) electrodes as electrochemical detectors in flowing systems". *Analytica Chimica Acta* 314 (1995) 13-22.
- Fernández, C., Reviejo, A.J., Polo L.M., Pingarrón, J.M. (1996). "HPLC-Electrochemical detection with graphite-poly(tetrafluoroethylene) electrode. Determination of the fungicides thiram and disulfiram". *Talanta* ; 43, 1341-1348.
- Fisk, J.D., Boyle, J.D. (2000). "Electrolytic toxic metal removal from effluents using reticulated vitreous carbon". *Transactions of the institute of metal finishing*. 78 Part 3 : 113-119.
- Galan Vidal, C., Muñoz J., Dominguez C., Alegret S. (1998). "Glucose biosensor strip in a three electrode configuration based on composite and biocomposite materials applied by planar thick film technology". *Sensors and Actuators B Chemical* ; 52(3) :257-263.
- Gálvez, R., Pedrero, M., Buyo, F., Manuel De Villena, F.J., Pingarrón, J.M., (2000). " Oil-in-water emulsions as suitable working media for the direct polarographic determination of azpyrotryne and desmetryne from its organic extracts in water samples". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 367, 454-460.
- Ge, H., Wallace, G.G. (1989). "Characterization of conducting polymer stationary phases and electrochemically controlled high-performance liquid chromatography". *Analytical Chemistry*, 61, 2391-2394.
- Ge, H., Wallace, G.G. (1990). "Electrochemically controlled liquid chromatography on conducting polymer stationary phases". *Journal of Liquid Chromatography* 13 (16), 3245-3260.
- Giang, P.A., Hall, S.A. (1951). Enzymatic determination of organic phosphorus insecticides, *Anal. Chem.*, 23 :1830.
- Gorton, L., (1995). "Carbon paste electrodes modified with enzyme tissues, and cells". *Electroanalysis*, 7, No.1. 23-45.

- Gorton, L., Jönsson-Pettersson, G., Csöregi E., Johansson K., Dominguez E., Marko-Varga, G. (1992) *Analyst*, 117, 1235.
- Guilbault, G.G., Kramer, D.N., Cannon, P.L., Jr. (1962). "Electrochemical determination of organophosphorus compounds", *Anal. Chem.*, 34 :1437.
- Guilbault, G.G., Lubrano, G.J. (1974) "Amperometric enzyme electrodes. Part II. Amino acid oxidase, *Anal. Chim. Acta*, 69 :183.
- Guilbault, G.G., Smith, R.K., Montalvo, J.G., Jr. (1969). "Use of ion selective electrodes in enzymatic analysis. Cation electrodes for deaminase enzyme systems". *Anal. Chem.*, 41 :600.
- Guo, Y.Z., Dong S.J. (1997). "Organic phase enzyme electrodes based on organohydrogel". *Analytical Chemistry*, 69 (10) :1904-1908.
- Hagino, H., Nakayama, K. (1968). "Amino acid metabolism in microorganisms. Part IV. L-Methionine decarboxylase produced by a *Streptomyces* strain", *Agric. Biol. Chem.*, 32 :727.
- Hale, P.D., Boguslavsky, L.I., Inagaki, T., Lee, H.S., Skotheim T.A., Karan, H.I., Okamoto, Y. (1990). *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 190, 251.
- Hall, G.F. Best, D.J., Turner A.P.F. (1988a). "Amperometric enzyme electrode for the determination of phenols in chloroform". *Enzyme Microb. Technol.* 10, 543.
- Hall, G.F. Best, D.J., Turner AP.F. (1988b). "The determination of p-cresol in chloroform with an enzyme electrode used in organic phase". *Anal. Chim. Acta.* 212, 113-119.
- Heineman, W.R., Kissinger, P.T. (1980). *Analytical Chemistry*, 52, 138R/151R.
- Hjelm, A.K., Lindbergh, G., Lundqvist, A. (2001) *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 509 (2), 139-147.
- Huang, T., Warsinke, A., Koroljova Skovobogat-ko O.V., Makower A., Kuwana T., Scheller, F.W. (1999). "A bienzyme carbon paste electrode for the sensitive detection of NADPH and the measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase". *Electroanalysis*, 11(5) :295-300.
- Iwuoha, E.I., Leister, I., Miland, E., Smyth, M.R., O'Fagain C. (1997). "Reactivities of organic-phase biosensors. 1. Enhancement of the sensitivity and stability of amperometric peroxidase biosensors using chemically modified enzymes". *Analytical Chemistry*, 69 (8) : 1674-1681.
- Jones, J.L. (1991). "DNA probes :applications in the food industry", *Trends Food Sci. Technol.*, 2(2) :28.
- Kalcher, K., Kauffmann J.M., Wang J., Svancara, I., Vytras, K., Neuhold, C., Yang, Z. (1995). "Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis : a review with particular emphasis on the period 1990-1993. *Electroanalysis*, 7, 5-22.
- Kepler, C.R. Tove, S.B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -cis, Δ^{11} -trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*, *J. Biol. Chem.*, 242 :5686.
- Khoroshilov, A.A., Koroleva I.P., Volodin Y.Y. (2000a) *Russian Journal of Applied Chemistry*, 73 (11) :1918-1921.

- Khoroshilov, A.A., Koroleva I.P., Volodin Y.Y. (2000b) *Russian Journal of Applied Chemistry*, 73 (11) :1922-1925.
- Kirsten, E., Gerez, C., Kirsten, R. (1963) "Eine enzymatische Mikrobestimmung des Ammoniaks, geeignet für extrakte tierischer Gewebe und Flüssigkeiten. Bestimmung des NH_4^+ - Gehaltes im Blut", *Biochem. Z.*, 337 :312.
- Klatt L.N., Connell D.R., Adams R.E., Honigberg I.L., Price J.C. (1975), *Anal. Chem*, 47, 2470.
- Kinsella, J.E. (1987). "Seafoods and Fish Oils in Human Health and Disease", Marcel Dekker, New York.
- Kornberg, A., Pricer, W.E., Jr. (1953). "Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids". *J. Biol. Chem.*, 204 :329.
- Kutner, W. (1996). "Novel approach to the solid-state electrochemistry of fullerenes : cyclic voltammetry at a C-60(-)-modified graphite-PTFE composite electrode". *Electroanalysis*, 8(11), 1077-1078.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). "Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents". *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81-87.
- Lanza, MRV., Bertazzoli, R. (1999). "Removal of Zn (II) from chloride medium using a porous electrode : current penetration within the cathode". *Journal of applied Electrochemistry*. 30(1) 61-70.
- Liden, H., Buttler T., Jeppsson, H., Marko-Varga, G., Volc J., Gorton L. (1998). "On-line monitoring of monosaccharides and ethanol during a fermentation by microdialysis sampling, liquid chromatography and two amperometric biosensors". *Chromatographia*. 47(9-10) : 501-508.
- Lissant, K.J. (1979). " Emulsions and Emulsion Technology". Marcel Dekker, Nueva York.
- Liu, F., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., Wang, J. (1994). *Talanta*, 41, 455.
- Luong, J.H.T., Bouvrette, Male K.B. (1997). "Developments and applications of biosensors in food analysis". *Trends in Biotechnology*, (Vol. 15) .
- Mahler, H.R., Wakil, S.J., Bock, R.M. (1953). "Studies on fatty acid oxidation, I. Enzymatic activation of fatty acids", *J. Biol. Chem.*, 204 :453.
- Mannino, S., Cosio, M.S., Wang, J. (1994). *Analyst*, 119, 2001.
- Mareike Lutz E.S., Dominguez, E. (1996). "Development and Optimization of a Solid Composite Tyrosinase Biosensor for Phenol Detection in Flow Injection Systems", *Electroanalysis*. 8, No.3, 117-123.
- Martin, R.O., Stumpf K. (1959). "Fat metabolism in higher plants. XII. α -Oxidation of long chain fatty acids." *J. Biol. Chem.*, 234 :2548.
- Martinek, K., Klyachko, N.L. Kabanov, A.V. Khmel'nitsk, Y.L., Levastov, A.V., (1989). *Biochim. et Biophys. Acta*, 981, 161.
- Martorell, D., Cespedes F., Martinez-Fabregas, E., Alegret, S. (1997). "Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on a polishable,

- 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane modified graphite-epoxi biocomposite". *Analytica Chimica Acta.* 337 (3) : 305-313.
- Matesic-Puac, R., Stojanovic, M., Sak-Bosnar, M., Hasenay, D., Seruga, D., (2000). "Cationic-surfactant response of ion-selective, N,N,N'-tetracyclohexyl-3-oxapentanediamide-based PVC membrane electrode". *Tenside surfactants detergents.* 37(4) 222-228.
- Matuszewski, W., Trojanowicz, M. (1988) *Analyst*, 113, 735.
- Michel H.O. (1949). "An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity", *J. Lab. Clin. Med.*, 34 :1564.
- Mirhabibollahi, B., Brooks, J.L. Kroll, R.G. (1991). "Electrical detection of food-borne microorganisms", *Trends Food Sci. Technol.*, 2(3) :62.
- Morales, A., Cespedes F., Martinez-Fábregas E., Alegret S. (1998). "Ethanol amperometric biosensor based on an alcohol oxidase graphite-polymer biocomposite". *Electrochimica Acta.* 43 (23) :3575-3579.
- Nielsen S.S.. (1998). "Food Analysis" Second Edition. Chapman & Hall Food Science Title. Aspen Publishers, Inc.
- Norvell, V.E., Mamantov, G. (1977). "Optically Transparent vitreous carbon electrode" *Analytical Chemistry*, Vol 49, No.9. 1470-1472.
- O'Dea, J., Wojciechowski, M., Osteryoung, J., Aoki, K., (1985). "Square wave voltammetry at electrodes having a small dimension". *Analytical Chemistry*, Vol. 57, No 4. 954-955.
- Pandey, P.C., Kayastha, A.M., Pandey V. (1992). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 33, 139.
- Paredes, P.A., Parellada, J., Fernández, V.M., Katakis I., Dominguez E. (1997) "Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for the determination of fructose in food analysis". *Biosensors and Bioelectronics.* 12(2) :1233-1243.
- Park, J. and Shaw B.R. (1994) *J. Electrochem. Soc.*, 141, 323.
- Pasco N., Jeffries, C., Davies Q., Downard A.J., Roddick-Lanzilotta A.D., Gorton L. (1999). "Characterisation of a thermophilic L-glutamate dehydrogenase biosensor for amperometric determination of L-glutamate by flow injection analysis". *Biosensors and Bioelectronics.* 14 (2) :171-178.
- Pedrero, M., Alonso, M.R., Manuel de Villena, F.J., Pingarrón, J.M. (1995). "Adsorptive stripping voltammetry in disperse media. Application to the determination of the herbicide terbutryn". *Electroanalysis* 7(7), 644-648.
- Pedrero, M., Salas P., Galvez, R., De Villena, F.J.M., Pingarrón J.M. (2001). "Ruthenium and ruthenium dioxide-modified graphite-ethylene/propylene/diene and graphite-Teflon composite electrodes as amperometric flow detectors". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry.* 371(4) :507-513.
- Pingarrón Carrazón J.M., Reviejo García, A.J., Polo Díez, L.M. (1990). "Determination of Indole in shrimps by differential-pulse voltammetry in an emulsified medium". *Analyst*, Vol. 115, 869.
- Pingarrón, J.M. Sánchez Batanero, P. (1999). "Química electroanalítica, Fundamentos y aplicaciones". Ed. Síntesis.

- Piñeiro-Avila, G., Salvador, A. y De la Guardia, M., (1998) *Analyst*, Vol. 123, 999-103.
- Popescu, I.C., Csoregi, E. Gorton, L. (1996). "Peroxidase-modified carbon paste microelectrode as amperometric FI-detector for peroxides in partial aqueous media". *Electroanalysis*. 8(11) :1014-1019.
- Puig Lleixa, C., Jimenez, C., Bartroli, J., (2001). "Acrylated polyurethane-photopolymeric membrane for amperometric glucose biosensor construction". *Sensors and Actuators B Chemical*. 72(1) :56-62.
- Ramirez-García, S., Céspedes, F., Alegret, S. (2001). "Development of conducting composite materials for electrochemical sensing in organic media". *Electroanalysis*, 13. No 7. 529-535.
- Ramsey, G., Turner, A.P.F., Franklin, A., Higgins, I.J. (1986). "Rapid bioelectrochemical methods for the detection of living microorganisms", *Proc. Modelling Control Biotechnol. Process*, 1 :95.
- Reviejo, A.J., González, A., Pingarrón, J.M., Polo, L.M. (1992). "Determination of organochlorine pesticides in apple samples by differential-pulse polarography in emulsified medium". *Analytica Chimica Acta*, 264, 141-147.
- Reviejo, A.J. Liu, F., Pingarrón, J.M. , Wang, J. (1994). "Amperometric biosensors in reversed micelles". *J. Electroanal. Chem.* , 374, 133.
- Robb, I.D. (1982). "Microemulsions", Ed. Plenum, Nueva York.
- Rodriguez, F.J., Gutierrez, S., Ibañez, J.G., Bravo, J.L., Batina, N. (2000). "The efficiency of toxic chromate reduction by a conducting polymer(polypyrrole): Influence of electropolymerization conditions". *Environmental Science and Technology*. 34(10) 2018-2023.
- 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.
- Rom, I., Wachtler, M., Papst, I., Schmied, M., Besenhard, J.O., Hofer, F., Winter, M. (2001). *Solid State Ionics*, 143 (3-4), 329-336.
- Rosen, M.J. (1978). "Surfactants and Interfacial Phenomena"; John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Saini, S. Hall, G.F. Downs, M.E.A., Turner, A.P.F. (1991) "Organic phase electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 249, 1-15.
- Santandreu, M., Céspedes, F., Alegret, S., Fàbregas, E. (1997). *Analytical Chemistry*, 69, 2080.
- Shah, M.H., Honigberg, J.L, (1983). *Analytical Letters*, 16, 1149.
- Schreiber, G., Eckstein, M., Oeser, A., Holzer, H. (1964). Anreicherung einer Aspartataminotransferase aus Bierhefe, *Biochem. Z.*, 340 :13.
- Sleszynski, N., Osteryoung, J., Carter, M. (1984). "Arrays of very small voltammetric electrodes based on reticulated vitreous carbon". *Analytical Chemistry*, 56, 130-135.
- Snook, R.D. (1985). "ICP source utilization and sample presentation". *Anal. Proc.* 22(3) 69-71.

- Spohn, U., Narasaiah D., Gorton L. (1997). "Reagentless hydrogen peroxide and L-Lactate sensors based on carbon paste electrodes modified with different peroxidases and lactate oxidases". *Journal fur Praktische Chemie Chemiker Zeitung*. 339 (7) : 607-614.
- Stern, R., Mehler, A.H. (1965). Lysyl-sRNA (soluble RNA) synthetase from *Escherichia coli*, *Biochem. Z.*, 342 :400.
- Sorrels, J.W., Dewald, H.D. (1990). "Spectroelectrochemical characteristics of the reticulated vitreous carbon electrode" *Analytical Chemistry*. 62, 1640-1643.
- Szanto, D., Trinidad, P., Walsh, F. (1998). "Evaluation of carbon electrodes and electrosynthesis of coumestan and catecholamine derivatives in the FM01 electrolyser" *Journal of Applied electrochemistry*. 28(3) 251-258.
- Tallman, D.E. and Petersen, S.L. (1990). *Electroanalysis*, 2, 499.
- Tobalina, F., Pariente, F.; Hernández, L., Abruna, H.D., Lorenzo, E., (1999). "Integrated ethanol biosensor based on carbon paste electrodes modified with [Re(phen-dione)(CO)(3)Cl] and [Fe(phen-dione)(3)](PF6)(2)". *Analytica Chimica Acta*. 395 (1-2) :17-26.
- Torabi, F., Ramanathan, K., Larsson, PO, Gorton, L., Svanberg, K., Okamoto, Y., Danielsson B., Khayyami, M. (1999). "Coulometric determination of NAD(+) and NADH in normal and cancer cells using LDH, RVC and a polymer mediator". *Talanta*. 50(4) 787-797.
- Tuley, L. (1991). "Measuring quality in the 1990s", *Food Manuf.*, 66(9) :56.
- Vieira I.C., Fatibello, O. (2000). "Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase". *Talanta*. 52(4) :681-689.
- Wagner, G., Guilbault G.G. (1994). "Food Biosensor Analysis". Marcel Dekker, Inc. New York.
- Wang, J. (1991). "Flow Injection Analysis (FIA) Based on Enzymes or Antibodies (De. R.D. Schmidt), VCH, Germany, pp. 277-286.
- Wang, J., Dewald, H.D. (1984). "Electrochemical detector for liquid chromatography based on a reticulated vitreous carbon electrode in a thin-layer cell". *Journal of chromatography*, 285 281-287.
- Wang, J., Freiha, B.A., (1984). "Vitreous carbon-based composite electrode as an electrochemical detector for liquid chromatography". *Journal of chromatography*, 298, 79-84.
- Wang, J., Freiha, B., Naser, N., González-Romero, E., Wollenberger U., Ozsoz, M. (1991). "Amperometric biosensing of organic peroxides with peroxidase-modified electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 254, 81-88.
- Wang, J., González-Romero, E., Ozsoz, M. (1992). "Renewable Alcohol Biosensors based on Alcohol-dehydrogenase/Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide Graphite Epoxy Electrodes". *Electroanalysis*, 4, 539-544.
- Wang J., Kirgoz, U.A., Mo, J.W., Lu, J.M., Kawde, A.N., Muck A. (2001). *Electrochemistry Communications*, 3 (4) : 203-208.
- Wang, J., Lu, F., Kane, S.A., Choi Y.K., Smyth, M.R., Rogers K. (1997). "Hydrocarbon pasting liquids for improved tyrosinase-based carbon paste phenol biosensors". *Electroanalysis*. 9(14) :1102-1106.

- Wang, J., Ozsoz, M. (1990). "A Polishable Amperometric Biosensor for Bilirubin". *Electroanalysis*, 2, 647-650.
- Wang, J., Reviejo, A.J. (1993). "Enzymic Assays of organic peroxides in microemulsions systems". *Analyst*, vol. 118, 1149-1151.
- Warburg, O., Christian, W. (1938). Isolierung der prosthetischen Gruppe der D-Aminosäureoxidase, *Biochem. Z.*, 298 :150.
- Widner R.C., Sousa, M.F.B., Bertalozzi, R. (1998). "Electrolytic removal of lead using a flow-through cell with a reticulated vitreous carbon cathode". *Journal of Applied electrochemistry*. 28(2) 201-207.
- Whitaker, J.R. (1985). "Analytical uses of enzymes in Food Analysis: Principles and Techniques, Vol. 3, Biological Techniques (D.W. Gruenwedel and J.R. Whitaker, eds.), Marcel Dekker, New York, p. 297.
- Wu, T.-Z., Wang, H.-H., Au, L.-C. (1990). "Gene probe coated piezoelectric biosensors for biochemical analysis", *Chin. J. Microbiol. Immunol.*, 23 :147.
- Xien B., Khayyami, M., Nwosu, T., Larsson, PO, Danielsson B. (1993). "Ferrocene-mediated Thermal Biosensor". *Analyst*. Vol 118. 845-848.
- Xu, H.D., Luo, Y.J., Zou, M.Z. (1997). "Development and appliation of graphite-Teflon composite coating electrode". *Chemical Journal of Chinese Universities Chinese.*, 18(4) : 535-537.
- Yao, T., Kobayashi, Y., Sato, M. (1983). "Amperometric determination of phospholipids in blood serum with a lecithin-sensitive electrode in a flow injection system". *Analytica Chimica Acta*, 153, 337-340.
- Zhu, C., Curran, D.J. (1991). "Amperometric Operation of Porous Flow-Through electrodes at very low conversion efficiencies in flow stream detectors". *Electroanalysis* 3, 511-518.
- Zulfikar, D. Brynn Hibbert, P.W. Alexander. (1995), "A tubular graphite-epoxy electrode incorporating horseradish peroxidase as a potentiometric sensor for hydrogen peroxide". *Electroanalysis*, 7, No. 8. 722-725.

III. ELECTRODOS COMPÓSITOS DE PEROXIDASA

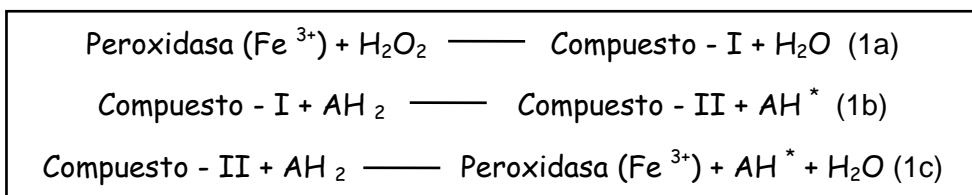
III.1. OBJETIVO

Diseño, desarrollo, optimización y evaluación de las características operacionales de matrices electródicas de grafito-Teflón-peroxidasa-mediador y RVC-resina epoxi-peroxidasa-mediador en medios acuosos y predominantemente no acuosos. Establecimiento de las diferentes variables cinéticas de la reacción enzimática en los medios estudiados y de las características analíticas para la determinación de peróxido de hidrógeno y de peróxido de 2-butanona.

III.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PEROXIDASAS

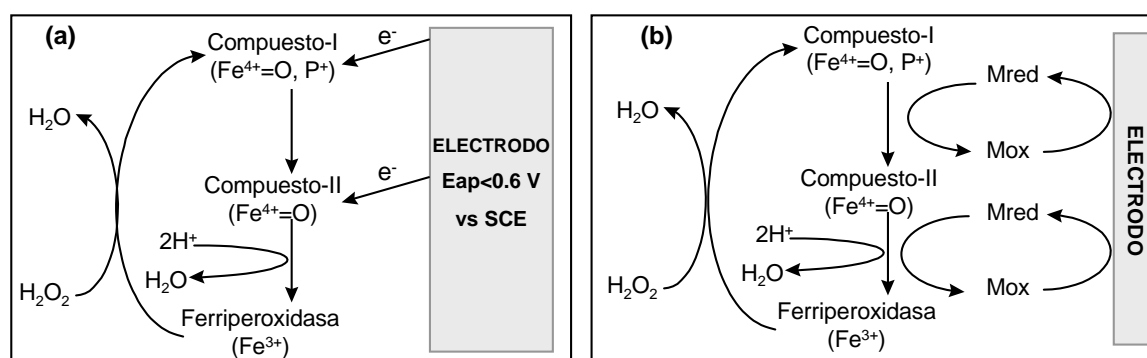
Las peroxidases o más correctamente las “hidroperoxidases” son un grupo de ferri-hemoproteínas cuyos sustratos son el peróxido de hidrógeno y los peróxidos alquílicos. Dentro de ellas, las enzimas más afines al H_2O_2 se llaman *catalasas*, mientras que las que lo son a los peróxidos alquílicos se denominan *peroxidases*, si bien todas ellas pueden utilizar ambos sustratos.

Existen altas concentraciones de catalasas en pequeños orgánulos subcelulares llamados peroxisomas en células del hígado y de los riñones. Se encuentran en animales, plantas y microorganismos aerobios, donde su función fisiológica es eliminar el H_2O_2 tóxico generado por la acción de varias flavoproteínas oxidasas del organismo. Las peroxidases son más comunes en plantas, donde su función es la biosíntesis poliaromática. Dado que todas las peroxidases y catalasas tienen un ciclo catalítico común (Everse et al., 1991), en lo que sigue se hablará en general de peroxidases, enzimas de la clase EC 1.11. definidas como oxidorreductasas. La peroxidasa procedente del rábano silvestre (HRP) ha sido probablemente la estudiada en mayor profundidad, y se utiliza con frecuencia como ejemplo del ciclo de reacciones que tienen lugar con las peroxidases :



La primera reacción (1a) engloba una oxidación de dos electrones del grupo ferrihemo prostético de la peroxidasa nativa por el H_2O_2 (o hidroperóxidos orgánicos). Esta reacción da lugar a un producto intermedio, compuesto I (estado de oxidación +5), que consiste en un ión oxiferrilo ($Fe^{4+}=O$) y un radical catiónico porfirínico π . En la siguiente reacción (1b), el compuesto I es reducido por un dador de electrones AH_2 originando el compuesto II (estado de oxidación +4), el cual en la tercera etapa (1c) capta electrones de AH_2 , con lo que la enzima vuelve a su estado inicial de ferriperoxidasa. Dadores electrónicos como las aminas aromáticas

o compuestos fenólicos dan lugar a radicales libres, AH^{\cdot} (reacciones (1b) y (1c) (Dunford y Adeniran, 1986), mientras que sustratos como ferrocianuro o yoduro son oxidados sin producción de radicales (Ugarova y Lebedeva, 1978). Cuando la enzima se inmoviliza en la superficie de un electrodo, la regeneración a su forma nativa puede realizarse por dos vías. La primera de ellas (Esquema 5a) es la reducción del compuesto I a compuesto II y de éste a la enzima en forma nativa intercambiando con el material electródico $1 e^-$ en cada etapa. La segunda vía (Esquema 5b), requiere el empleo de mediadores, entre los que se incluyen los compuestos donadores de electrones citados anteriormente. Estos mediadores son normalmente moléculas pequeñas con procesos redox con velocidades de transferencia de electrones heterogéneas altas, y su utilización en el desarrollo de biosensores se debe a que la transferencia de electrones heterogénea de la enzima suele ser muy lenta (Barlett et al. 1991). De este modo los mediadores transfieren los electrones desde la superficie del electrodo a los compuestos I y II. (Ruzgas et al., 1996). El mediador elegido tiene que reaccionar rápidamente con la peroxidasa oxidada.



Esquema 5. Mecanismo de la reducción bioelectrocatalítica directa (a) y mediada (b) del H_2O_2 en electrodos de peroxidasa. Mox y Mred : formas oxidadas y reducidas del mediador, respectivamente. $P^{\cdot+}$: radical catiónico localizado en un anillo porfirínico o una cadena polipeptídica

Para este tipo de sistemas se pueden utilizar tanto mediadores de uno como de dos electrones. Los mediadores de un electrón más empleados con electrodos de peroxidasa suelen ser ferrocenos (Epton et al., 1978 ; Tatsuma et al., 1989 ; Schubert et al., 1992 ; Wang et al. 1993), ferrocianuro (Scott et al., 1992 ; Kulys et al. 1981 ; Wang y Varughese, 1990), complejos de Os con piridina, $Os(bpy)_2(py)Cl_2$ (Vreeke et al., 1992 ; Ohara et al., 1993 ; Garguilo et al., 1993) y niquelocenos (Liu et al., 1995a). En estos casos es necesaria la presencia de protones para que se produzca la reacción de la peroxidasa, consumiéndolos de la disolución de una forma similar a la que ocurre en la transferencia de electrones directa (Esquema 5a). Por otro lado los mediadores de dos electrones más utilizados son la fenilendiamina (Adeyoju et al., 1995 ; Wang y Lin , 1989), catecol (Pantano et al. 1991), colorantes como azul de metileno (Liu et al., 1995), y tetratrafalvaleno (Bifulco et al., 1994) entre otros.

Aunque la transferencia electrónica directa y mediada puede ocurrir simultáneamente, no todas las moléculas de HRP toman parte en estos dos procesos de la misma forma. Alrededor de un 40-50% de las moléculas de HRP adsorbidas sobre un electrodo de grafito son capaces de participar en una transferencia electrónica directa. Este porcentaje relativamente alto, sugiere que la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo se realiza mediante canales de transferencia de electrones, además de por el contacto directo entre dicho centro activo y el electrodo, que actúa como dador de electrones. (Lindgren et al., 1999).

Se han utilizado electrodos amperométricos modificados con peroxidasa para la detección de H_2O_2 , peróxidos e hidropéroxidos orgánicos, fenoles y aminas aromáticas. Todas estas moléculas son sustratos de las reacciones catalizadas por la peroxidasa, que en las condiciones experimentales y con el diseño de electrodos adecuados, pueden ser monitorizados selectivamente en muestras de interés industrial, medioambiental y biológico (Ruzgas et al., 1996). Además, el hecho de que en las reacciones de oxidación de sustratos catalizadas por enzimas oxidasas se genere como producto peróxido de hidrógeno, hace factible que estos sustratos puedan ser monitorizados mediante el diseño de electrodos modificados con peroxidasa y diferentes oxidasas. De este modo es posible resolver los problemas asociados con el elevado potencial operacional que requiere la monitorización amperométrica de peróxido de hidrógeno (Ruzgas et al., 1996). Esta posibilidad de acoplamiento de oxidasas/peroxidasa es lo que permite el desarrollo de numerosos biosensores para la determinación de componentes, aditivos y contaminantes en diferentes muestras agroalimentarias, tal y como se pondrá de manifiesto a lo largo de esta Memoria.

III.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los electrodos amperométricos de peroxidasa se han empleado para la determinación de diferentes sustratos, activadores e inhibidores de la reacción enzimática catalizada por la peroxidasa. Sin embargo, en esta revisión bibliográfica sólo se van a comentar los trabajos relacionados con la detección de peróxidos.

Los biosensores amperométricos de peroxidasa son especialmente atractivos para la detección de peróxidos, frente a otras técnicas instrumentales (Wang et al., 1991 ; Gerlache et al., 1998 ; Shan Lin y Luan Jan, 1997 ; Wang et al. 1992 ; Johnston, et al.,1995) debido a su simplicidad, alta sensibilidad y selectividad, por lo que son muchos los artículos que se encuentran en bibliografía sobre este tema. Por ello, en la Tabla VII se han recogido los artículos que, en opinión de la autora de esta Memoria, se creen significativos de los dos últimos años y algunos de años anteriores que se han considerado de especial relevancia. Sin embargo, si que se encuentran recogidos todos los biosensores encontrados en bibliografía

que operan en medios predominantemente no acuosos.

Dada la lentitud de la transferencia directa de electrones entre la enzima y los electrodos, lo que da lugar a bajas señales, la gran mayoría de los biosensores de peroxidasa utilizan mediadores con objeto de aumentar la sensibilidad y rebajar el potencial de medida. Aunque con electrodos de carbono vitrificado se tiene que recurrir todavía en muchas ocasiones a la inmovilización de la enzima por entrecruzamiento con glutaraldehído, el método de inmovilización más empleado es, el atrapamiento físico. Sin duda se están consiguiendo muchos logros en este campo, ya que es una forma contribuir a la estabilidad de la enzima sin que disminuya su actividad. En la actualidad, los atrapamientos en polímeros, geles, etc. están suponiendo importantes alternativas a los métodos de inmovilización tradicionales.

Por otro lado, se está investigando en la posibilidad de aprovechar interacciones electrostáticas con la enzima (Zhang, et al., 2001 ; Gaspar et al., 2001). La oxidación química de la HRP con NaIO_4 (Rajendran et al. 1998) introduce funcionalidades en la enzima que pueden utilizarse para su acoplamiento a soportes u otras enzimas o anticuerpos. La polietilenimina (que tiene una alta concentración de grupos amino primarios y secundarios) se ha utilizado en numerosas aplicaciones de biosensores y biosistemas inmovilizados industriales, ya que tiene una influencia muy beneficiosa sobre la estabilidad y en la respuesta de los sustratos de oxidasa en sistemas oxidasa-peroxidasa (Rajendran et al. 1998).

Como puede observarse en la Tabla, los electrodos empleados más asiduamente siguen siendo los de carbono vitrificado, pasta de C o grafito-resina epoxi, si bien con muy diferentes modificadores, mediadores, etc., por lo que las dos matrices compósitas que se han utilizado en este trabajo suponen una interesante innovación desde el punto de vista del empleo de nuevos materiales electródicos para el diseño de biosensores con buenas características operacionales. Por otra parte, se observa que la concentración de peróxido de hidrógeno mínima que se puede detectar es de orden micromolar, aunque en algunos casos se ha alcanzado un nivel nanomolar (Valdés García et al., ; Razola et al., 1999).

Como se pone de manifiesto en los datos recogidos en la Tabla, el estudio de peróxidos orgánicos en medios no acuosos no es un campo muy explotado, a pesar de la multitud de aplicaciones en que es necesaria su determinación. Sin duda esta escasez de trabajos en medios orgánicos viene dada por la, a su vez, escasa estabilidad de las matrices electródicas en este tipo de medios, ya que ni todos los materiales compósitos presentan estabilidad mecánica en ellos, ni todos los polímeros, membranas, etc. que se utilizan en medios acuosos pueden ser empleados en medios no acuosos. De todas formas, existe un creciente interés por este tipo de sistemas. Así, por ejemplo, A. Moore y col. (Moore et al., 1996), han inmovilizado microperoxidasa-11 sobre un electrodo de oro para llevar a cabo la reducción electrocatalítica de peróxidos orgánicos en disolventes orgánicos. Esta enzima es un oligopéptido obtenido por

digestión de citocromo C que consiste en un sistema de porfirina IX que contiene hierro, conectado a un undecapeptido por dos uniones tioéter con un tamaño tan pequeño que lo hace ideal para su empleo en biosensores amperométricos en fase orgánica.

Por último decir que la revisión de los antecedentes bibliográficos correspondientes a los acoplamientos de la peroxidasa con otras enzimas, fundamentalmente oxidasas, se realizará a lo largo del capítulo IV de esta Memoria.

III.4. PARTE EXPERIMENTAL

III.4.1. INSTRUMENTACIÓN

III.4.1.1. APARATOS

Las medidas amperométricas se han realizado con un potenciostato BAS CV-27 (Bioanalytical Systems, Inc) conectado a un registrador x-t Linseis L250 E. En el caso de los biosensores fabricados con RVC y Resina Epoxi se ha utilizado un potenciostato Petit Ampère BAS LC-3D.

El sistema de inyección en flujo está constituido por una bomba peristáltica WIZ y una válvula Omnifit 1106 de volúmenes de inyección variables.

Otros aparatos utilizados han sido un agitador magnético Ikamag Ret, un pH-metro de precisión Metrohm E-510 calibrado de forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.00 y 7.02 a 25.0 ± 0.5 °C, un baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, una prensa de infrarrojos Carver y una estufa P-Selecta.

III.4.1.2. ELECTRODOS Y CÉLULAS DE TRABAJO

- Electrodo de trabajo :
 - Electrodo compósitos enzimáticos preparados según se describe en los apartados III.5.2. y III.6.2.
- Electrodo de referencia :
 - Electrodo de Ag/AgCl/KCl (3 M) BAS RE-1 tanto en discontinuo como para las medidas en FIA.
- Electrodo auxiliar:
 - Electrodo de punta de platino tanto en discontinuo como para las medidas en FIA.

Como células de trabajo se utilizaron las siguientes :

- Célula electroquímica BAS modelo VC-2 para las medidas realizadas en discontinuo.

- Célula de tipo “wall-jet” de gran volumen para las medidas mediante análisis por inyección en flujo y cromatografía líquida (Figura 1).

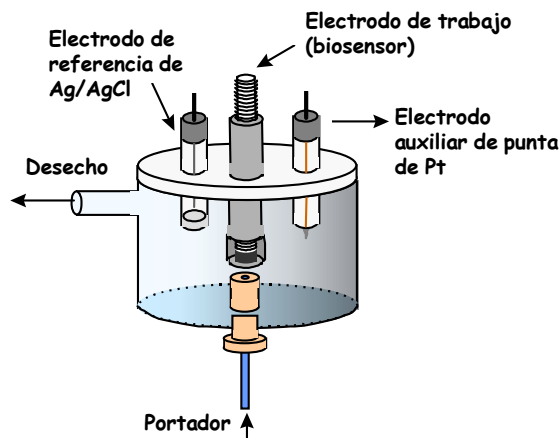


Figura 1. Célula de flujo “wall-jet” de gran volumen

III.4.2. REACTIVOS

Para la preparación de los electrodos compósitos enzimáticos se ha utilizado :

Electrodos de grafito-Teflón:

- Grafito Ultra “F” purity (Carbone of America) como fase conductora.
- Teflón (politetrafluoroetileno) (Aldrich), como fase aislante.

Electrodos de RVC-resina epoxi:

- Carbono vítreo reticulado (RVC) 2x1-100 ppi (Energy Research & Generation Inc.), como fase conductora.
- Resina epoxi [bisfenol-A y N(3-dimetilaminopropil)-1,3-propilendiamina] (Araldit), como fase aislante.

Como reactivos comunes en la fabricación de estos electrodos se han utilizado :

- Peroxidasa (HRP) EC 1.11.1.7 (Type II-from Horseradish) de actividad 180 unidades por miligramo de sólido (Sigma).
- Ferroceno (Merck) , como mediador en medios acuosos.
- Ferrocianuro potásico (Sigma) , como mediador en medios predominantemente no acuosos.

Como sustratos se han empleado peróxido de hidrógeno (30 % w/w) (Sigma) y peróxido de 2-butanona (Fluka).

Otros reactivos utilizados han sido :

- Fosfato disódico anhidro (Panreac) y fosfato monosódico dihidratado (Merck)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Sigma).
- Acetonitrilo y acetato de etilo (Panreac).

- Triton X-100 (Merck).
- Dioctilsulfosuccinato de sodio, AOT (Sigma).

Todos los reactivos utilizados han sido de calidad para el análisis.

El agua empleada en todos los casos ha sido obtenida mediante purificación en un sistema Millipore Milli-Ro.

III.4.3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

III.4.3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

III.4.3.1.1. Medios de trabajo

- Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.05 mol l⁻¹, pH 7.4 : Se prepara disolviendo las cantidades apropiadas de las sales disódica y monosódica, ajustando posteriormente el pH con NaOH 2 mol l⁻¹.
- Disolución reguladora Tris(hidroximetil)aminometano 0.02 mol l⁻¹, pH 7.4 : Preparada disolviendo la cantidad adecuada de la sal y ajustando después el pH con NaOH 2 mol l⁻¹.
- Disolución acetonitrilo-regulador en fase acuosa : Se disuelve en acetonitrilo el volumen adecuado de disolución reguladora de tris(hidroximetil)aminometano 0.02 mol l⁻¹ de pH 7.4 para obtener el porcentaje de fase acuosa requerido.
- Disolución micelar de Triton X-100 :Se prepara disolviendo la cantidad necesaria de tensoactivo para llegar al porcentaje requerido en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4.
- Emulsiones aceite/agua de Triton X-100 : Se obtienen añadiendo a la disolución micelar de Triton X-100 el volumen de disolvente orgánico necesario para alcanzar el porcentaje de fase orgánica deseado, e introduciendo la disolución obtenida en un baño de ultrasonidos durante 2 minutos.
- Emulsiones agua/aceite o micelas inversas de AOT: Estas emulsiones se componen de acetato de etilo como fase continua, un 4% de disolución reguladora de fosfato (pH 7.4) como fase dispersa y AOT 0.1 mol l⁻¹ como agente emulsificante. Para prepararlas se disuelve la cantidad apropiada de tensoactivo en acetato de etilo, añadiéndose seguidamente el volumen correspondiente de la disolución de regulador fosfato. Finalmente se enrasa con acetato de etilo.
- Disoluciones portadoras empleadas en los sistemas de análisis por inyección en flujo :
Se utiliza en cada caso el medio con el que se vaya a trabajar, es decir :
 - Medio acuoso : Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4.
 - Medio acetonitrilo-agua : Disolución acetonitrilo-regulador tris(hidroximetil)aminometano 0.02 mol l⁻¹ de pH 7.4.
 - Medio micelar : Disolución de Tritón X-100 al 0.05 % en tampón fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4.

- Medio emulsionado aceite/agua : Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) como fase continua, 2% de acetato de etilo como fase dispersa y 0.05% de Tritón X-100 como agente emulsificante.
- Medio emulsionado agua/aceite o micelas inversas : Acetato de etilo como fase continua, 4% de disolución reguladora de fosfato (pH 7.4) como fase dispersa y AOT 0.1 mol l^{-1} .

III.4.3.1.2. Disoluciones patrón de los compuestos empleados como sustratos en las reacciones enzimáticas

- Disolución patrón de peróxido de hidrógeno : Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de peróxido de hidrógeno en el medio de trabajo de que se trate en cada caso, para llegar a una concentración final de 0.10 mol l^{-1} . Las disoluciones más diluidas se prepararon por dilución de la disolución patrón en el medio correspondiente.
- Disolución patrón de peróxido de 2-butanona : Se prepara disolviendo la cantidad apropiada de peróxido de 2-butanona en acetonitrilo para obtener una concentración final de 0.1 mol l^{-1} . En el caso de las micelas inversas, se disuelve directamente en ese medio. Las disoluciones más diluidas se prepararon por dilución de las disoluciones patrón en el medio de trabajo e que se trate en cada caso.

Tanto las disoluciones de peróxido de 2-butanona como las de peróxido de hidrógeno se prepararon diariamente y se guardaron en viales con protección frente a la luz.

III.4.3.2. OBTENCIÓN DE LOS AMPEROGRAMAS EN DISCONTINUO

Antes de realizar las medidas, se permite que el biosensor, que se guarda a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, alcance la temperatura ambiente.

Los amperogramas se obtienen sumergiendo el biosensor en la célula de medida que contiene 5.0 ó 10.0 ml del medio de trabajo de que se trate en cada caso, agitándose mecánicamente de forma 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 deseado de la disolución patrón del compuesto a estudiar y se registra la corriente hasta que ésta alcance el estado estacionario. Se siguen realizando adiciones de pequeños volúmenes constantes con la micropipeta hasta que se obtienen todas las señales deseadas. No fue necesario aplicar ningún tipo de tratamiento, físico o químico al electrodo entre medidas.

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

III.4.3.3. MEDIDAS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

El electrodo enzimático se coloca en la célula de flujo de tipo “wall-jet” de gran volumen

III.5. BIOSENSORES COMPÓSITOS DE GRAFITO-TEFLÓN-PEROXIDASA

III.5.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha puesto de manifiesto en el apartado II.3. los biosensores enzim. compósitos más comunes son los de pasta de carbono, con todas las desventajas que llevan consigo en cuanto a estabilidad, reproducibilidad, fabricación, etc. El empleo de biosensores de grafito-Teflón es mucho más prometedor en este sentido por la combinación de buena, relación señal/ruido, regeneración de la superficie electródica, rigidez, economía y compatibilidad con disolventes orgánicos.

En 1993, Wang y col. (Wang et al. 1993) emplearon este material como alternativa para la fabricación de electrodos compósitos tridimensionales. Estos bioelectrodos de grafito-Teflón se prepararon del modo usual, después de unir covalentemente la enzima al polvo de grafito. Este trabajo constituyó el antecedente fundamental de las investigaciones que se han llevado a cabo en parte del trabajo descrito en esta Memoria. En la Tabla VIII se recogen algunos trabajos basados en la matriz electródica compósita de grafito-Teflón.

Tabla VIII. Biosensores compósitos basados en matrices de grafito-Teflón

Composición matriz	Tipo de detección	Modo de medida	Analito	Referencias
Grafito-PTFE-HRP-GOD -fenilporfirina de cobalto tetrametoxi pirolizada	Amperometría (ox con fenilporf y red con HRP)	Discontinuo	Glucosa	Gamburzev et al., 1997
Grafito-PTFE-tirosinasa	Amperometría	Discontinuo y flujo en disolución reguladora, aceto-nitrilo y metanol	Catecol	Puig et al., 1996
Grafito-PTFE-lactato oxidasa-ferroceno	Amperometría	Discontinuo y flujo	L-lactato en alimentos	Serra et al. 1999a
Grafito-PTFE-tirosinasa	Amperometría	Discontinuo en micelas inversas	Compuestos fenólicos	Serra et al. 1999b
Grafito-PTFE-HRP	Amperometría	Discontinuo en disolución reguladora de fosfato	Compuestos fenólicos	Serra et al. 2001
Grafito-PTFE-amino ácido oxidasa-HRP- ferroceno	Amperometría	Discontinuo y flujo en disolución reguladora de fosfato	Amino ácidos	Dominguez et al., 2001
Grafito-PTFE-tirosinasa Grafito-EPD-tirosinasa RVC-resina epoxi- tirosinasa	Amperometría	Discontinuo en disolución reguladora de fosfato	Compuestos fenólicos	Serra et al. 2002
Grafito-PTFE-tirosinasa	Amperometría (inhibición)	Discontinuo en micelas inversas	Ácido benzoico	Morales et al., 2002

PTFE= Politetrafluoroetileno (Teflón)
HRP= Peroxidasa
GOD= Glucosa oxidasa

Como se puede observar, a pesar de las características tan atractivas que presenta este tipo de matriz compósita para la fabricación de biosensores, son muy escasos los trabajos publicados que no han sido realizados por nuestro grupo de investigación.

A lo largo de esta Memoria, se demostrarán todas las ventajas y posibilidades que ofrecen los biosensores de grafito-Teflón.

III.5.2. PREPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES

La preparación de los electrodos de grafito-Teflón-peroxidasa se llevó a cabo en forma de pastillas cilíndricas del siguiente modo :

Se mezclan las cantidades apropiadas, pesadas exactamente, de grafito y peroxidasa mediante agitación mecánica, durante 2 horas, en una suspensión de 0.4 ml de una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 a una temperatura de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se evapora el agua por paso de una corriente de Argon y se añade seguidamente la cantidad escogida de mediador pesada exactamente, en una suspensión de 0.4 ml de acetato de etilo, agitándose mecánicamente durante aproximadamente 15 minutos. A continuación, se evapora el acetato de etilo por paso de una corriente de Argon. Posteriormente, se añade la cantidad elegida de Teflon, pesada exactamente, y se mezcla manualmente. Se procede, seguidamente, a la compresión mecánica de la mezcla en forma de pastillas utilizando una prensa de IR y aplicando una presión de 10000 kg/cm^2 durante 10 minutos. La pastilla así obtenida tiene 1.3 cm de diámetro y 0.4 cm de grosor, aproximadamente.

Se preparan a continuación pastillas más pequeñas, de 3.0 mm de diámetro con ayuda de un troquel y se colocan por presión en un 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 2).

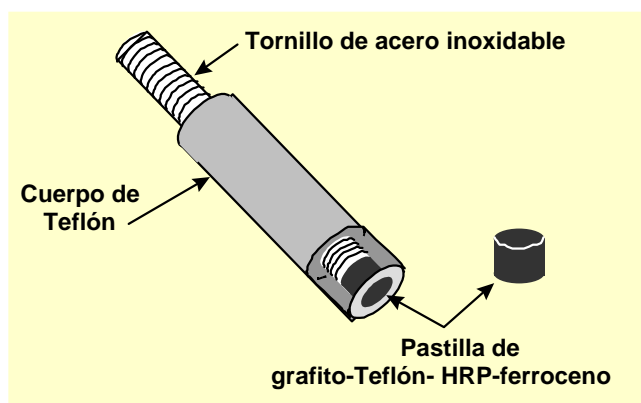


Figura 2. Esquema del electrodo

En el caso de los electrodos de grafito-Teflón-peroxidasa-ferrocianuro utilizados en los medios predominantemente no acuosos, el procedimiento empleado es el mismo, con la diferencia de que, al ser el ferrocianuro soluble en agua, el grafito se mezcla con una disolución que contendrá la peroxidasa y el mediador.

III.5.3. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

La optimización de las diferentes variables relacionadas tanto con la composición de las matrices electródicas, como con la composición de los diferentes medios de trabajo ensayados, se realizó mediante amperometría a potencial constante en disoluciones agitadas a una velocidad constante y utilizando H_2O_2 como sustrato. La metodología seguida se ha especificado en el apartado III.4.3.2.

Dado que las enzimas actúan normalmente en medios acuosos a pH fisiológico (7.4), los primeros estudios de optimización de variables experimentales se realizaron empleando como medio de trabajo una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

Las matrices electródicas de grafito como fase conductora y Teflón como fase aislante, en cuyo seno se inmovilizan tanto la peroxidasa como el mediador, se fabrican como se indica en el apartado III.5.2. Como mediador en la reacción de reducción de H_2O_2 catalizada por HRP se ha elegido el ferroceno, debido a la escasa solubilidad de este compuesto en medios acuosos, con lo que se evitan posibles problemas de solubilización en este medio. En la Figura 3 se muestran, a modo de ejemplo, los registros intensidad-tiempo obtenidos para un electrodo de grafito-teflón (70%)-ferroceno (a) con peroxidasa inmovilizada y (b) sin peroxidasa, para tres adiciones sucesivas de 50 :l de una disolución patrón de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ sobre 5.0 ml de la disolución reguladora de fosfato.

Como puede apreciarse, el electrodo enzimático exhibe una respuesta rápida a los cambios en la concentración de sustrato, alcanzándose la corriente en el estado estacionario en muy pocos segundos (5 s). Esta rápida respuesta está favorecida por la ausencia de barrera en forma de membrana sobre la superficie del electrodo que, con otros diseños de biosensores, es necesaria para trabajar en disolución acuosa para mantener inmovilizada la enzima. Además, dicha membrana produce una disminución en la señal analítica debido a que el analito debe atravesarla, con el consiguiente impedimento difusivo. Así mismo, la ausencia de enlaces covalentes entre la enzima y el grafito, que implican una disminución de la velocidad de la reacción enzimática debido a la pérdida de actividad de la enzima en el proceso de inmovilización, ayuda a la rápida respuesta. Debe observarse también como no se obtiene

ninguna señal amperométrica medible tras adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno cuando se emplea un electrodo de grafito-Teflón sin la enzima inmovilizada (Fig. 3b).

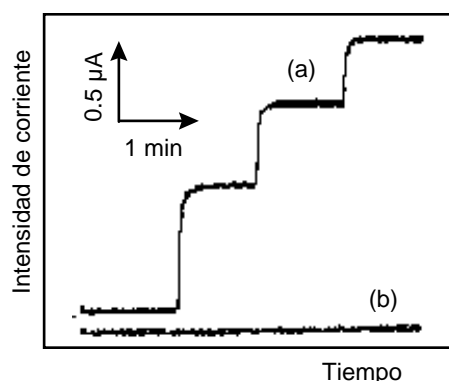


Figura 3. Registros intensidad-tiempo obtenidos con un electrodo compuesto de grafito-teflón-ferroceno (a) con HRP y (b) sin HRP en 5.0 ml de una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4 agitada mecánicamente tras adiciones sucesivas de 50 μl de disolución $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ de H_2O_2 . $E_{\text{ap}} = 0.00 \text{ V}$.

Ya vimos en el apartado III.2., que existen varios trabajos en los que se describe la electroquímica de la HRP en diferentes materiales electrónicos en ausencia de mediadores, donde la monitorización de la reacción enzimática se realiza mediante la reducción electródica de la forma oxidada de la enzima HRP (Bogdanovskaya et al., 1988 ; Razumas, et al., 1986 ; Yaaropolov et al., 1978, Jönsson-Pettersson, 1991). Sin embargo, el buen funcionamiento de un biosensor amperométrico depende de la facilidad de transferencia de electrones desde el centro activo de la enzima a la superficie del electrodo, para lo que se utilizan mediadores redox. (Iwuoha, et al., 1997). Así, Gorton y col. (Jönsson y Gorton, 1989), comprobaron que aunque, en efecto, la reacción enzimática catalizada por la peroxidasa puede monitorizarse por la reducción electródica de la propia enzima, la utilización de mediadores como ferroceno proporciona intensidades de corriente en el estado estacionario mucho más elevadas. Además, el empleo de mediadores de transferencia de electrones diferentes del oxígeno molecular evita la necesidad de un control riguroso del contenido de O_2 en la disolución de trabajo. Con el fin de comprobar que este hecho también se cumple con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno, se procedió a realizar los registros intensidad-tiempo obtenidos con un electrodo de grafito-teflón-peroxidasa (Figura 4a) con ferroceno y (Figura 4b) sin ferroceno, para tres adiciones sucesivas de 50 μl de disolución patrón de peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$.

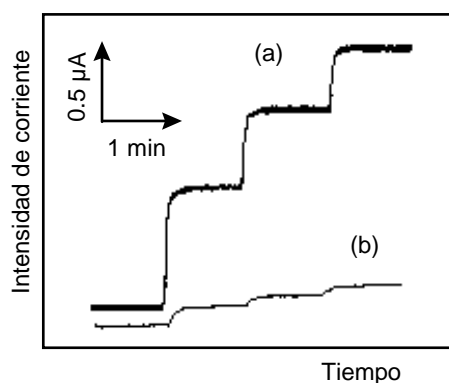


Figura 4. Registros intensidad-tiempo obtenidos con un electrodo compuesto de grafito-Teflón(70%)-peroxidasa con (a) y sin (b) ferroceno, en 5.0 ml de una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4 por adiciones sucesivas de 50 μl de disolución $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ de peróxido de hidrógeno. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$

Como se puede apreciar en la Figura 4, se obtiene una intensidad de corriente en el estado estacionario mucho menor si no se utiliza mediador. Con el fin de obtener mayor sensibilidad, y puesto que la utilización de ferroceno como mediador no incrementa significativamente el tiempo de fabricación del electrodo ni su coste, se han utilizado biosensores compósitos que contienen dicho mediador en los estudios posteriores.

III.5.3.1. COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ ELECTRÓDICA

a) Porcentaje de Teflón

El aumento del contenido de fase aislante en los electrodos compósitos da lugar a una menor superficie electródica y, por tanto, a una menor intensidad de corriente, así como a una mayor resistencia mecánica de la matriz electródica. Por ello, la optimización del porcentaje de Teflón en esta matriz es uno de los parámetros más importantes en el diseño y desarrollo de estos biosensores. Se construyeron electrodos de grafito-Teflón con diferente porcentaje de Teflón (50%, 60% y 70%), manteniendo constantes las cantidades de enzima y de mediador conmovilizados. Este estudio se llevó a cabo realizando las medidas con el electrodo compuesto enzimático correspondiente para una adición de 50 μl de disolución patrón de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ sobre 5.0 ml de una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4), aplicando un potencial constante de 0.00 V. Se realizaron series de 5 medidas cada día durante 3 días consecutivos para cada uno de los electrodos. En la Tabla 1 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 1. Variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario con el porcentaje de Teflón del electrodo compuesto de peroxidasa-ferroceno para adiciones de 50 μl de disolución de peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Día	70% Teflón $i, \mu\text{A}$	60% Teflón $i, \mu\text{A}$	50% Teflón $i, \mu\text{A}$
1	0.62	0.74	1.54
	0.72	0.80	1.48
	0.68	0.74	1.40
	0.64	0.82	1.34
	0.66	0.76	1.20
	$i=0.66 \pm 0.05$ RSD=5.7%	$i=0.77 \pm 0.05$ RSD=4.7%	
2	0.76	0.80	1.44
	0.76	0.76	1.44
	0.68	0.76	1.38
	0.70	0.80	1.28
	0.72	0.74	1.26
	$i=0.72 \pm 0.05$ RSD=5.0%	$i=0.77 \pm 0.03$ RSD=3.5%	
3	0.60	0.84	1.24
	0.70	0.75	1.12
	0.66	0.76	1.10
	0.66	0.78	1.06
	0.62	0.76	0.98

	$i=0.65\pm 0.05$ RSD=6.0%	$i=0.78\pm 0.05$ RSD=4.6%	
MEDIA	0.68 μ A	0.77 μ A	

Como puede apreciarse, la intensidad de corriente aumenta a medida que el porcentaje de Teflón disminuye. Sin embargo, se observa que la corriente medida en el estado estacionario disminuye con el número de medidas para los electrodos contruidos con el 50% de Teflón, y que la reproducibilidad entre las medidas realizadas en días diferentes no era buena. Este comportamiento del electrodo de teflón conteniendo un 50% de Teflón puede ser debido a que la enzima esté menos inmovilizada en la matriz electródica, pudiendo producirse una ligera solubilización de la enzima, y dando lugar a una disminución de la intensidad de corriente en el mismo día y entre días. Por consiguiente, este electrodo enzimático se descartó para estudios posteriores aunque proporcione una mayor intensidad de corriente. Por otro lado, las medidas llevadas a cabo con electrodos fabricados con un 60% proporcionan una corriente ligeramente mayor que la obtenida con los contruidos con el 70%. Las desviaciones estándar relativas para grupos de 5 medidas tanto en el mismo día como en tres días consecutivos, fueron siempre menores de un 6%. Sin embargo, los electrodos contruidos con el 70% de Teflón proporcionan mayores relaciones señal/ruido y menores tiempos necesarios para alcanzar una línea base estable, además de ser mecánicamente más estable. Por todo ello, se ha elegido un **porcentaje de Teflón de 70%** para preparar las matrices bioelectródicas.

b) Cantidad de peroxidasa inmovilizada.

Uno de los factores más importantes que hay que considerar en la fabricación de este tipo de electrodos compósitos enzimáticos, es la cantidad de enzima que se ha de inmovilizar para obtener un reparto uniforme en todo el volumen de la matriz electródica y obtener así señales reproducibles cuando se procede a la regeneración de la superficie electródica. Para llevar a cabo este estudio, se fabricaron electrodos compósitos enzimáticos con diferentes contenidos de enzima (1900, 2700 y 3900 U).

Los valores de intensidad de corriente en el estado estacionario para 10 medidas efectuadas sin regeneración de la superficie del electrodo, en disoluciones diferentes de 5.0 ml de disolución fosfato 0.05 mol l⁻¹ (pH 7.4) y H₂O₂ 5.0x10⁻⁵ mol l⁻¹ se recogen en la Tabla 2. Además, se recoge el valor medio de la intensidad de corriente con su intervalo de confianza calculado para un nivel de significación de 0.05.

Como puede observarse, no hay diferencias apreciables entre las medidas realizadas con un mismo electrodo. Por otro lado, si se comparan los valores medios obtenidos con cada uno de los electrodos ensayados, se puede decir que el electrodo con 1900 U de peroxidasa proporciona una señal tres veces menor que la obtenida con el electrodo contruido con 2700 U, la cual a su vez es ligeramente inferior a la que se consigue con el electrodo que contiene 3900 U.

Tabla 2. Influencia del contenido de enzima en el electrodo compósito sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario. $[H_2O_2] = 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4). $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$

	1900 Unidades HRP	2700 Unidades HRP	3900 Unidades HRP
1	0.23	0.72	0.73
2	0.22	0.67	0.78
3	0.18	0.67	0.71
4	0.22	0.72	0.88
5	0.20	0.63	0.78
6	0.25	0.70	0.79
7	0.23	0.58	0.71
8	0.25	0.56	0.74
9	0.24	0.67	0.71
10	0.21	0.65	0.86
$i, \mu\text{A}$	0.223 ± 0.015	0.66 ± 0.04	0.77 ± 0.04

También se observa que alguno de los valores de intensidad de corriente en estado estacionario que se obtienen con el electrodo con una cantidad de enzima de 2700 U, se encuentra dentro del intervalo de valores de intensidad obtenidos con el electrodo fabricado con 3900 U de enzima. Por ello se decidió emplear, para estudios subsiguientes, una cantidad de peroxidasa inmovilizada en la matriz de grafito-Teflón de **2700 U**.

Por lo que respecta a la cantidad de mediador coinmovilizado en la matriz electródica, se empleó en todos los casos un porcentaje fijo, **1.6 %**, suficiente para asegurar que existe un exceso con respecto al sustrato utilizado (Wang et al. 1993).

III.5.3.2. INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE EN EL ESTADO ESTACIONARIO.

Como ya se ha comentado, las enzimas realizan sus funciones en los organismos vivos a un pH fisiológico de 7.4, por lo que normalmente es en los alrededores de este pH donde la catálisis enzimática va a tener una mayor eficiencia. También es en este medio acuoso donde más difícil resulta inmovilizar las enzimas en la superficie del electrodo (transductor) debido a su alta solubilidad en dichos medio. Por ello, se ha estudiado la influencia del pH sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida con el electrodo de grafito-teflón(70%)-peroxidasa-ferroceno, para una concentración de peróxido de hidrógeno de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, utilizando disoluciones reguladoras de fosfato 0.05 mol l^{-1} con valores de pH comprendidos en el intervalo 6.5-8.0, preparadas según se indica en el apartado III.4.3.1.1. y ajustándolas al pH requerido.

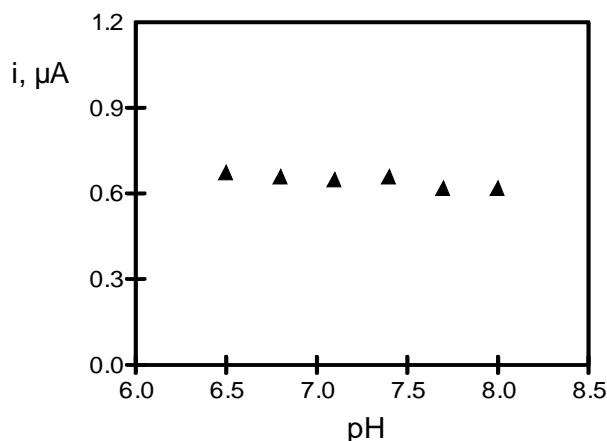


Figura 5. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida con un electrodo de grafito-Teflón(70%)-HRP-ferroceno para una concentración $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de H_2O_2 . $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

En la figura 5 se observa que no hay una variación importante de la intensidad de corriente en el estado estacionario con el pH en el intervalo estudiado. Por lo tanto, se ha elegido como pH de trabajo para estudios posteriores **7.4**.

III.5.3.3. EFECTO DEL POTENCIAL APLICADO SOBRE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE EN ESTADO ESTACIONARIO.

Este efecto se ha evaluado utilizando una concentración de peróxido de hidrógeno de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 6. Como puede apreciarse, la señal amperométrica es prácticamente constante en el intervalo comprendido entre -0.10 V y 0.15 V , mientras que para valores de potencial superiores o inferiores a los de dicho intervalo, la intensidad de corriente disminuye

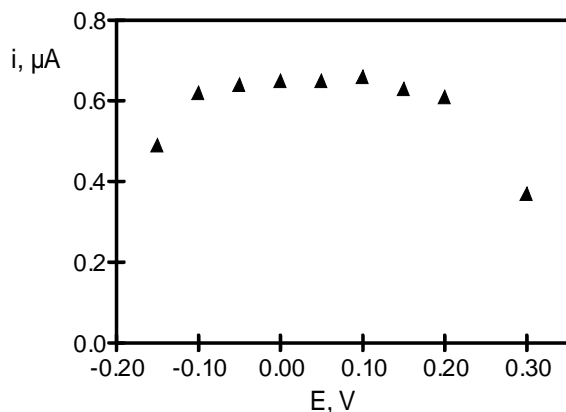


Figura 6. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de la corriente obtenido con el electrodo compuesto de HRP-ferroceno para una concentración de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de H_2O_2 en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4.

La disminución de la intensidad de corriente en el estado estacionario a potenciales más negativos de -0.10 V tiene que deberse a una disminución de la concentración de ferricinio en la capa de difusión. Esta disminución de la concentración de mediador puede ser debida a que haya una menor concentración de H_2O_2 en la capa de difusión, como consecuencia de la reducción electroquímica de parte del peróxido de hidrógeno a dichos potenciales. Con objeto de verificar esta hipótesis, se estudió la influencia de la variación del potencial aplicado sobre la señal de reducción del H_2O_2 al mismo nivel de concentración, $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, utilizando un electrodo de grafito-(70%)Teflón, en el que no se inmovilizaron ni la enzima ni el mediador. Como se observa en la Figura 7, el peróxido de hidrógeno comienza a reducirse sobre un electrodo de grafito-Teflón a partir de 0.00 V, aumentando la corriente a medida que el potencial aplicado se hace más negativo, lo que confirma la hipótesis establecida, si bien dicha reducción electródica del H_2O_2 sólo es significativa sobre el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno a potenciales más negativos de -0.10 V. Se ha elegido para estudios posteriores un potencial constante aplicado de **0.00 V**.

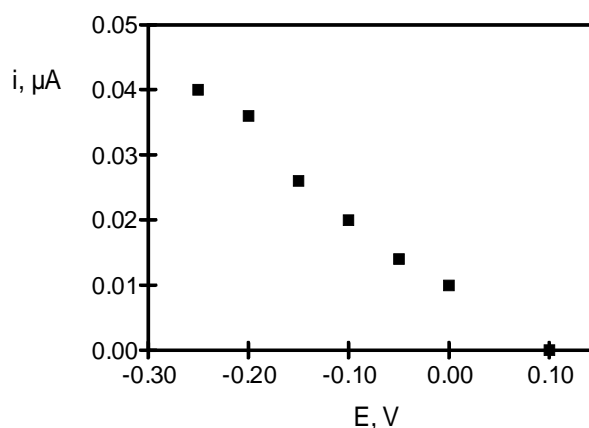


Figura 7. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de la corriente obtenido con un electrodo compósito de grafito-(70% Teflón) para una concentración $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de H_2O_2 en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4.

Todas las variables experimentales optimizadas hasta ahora serán las mismas para todos los medios predominantemente acuosos que se utilizan en esta Memoria (las diferencias en su composición no deben afectar a dichas variables). Así pues, para los medios predominantemente acuosos, solo se optimizarán las variables experimentales propias de las características particulares de dichos medios.

III.5.3.4. DISOLUCIONES MICELARES: ELECCIÓN DEL TENSOACTIVO Y DE SU CONCENTRACIÓN

Con objeto de evaluar la actividad catalítica de la peroxidasa en distintas disoluciones micelares, se ha estudiado como influye la naturaleza del tensoactivo utilizado para preparar disoluciones micelares sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario de

disoluciones de peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

Los tensoactivos ensayados fueron : Hyamina 2389 (tensoactivo catiónico), Triton X-100 (no iónico) y laurilsulfato de sodio (aniónico) (SDS). Todos los porcentajes ensayados para cada uno de los tensoactivos están por encima de la concentración micelar crítica (Bethod A., García Alvarez Coque) por lo que los medios de trabajo son en todos los casos verdaderas disoluciones micelares.

En la Figura 8 se muestra la variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario con el porcentaje de cada uno de los tensoactivos estudiados.

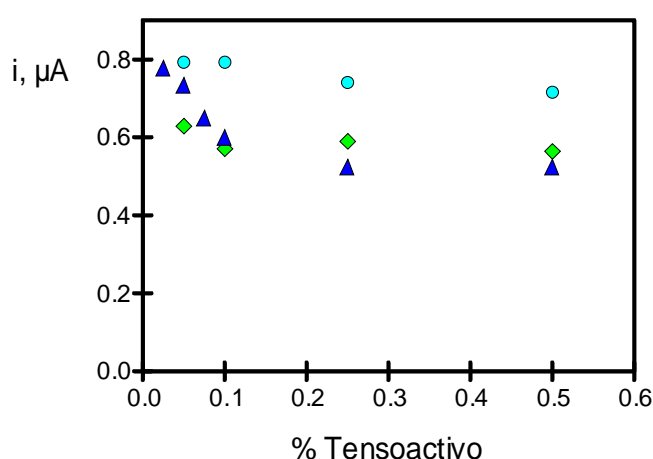


Figura 8. Efecto del porcentaje de tensoactivo sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario para disoluciones micelares formadas por una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) y Triton X-100 (\blacktriangle), Hyamina 2389 (\bullet) y SDS (\blacklozenge). Concentración de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Como se puede apreciar, las señales obtenidas en las disoluciones micelares formadas con Triton X-100 y SDS son similares entre si, y algo menores que los valores de intensidad en la disolución micelar formada con Hyamina 2389. Sin embargo, las micelas formadas con Hyamina son el medio de trabajo donde los registros $i-t$ tienen un ruido de fondo más alto y se precisa un mayor tiempo de estabilización de la línea base, por lo que se decidió elegir el sistema micelar formado con **Triton X-100**.

Por otro lado, no se apreciaron cambios visibles en el aspecto de la disolución para todos los porcentajes de Triton X-100 estudiados. Como se muestra en la Fig. 8, la señal disminuye al aumentar el porcentaje de tensoactivo en la disolución. Este comportamiento puede atribuirse fundamentalmente al fenómeno bien estudiado de la adsorción de los tensoactivos en las interfases sólido/líquido, cuya extensión depende principalmente de la concentración de tensoactivo y de su orientación en la interfase (Rosen, 1978). Es decir, a medida que aumenta la concentración de tensoactivo en el seno de la disolución aumenta su concentración en la interfase y, por tanto, el recubrimiento de la fase conductora del electrodo dando lugar a una disminución en la señal analítica. Además, el Triton X-100 posee fuertes propiedades superficiales activas, habiéndose reportado disminución en la señal por adsorción

en la superficie de algunos electrodos (Gerlache et al., 1998).

El Triton X-100 tiene dos valores de concentración micelar crítica (CMC): $3.1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (0.02%) y $1.3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (0.08%) (Tianqing et al., 1999). Obviamente, cuando la concentración de tensoactivo es menor que la primera CMC, el Triton X-100 está en forma de molécula monómera o premicela y el coeficiente de difusión es relativamente alto. Cuando la concentración es mayor que la primera CMC, el Triton X-100 se encuentra como micela esférica y su coeficiente de difusión es menor que en la premicela ya que el volumen de la micela esférica es mayor. A concentraciones por encima de la segunda CMC, la forma de la micela es de barra y su coeficiente de difusión es menor que el de la micela esférica. Como se puede observar en la figura 8, estos cambios son consistentes con la variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario que se produce cuando se alcanza la concentración de Triton X-100 correspondiente a esa segunda CMC.

Atendiendo a los resultados obtenidos se eligió un porcentaje de **0.1 % de Triton X-100** ($15.5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 para estudios posteriores.

III.5.3.5. EMULSIONES ACEITE-AGUA

Para estudiar el comportamiento del biosensor electroquímico de grafito-Teflón-HRP-ferroceno en las emulsiones del tipo aceite/agua, en primer lugar se debe elegir el disolvente orgánico más adecuado para formar la emulsión y el tensoactivo que proporcione una emulsión estable y que permita obtener una buena respuesta analítica. Estudios previos sobre la reacción de reducción de H_2O_2 catalizada por la peroxidasa en disolución, realizados por Wang y Reviejo (Wang y Reviejo, 1993), demostraron que las emulsiones formadas con acetato de etilo y Triton X-100 proporcionaban los mejores resultados desde el punto de vista analítico. Por ello, se ha elegido el acetato de etilo como disolvente orgánico para constituir la fase dispersa y Triton X-100 como agente emulsificante. En este último caso, además, se trata del mismo tensoactivo utilizado en las disoluciones micelares (apartado III.5.3.4.).

III.5.3.5.1. Influencia del porcentaje de fase dispersa sobre la intensidad en el estado estacionario.

Se ha estudiado la variación de la señal amperométrica obtenida a 0.00 V con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno, con la proporción de acetato de etilo presente en la emulsión que contiene peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. El porcentaje de tensoactivo utilizado como agente emulsificante se mantuvo constante a un valor de 0.1 %, y como fase continua se utilizó la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

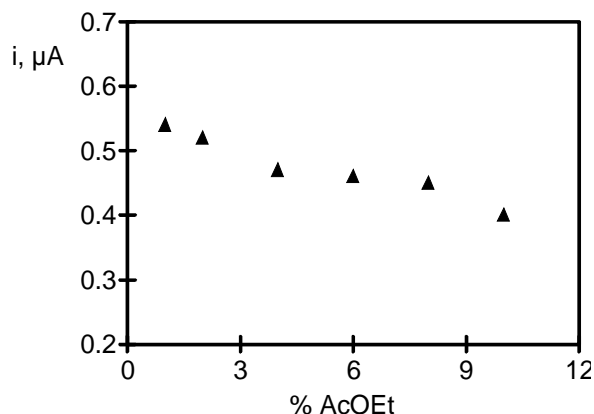


Figura 9. Influencia del porcentaje de acetato de etilo sobre la intensidad de corriente en estado estacionario de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en emulsiones aceite-agua. Agente emulsificante: 0.1 % de Triton X-100 ; fase continua : disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4). $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$

El empleo de ultrasonidos se hizo necesario para favorecer la formación de la emulsión con todos los porcentajes de acetato de etilo ensayados. El tiempo requerido para formar la emulsión aumentó con el porcentaje de disolvente orgánico. A partir de un 8.0 % de acetato de etilo, las emulsiones presentaron un aspecto translúcido, indicando un cambio en la estructura de la emulsión y haciéndose menos estables con el tiempo. Como se observa en la Figura 9, la señal amperométrica disminuye ligeramente con el porcentaje de fase orgánica. Como compromiso entre una adecuada sensibilidad y una cantidad de disolvente orgánico suficiente para permitir la extracción de analitos de muestras reales, se ha elegido un porcentaje del **2.0 % de acetato de etilo** como fase dispersa en estas emulsiones aceite-agua.

III.5.3.5.2. Influencia del porcentaje de agente emulsificante

Se estudió la variación de intensidad de corriente en el estado estacionario con la proporción de tensoactivo utilizado como agente emulsificante para la preparación de las emulsiones, manteniendo constante el porcentaje de AcOEt (2.0%). En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos cuando se añaden 50 µl de una emulsión de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a 5.0 ml de la emulsión correspondiente a cada proporción de tensoactivo. Como puede observarse, el cambio en la proporción de agente emulsificante no supone una variación significativa de la señal amperométrica, por lo que se continuará utilizando un porcentaje de **Triton X-100 de 0.1 %** en lo sucesivo, dado que éste es también el porcentaje que se emplea en el medio micelar.

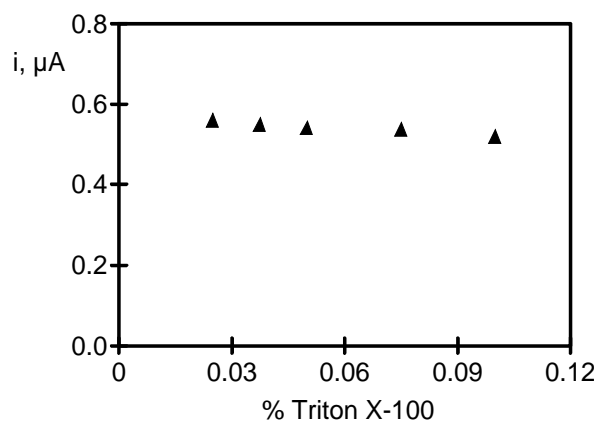


Figura 10. Influencia del porcentaje de Triton X-100 sobre la intensidad de corriente en estado estacionario de emulsiones aceite-agua conteniendo H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ sobre el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-Ferroceno. Fase dispersa : 2 % de acetato de etilo, fase continua : disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

III.5.3.6. MEDIO ACETONITRIL:DISOLUCIÓN REGULADORA ACUOSA

Tanto la solubilidad de diferentes peróxidos orgánicos en mezclas acetonitrilo-agua (disoluciones reguladoras acuosas) como la posibilidad de determinar estos peróxidos mediante cromatografía líquida, técnica en la que las mezclas acetonitrilo/agua son ampliamente utilizadas como fase móvil, hace interesante estudiar el comportamiento del biosensor desarrollado en este medio. En este caso, el mediador inmovilizado en la matriz electródica fue el ferrocianuro potásico, ya que su escasa solubilidad en fase orgánica permite minimizar los posibles problemas de pérdida del mediador por solubilización. De este modo, el electrodo compuesto utilizado en este medio está formado por grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro.

III.5.3.6.1. Influencia del contenido de fase acuosa sobre la intensidad en el estado estacionario.

La influencia del porcentaje de fase acuosa en este tipo de mezclas sobre la intensidad en el estado estacionario se evaluó empleando como dicha fase acuosa una disolución reguladora de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 0.02 mol l^{-1} de pH 7.4. No fue posible utilizar en este medio la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} empleada con los medios anteriores, dado que se producía la precipitación del fosfato. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos para dos concentraciones de H_2O_2 , 5.0×10^{-5} y $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en el intervalo comprendido entre el 1 y el 20 % de Tris. Las disoluciones patrón de peróxido de hidrógeno se prepararon, en cada caso, en la mezcla acetonitrilo/fase acuosa correspondiente.

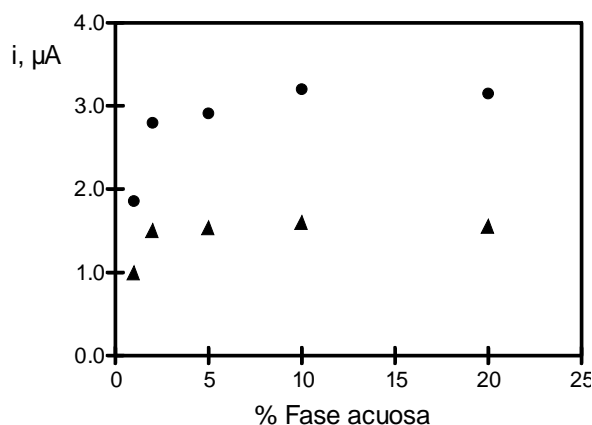


Figura 11. Influencia del porcentaje de fase acuosa (disolución reguladora Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4) en mezclas acetonitrilo :fase acuosa sobre la corriente en estado estacionario obtenida con un electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro. $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5.0 \times 10^{-5}$ (\blacklozenge) y $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (\bullet). $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$

Como se puede observar, la intensidad de corriente en el estado estacionario aumenta rápidamente con el porcentaje de fase acuosa hasta aproximadamente un 5%, para permanecer prácticamente constante a porcentajes superiores. Por otra parte, una adición de peróxido de hidrógeno sobre acetonitrilo puro, empleando perclorato de tetrabutilamonio 0.02 mol l^{-1} como electrolito fondo, no produjo ninguna respuesta amperométrica, lo que puede atribuirse a la necesidad de la existencia de una cantidad mínima de agua en el medio para que se produzca la catálisis enzimática. Esta misma razón es la responsable del aumento de la señal al aumentar el porcentaje de disolución reguladora. Este comportamiento es similar al observado en estudios de catálisis enzimática en disolución en medios orgánicos (Valivety et al., 1992), en los que se ha demostrado la necesidad de una cantidad de agua esencial para obtener una velocidad apreciable de la reacción enzimática. En estos estudios, a menudo se alcanza un máximo para dicha velocidad con el contenido de agua, a partir del cual disminuye. Por lo tanto, se considera que el aumento inicial que se observa en la Figura 11 refleja la cantidad de agua esencial para la actividad enzimática, mientras que la leve disminución que se produce para elevados porcentajes de fase acuosa se debe, posiblemente, a que se producen cambios en la naturaleza de la interfase que afectan a la velocidad de la reacción enzimática. Se ha elegido como medio de trabajo para estudios posteriores el formado por **90% acetonitrilo y 10% disolución acuosa reguladora Tris 0.02 mol l^{-1} (pH 7.4)**.

III.5.3.6.2. Influencia del potencial aplicado.

Dado que el mediador utilizado en este medio es distinto al de los medios anteriores, y que es la reacción electródica del mediador la que se utiliza para monitorizar amperométricamente la reacción enzimática, parece apropiado evaluar ahora la influencia del potencial aplicado sobre dicha señal amperométrica. En la Figura 12 se muestra la variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario con el potencial aplicado al electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro en el intervalo de -0.2 V a $+0.2 \text{ V}$. Se observa una meseta de

corriente en el intervalo de -0.15 V a +0.15 V, muy similar a la obtenida en el medio acuoso con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno, mientras que la caída de la señal se produce a valores más negativos en el medio acetonitrilo-agua. Al igual que entonces, esta disminución de la señal amperométrica a valores menores de -0.15 V puede atribuirse a la reducción electródica del H_2O_2 . Se ha elegido como valor de potencial a aplicar en el medio hidroorgánico **0.00 V**, que por otra parte coincide con el escogido en los medios predominantemente no acuosos, como se verá más adelante.

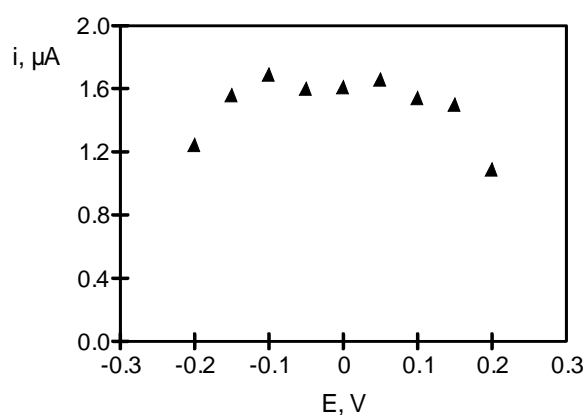


Figura 12. Efecto del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida con un electrodo compósito de grafito-Teflón-HRP-Ferrocianuro para una concentración de peróxido de hidrógeno de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en medio acetonitrilo-disolución reguladora tris 0.02 mol l^{-1} (pH 7.4)

III.5.3.7. EMULSIONES AGUA-ACEITE O MICELAS INVERSAS

Como ya se ha explicado en la Introducción, los medios emulsionados agua-aceite, también llamados micelas inversas, pueden describirse como sistemas de tres componentes formados por un disolvente orgánico, que constituye la fase continua, agua o una disolución reguladora acuosa, que es la fase dispersa y un tensoactivo, que actúa como agente emulsificante. Una propiedad especialmente ventajosa de estos medios para su utilización con biosensores enzimáticos radica en el fácil control del contenido de agua necesario para una óptima actividad de la enzima.

Como ya se comentó en el apartado III.4. Reviejo et al (Reviejo et al., 1994) estudiaron previamente de forma sistemática diferentes emulsiones agua/aceite cuya fase continua estaba formada por varios disolventes orgánicos : n-hexano, acetato de etilo y cloroformo, en relación con la reducción enzimática de H_2O_2 y empleando un electrodo de grafito en cuya superficie la enzima HRP se inmovilizó por simple adsorción. Contrariamente a lo reportado en la bibliografía dedicada a reacciones enzimáticas en fase orgánica con la enzima en disolución, el disolvente que proporcionó una mejor respuesta analítica fue el acetato de etilo el cual, sin embargo, posee el valor más bajo de log P de los tres ensayados. Este comportamiento se explicó por la mayor conductividad que proporcionan las emulsiones formadas con este disolvente. Por ello, se ha elegido el **acetato de etilo** como el disolvente orgánico utilizado

como fase continua para preparar las micelas inversas. A continuación, se detallan los ensayos realizados para elegir la composición de la emulsión, optimizándose, además, el potencial aplicado al electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa-ferrocianuro debido a que el medio de trabajo es en este caso muy diferente a los considerados anteriormente.

III.5.3.7.1. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario.

Se ha estudiado como influye el valor del potencial aplicado al electrodo compuesto enzimático sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario para una concentración de peróxido de hidrógeno de $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en la micela inversa. Para realizar este estudio se utilizó una composición de la emulsión idéntica a la empleada por Reviejo y col. en el trabajo mencionado anteriormente. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 13.

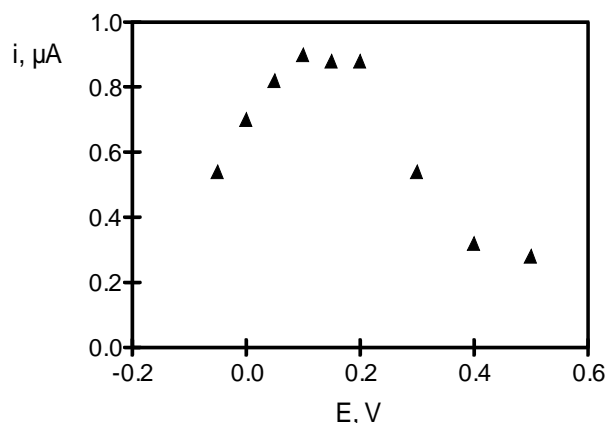


Figura 13. Influencia del potencial aplicado a un electrodo compuesto de grafito-teflón peroxidasa-ferrocianuro sobre la respuesta amperométrica para el peróxido de hidrógeno a un nivel de concentración de $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, en micelas inversas constituidas por acetato de etilo como disolvente orgánico, AOT (0.1 mol l^{-1}), como agente emulsificante y 4% de regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 como fase acuosa.

Como puede observarse, se alcanza una pequeña meseta de valores máximos de la intensidad de corriente en el estado estacionario entre + 0.05 y + 0.20 V, produciéndose una disminución gradual de la respuesta a potenciales mayores de +0.20 V y menores de +0.05 V. El hábito de esta variación es, en este caso, distinto al obtenido en los otros medios de trabajo ensayados, incluso en las mezclas acetonitrilo :agua, en las que se emplea el mismo mediador. Lógicamente, este diferente comportamiento se debe a la diferente naturaleza del medio. Se aprecia ahora una disminución de la respuesta amperométrica a potenciales más reductores de +0.05V, lo que indica que, en este medio, la reducción electródica del H_2O_2 ocurre a potenciales más positivos que en los otros medios de trabajo estudiados.

Se ha escogido como potencial de trabajo para los estudios siguientes un valor de **+0.10 V**, con objeto de obtener una respuesta lo más sensible posible y, como se verá más adelante, capaz de minimizar las posibles interferencias.

III.5.3.7.2. Elección del tensoactivo.

Para elegir el tensoactivo más adecuado para la formación de las micelas inversas con acetato de etilo como fase continua, se consideraron los mismos tensoactivos empleados para formar las disoluciones micelares y las emulsiones aceite/agua, es decir, Hyamina 2389 (tensoactivo catiónico), Triton X-100 (no iónico) y laurilsulfato de sodio (aniónico) (SDS), y además el tensoactivo dioctilsulfosuccinato de sodio (AOT) debido a su elevada capacidad de formación de emulsiones agua/acetato de etilo (Reviejo et al., 1994)

En todos los casos las micelas inversas se formaron con un 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) como fase dispersa. Las emulsiones formadas con Hyamina 2389 y SDS tenían un aspecto lechoso, y se rompían (formación de dos fases) a los pocos minutos de su preparación, por lo que no se consideraron como medios de trabajo apropiados desde un punto de vista analítico. Por lo que respecta a las emulsiones formadas con Triton X-100 y AOT, se obtuvieron señales analíticas para una concentración de peróxido de hidrógeno de $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de similar intensidad de corriente. Sin embargo, el ruido de fondo de la línea base es mucho mayor en las emulsiones formadas con Triton X-100 como agente emulsificante. Además, en este caso es necesario añadir un electrolito fondo (perclorato de tetrabutilamonio 0.02 mol l^{-1}) para conseguir una conductividad suficiente como para permitir medidas amperométricas adecuadas. Sin embargo, el AOT, además de actuar como agente emulsificante, puede actuar como electrolito fondo al ser un tensoactivo aniónico. Por estas razones se eligió el **dioctilsulfosuccinato de sodio (AOT)** como el tensoactivo más adecuado para la formación de las micelas inversas que se van a emplear como medio de trabajo con el biosensor de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro.

III.5.3.7.3. Influencia de la concentración de tensoactivo

Una vez elegido el tensoactivo se procedió a determinar su concentración más adecuada para las medidas con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro en las micelas inversas. Para ello, se prepararon emulsiones con diferentes concentraciones de AOT ($0.05\text{-}0.20 \text{ mol l}^{-1}$) y se estudió su influencia sobre la formación y estabilidad de las micelas inversas y sobre la intensidad de corriente en estado estacionario.

Las emulsiones obtenidas mostraron un aspecto completamente transparente para concentraciones de AOT iguales o mayores a 0.1 mol l^{-1} , lo que indica una buena estabilidad de las micelas. Sin embargo, para concentraciones inferiores a 0.1 mol l^{-1} , las emulsiones mostraron un aspecto translúcido que era más acusado a medida que disminuía la concentración de AOT. Además, como puede apreciarse en la Figura 14, la intensidad de corriente disminuye progresivamente para concentraciones de AOT inferiores a 0.1 mol l^{-1} . Por ello, se eligió **0.1 mol l^{-1} de AOT** como la concentración de agente emulsificante empleada

para llevar a cabo estudios posteriores.

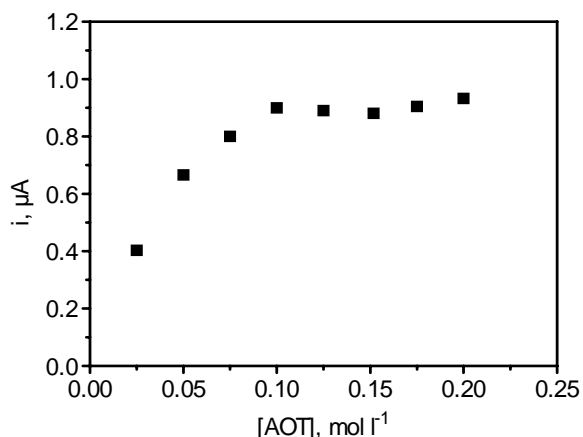


Figura 14. Variación de la intensidad de corriente obtenida con un electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro con la concentración de AOT en micelas inversas formadas con un 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) como fase dispersa en acetato de etilo. Concentración de peróxido de hidrógeno : $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $E_{ap} = +0.10 \text{ V}$

III.5.3.7.4. Influencia del porcentaje de fase acuosa dispersa.

Como fase dispersa se ha utilizado una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Para llevar a cabo este estudio, se prepararon micelas inversas con diferentes porcentajes de fase acuosa (0-6 %). En la Figura 15 se muestra la variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario, obtenida para una concentración de peróxido de hidrógeno de $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ con el biosensor de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro, en función de dicho porcentaje de fase dispersa.

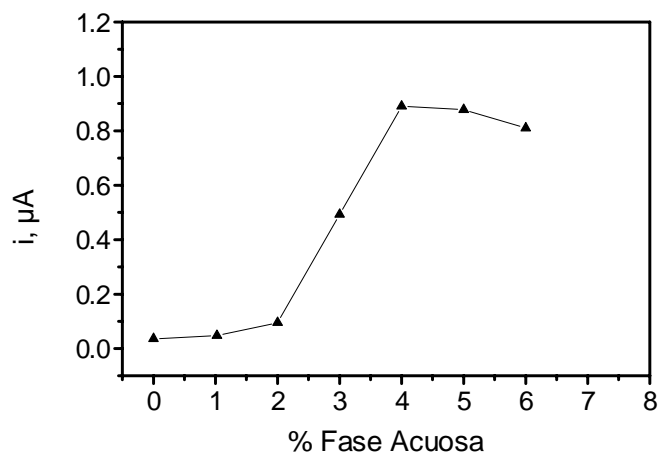


Figura 15. Influencia del porcentaje de fase dispersa (disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4) sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario de H_2O_2 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en micelas inversas. Agente emulsificante : 0.1 mol l^{-1} AOT, fase continua : acetato de etilo. $E_{ap} = +0.10 \text{ V}$.

Como cabía esperar, prácticamente no se observó respuesta del biosensor amperométrico enzimático en ausencia de fase acuosa, siendo dicha pequeñísima respuesta debida probablemente a las trazas de agua existentes en el acetato de etilo comercial. Además, la figura muestra como la señal va aumentando al aumentar el porcentaje de agua produciéndose un salto brusco entre un 2% y un 4% de fase acuosa. A partir de este último porcentaje y hasta un 6% no hay una variación significativa. No fue posible estudiar porcentajes más altos debido a la ruptura de las emulsiones a los pocos minutos de ser formadas. Además, las emulsiones formadas con un 5% de fase acuosa eran transparentes, mientras que las formadas con un 6% eran translúcidas, lo que indica que estas últimas son menos estables. Por todo ello, se ha elegido un porcentaje de **4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ a pH 7.4** como fase dispersa para estudios posteriores. Así mismo, el comportamiento observado vuelve a poner de manifiesto la necesidad de una capa de hidratación de la enzima para su óptimo funcionamiento, así como la gran facilidad con la que puede controlarse dicha cantidad de agua en las micelas inversas.

III.5.4. ESTABILIDAD DE LOS BIOSENSORES EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE TRABAJO

Una de las mayores ventajas prácticas que se presuponen a los biosensores electroquímicos compósitos en general, es su capacidad de regeneración de su superficie mediante la aplicación de un procedimiento tan sencillo como es un simple pulido. Por consiguiente, es importante establecer cuanto tiempo es posible utilizar el biosensor con una respuesta reproducible. Este estudio es esencial en el caso de los medios de trabajo predominantemente acuosos, ya que la peroxidasa es soluble en ellos, y por lo tanto podría pensarse que el electrodo perdería estabilidad como resultado de la posible solubilización de la enzima, al estar inmovilizada por simple atrapamiento físico en la matriz electródica. Los aspectos estudiados relacionados con la estabilidad del biosensor han sido : repetibilidad de la señal amperométrica con un mismo electrodo sin regeneración de la superficie electródica, repetibilidad de la señal amperométrica cuando se regenera la superficie del electrodo mediante pulido, tiempo de utilización de un biosensor, reproducibilidad en la fabricación de diferentes electrodos enzimáticos y el efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla a partir de la cual se construyen los electrodos. Estos estudios se van a presentar de forma conjunta para todos los medios ensayados con el fin de poder comparar los resultados obtenidos.

III.5.4.1. REPETIBILIDAD DE LAS MEDIDAS SIN REGENERACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA.

Se ha estudiado la repetibilidad de la intensidad de corriente en el estado estacionario

obtenida con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferroceno para los medios predominantemente acuosos, y con el de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro para los predominantemente no acuosos, para una concentración de peróxido de hidrógeno de 5.0×10^{-5} mol l⁻¹, a un potencial aplicado de 0.00 V para todos los medios, excepto en las micelas inversas, en las que el potencial aplicado fue de +0.10 V. En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos para diez medidas en cada caso, especificándose el valor medio con su intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05, y la desviación estándar relativa de la serie de medidas realizadas.

Como puede observarse, los valores de las desviaciones estándar relativas son menores del 10 % en todos los medios de trabajo ensayados, lo que pone de manifiesto la buena repetibilidad de las medidas amperométricas sin necesidad de regenerar la superficie del electrodo. Además, los valores de RSD obtenidos en los medios predominantemente acuosos indican la buena inmovilización de la enzima en la matriz electródica, a pesar de que la peroxidasa es soluble en dichos medios.

Tabla 3. Intensidad de corriente en estado estacionario para medidas sucesivas realizadas con el electrodo compuesto enzimático sin regeneración de la superficie electródica. $[H_2O_2] = 5.0 \times 10^{-5}$ mol l⁻¹; $E_{ap} = 0.00$ V Medio acuoso: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹, pH 7.4; disoluciones micelares: 0.1 % Triton X-100 en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ (pH 7.4); emulsiones aceite/agua: 2% AcOEt y 0.1 % Triton X-100 en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ (pH 7.4); medio acetonitrilo/agua: 90% CH₃CN :10 % disolución reguladora Tris 0.02 mol l⁻¹ y micelas inversas: 4 % disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ (pH 7.4) y AOT 0.1 mol l⁻¹ en acetato de etilo ($E_{ap} = +0.10$ V).

Medidas	Disolución reguladora de fosfato	Disolución micelar	Emulsiones aceite/agua	Medio CH ₃ CN/H ₂ O	Micelas inversas
1	0.72	0.52	0.53	1.68	2.10
2	0.67	0.52	0.53	1.68	2.30
3	0.67	0.63	0.50	1.62	2.10
4	0.72	0.63	0.53	1.56	2.06
5	0.63	0.64	0.56	1.62	2.10
6	0.70	0.59	0.53	1.59	2.20
7	0.58	0.64	0.50	1.62	2.45
8	0.56	0.63	0.53	1.65	2.40
9	0.67	0.66	0.53	1.41	2.35
10	0.65	0.59	0.50	1.53	2.42
i, μA	0.66 ± 0.04	0.61 ± 0.05	0.52 ± 0.01	1.60 ± 0.06	2.2 ± 0.1
RSD, %	7.6	8.2	3.8	5.0	6.7

Por otro lado, puede observarse que la magnitud de la señal amperométrica obtenida

sigue un orden micelas inversas > medio acetonitrilo/agua > medio acuoso \approx disoluciones micelares > emulsiones aceite/agua.

III.5.4.2. REPETIBILIDAD DE LAS MEDIDAS REGENERANDO LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA POR PULIDO.

Como ya se ha comentado, una de las ventajas más interesantes desde el punto de vista práctico que poseen los electrodos compósitos enzimáticos es la posibilidad de obtener una nueva superficie electródica y, por tanto, un nuevo biosensor por simple pulido de dicha superficie. Por ello, uno de los estudios que se deben realizar en la caracterización de este tipo de biosensores es la repetibilidad de las medidas amperométricas después de haber regenerado la superficie del electrodo. En este estudio se realizaron 3 medidas sucesivas de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ después de cada pulido. En la Tabla 4 se recogen los valores medios de intensidad obtenidos tras realizar cada uno de los pulidos. La repetibilidad de las señales amperométricas cuando se regenera la superficie puede considerarse como un indicador de la uniformidad de la distribución de la enzima en el seno de la matriz electródica. A la vista de los valores de RSD obtenidos en cada uno de los medios estudiados, puede decirse que los electrodos de grafito-Teflón-HRP permiten una buena repetibilidad de las medidas amperométricas tras ser sometidas al procedimiento de regeneración de la superficie electródica por pulido. Este comportamiento indica, por tanto, que la peroxidasa y el mediador están uniformemente repartidos en todo el volumen de la matriz del biosensor.

Tabla 4. Repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas con los electrodos compósitos enzimáticos tras pulidos sucesivos de la superficie electródica. $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$; $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. Medio acuoso: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4; disoluciones micelares: 0.1 % Triton X-100 en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4); emulsiones aceite/agua: 2% AcOEt y 0.1 % Triton X-100 en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4); medio acetonitrilo/agua: 90% CH_3CN :10 % disolución reguladora Tris 0.02 mol l^{-1} (pH 7.4) y micelas inversas: 4 % disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) y AOT 0.1 mol l^{-1} en acetato de etilo ($E_{ap} = +0.10 \text{ V}$).

Medidas	Disolución reguladora de fosfato	Disolución micelar	Emulsiones aceite/agua	Medio $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$	Micelas inversas
1	0.62	0.56	0.53	1.66	2.08
2	0.66	0.61	0.62	1.65	2.08
3	0.63	0.64	0.53	1.64	2.32
4	0.76	0.58	0.50	1.60	2.20
5	0.74	0.56	0.53	1.67	2.20
6	0.71	0.55	0.56	1.59	2.08
7	0.62	0.63	0.53	1.62	2.16
8	0.58	0.59	0.60	1.59	2.24
9	0.65	0.65	0.52	1.60	2.12
10	0.60	0.55	0.56	1.62	1.80

i, μA	0.66 ± 0.04	0.59 ± 0.03	0.55 ± 0.03	1.62 ± 0.02	2.2 ± 0.1
RSD, %	9.1	6.8	7.3	2.0	6.6

III.5.4.3. TIEMPO DE UTILIZACIÓN DEL ELECTRODO ENZIMÁTICO

Desde el punto de vista de la utilización de los biosensores, estos pueden diferenciarse entre biosensores desechables o de un solo uso, y biosensores reutilizables, los cuales se desarrollan para llevar a cabo varias medidas con el mismo dispositivo. Los electrodos compósitos enzimáticos pertenecen obviamente a este segundo grupo. Por ello, es importante saber cuánto tiempo puede funcionar el biosensor proporcionando señales reproducibles, dado que un mayor tiempo de vida útil permitirá un ahorro de tiempo y de costes. Para establecer el tiempo de vida útil del biosensor, se construyó un gráfico de control en el que se representaron los valores medios de tres medidas, efectuadas diariamente, correspondientes a disoluciones diferentes de peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Una vez realizadas las medidas de control, el mismo electrodo se utilizó para los experimentos necesarios durante la jornada de trabajo y, al final de la misma, se almacenó en seco a 4°C .

Para determinar el valor central, y los límites superior e inferior del gráfico de control se tomó como periodo base las medidas de las señales amperométricas obtenidas en el estudio de repetibilidad sin regeneración de la superficie electródica. Así, en el caso de las disoluciones acuosas de regulador fosfato, el valor central considerado es el valor medio del período base correspondiente ($0.66 \mu\text{A}$, Tabla 3), y los límites superior e inferior son $\bar{x}+3s$ ($0.84 \mu\text{A}$) y $\bar{x}-3s$ ($0.48 \mu\text{A}$) respectivamente. Cuando un valor medio de tres medidas realizadas en un mismo día está por debajo del límite de control inferior, se procede al pulido de la superficie electródica, recuperándose entonces la señal dentro de los límites de control. En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos durante un periodo de tiempo de 70 días.

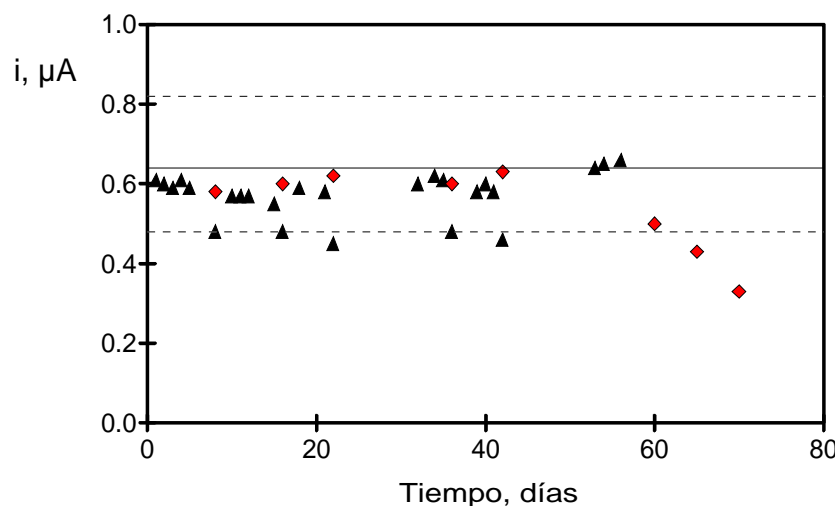


Figura 16. Gráfico de control para la dependencia de la corriente en estado estacionario con el tiempo de un electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferroceno. Los puntos que se muestran son la media de tres medidas de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. (♦) Sin pulir, (◆) después de pulir.

Como puede observarse, la señal amperométrica permanece prácticamente constante entre 3 y 5 días sin necesidad de regeneración de la superficie electródica. También se aprecia como un período de almacenamiento del biosensor de 10 días no produce ninguna disminución de su capacidad de respuesta, lo que indica que la actividad enzimática no se ve afectada por dicho período de almacenamiento. Sin embargo, a partir de aproximadamente 60 días se observa una disminución progresiva de la respuesta que no pudo recuperarse por pulido de la superficie del electrodo. Este hecho puede atribuirse a dos causas. Una es que el pulido repetido del electrodo haga que el grosor de la pastilla llegue a ser demasiado fino; otra razón puede ser el cambio de temperatura que sufre diariamente el biosensor al pasar de la temperatura de almacenamiento ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) a la temperatura de trabajo y viceversa, lo que puede dar lugar a una pérdida de la actividad enzimática. Esta última causa parece ser la más probable, ya que en el estudio de repetibilidad de las medidas tras regenerar la superficie del electrodo, el número de pulidos que se realizó sin pérdida de señal analítica fue de diez, mientras que, como puede apreciarse en la Figura 15, tan solo se realizaron 7 pulidos tras más de 60 días de trabajo.

Este período de vida útil del biosensor de aproximadamente 60 días es, como cabía esperar, idéntico al que se observa en los demás medios predominantemente acuosos.

Por lo que se refiere al electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro, utilizado en las micelas inversas, un estudio similar al comentado anteriormente permitió construir el gráfico de control que se muestra en la Figura 17. Ahora, el valor central corresponde al valor medio del período base ($2.25 \text{ } \mu\text{A}$), y los límites superior e inferior se toman de nuevo como $\bar{x}+3s$ y $\bar{x}-3s$, respectivamente.

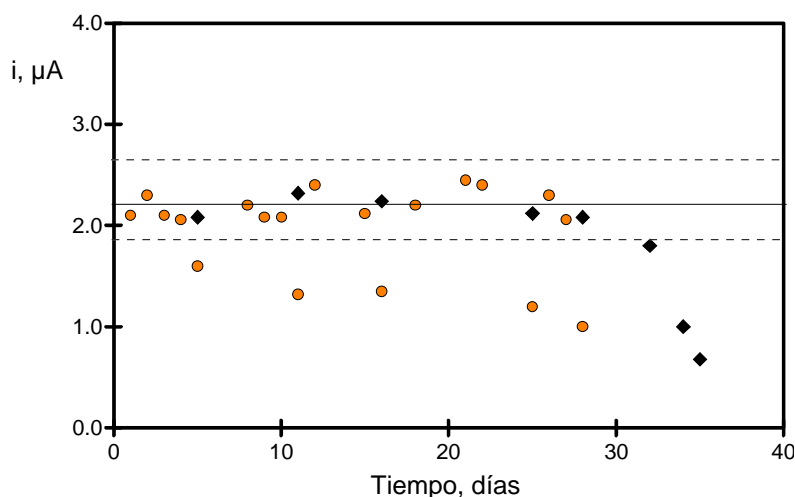


Figura 17. Gráfico de control para la dependencia de la corriente en estado estacionario con el tiempo de un electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro. Los puntos que se muestran son la media de tres medidas realizadas para H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en micelas inversas formadas por un 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) y 0.1 mol l^{-1} de AOT en acetato de etilo. $E_{ap} = +0.1 \text{ V}$. (●) Sin pulir, (◆) después de pulir.

Puede observarse como en este caso un mismo electrodo puede utilizarse regularmente durante aproximadamente 1 mes, debiendo regenerarse la superficie por pulido en ese período de tiempo 5 ó 6 veces.

El hecho de que el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro presente un menor tiempo de vida útil que el biosensor en medio acuoso, parece indicar que el medio de trabajo afecta en mayor medida ahora a la estabilidad de la enzima.

III.5.4.4. REPRODUCIBILIDAD EN LA FABRICACIÓN DE LOS ELECTRODOS

Cuando la señal amperométrica no puede recuperarse por pulido, es necesario sustituir el electrodo por uno nuevo. Por lo tanto, la reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes electrodos, fabricados tanto a partir de la misma pastilla madre como a partir de diferentes pastillas, es un aspecto esencial a evaluar con objeto de asegurar la utilidad práctica de los biosensores desarrollados. En la Tabla 5 se muestran los valores de las medidas amperométricas realizadas para una concentración de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ con diferentes electrodos, algunos de ellos contruidos a partir de la misma pastilla y otros preparados a partir de pastillas distintas. En todos los casos se realizaron tres medidas en diferentes disoluciones con cada uno de los electrodos y los intervalos de confianza se han calculado a un nivel de significación de 0.05

Tabla 5. Reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos compósitos de grafito-Teflón-HRP-ferroceno (medio acuoso) y grafito-Teflón-HRP-Ferrocianuro (micelas inversas) fabricados a partir de la misma pastilla y de pastillas diferentes. Se llevaron a acabo tres medidas de la corriente en estado estacionario de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4 ($E_{ap} = 0.0 \text{ V}$) y micelas inversas (4 % disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) y AOT 0.1 mol l^{-1} en acetato de etilo) ($E_{ap} = +0.10 \text{ V}$), respectivamente.

Medio	Pastilla	Electrodo	i , μA	i , μA	RSD, %
-------	----------	-----------	---------------------	---------------------	--------

Disolución reguladora de fosfato	1	1	0.65	0.66 ± 0.05	6.1
		2	0.72		
	2	1	0.69		
		2	0.64		
	3	1	0.62		
		2	0.64		
Micelas inversas	1	1	2.67	2.5 ± 0.1	6.5
		2	2.41		
		3	2.43		
	2	1	2.37		
	3	1	2.49		

Como puede observarse, tanto en el medio acuoso como en las micelas inversas, los valores de la desviación estándar relativa permiten concluir que el procedimiento de fabricación de los biosensores enzimáticos compósitos es reproducible y fiable, permitiendo obtener respuestas electroanalíticas reproducibles con diferentes electrodos construidos de la misma forma. Señalar además que los electrodos utilizados en este estudio son los mismos que se han empleado para realizar las medidas que dieron lugar a todos los resultados que se recogen en esta Memoria.

III.5.4.5. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LA PASTILLA MADRE

El último estudio de estabilidad realizado fue comprobar el efecto de un período de tiempo prolongado de almacenamiento en seco a 4 °C de la pastilla a partir de la cual se construyen los electrodos, sobre la actividad del electrodo enzimático. En el caso de los electrodos de grafito-Teflón-HRP-ferroceno se comprobó que se obtuvieron señales reproducibles y similares a las mostradas en la Tabla 5 con electrodos fabricados después de 7 meses de almacenamiento de la pastilla compósita en las condiciones mencionadas. En el caso de los biosensores de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro, se observó así mismo que después de cuatro meses de almacenamiento (período máximo ensayado), se obtuvieron señales amperométricas reproducibles con electrodos fabricados a partir de la pastilla almacenada, cuando se compararon con las proporcionadas por otros electrodos construidos cuatro meses antes.

Esta buena estabilidad de las pastillas compósitas con el tiempo de almacenamiento demuestra que no existe pérdida significativa de la actividad de la enzima inmovilizada en la

matriz electródica, lo que demuestra a su vez, la bondad del método empleado para llevar a cabo dicha inmovilización.

Todos estos estudios ilustran claramente la estabilidad y robustez de los biosensores compósitos desarrollados.

III.5.5. ESTUDIO CINÉTICO DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA

La característica cinética más destacable de las reacciones catalizadas por enzimas es que muestran *saturación* (Cornish-Bowden y Wharton, 1988). Prácticamente todas las reacciones catalizadas por enzimas presentan una dependencia de primer orden de la velocidad de reacción con respecto al sustrato a concentraciones bajas, alcanzándose un límite en el que la velocidad no depende de la concentración y, por lo tanto, la reacción pasa a ser de orden cero con respecto al sustrato. Si la reacción enzimática involucra un solo sustrato, se puede formular de forma general como :



A partir de este mecanismo, y para una concentración de enzima fija, la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten :

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

donde V_m es la velocidad máxima de reacción y K_m es la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima. Desde un punto de vista analítico, cuanto más alta es la constante de Michaelis-Menten menor es la sensibilidad del método, pero mayor es el intervalo de linealidad. Por todo ello, un aspecto importante a tener en cuenta cuando se desarrollan electrodos enzimáticos es el conocimiento de las variables cinéticas de la reacción enzimática que tiene lugar, con el fin de conocer la velocidad de dicha reacción así como el intervalo lineal que se puede obtener, siendo este último punto fundamental para la aplicación analítica de los

biosensores desarrollados.

III.5.5.1. CÁLCULO DE V_{\max} y K_m

Las constantes cinéticas se calcularon para dos sustratos diferentes : peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona, con muy diferente solubilidad en agua (el H_2O_2 es soluble, y el peróxido de 2-butanona es escasamente soluble). El cálculo de los parámetros cinéticos se realizó utilizando los datos de la intensidad de corriente medida en el estado estacionario, obtenidas con un electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno para adiciones sucesivas de 25 μl de una disolución patrón $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ de peróxido de hidrógeno en los medios predominantemente acuosos, y de 25 y 50 μl de peróxido de hidrógeno $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en las micelas inversas y las mezclas acetónitrilo :agua respectivamente, utilizando en estos casos el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro. Para el peróxido de 2-butanona, se realizaron adiciones de 50 μl de una disolución patrón $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ en los medios predominantemente acuosos, y de 10 y 50 μl de una disolución $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ para las micelas inversas y el medio acetónitrilo :agua, respectivamente. Todas las adiciones sucesivas se llevaron a cabo sobre un volumen de 5.0 ml de cada uno de los medios de trabajo, hasta no observar variación apreciable en la intensidad de corriente. En las Figuras 18 y 19 se muestra la variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario con la concentración de sustrato en los diferentes medios ensayados. En todos los casos se obtuvieron las curvas típicas de los sistemas enzimáticos.

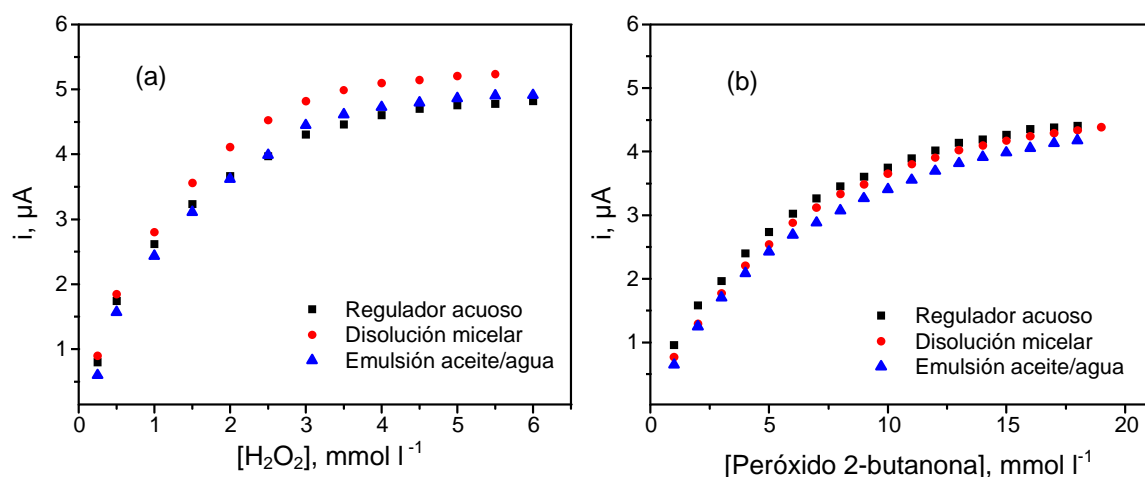


Figura 18 . Curvas de saturación de la enzima para adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno (a) y de peróxido de 2-butanona (b) en los medios acuoso y predominantemente acuosos.

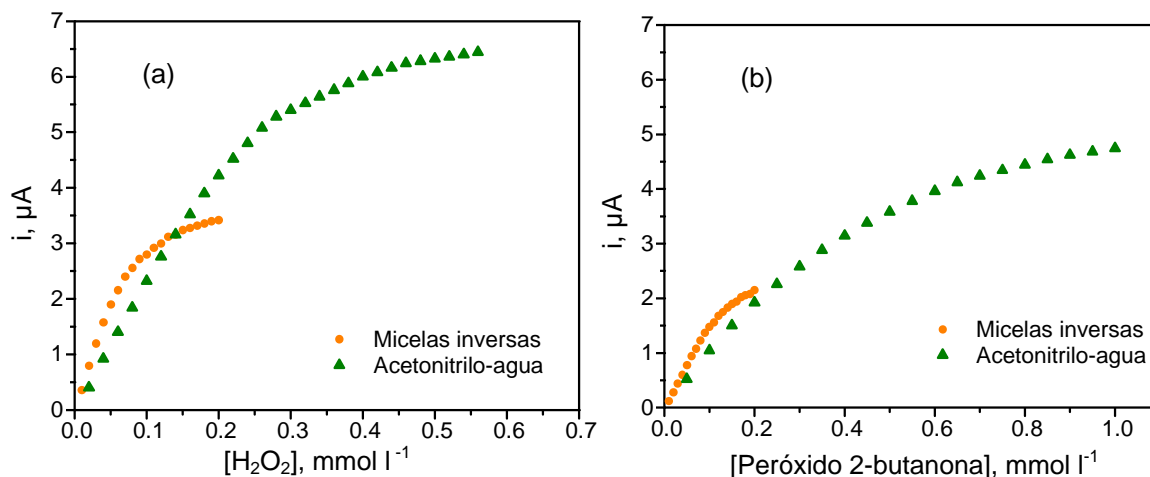


Figura 19 . Curvas de saturación de la enzima para adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno (a) y de peróxido de 2-butanona (b) en los medios predominantemente orgánicos.

Antes de calcular las constantes cinéticas, se verificó que las reacciones enzimáticas que tienen lugar con los dos sustratos obedecían a una cinética del tipo Michaelis-Menten. Para ello, se calculó el parámetro “x” de la ecuación de Hill (Iwuoha, Saenz de Villaverde et al., 1997), que da una medida del grado de desviación de una cinética de Michaelis-Menten. Dicha ecuación es :

$$\log \left(\frac{i_{\text{máx}}}{i} - 1 \right) = \log K_m' - x \log [\text{sustrato}]$$

La desviación de la unidad del valor de “x” indicará una desviación de la cinética típica de Michaelis-Menten. Los gráficos de Hill, en los que se representa $\log \left(\frac{i_{\text{máx}}}{i} - 1 \right)$ en función del logaritmo de la concentración de sustrato, se muestran en la Figura 20 para el peróxido de hidrógeno (a) y el peróxido de 2-butanona (b) en los medios acuoso y predominantemente acuosos, y en la figura 21 en los medios predominantemente no acuosos. Los valores de x (pendiente con signo cambiado, de los gráficos de Hill) obtenidos se recogen en la Tabla 6.

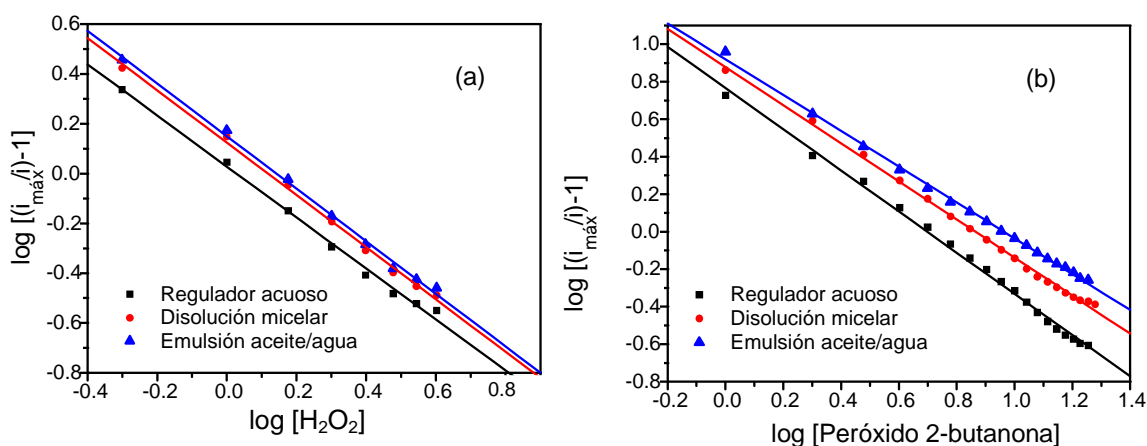


Figura 20. Gráficos de Hill para el H_2O_2 (a) y el peróxido de 2-butanona (b) obtenidos con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferroceno en los diferentes medios acuoso y predominantemente acuosos.

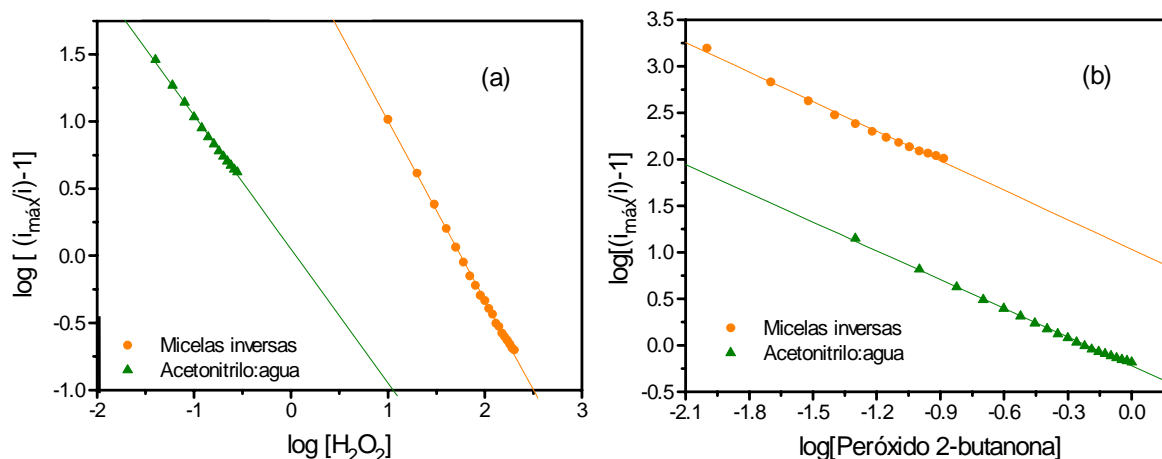


Figura 21 . Gráficos de Hill obtenidos para el peróxido de hidrógeno (a) y el peróxido de 2-butanona (b) en acetonitrilo : tampón Tris y en micelas inversas con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro.

Como puede apreciarse, los valores de “x” para los dos peróxidos en los 5 medios de trabajo ensayados son muy próximos a 1, indicando que, en todos los casos, la reacción de reducción de H_2O_2 y de peróxido de 2-butanona catalizada por la enzima HRP tiene una cinética típica de Michaelis-Menten. Por lo tanto, se procedió al cálculo de los parámetros cinéticos K_m y V_m mediante el método de Lineweaver-Burk, en el que se representa la inversa de la intensidad de corriente en el estado estacionario frente a la inversa de la concentración de sustrato. Se obtienen líneas rectas cuyo punto de corte con el eje de ordenadas proporciona la inversa de la velocidad máxima, mientras que el punto de corte con el eje de abscisas es la inversa de la constante de Michaelis-Menten cambiada de signo. En las figuras 22 y 23 se representan los gráficos obtenidos para los dos peróxidos en los cinco medios de trabajo. Estos gráficos se han construido a partir de los correspondientes valores inversos de los datos que aparecen en las figuras 18 y 19, respectivamente. Los valores de V_m y K_m calculados se recogen en la Tabla 6.

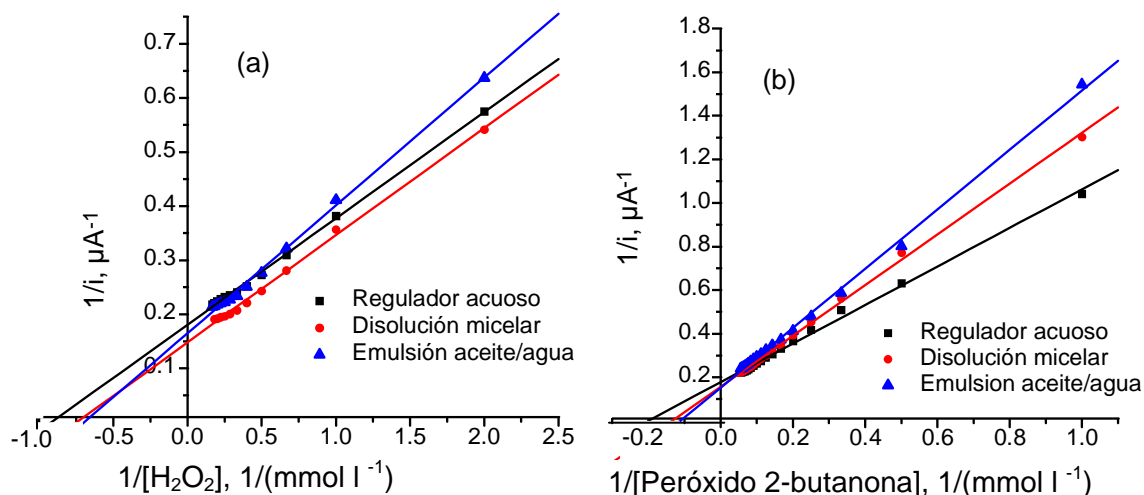


Figura 22. Representaciones de Lineweaver-Burk para (a) H_2O_2 y (b) peróxido de 2-butanona en los medios acuosos y predominantemente acuosos

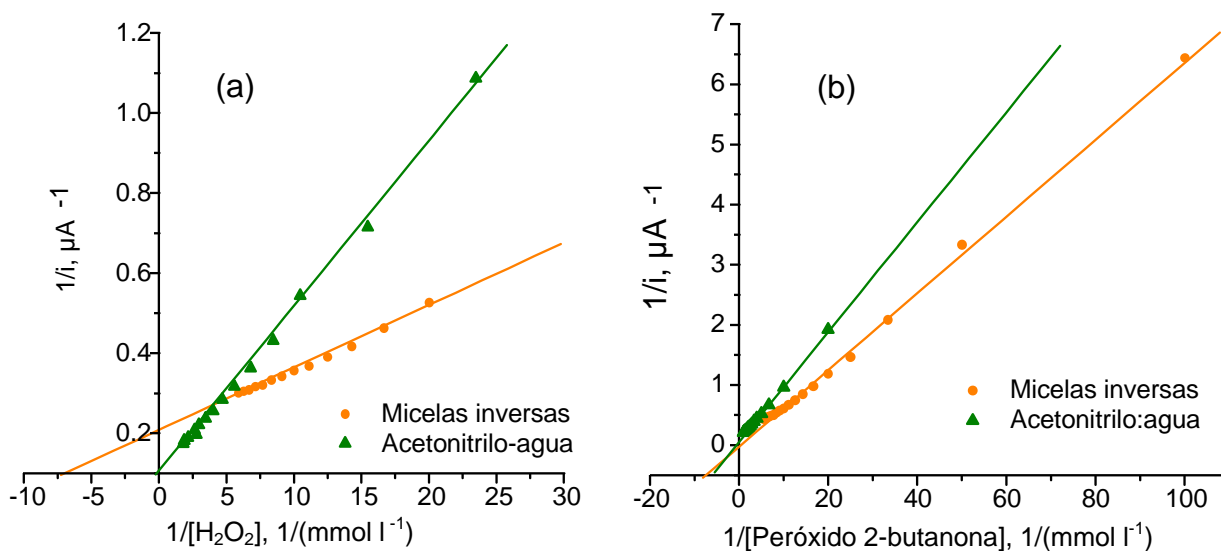


Figura 23. Representaciones de Lineweaver-Burk para H_2O_2 (a) y peróxido de 2-butanona (b) en los medios predominantemente orgánicos.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos con los electrodos de grafito-Teflón-HRP-ferroceno/ferrocianuro para peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona en: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4, disolución micelar formada con 0.1 % Triton X-100 en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4), emulsión aceite-agua formada por 0.1% Triton X-100 y 2% AcOEt en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4), mezcla acetonitrilo:tampón Tris 0.02 mol l^{-1} (pH 7.4) (90 :10), ($E_{ap}=0.00 \text{ V}$) y micelas inversas formadas por 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) y AOT 0.1 mol l^{-1} en acetato de etilo ($E_{ap}=+0.10 \text{ V}$).

Medio de trabajo	Peróxido de hidrógeno			Peróxido de 2-butanona		
	V_m , μA	K_m , mol l^{-1}	x	V_m , μA	K_m , mol l^{-1}	x

Disolución reguladora, pH 7.4	4.5	1.09×10^{-3}	0.995	3.7	4.97×10^{-3}	0.998
Disolución micelar de Triton X-100	5.0	1.14×10^{-3}	0.998	3.9	6.44×10^{-3}	1.000
Emulsión aceite/agua	4.7	1.23×10^{-3}	0.997	4.0	7.32×10^{-3}	0.999
CH ₃ CN :H ₂ O	8.7	0.19×10^{-3}	0.994	7.9	0.61×10^{-3}	0.998
Micelas inversas	4.1	0.04×10^{-3}	0.990	3.0	0.10×10^{-3}	1.057

Los valores de la V_m obtenidos en los medios predominantemente acuosos y no acuosos no son comparables entre sí, ya que se emplearon mediadores diferentes en la matriz electródica. Hay que recordar que la intensidad de corriente en el estado estacionario que se mide es debida a la reducción del mediador, por lo que, a mayor sensibilidad del mediador mayor V_m se va a obtener. Los valores de V_m para el H₂O₂ en los medios acuosos son muy similares, lo que indica que la velocidad de formación de los productos es prácticamente la misma en todos ellos ya que, como es conocido, la k_{cat} es proporcional a V_m ($k_{cat}=[E] V_m$). Un comportamiento similar se observa cuando se comparan los valores de V_m para el peróxido de 2-butanona. Si se comparan los valores de V_m obtenidos para H₂O₂ y el peróxido de 2-butanona, puede verse como son ligeramente inferiores para el peróxido orgánico en todos los casos, lo que indica, en principio, que la ruptura del complejo ES para formar los productos es más favorable para el H₂O₂.

En el caso de los medios predominantemente no acuosos, los valores de V_m para el H₂O₂ son ligeramente mayores que para el peróxido de 2-butanona, como ocurría en los medios predominantemente acuosos. Sin embargo, si se comparan los dos medios predominantemente no acuosos para un mismo peróxido, se observa que V_m es prácticamente la mitad en las micelas inversas que en la mezcla acetonitrilo/agua. Este comportamiento indica que la velocidad de disociación del complejo para formar los correspondientes productos, es más lenta en el medio de micelas inversas.

Por lo que se refiere a la constante aparente de Michaelis-Menten, la cual es proporcional a la constante de disociación (K_s) del complejo ES, sí que se puede comparar en todos los medios estudiados aunque se empleen diferentes mediadores, ya que su valor no depende de la intensidad de corriente medida, sino de la concentración del sustrato. Los valores de K_m obtenidos en los medios predominantemente acuosos para el H₂O₂ son muy similares, lo que indica que la formación del complejo ES es similar en los tres medios. Por lo que respecta al peróxido de 2-butanona, se obtiene una menor K_m en el medio formado con la disolución reguladora de fosfato, si bien la diferencia con los otros dos medios predominantemente acuosos no es suficientemente grande como para poder decir que la formación del complejo ES está más favorecida. Por lo que se refiere a los valores de K_m en los

medios predominantemente orgánicos, éstos son considerablemente menores que los obtenidos en los medios predominantemente acuosos, por lo que se puede decir que, especialmente en las micelas inversas, la formación del complejo ES se halla más favorecida.

III.5.5.2. VELOCIDAD DE REACCIÓN

Como ya se ha comentado, tanto la naturaleza del medio de trabajo, como el carácter polar o apolar del sustrato, influyen en el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario. Por ello, se evaluó la influencia que tienen dichos factores sobre la constante de la velocidad de la reacción catalizada por la enzima peroxidasa. En el apartado anterior, ha quedado demostrado que las reacciones del peróxido de hidrógeno y del peróxido de 2-butanona se ajustan a una cinética de Michaelis-Menten en todos los medios estudiados, por lo que se puede considerar que las reacciones son de pseudo primer orden. Por lo tanto, se puede calcular la velocidad de reacción a partir del valor de la pendiente obtenida en la representación del logaritmo neperiano de la intensidad de corriente ($\ln i$) frente al tiempo (Ennis y Buxton, 1998). Las experiencias se realizaron con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno tanto para el peróxido de hidrógeno (soluble en agua) como para el peróxido de 2-butanona (escasamente soluble en agua), en todos los medios sin tener en cuenta la solubilidad del mediador, con objeto de poder comparar realmente la influencia de la naturaleza del sustrato y del medio de medida. Evidentemente, los valores de las constantes de velocidad que se obtendrán son aparentes, dado que son específicas para el electrodo y los medios de trabajo empleados, pero suficientes para poder comparar los resultados.

En la figura 24 se muestra, a modo de ejemplo, la variación de la intensidad de corriente con el tiempo (a), y la representación del $\ln i$ frente al tiempo en el intervalo en el que se produce la subida de corriente (b), para una adición de 50 μl de una disolución 0.1 mol l^{-1} de peróxido de hidrógeno a 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4), aplicando un potencial constante de 0.00 V. En todos los demás medios de trabajo se obtuvieron representaciones similares. Para una mejor comparación visual de las constantes de velocidad obtenidas, se recogen en la figura 25 los valores calculados en forma de diagrama de barras.

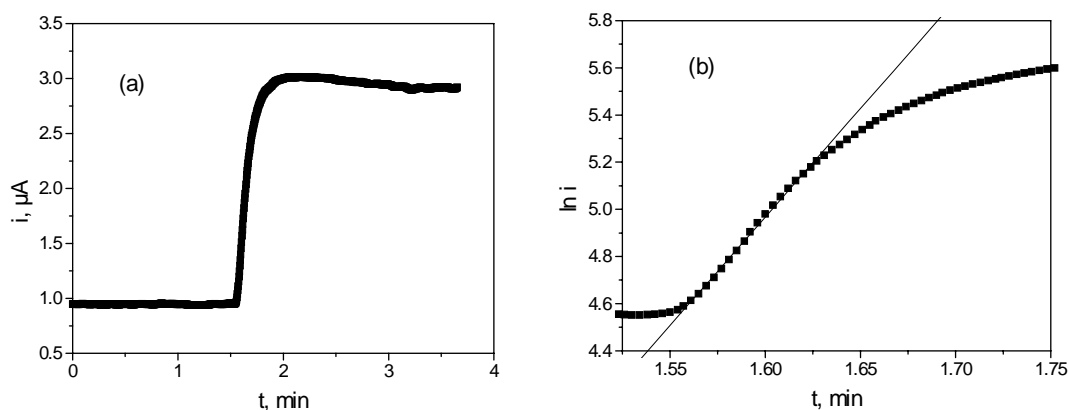


Figura 24. Variación de la intensidad de corriente (a) y del $\ln i$ (b) con el tiempo, tras la adición de $50 \mu\text{l}$ de una disolución de peróxido de hidrógeno 0.1 mol l^{-1} en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} . $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

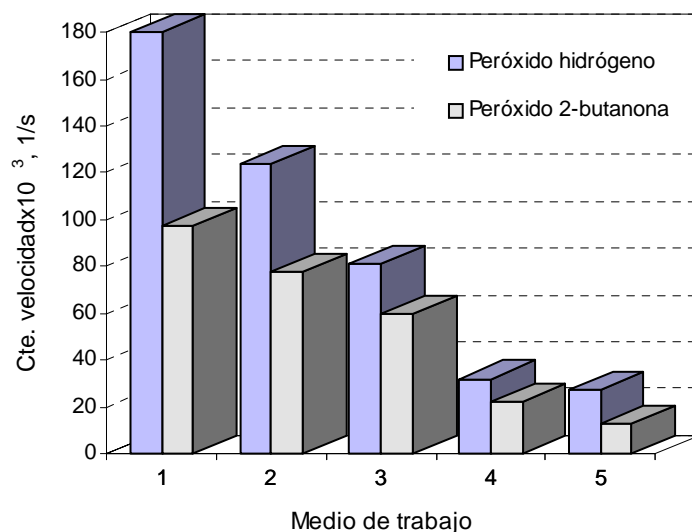


Figura 25. Comparación de las constantes de velocidad obtenidas para el peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ para cada uno de ellos en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (1), disolución micelar formada con Triton X-100 0.1 % (2), emulsión aceite-agua formada por 0.1 % de Tritón X-100 y 2 % de acetato de etilo (3), mezcla hidroorgánica de acetonitrilo (90 %) y disolución reguladora Tris 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4) (4) y micelas inversas formadas por un 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) y 0.1 mol l^{-1} de AOT en acetato de etilo (5) con un electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferroceno. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

El peróxido de hidrógeno presenta mayor velocidad de reacción en todos los medios, y es en los medios predominantemente orgánicos donde ambos sustratos tienen constantes de velocidad menores. Esto parece lógico desde el punto de vista de la solubilidad, ya que se trata

de un sustrato soluble en agua, pero es destacable el hecho de que incluso en los medios orgánicos presente velocidades mayores que el peróxido de 2-butanona. La razón de este comportamiento es atribuible a que se establece una constante de reparto del analito entre las dos fases que forman el medio de medida y que influye de forma decisiva sobre la cinética de la reacción enzimática. Ésta tiene lugar siempre en el microdominio acuoso y, por tanto, los sustratos deben alcanzar dichos microdominios. Evidentemente, en nuestro caso, siempre tendrá más tendencia a pasar al medio acuoso el peróxido de hidrógeno que el peróxido de 2-butanona, lo que se traduce en mayores velocidades de reacción.

Al establecerse un coeficiente de reparto entre los microdominios acuoso y orgánico, es lógico pensar que cuanto menos tendencia tenga el sustrato a pasar a la fase acuosa, más lenta será la respuesta y la velocidad de reacción y, por ello, el peróxido de 2-butanona presenta una menor velocidad en micelas inversas que en la mezcla homogénea acetonitrilo :agua. Además, en las micelas inversas hay que considerar que la barrera que forman las moléculas de tensoactivo alrededor de las microgotículas de agua dificulta el transporte de los sustratos, por lo que se obtienen constantes de velocidad aparentes menores.

III.5.6. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

En las condiciones experimentales elegidas se obtuvieron las curvas de calibrado para

el peróxido de hidrógeno y el peróxido de 2-butanona que se muestran en las Figuras 26 y 27.

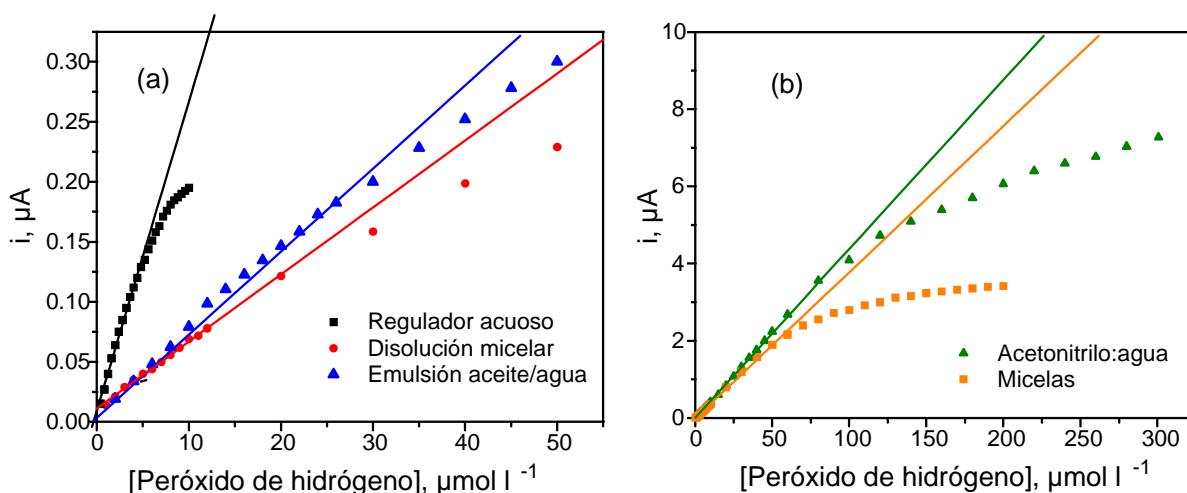


Figura 26. Curvas de calibrado para peróxido de hidrógeno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4), disolución micelar de Tritón X-100 0.1 %; medio emulsionado aceite-agua con 0.1 % de Tritón X-100 y 2 % de acetato de etilo en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) (a); y medio acetonitrilo:agua 90:10 (disolución Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4) y micelas inversas formadas por un 4% de disolución reguladora fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) como fase dispersa y 0.1 mol l^{-1} de AOT como agente emulsificante en acetato de etilo como fase continua (b).

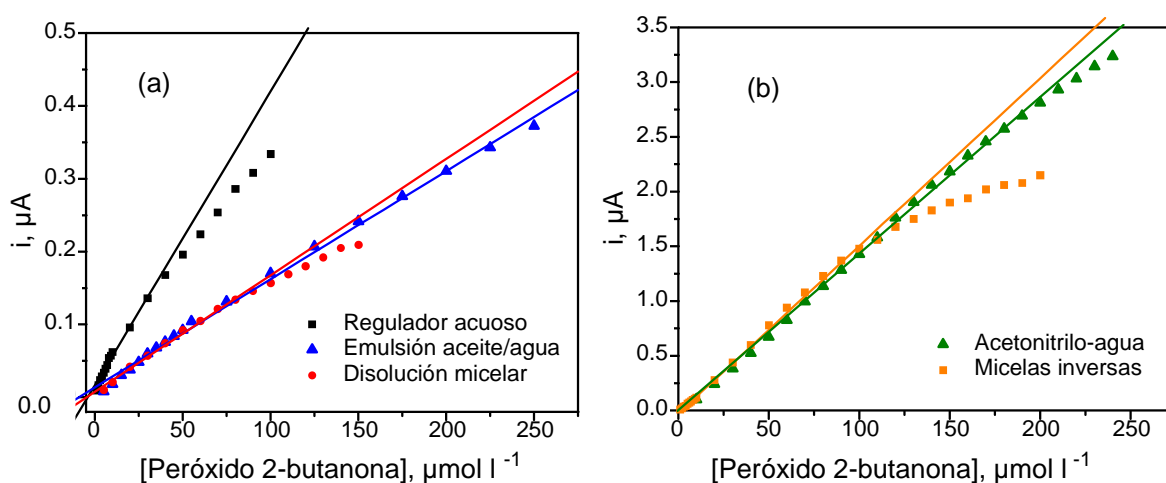


Figura 27. Curvas de calibrado para peróxido de 2-butanona en medios predominantemente acuosos (a) y predominantemente orgánicos (b). Ver texto de Figura 26.

El intervalo lineal de dichos calibrados se ha determinado considerando que no hay pérdida de linealidad cuando el coeficiente de correlación es mayor de 0.998. En la Tabla 7 se recogen las características de los calibrados para ambos peróxidos, en cada uno de los medios estudiados. Los intervalos de confianza se calcularon para un nivel de significación de 0.05.

Tabla 7. Intervalos de linealidad, pendientes y ordenadas en el origen de los calibrados obtenidos para peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona en los medios estudiados con un electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferroceno para los medios predominantemente acuosos y de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro para el medio acetonitrilo/agua y las micelas inversas.

Medio	Intervalo linealidad mol l ⁻¹	Pendiente μA/mol l ⁻¹	Ordenada en el origen, μA	r
Peróxido de hidrógeno				
Regulador fosfato	(0.4-3.6)x10 ⁻⁶	(2.8 ± 0.1)x10 ⁴	(6 ± 1)x10 ⁻³	0.998
Disolución micelar	(1.0-20)x10 ⁻⁶	(0.56 ± 0.09)x10 ⁴	(11.0 ± 0.8)x10 ⁻³	0.998
Emulsión aceite-agua	(2.0-26)x10 ⁻⁶	(0.69 ± 0.01)x10 ⁴	(9 ± 2)x10 ⁻³	0.998
CH ₃ CN :H ₂ O	(0.5-100)x10 ⁻⁶	(4.4 ± 0.1)x10 ⁴	-0.020 ± 0.001	0.999
Micelas inversas	(0.5-60)x10 ⁻⁶	(3.9± 0.1)x10 ⁴	0.01 ± 0.04	0.998
Peróxido de 2-butanona				
Regulador fosfato	(1.0-40)x10 ⁻⁶	(0.57 ± 0.01)x10 ⁴	(5.0 ± 0.5)x10 ⁻³	0.998
Disolución micelar	(5.0-80)x10 ⁻⁶	(0.16 ± 0.04)x10 ⁴	(6 ± 2)x10 ⁻³	0.998
Emulsión aceite-agua	(5.0-125)x10 ⁻⁶	(0.165 ± 0.003)x10 ⁴	(6 ± 2)x10 ⁻³	0.998
CH ₃ CN :H ₂ O	(1.0-200)x10 ⁻⁶	(1.90± 0.02)x10 ⁴	(-9 ± 3)x10 ⁻³	0.999
Micelas inversas	(1.0-100)x10 ⁻⁶	(1.5± 0.1)x10 ⁴	(-10 ± 10)x10 ⁻³	0.998

Como cabía esperar teniendo en cuenta los parámetros cinéticos calculados en el apartado III.5.5.1., los intervalos de linealidad son mayores para el peróxido de 2-butanona que para el peróxido de hidrógeno, ya que los valores de K_m para el peróxido orgánico eran mayores en todos los medios de trabajo. Ello supone también, que los valores de las pendientes, y por tanto de la sensibilidad, sean menores para el peróxido de 2-butanona. La comparación de las pendientes entre los medios predominantemente acuosos y los medios predominantemente no acuosos también resulta lógica, puesto que el mediador empleado en los medios predominantemente orgánicos, ferrocianuro, es más sensible que el ferroceno utilizado en los medios predominantemente acuosos. Conviene destacar que, a pesar de los menores valores de K_m obtenidos en los medios predominantemente orgánicos, los intervalos lineales son mayores. Esto pone de manifiesto que el medio de trabajo influye decisivamente en la cinética de la reacción enzimática.

En la Tabla 8 aparecen las características analíticas de los métodos para la determinación de peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona en los distintos medios de trabajo. Como criterio para estimar el límite de determinación se ha utilizado el sugerido por la IUPAC (ACS Committee in Environmental Improvement : Principles of Environmental Analysis", 1983), 10 s, donde "s" es la desviación estándar, en concentración, obtenida para el blanco. Como estimador del valor de "s" se tomó la desviación estándar de las señales obtenidas para 10 disoluciones distintas de los sustratos a una concentración igual o próxima a la

concentración más baja medida en el calibrado. Dichas concentraciones aparecen reseñadas en la Tabla 8, así como los valores correspondientes de la desviación estándar relativa.

Por lo que respecta al límite de detección, se ha calculado de acuerdo con el criterio $3s_b/m$ (Hasebe y Osteryoung, 1975) donde “m” es la pendiente del intervalo lineal del calibrado que aparece en la Tabla 7 y “ s_b ” es la desviación estándar del blanco en intensidad de corriente. Al igual que para el límite de determinación se tomó como estimador de “ s_b ” la desviación estándar de las señales de 10 disoluciones de cada uno de los sustratos en las concentraciones antes mencionadas.

Tabla 8. Características analíticas de los métodos para la determinación de peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona empleando el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferroceno ($E_{ap}=0.00$ V) en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} , (pH 7.4), disoluciones micelares formadas con Triton X-100 y en emulsiones aceite/agua y con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro ($E_{ap}=+0.10$ V) en mezcla acetonitrilo :agua y en las micelas inversas.

Medio	Concentración mol l^{-1}	RSD, %	Límite determinación, mol l^{-1}	Límite detección, mol l^{-1}
Peróxido de hidrógeno				
Disolución reguladora	1.0×10^{-6}	6.1	6.1×10^{-7}	1.8×10^{-7}
Disolución micelar	1.0×10^{-6}	9.6	1.4×10^{-6}	4.3×10^{-7}
Emulsión aceite-agua	2.0×10^{-6}	9.5	2.3×10^{-6}	7.0×10^{-7}
$\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$	1.0×10^{-6}	6.3	6.6×10^{-7}	1.9×10^{-7}
Micelas inversas	1.0×10^{-6}	7.1	7.1×10^{-7}	2.1×10^{-7}
Peróxido de 2-butanona				
Disolución reguladora	1.0×10^{-6}	7.5	1.6×10^{-6}	4.7×10^{-7}
Disolución micelar	5.0×10^{-6}	8.7	8.5×10^{-6}	2.5×10^{-6}
Emulsión aceite-agua	5.0×10^{-6}	8.9	6.1×10^{-6}	1.8×10^{-6}
$\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$	1.0×10^{-6}	7.7	8.0×10^{-7}	2.5×10^{-7}
Micelas inversas	1.0×10^{-6}	7.5	1.1×10^{-6}	3.5×10^{-7}

Los valores de los límites de detección y determinación obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno para los medios predominantemente acuosos, y con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro para los orgánicos, presentan, como era de esperar, la misma tendencia que la sensibilidad de los calibrados. Así, el límite de detección menor se obtuvo para el peróxido de hidrógeno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4), si bien es muy similar al valor obtenido con el biosensor compuesto en medios predominantemente orgánicos, como la mezcla acetonitrilo :agua o las micelas inversas.

Una vez más se pone de manifiesto la importancia que tiene la solubilidad del sustrato empleado en el medio de trabajo sobre las características analíticas del método. Como ya se ha comentado, el comportamiento de los electrodos compósitos enzimáticos depende fuertemente de este hecho, junto con la evidencia de que la enzima no reacciona de la misma manera con cada sustrato independientemente del medio en el que se produzca la reacción. Esto hace que los límites de detección sean mejores para el peróxido de hidrógeno incluso en los medios orgánicos.

Las características analíticas que aparecen en la Tabla 8 son comparables, e incluso mejores en muchas ocasiones con las que aparecen en la bibliografía. Esto es especialmente cierto cuando se comparan los intervalos de linealidad de los calibrados y los valores de los límites de detección para peróxido 2-butanona. Si la comparación se efectúa solamente con electrodos de peroxidasa en fase orgánica (Ruzgas, et al., 1996), los límites de detección obtenidos con el electrodo enzimático compósito de grafito y Teflón, tanto para peróxido de hidrógeno como peróxido de 2-butanona, son considerablemente mejores que los reportados previamente.

III.5.7. INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

El uso de biosensores electroquímicos como detectores en sistemas en flujo presenta varias ventajas: permite una alta velocidad de muestreo, requiere pequeños volúmenes de

muestra, permite una fácil automatización de los sistemas y, fundamentalmente, el empleo de la detección amperométrica unido a la especificidad intrínseca de las biomoléculas inmovilizadas proporciona una alta selectividad y sensibilidad. La rápida respuesta que los biosensores compósitos exhiben frente a los cambios en la concentración de los peróxidos estudiados en discontinuo en todos los medios de trabajo, sugirió la posibilidad de emplear los electrodos biocompósito en sistemas de inyección en flujo como detectores amperométricos.

En los siguientes apartados se recogen los estudios sistemáticos realizados de las distintas variables experimentales que, en las condiciones de trabajo FIA, afectan a la respuesta amperométrica que se obtiene con el electrodo compósito de grafito-teflón-HRP-ferroceno en los medios predominantemente acuosos y con el electrodo de grafito-teflón-HRP-ferrocianuro en los no acuosos. En todos los casos se utilizó peróxido de hidrógeno como sustrato, así como la célula de flujo del tipo "wall-jet" de gran volumen mencionada en la Parte Experimental (Figura 1). Como disoluciones portadoras se emplearon algunos de los medios de trabajo estudiados.

III.5.7.1. INFLUENCIA DEL POTENCIAL APLICADO SOBRE SEÑAL AMPEROMÉTRICA.

La influencia del potencial aplicado al electrodo compósito de grafito-Teflón-HRP-ferroceno sobre la intensidad del pico FIA, se evaluó inyectando volúmenes de 100 μl de peróxido de hidrógeno $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, utilizando como disolución portadora el regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 y un caudal de 1.0 ml min^{-1} . El intervalo de potenciales ensayado fue de -0.15 V a 0.30 V. En la Figura 28 se representan los valores de la intensidad de pico (i_p) en función del potencial aplicado.

Como puede observarse, la corriente aumentó rápidamente entre 0.30 y 0.10 V, para no variar significativamente entre este valor y -0.1 V. Nuevamente se observa, de forma más pronunciada que en el mismo estudio en discontinuo, que la señal analítica disminuyó a potenciales más negativos de -0.10 V, como consecuencia de la reducción electródica del H_2O_2 a dichos potenciales. El hecho de que no existan diferencias significativas en el comportamiento observado a dichos potenciales en discontinuo y en flujo, permite suponer que tampoco existirán en los demás medios de trabajo. Por ello, se eligió el mismo potencial aplicado, es decir **0.00 V**, en todos ellos, excepto en las micelas inversas, que fue +0.10 V, para llevar a cabo los estudios posteriores.

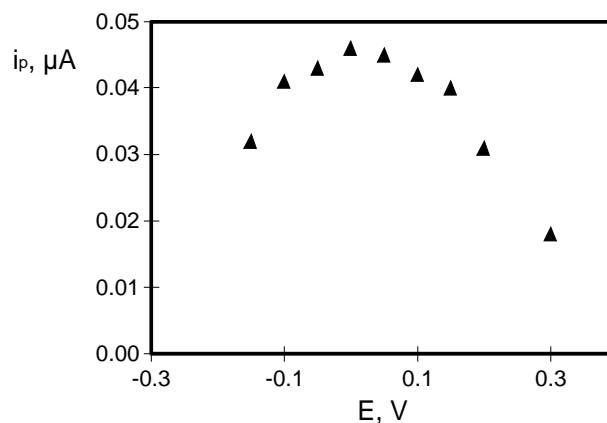


Figura 28. Efecto del potencial aplicado al electrodo de grafito-teflón-HRP-ferroceno sobre la intensidad de pico FIA. Portador: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} . Concentración de peróxido de hidrógeno: $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Caudal= 0.93 ml min^{-1} . $V_r = 150 \mu\text{l}$.

III.5.7.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE INYECCIÓN EN FLUJO.

III.5.7.2.1. Caudal

Se evaluó la influencia del caudal de la disolución portadora sobre los parámetros característicos del fiagrama (intensidad de pico, i_p ; tiempo de residencia, T ; tiempo de aparición, t_a y anchura de pico a la semialtura, $W_{1/2}$) para un nivel de concentración de peróxido de hidrógeno $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

La disolución portadora fue una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, se inyectaron volúmenes de $150 \mu\text{l}$ y se aplicó un potencial de 0.00 V . Los resultados se representan en la Figura 29.

Como se puede observar, la altura del pico del fiagrama disminuye al aumentar el caudal de la disolución portadora. Este comportamiento es característico de los sistemas FIA en los que se emplean biosensores enzimáticos como detectores, y es opuesto al que se observa en los sistemas FIA con detección convencional en los que un aumento del caudal provoca un aumento en la altura del pico. El comportamiento observado puede atribuirse a la necesidad de un paso suficientemente lento del volumen de muestra que la reacción enzimática se de en toda su extensión.

Un aumento en el caudal hace que la reacción enzimática se produzca en una menor extensión y, por tanto, la especie monitorizada, que es un producto de la reacción enzimática, tiene una menor concentración, obteniéndose como consecuencia una menor intensidad del pico en el fiagrama.

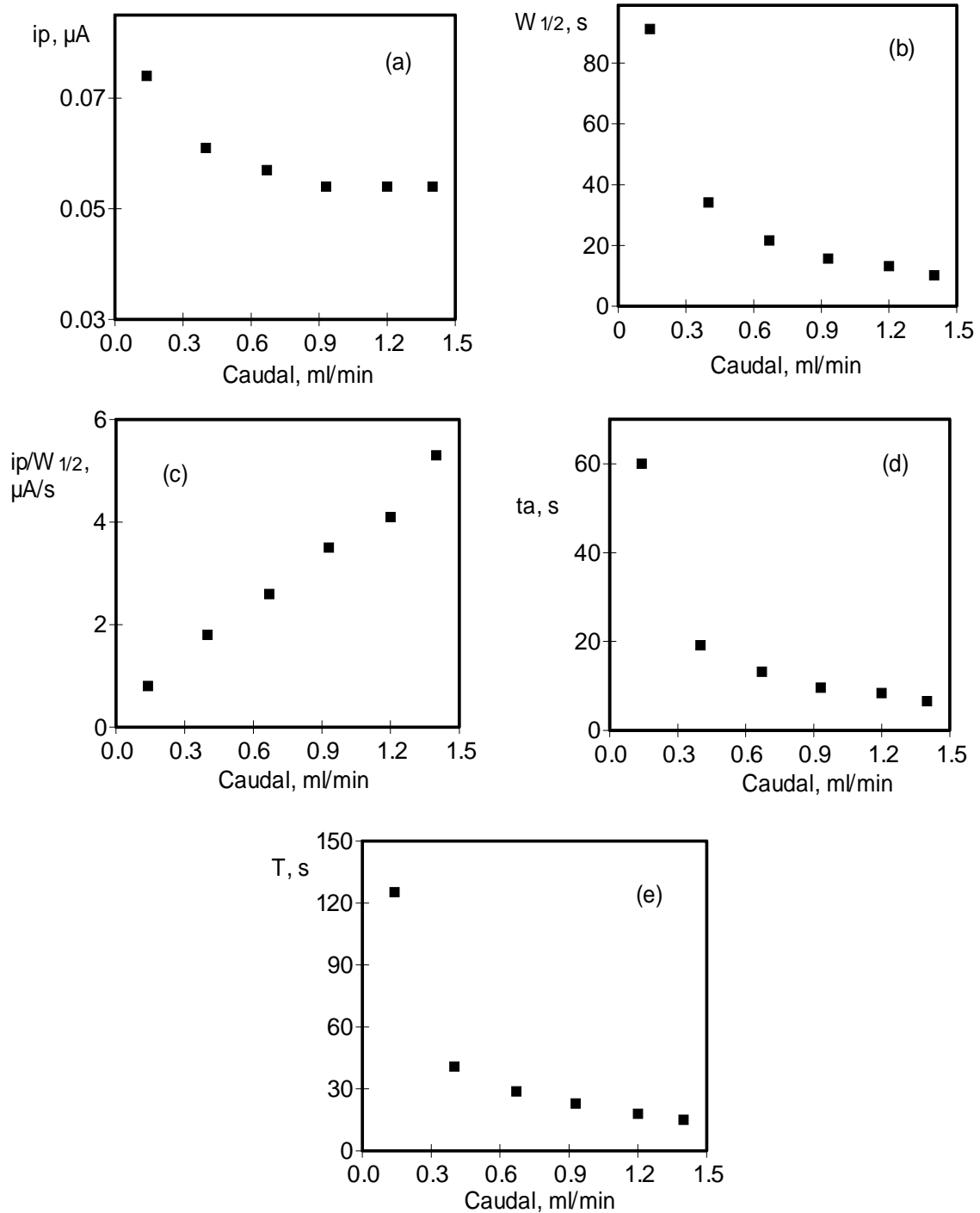


Figura 29. Influencia del caudal sobre i_p (intensidad de pico) (a), $W_{1/2}$ (anchura de pico a semialtura) (b), $i_p/W_{1/2}$ (c), t_a (tiempo de aparición del pico) (d) y T (tiempo de residencia) (e), obtenidos con un electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno como detector amperométrico. H_2O_2 1.0×10^{-4} mol l^{-1} ; portador: regulador de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap}=0.00$ V. $V_{iny}=150$ μl .

Por otra parte, como era de esperar, la anchura de pico aumentó a medida que el caudal disminuía. Esto hace que la relación entre intensidad de pico y anchura de pico a media altura presente una variación lineal con el caudal. Por otra parte, tanto el tiempo de residencia (T), como el tiempo de aparición (t_a) disminuían al aumentar la velocidad del portador.

Teniendo en cuenta estos factores se eligió un caudal de 0.93 ml min^{-1} , para el cual se obtenía una buena altura de pico y prácticamente no había variación de la anchura de pico para caudales próximos. Así mismo, el tiempo de residencia y el tiempo de aparición son prácticamente mínimos con este caudal. En el resto de medios de trabajo, el comportamiento de las señales con la variación del caudal resultó ser similar, por lo que se eligió el mismo valor. Únicamente se observó alguna diferencia en el tiempo de residencia, que en los medios orgánicos resultó ser algo mayor que en los medios acuosos.

III.5.7.2.2. Volumen de inyección

Se estudió la influencia del volumen de inyección sobre los parámetros característicos del diagrama obtenido con el electrodo de grafito-teflón-HRP-ferroceno. Un aumento en el volumen de inyección supone que la enzima va a estar en contacto con una mayor cantidad de sustrato, lo que aumenta la altura del pico, pero también la anchura y el tiempo de aparición y de residencia, por lo que debe llegarse a una situación de compromiso entre las diferentes variables hidrodinámicas. Las condiciones experimentales de trabajo son las descritas en el apartado anterior. Los resultados obtenidos se se representan en la Figura 30.

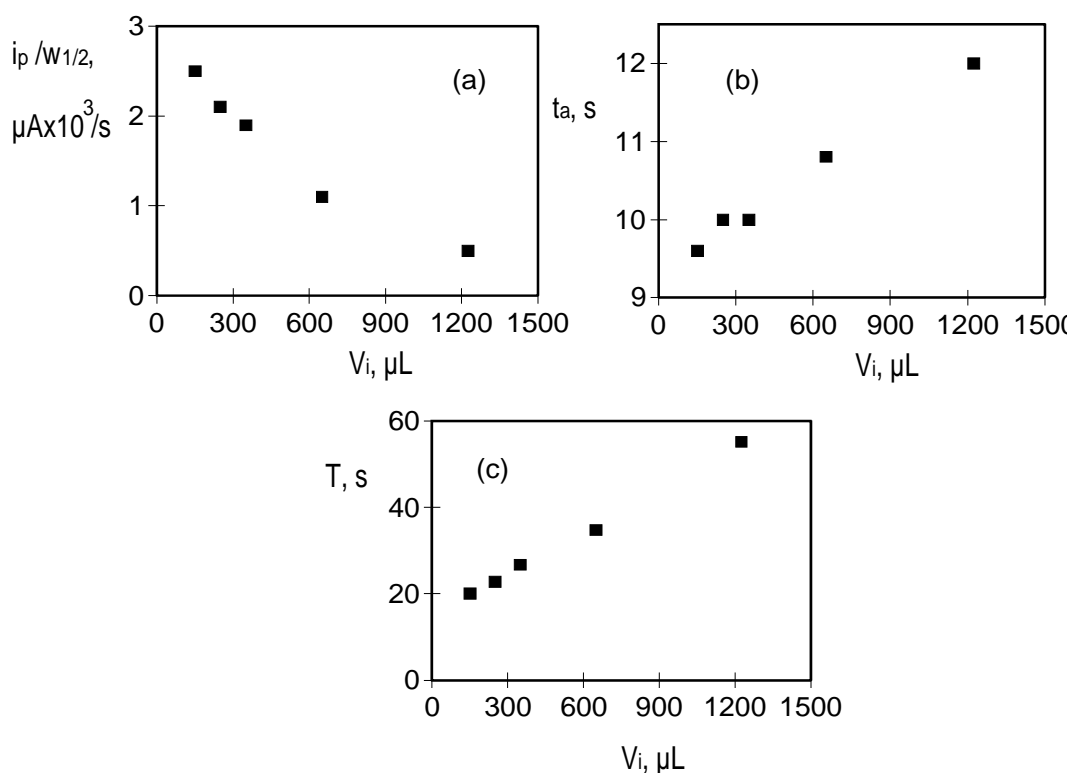


Figura 30. Influencia del volumen de inyección sobre la relación $i_p/W_{1/2}$ (intensidad de pico/anchura a la semialtura (a), t_a (tiempo de aparición) (b) y T (tiempo de residencia) (c). Caudal= 0.93 ml min^{-1} . Otras condiciones como en la Figura 29.

La mayor relación $i_p / W_{1/2}$ fue el parámetro empleado para escoger el volumen de inyección. Como se puede apreciar dicha relación es máxima para un volumen de inyección de **150 μl** , por lo que se eligió para estudios posteriores. Además, para este volumen de inyección tanto t_a como T tienen el menor valor, por lo que es posible realizar un mayor número de inyecciones por unidad de tiempo.

III.5.7.3. REPETIBILIDAD DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS

Empleando las condiciones experimentales elegidas en el apartado anterior, se procedió a evaluar la repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas mediante inyección en flujo. Para ello se realizaron series 15 inyecciones sucesivas de 150 μl de peróxido de hidrógeno $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en los diferentes medios utilizados como disoluciones portadoras (Figura 31): disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 (a), disolución micelar de Tritón X-100 0.1 % (b); emulsiones aceite-agua formadas con 0.1 % de Tritón X-100 y 2 % de acetato de etilo en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) (c); mezcla acetonitrilo:agua en proporción 90:10 (disolución Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4) (d) y micelas inversas formadas por un 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) como fase dispersa y 0.1 mol l^{-1} de AOT como agente emulsificante en acetato de etilo como fase continua (e). En la misma figura 31 se incluyen los valores de la desviación estándar relativa obtenidos en cada uno de los medios de trabajo.

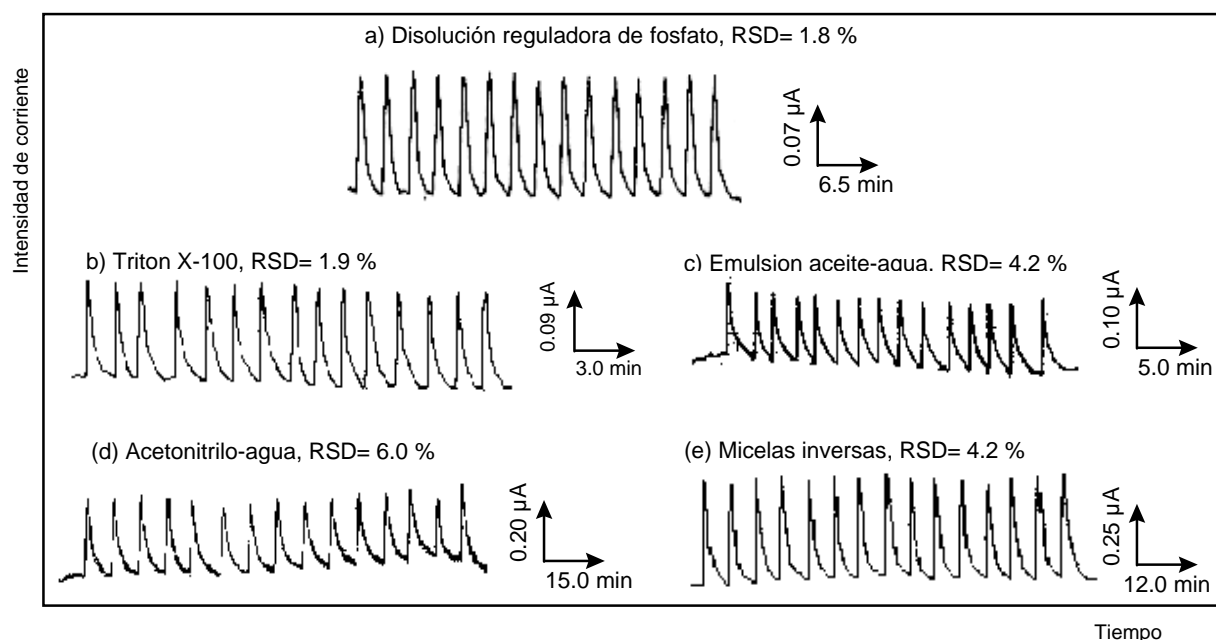


Figura 31. Diagramas correspondientes a 15 inyecciones sucesivas de H_2O_2 a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ obtenidos con los electrodos de grafito-Teflón-HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) (a), disolución micelar de Tritón X-100 0.1 % (b) y medio emulsión aceite-agua (c) y con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro en medio acetonitrilo:agua (d) ($E_{ap} = 0.00 \text{ V}$) y micelas inversas (e) ($E_{ap} = +0.10 \text{ V}$). Caudal= 0.93 ml min^{-1} . Volumen de inyección= $150 \mu\text{l}$.

Como puede observarse, a pesar de las condiciones hidrodinámicas existentes en la célula de flujo, los valores de RSD para i_p ponen de manifiesto una buena inmovilización de la enzima en la matriz electródica sin que existan diferencias apreciables en función del medio de trabajo de que se trate.

No se llevaron a cabo más estudios de estabilidad del electrodo debido a que, obviamente, la reproducibilidad de las señales amperométricas con los pulidos, la reproducibilidad entre diferentes biosensores y la estabilidad con el tiempo de utilización y almacenaje, serán similares a los obtenidos realizando las medidas en discontinuo.

III.5.7.4. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Los calibrados obtenidos para la determinación de peróxido de hidrógeno mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica, sobre los electrodos compósitos de peroxidasa se muestran en las figuras 32 y 33, para un intervalo de concentraciones de $(0.1-10) \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ para la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} y de $(1.0-100) \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ para el resto de disoluciones portadoras. Análogamente a las medidas en discontinuo, se tomó como intervalo lineal aquel que proporciona un coeficiente de correlación con un valor mínimo de 0.998. En la Tabla 9 se recogen los valores de los intervalos lineales, sus coeficientes de correlación, pendientes y ordenadas en el origen en los diferentes medios de trabajo utilizados.

Tanto en la disolución reguladora de fosfato, como en las micelas inversas, los intervalos de linealidad son más amplios que los obtenidos con las medidas en discontinuo, lo que resulta lógico si se considera que las medidas en FIA no se realizan alcanzando el estado estacionario. Para los otros medios de trabajo, los intervalos lineales obtenidos son muy similares empleando ambas metodologías.

En cuanto a los valores de las pendientes, resultaron ser menores que en discontinuo en todos los medios de trabajo, comportamiento esperado dado que las medidas no se realizan en el estado estacionario. La variación según el medio de trabajo es similar a lo observado en discontinuo, salvo para el medio acetonitrilo :agua, en el que se obtiene ahora una pendiente menor que en micelas inversas.

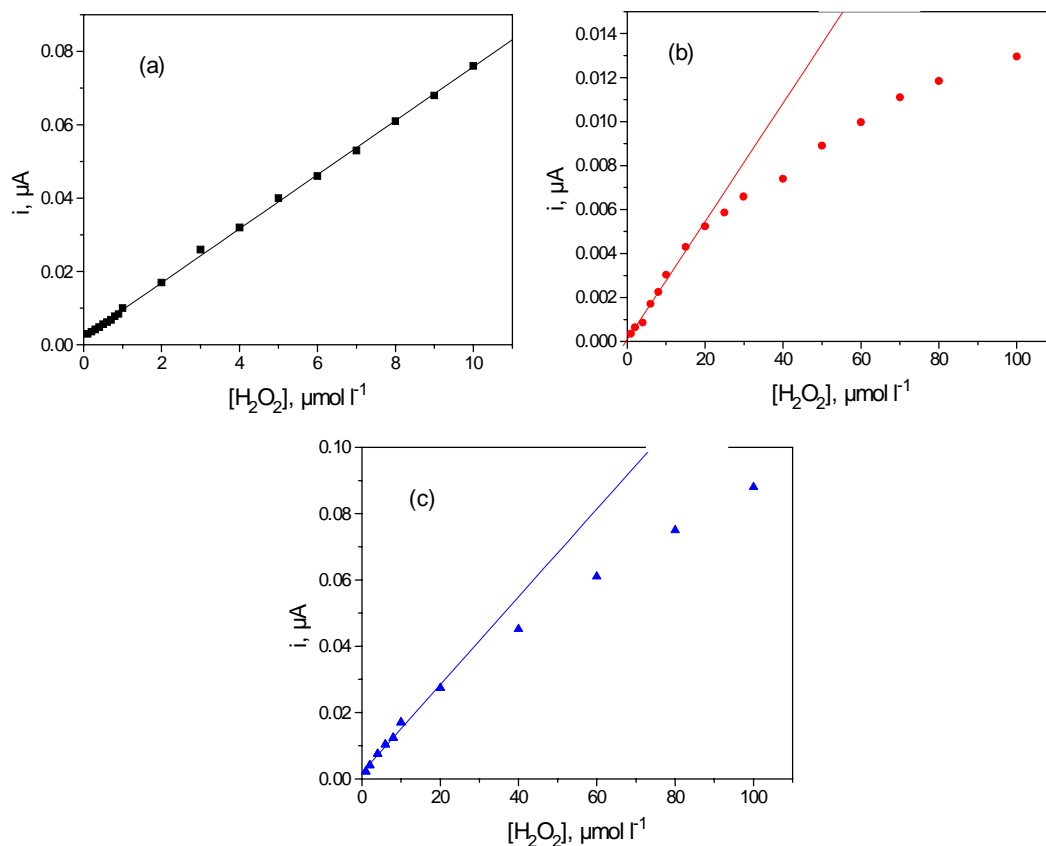


Figura 32. Curvas de calibrado para el peróxido de hidrógeno obtenidas mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica sobre un electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato $0.05\ mol\ l^{-1}$ (pH 7.4) (a), disolución micelar de Tritón X-100 0.1 % (b) y emulsiones aceite-agua (c). $E_{ap} = 0.00\ V$. Caudal= $0.93\ ml\ min^{-1}$. Volumen de inyección= $150\ \mu l$.

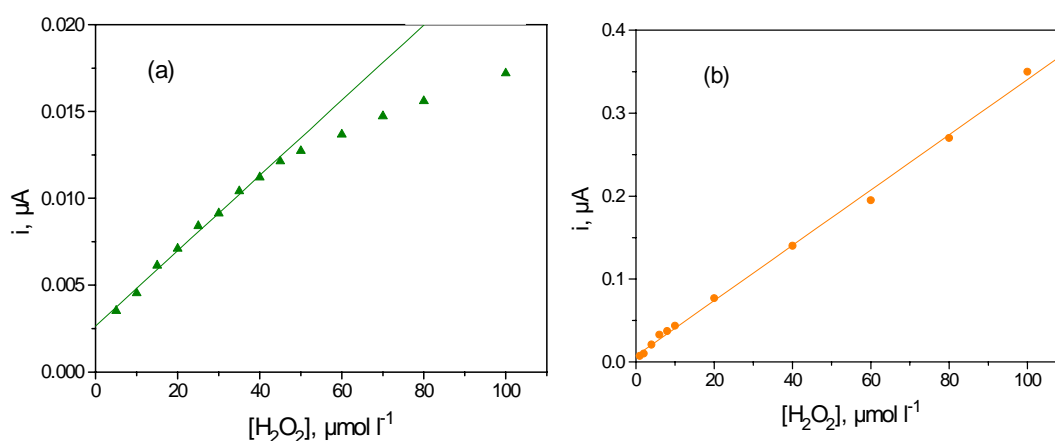


Figura 33. Curvas de calibrado para el peróxido de hidrógeno obtenidas mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica sobre un electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro en la mezcla hidroorgánica de acetonitrilo:agua (a) ($E_{ap} = 0.00\ V$) y en micelas inversas (b) ($E_{ap} = +0.10\ V$). Caudal= $0.93\ ml\ min^{-1}$. Volumen de inyección= $150\ \mu l$.

Tabla 9. Características de los calibrados para peróxido de hidrógeno obtenidos mediante inyección en flujo con detección amperométrica con electrodos compósitos de grafito-Teflón-HRP-ferroceno para los medios predominantemente acuosos y con electrodos de grafito-Teflón-HRP- ferrocianuro para el medio acetonitrilo/agua y las micelas inversas. Caudal= 0.93 ml min⁻¹. Volumen de inyección= 150 µl.

Medio	Intervalo linealidad mol l ⁻¹	Pendiente µA/mol l ⁻¹	Ordenada en el origen, µA	r
Regulador fosfato	(0.1-10)x10 ⁻⁶	(7.37 ± 0.04)x10 ³	(2.2 ± 0.2)x10 ⁻³	0.999
Disoluciones micelares	(0.1-20)x10 ⁻⁶	(2.63 ± 0.08)x10 ³	(1.0 ± 0.9)x10 ⁻³	0.998
Emulsión aceite-agua	(0.1-20)x10 ⁻⁶	(1.30 ± 0.04)x10 ³	(1.9 ± 0.4)x10 ⁻³	0.998
CH ₃ CN :H ₂ O	(0.5-50)x10 ⁻⁶	(2.0 ± 0.4)x10 ³	(3.2 ± 0.1) x10 ⁻³	0.999
Micelas inversas	(0.5-100)x10 ⁻⁶	(3.4± 0.1)x10 ³	(6 ± 3) x10 ⁻³	0.999

En la Tabla 10 se recogen los valores de los límites de determinación y de detección calculados de acuerdo con los mismos criterios que se mencionaron para las medidas amperométricas en discontinuo. Los valores de la desviación estándar utilizados como estimadores de la del blanco se calcularon a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones diferentes de H₂O₂ al nivel de concentración que se indica en la Tabla 10.

Los límites de detección son, en general, bastante similares a los obtenidos mediante amperometría en discontinuo, si bien cabe señalar el valor considerablemente menor que se obtuvo utilizando la disolución reguladora de fosfato como disolución portadora.

Tabla 10. Características analíticas para la determinación de peróxido de hidrógeno mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica sobre electrodos compósitos de grafito-Teflón-peroxidasa. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Tabla 11.

Medio	Nivel de concentración mol l ⁻¹	Límite determinación, mol l ⁻¹	Límite detección mol l ⁻¹	RSD
Regulador fosfato	1.0x10 ⁻⁷	0.22x10 ⁻⁶	6.8x10 ⁻⁸	5.2
Disoluciones micelares	1.0x10 ⁻⁶	1.1x10 ⁻⁶	3.4x10 ⁻⁷	4.7
Emulsión aceite-agua	2.0x10 ⁻⁶	2.2x10 ⁻⁶	6.5x10 ⁻⁷	6.9
CH ₃ CN :H ₂ O	2.0x10 ⁻⁶	3.1x10 ⁻⁶	9.2x10 ⁻⁷	7.7
Micelas inversas	2.0x10 ⁻⁶	1.0x10 ⁻⁶	3.1x10 ⁻⁷	4.5

El carácter cinético de las reacciones enzimáticas permite, como se pone de manifiesto en esta Memoria, relacionar la concentración de analito con la medida de la señal analítica obtenida una vez alcanzado el estado estacionario (medidas en discontinuo), o bien con la medida de la respuesta amperométrica en la región cinética (medidas en FIA). Por ello, la

intensidad de los picos obtenidos en flujo depende fundamentalmente del tiempo de medida y de la velocidad de la reacción enzimática. Puesto que las medidas de H_2O_2 en los diferentes medios estudiados se realizan en el mismo tiempo, la señal depende fundamentalmente de la cinética de la reacción enzimática. Así, los medios en los que la velocidad de reacción sea mayor, darán lugar a una mayor concentración de la especie que se monitoriza y por tanto a mayores intensidades de pico en los diagramas.

III.6. BIOSENSORES COMPÓSITOS DE CARBONO VÍTREO RETICULADO-RESINA EPOXI-PEROXIDASA

III.6.1. INTRODUCCIÓN

Además de las características que ya se han comentado en el apartado II.2.2., el RVC posee grupos superficiales, lo que hace que la enzima pueda adsorberse a su superficie con mucha facilidad. A esto también contribuye la estructura porosa de este material. En la figura 34 se muestra la estructura del RVC con y sin enzima inmovilizada por simple adsorción.

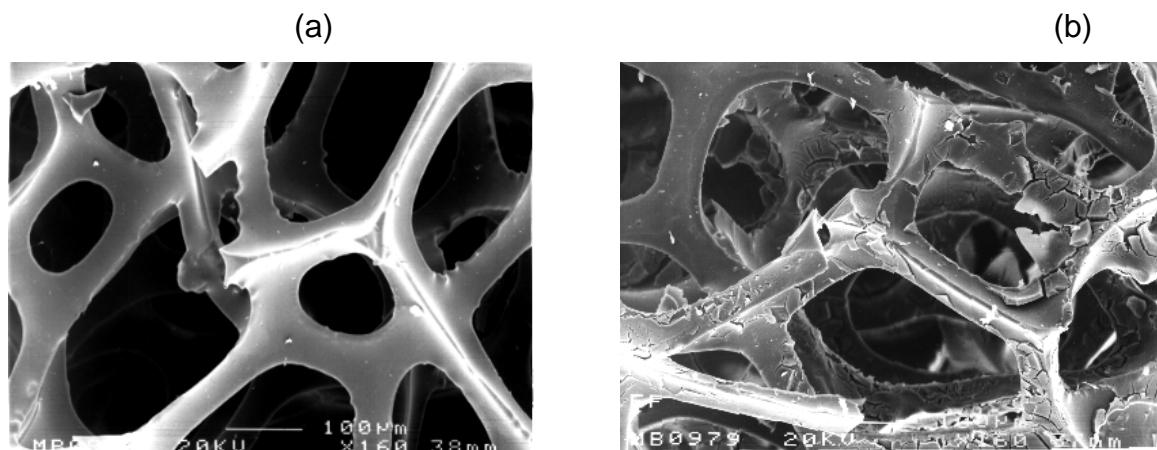


Figura 34. Estructura reticulada del RVC (a) sin enzima y (b) con enzima inmovilizada.

Se han desarrollado diversos biosensores basados en el RVC, que se suelen emplear como detectores en flujo “a través” con inmovilización covalente. Este tipo de biosensores para flujo se ha desarrollado con glucosa oxidasa (Wieck ET AL., 1984 ; Heider et al., 1990 ; Khayyami et al., 1996), peroxidasa (Barlett et al., 1997), lactato deshidrogenasa (Laval et al., 1984 ; Khayyami et al., 1997 ; Jaraba et al., 1998) y alcohol deshidrogenasa (Blaedel y Wang, 1980a).

Sin embargo, no se han desarrollado muchos biosensores compósitos con este tipo de carbono, a pesar de que presenta características muy adecuadas para este fin como se pondrá de manifiesto a lo largo de esta Memoria. En la Tabla IX se recogen algunos de los trabajos publicados basados en el RVC como fase conductora de biosensores compósitos.

Tabla IX. Biosensores compósitos basados en matrices de RVC

Composición matriz	Tipo de detección	Modo de medida	Analito	Referencias
RVC-Gel de poliacrilamida-Glucosa oxidasa-ferroceno	Voltamperometría cíclica	Discontinuo	Glucosa	Lange y Chambers, 1985
RVC-gel de agarosa-acetilcolinesterasa	Amperometría	FIA	Pesticida paraoxon (inhibición)	Khayyami et al., 1998
RVC-Sol gel-Glucosa oxidasa-Catalasa	Regenerador electroquímico (detección térmica)	Flujo	Glucosa	Ramanathan et al., 2001
Grafito-PTFE-Tirosinasa Grafito-EPD-tirosinasa RVC-resina epoxi-tirosinasa	Amperometría	Discontinuo	Compuestos fenólicos	Serra et al., 2002

PTFE= Politetrafluoroetileno (Teflón) EPD= Etilenpropilendieno

Entre los biosensores que se recogen en la Tabla, solo se empleó inmovilización por atrapamiento físico con el electrodo de gel de poliacrilamida y de resina epoxi, en los otros dos casos se utilizó inmovilización covalente. Como se puede observar, son muy pocos los trabajos encontrados en la bibliografía, por lo que, al igual que ocurría con los biosensores de grafito-teflón, nuestro Grupo de Investigación ha sido uno de los pioneros en el uso del carbono vítreo reticulado como material conductor base para la fabricación de biosensores compósitos.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos acerca de la fabricación y comportamiento de electrodos amperométricos compósitos contruidos con RVC como fase conductora, resina epoxi como fase aislante, peroxidasa como elemento de reconocimiento biológico y ferroceno (o ferrocianuro) como mediador. Estos biosensores compósitos se han caracterizado en diferentes medios de trabajo útiles en electroanálisis con objeto de demostrar la versatilidad de este tipo de matriz. Dichos medios de trabajo son los mismos que los utilizados en el capítulo III.5., excepto en que dadas las características de la resina epoxi, no fue posible trabajar en micelas inversas. En este medio, la resina pierde rigidez por la acción del acetato de etilo, el cual la disuelve con períodos prolongados de contacto. Por lo tanto, el comportamiento de estos electrodos se estudió en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , disolución micelar preparada con Triton X-100, emulsión aceite-agua preparada con acetato de etilo como fase dispersa y Triton X-100 como agente emulsificante y, como medio predominantemente orgánico en una mezcla hidroorgánica acetonitrilo :disolución reguladora Tris de pH 7.4.

III.6.2. PREPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES

Antes de proceder a la construcción de los biosensores enzimáticos, fue necesario someter el carbono al siguiente pretratamiento. Se cortaron cilindros de RVC de 0.4 cm de diámetro y 0.6 cm de altura con un tubo de vidrio del diámetro mencionado (posteriormente este tubo se utilizará como soporte electródico). Los cilindros de RVC se sumergieron en HCl 6 mol l^{-1} durante una hora y media, lavándose a continuación con agua desionizada hasta que las aguas de lavado alcanzan un pH de aproximadamente 5. Posteriormente, se introdujeron el metanol durante 2 horas, para finalmente secarlos en estufa a $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas. Este pretratamiento se realizó en todos los casos un día antes de proceder a la fabricación de los biosensores enzimáticos.

Los electrodos compósitos de peroxidasa y ferroceno se prepararon según el procedimiento siguiente. Tanto el mediador (ferroceno o ferrocianuro potásico) y la enzima HRP se inmovilizaron por adsorción directa sobre el RVC. Esto se realizó sumergiendo el cilindro de RVC pretratado en un pequeño volumen ($150 \text{ }\mu\text{l}$) de una disolución $2 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ de ferroceno

en acetonitrilo durante 15 minutos. A continuación, se evaporó el disolvente pasando una corriente de Ar y el cilindro modificado se sumergió durante 30 minutos en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4 que contiene 270 U de enzima. Finalmente, se evaporó también esta disolución con una corriente de Ar. Cuando se utilizó ferrocianuro como mediador, tanto la enzima como dicho mediador se inmovilizaron en la misma etapa a partir de la disolución reguladora de fosfato.

Una vez inmovilizados la enzima y el mediador, se llenaron los poros de RVC con la resina epoxi (Araldit) mediante la aplicación de una suave succión a vacío, con objeto de asegurar un llenado completo, hasta aproximadamente la mitad de la altura del cilindro de RVC. Seguidamente, se procedió a curar la resina a temperatura ambiente durante 15 horas. La parte de RVC libre de resina epoxi se empleó para establecer el contacto eléctrico con un hilo de cobre. En la Figura 35 se muestra esquemáticamente el bioelectrodo compuesto así construido.

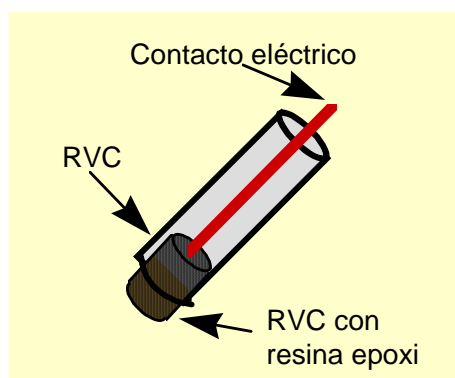


Figura 35. Esquema del electrodo de RVC-resina epoxi

Finalmente, se quitó la resina que cubría la parte externa del cilindro realizando un corte con un escalpelo, procediéndose al pulido de la superficie de carbono durante 5 segundos sobre papel abrasivo de SiC 150. Una vez utilizado, el bioelectrodo se almacenó a 4°C en un frigorífico.

III.6.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

La optimización de las condiciones experimentales se llevó a cabo en todos los casos mediante amperometría a potencial constante, en disoluciones agitadas mecánicamente a velocidad constante.

III.6.3.1. COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ ELECTRÓDICA.

Las matrices de RVC-resina epoxi pueden encuadrarse, dentro de la clasificación de electrodos compósitos, como electrodos compósitos impregnados, en los que la consolidación de la fase conductora viene determinada por su estructura porosa, la cual se empapa con el material aislante. Al igual que se hizo con los biosensores de grafito-Teflón, en primer lugar se optimizaron las variables experimentales relacionadas con la composición y fabricación del biosensor. Obviamente, no se llevó a cabo ninguna optimización de la cantidad de resina epoxi utilizada como aislante, ya que dicha cantidad viene fijada por el volumen vacío del RVC. Todos estos estudios se realizaron en el medio de trabajo constituido por la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

a) Influencia de pretratamiento del RVC.

Como ya se ha comentado, el RVC posee grupos superficiales (Strohl y Curran et al., 1980) que permiten la adsorción reproducible de sustancias, por ejemplo las enzimas, siempre que se haya llevado a cabo un pretratamiento del RVC, lo cual evita la formación de grupos óxido en su superficie que afecta la sensibilidad del electrodo con el tiempo (Blaedel y Wang, 1980b). De los diferentes pretratamientos del RVC que se encontraron en la bibliografía se eligió el utilizado más ampliamente en las diversas aplicaciones reportadas sobre el empleo del RVC en la fabricación de biosensores (Wieck et al. 1982; Wieck et al., 1984). Este pretratamiento se ha descrito en el apartado III.6.2. y se comprobó que era necesario para obtener señales amperométricas reproducibles con electrodos diferentes. En la Tabla 11 se muestran los valores de la intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos con varios electrodos construidos con y sin pretratamiento del RVC para una concentración de peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

Como puede apreciarse, los valores de RSD muestran una buena reproducibilidad de las respuestas obtenidas con los biosensores compósitos construidos con RVC pretratado. Dicho pretratamiento se ha realizado en todos los casos un día antes de la preparación del electrodo con objeto de que las condiciones de inmovilización de la enzima y del mediador fueran siempre las mismas.

Tabla 11. Intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida para diferentes biosensores de peroxidasa-ferroceno contruidos con RVC pretratado y sin pretratar. Peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$; 5.0 ml disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

Electrodo	RVC sin pretratar, (i μA)	RVC pretratado, (i μA)
1	0.051	0.032
2	0.066	0.038
3	0.036	0.040
4	0.093	0.034
5	0.156	0.036
	0.08 ± 0.06 > 50 %	0.036 ± 0.004 8.3 %

b) Contenido de peroxidasa en la matriz electródica

Para elegir la cantidad de enzima inmovilizada en el RVC, se construyeron diferentes electrodos compósitos en los que se procedió a inmovilizar dicha enzima a partir de disoluciones reguladoras de fosfato que contenían: 90, 180, 270 y 360 unidades respectivamente. Los valores de la intensidad de corriente en el estado estacionario para tres medidas sucesivas en diferentes disoluciones de trabajo sin llevar a cabo ningún tipo de regeneración de la superficie electródica se muestra en la Figura 36.

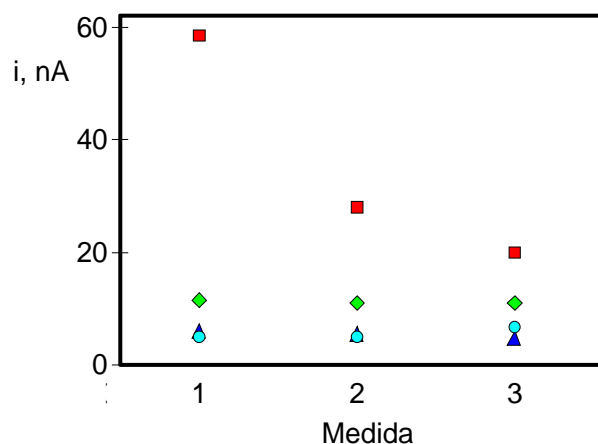


Figura 36. Medidas de intensidad de corriente en el estado estacionario realizadas con electrodos de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno fabricados con diferentes contenidos de enzima : ■ (360 U), ▲ (270 U), ▲ (180 U), ▲ (90 U). H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

Se obtuvieron señales análogas en todos los casos, con excepción del electrodo construido a partir de 360 U, para el cual se produjo una disminución progresiva de la corriente con el número de medidas. Esto puede deberse a que exista un exceso de enzima en la superficie del electrodo y, por tanto, que no esté suficientemente retenida, con lo que se produce su solubilización a medida que se realizan las medidas. Se aprecia, así mismo, que la señal tiende a igualarse con las obtenidas con el resto de electrodos contruidos a partir de una

menor cantidad de enzima, para los cuales no se apreciaron diferencias apreciables en la reproducibilidad de las medidas amperométricas.

Se realizaron series de experimentos similares con los electrodos construidos a partir de 90, 180 y 270 U, a los que se sometió a la regeneración de la superficie electródica por pulido. Los valores de RSD para la corriente en estado estacionario obtenidos fueron en todos los casos muy similares e inferiores al 10%.

El criterio seguido para elegir la cantidad de enzima en disolución que se procede a inmovilizar por adsorción sobre el RVC, fue aquella que proporcionara una mayor sensibilidad. Se realizaron adiciones sucesivas de 10 μl de una disolución patrón de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ sobre 5.0 ml de disolución reguladora en el intervalo de concentraciones de 2.0×10^{-6} a $10.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. En la Figura 37 se muestran los calibrados correspondientes, y en la Tabla 12 los valores de las pendientes de las rectas obtenidas.

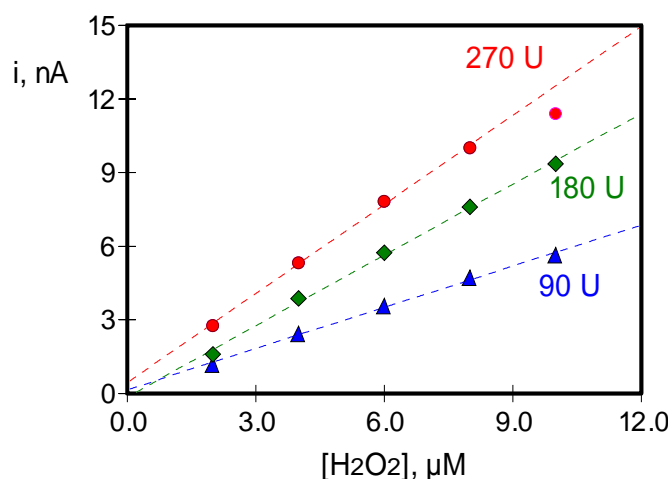


Figura 37. Respuesta del electrodo RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno a adiciones de peróxido de hidrógeno en el intervalo de concentraciones $(2.0-10.0) \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ para distintas cantidades de enzima : (●) 270 U, (◆) 180 U y (▲) 90 U de enzima peroxidasa en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap}=0.00\text{V}$

Tabla 12. Pendientes de las rectas de calibrado para el intervalo de concentraciones $(2.0-10.0) \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ de peróxido de hidrógeno en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4 con diferentes electrodos de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno

Unidades de enzima	90 U	180 U	270 U*
Pte (nA mol l^{-1})	$(0.56 \pm 0.02) \times 10^6$	$(0.96 \pm 0.02) \times 10^6$	$(1.41 \pm 0.08) \times 10^6$
r	0.998	0.999	0.999

La mayor pendiente obtenida con el electrodo fabricado a partir de un contenido mayor de enzima, nos llevó a elegir **270 U** para la realización de los estudios posteriores.

c) Cantidad de mediador.

Como ya se indicó en el apartado III.2., a pesar de que la reducción electroquímica directa de la peroxidasa podría utilizarse para monitorizar la reacción enzimática, la utilización de mediadores proporciona una mayor sensibilidad. Como también se comentó, el mediador elegido para trabajar en medio acuoso es el ferroceno, dada su escasa solubilidad, lo que minimiza las posibles pérdidas de la superficie electroquímica por este motivo. El ferroceno debe distribuirse uniformemente en el seno del RVC, donde se adsorbe, para obtener señales reproducibles, fundamentalmente cuando se realiza la regeneración de la superficie electroquímica por pulido. Se estudió el comportamiento de cinco electrodos diferentes, fabricados a partir de disoluciones en acetonitrilo que contienen distintas cantidades de ferroceno : 0.25, 0.38, 0.50, 0.75 y 1.00 mg y midiéndose la intensidad de corriente en el estado estacionario de peróxido de hidrógeno de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 a un potencial de 0.00 V.

Como se observa en la Figura 38 no hay diferencias importantes en el intervalo estudiado, si bien se aprecia un ligero aumento de la señal a medida que se adsorbe una cantidad mayor de mediador. Para estudios posteriores, y en todos los casos en los que se ha trabajado con este mediador, se escogieron **0.50 mg** de ferroceno como mediador, dado que se consideró que una cantidad más alta de ferroceno podría dificultar la inmovilización de la enzima en la superficie del carbono, teniendo en cuenta las características del método utilizado para tal fin en la fabricación de los biosensores.

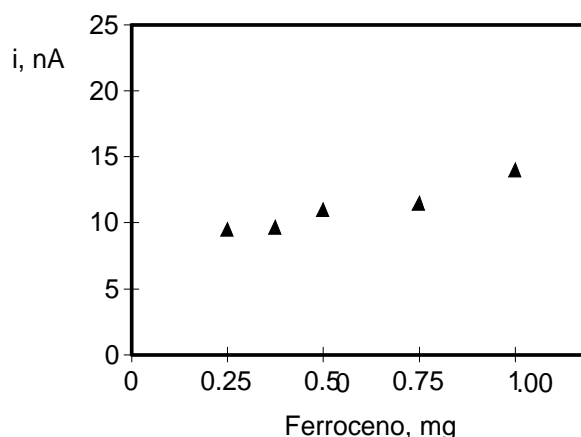


Figura 38. Variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario con la cantidad de ferroceno inmovilizado en la matriz electroquímica de RVC-resina epoxi-HRP. Peróxido de hidrógeno $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

d) Tiempo de curado

El curado de la resina epoxi, que constituye la fase no conductora del electrodo compuesto es un factor importante para obtener una resistencia mecánica y una estabilidad adecuadas. Por esta razón se comprobó si se observaban diferencias dejando curar la resina epoxi a temperatura ambiente y a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el mismo período de tiempo. No se

encontraron diferencias apreciables por efecto de la temperatura, por lo que en lo que sigue se procedió a curar los electrodos a **temperatura ambiente**.

En cuanto al tiempo de curado, se eligió el mínimo (15 h) suficiente para obtener la resistencia adecuada, observándose que mayores tiempos de curado no producían ninguna mejora de las señales amperométricas ni tampoco daban lugar a una mayor resistencia mecánica del electrodo.

En la Figura 39 se muestran, a modo de ejemplo, los registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo de RVC-resina Epoxi-HRP-ferroceno cuando se añadieron 50 μl de una disolución patrón de H_2O_2 0.1 mol l^{-1} (a) y 50 μl de una disolución de peróxido de 2-butanona 0.2 mol l^{-1} (b), a 10.0 ml de una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 agitada mecánicamente.

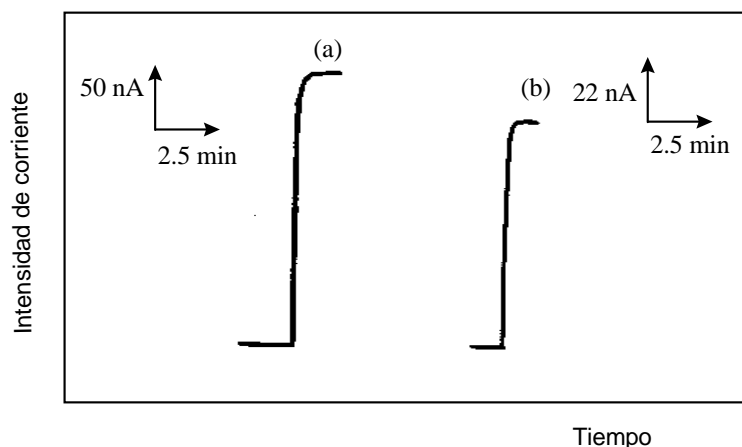


Figura 39. Registros intensidad-tiempo obtenidos con un electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-Ferroceno para H_2O_2 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (a) y peróxido de 2-butanona $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (b) en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Como puede apreciarse, el electrodo enzimático exhibe una rápida respuesta a los cambios en la concentración de sustrato, alcanzándose la corriente en el estado estacionario en unos pocos segundos. Al igual que ocurría con los electrodos compósitos basados de grafito-Teflón, esta rápida respuesta está favorecida por el hecho de que no existen barreras de difusión en forma de membranas sobre la superficie del electrodo, así como tampoco enlaces covalentes para mantener la enzima inmovilizada, lo que implicaría una disminución de la velocidad de la reacción enzimática y una menor sensibilidad.

Por otra parte, no se observó ninguna señal amperométrica medible tras realizar adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno, o de peróxido de 2-butanona, cuando se utilizaron electrodos de RVC-resina epoxi con y sin mediador sin la enzima inmovilizada.

III.6.3.2. INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE EN EL ESTADO ESTACIONARIO

La influencia del pH de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} sobre la intensidad de corriente en estado estacionario para una concentración de peróxido de hidrógeno $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, se evaluó en el intervalo de pH entre 6.5-8.0.

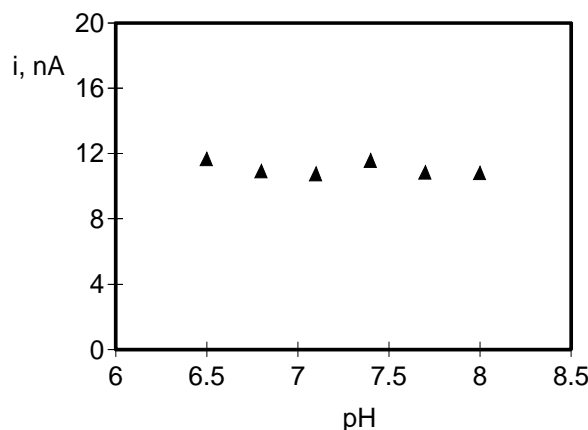


Figura 40 . Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida con un electrodo de RVC-Resina Epoxi-Peroxidasa-Ferroceno para una concentración $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de H_2O_2 . $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

Como se aprecia en la Figura 40, no existen diferencias significativas en la intensidad de corriente en estado estacionario en todo el intervalo estudiado, por lo que se eligió **7.4** como **pH de trabajo** para estudios posteriores, ya que suele ser el más utilizado en los antecedentes bibliográficos con biosensores de peroxidasa.

Esta misma disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 fue la utilizada como fase acuosa en el resto de medios de trabajo predominantemente acuosos ensayados en esta Memoria.

III.6.3.3. EFECTO DEL POTENCIAL APLICADO SOBRE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE EN ESTADO ESTACIONARIO

La Figura 40 muestra la dependencia de la intensidad de corriente en estado estacionario de un electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-HRP-Ferroceno con el potencial aplicado, para una concentración de peróxido de hidrógeno de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

Como puede observarse, la señal amperométrica es prácticamente constante en el intervalo comprendido entre -0.15 V y 0.15 V . Para valores de potencial superiores o inferiores a los de dicho intervalo, la intensidad de corriente en estado estacionario disminuye. La disminución que se produce a potenciales más negativos de -0.15 V es debida, al igual que ocurría con los construidos con grafito-Teflón, a la reducción electródica del H_2O_2 . Se eligió un potencial de **0.00 V** para estudios posteriores con objeto de minimizar las posibles interferencias, tanto de procesos de oxidación como de reducción.

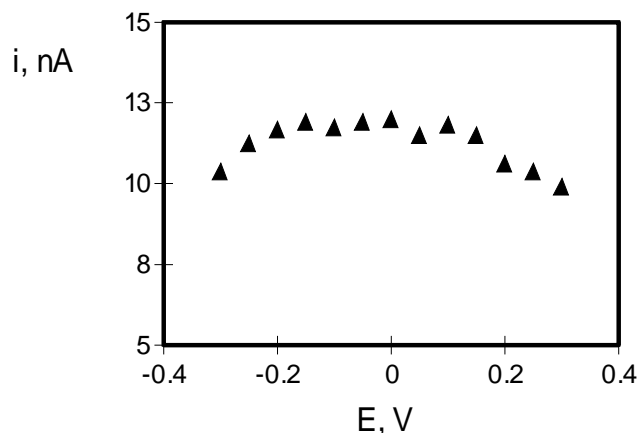


Figura 41. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de la corriente obtenido con el electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno para una concentración de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

Un comportamiento similar de la respuesta amperométrica del biosensor en función del potencial aplicado se encontró tanto en las disoluciones micelares como en las emulsiones aceite/agua, por lo que el mismo valor de 0.00 V se utilizó en estos medios de trabajo.

III.6.3.4. DISOLUCIONES MICELARES: ELECCIÓN DEL TENSOACTIVO Y DE SU CONCENTRACIÓN

Con objeto de encontrar las mejores condiciones para la actividad catalítica de la peroxidasa en este medio y que, además, sea posible la comparación con el resto de medios de trabajo, se estudió la variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario con diferentes disoluciones micelares preparadas con los mismos tensoactivos que se utilizaron con el electrodo de grafito-Teflón: Hyamina 2389 (tensoactivo catiónico), Triton X-100 (tensoactivo no iónico) y laurilsulfato de sodio (tensoactivo aniónico) (SDS). Para cada una de las disoluciones micelares se estudió el efecto en las señales amperométricas de diferentes disoluciones de H_2O_2 en concentración $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. En la Figura 42 se muestra la variación de la intensidad de corriente con el porcentaje de cada uno de los tensoactivos en la disolución.

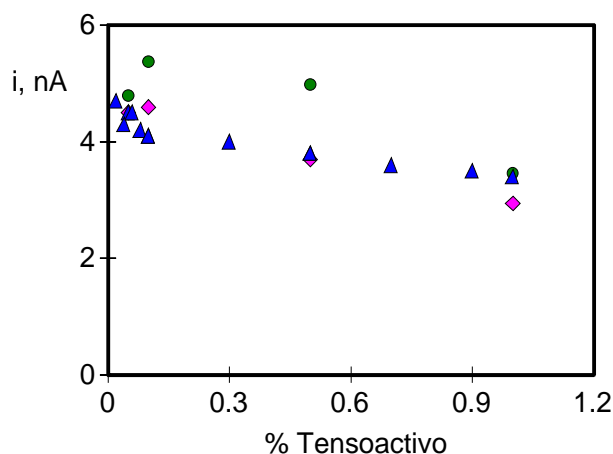


Figura 42. Variación de la intensidad de corriente en estado estacionario para disoluciones micelares de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ preparadas con disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Tensoactivos : (●) Hyamina, (◆) SDS y (▲) Triton X-100. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Como se puede apreciar, la señal amperométrica es similar para el primer porcentaje de tensoactivo estudiado, mientras que al aumentar dicha proporción se diferencia mejor el comportamiento observado con cada uno de ellos. El hábito general es una disminución de la intensidad de corriente con el porcentaje de tensoactivo. A pesar de que las señales son algo menores para Triton X-100, éste fue, por las mismas razones que en el caso de los biosensores de grafito-Teflón, el tensoactivo elegido para estudios subsiguientes.

Por otra parte, no se apreciaron cambios visibles en el aspecto de la disolución (todas las disoluciones fueron transparentes en todo el intervalo de concentraciones de Triton X-100 estudiado). La disminución de la señal con la concentración de tensoactivo, indica que la actividad enzimática disminuye con el aumento de tensoactivo en el medio. Por ello, se eligió un porcentaje de **0.05 % de Triton X-100** en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 como medio de trabajo, puesto que con ella se obtiene una buena intensidad de corriente.

III.6.3.5. EMULSIONES ACEITE-AGUA

III.6.3.5.1. Influencia del porcentaje de fase dispersa

Como ya se ha comentado, se eligió acetato de etilo como fase dispersa en este medio dada la buena solubilidad del peróxido de 2-butanona en este disolvente y también porque ha sido utilizado con éxito para formar este tipo de emulsiones. Lógicamente, se empleó el mismo tensoactivo elegido en las disoluciones micelares, Triton X-100, como agente emulsificante. La fase continua fue la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

El efecto del porcentaje de acetato de etilo sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario se evaluó para una concentración de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, aplicando un potencial de 0.00 V .

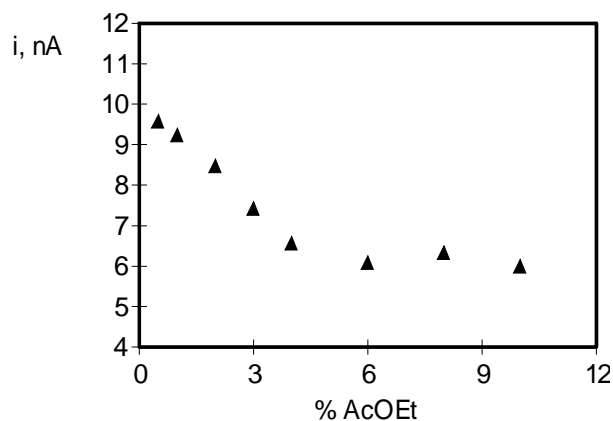


Figura 43. Influencia del porcentaje de acetato de etilo utilizado como fase dispersa en emulsiones aceite/agua sobre la intensidad de corriente para una concentración de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Fase continua : disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4, agente emulsificante : 0.05% Triton X-100. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Como puede observarse en la figura 43, la señal amperométrica disminuye con el porcentaje de fase orgánica hasta alcanzar un valor prácticamente constante. Se ha elegido un **2 % de AcOEt** para estudios posteriores, como compromiso entre una buena sensibilidad y una cantidad de disolvente orgánico suficientemente grande para permitir la extracción de los analitos de interés de las muestras a analizar.

III.6.3.5.2. Influencia del porcentaje de agente emulsificante.

Además del porcentaje de AcOEt, la proporción de tensoactivo utilizado en la emulsión también puede influir en la respuesta amperométrica del biosensor. En la Figura 44 se muestran los resultados obtenidos para emulsiones que contienen H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Como puede verse, no hay diferencias importantes en la intensidad de corriente cuando se varía el porcentaje de Triton X-100, por lo que se decidió seguir trabajando con el mismo porcentaje de **0.05 %** que se eligió para las disoluciones micelares.

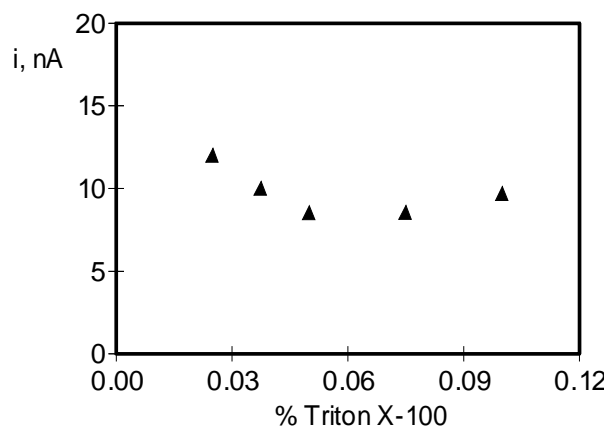


Figura 44. Influencia del porcentaje de Triton X-100 sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario para una concentración de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en emulsiones aceite/agua formadas con un 2% AcOEt y disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

III.6.3.6. MEDIO ACETONITRILLO :DISOLUCIÓN REGULADORA ACUOSA

Como se ha comentado anteriormente, en los medios predominantemente no acuosos conviene emplear mediadores poco solubles en dichos medios, para evitar que el mediador tenga influencia en la estabilidad del electrodo debido a su pérdida por solubilización. En la Figura 44 se muestran los registros corriente-tiempo obtenidos con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro en medio acetonitrilo :disolución reguladora Tris 0.02 mol l^{-1} (pH 7.4) tras una adición de disolución patrón de H_2O_2 $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (a) y peróxido de 2-butanona $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (b). Se muestra igualmente el amperograma que se obtuvo con un electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno (c) empleando como sustrato H_2O_2 . Al igual que en los demás medios de trabajo, se obtuvieron respuestas adecuadas con los electrodos compósitos enzimáticos utilizados para los dos tipos de peróxidos, no observándose señal amperométrica apreciable para adiciones sucesivas de los mismos cuando en la matriz electródica no se había inmovilizado la enzima.

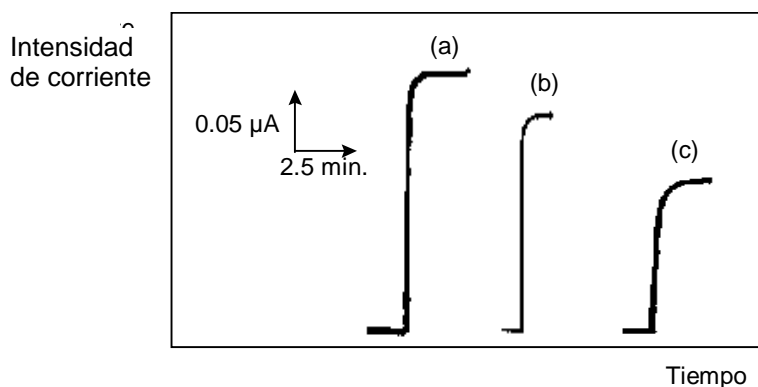


Figura 45. Registros intensidad de corriente-tiempo obtenidos con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro para una concentración $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ de (a) H_2O_2 , $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (b) peróxido de 2-butanona ; (c) amperograma obtenido para la misma concentración de H_2O_2 con un electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Si se comparan las señales obtenidas con los electrodos que contienen ferroceno (c) y ferrocianuro (a) como mediadores utilizando como sustrato H_2O_2 , se observa que la corriente límite obtenida con el biosensor de ferrocianuro es mayor, comportamiento análogo al observado con el biosensor de grafito-Teflón. Esto, unido a la poca solubilidad de este mediador en acetonitrilo, hizo que se escogiera para trabajar en este medio.

III.6.3.6.1. Influencia del contenido de fase acuosa

Se estudió la influencia del porcentaje de fase acuosa (disolución reguladora de Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4) en la mezcla sobre la intensidad de corriente en estado estacionario. La Figura 46 muestra los resultados que se obtuvieron cuando se varió la fase acuosa entre un 0 y un 16 % para una concentración de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

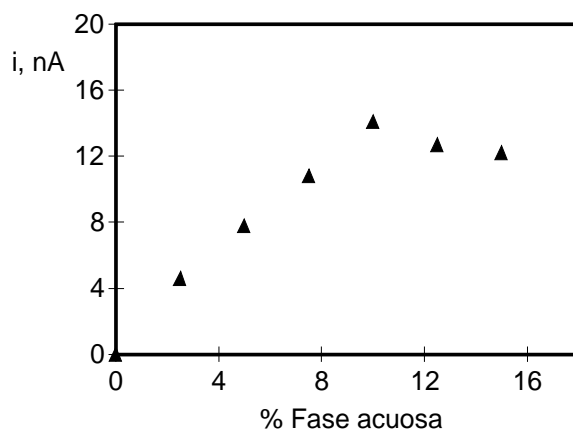


Figura 46. Influencia del porcentaje de fase acuosa (tampón Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4) sobre la corriente en estado estacionario para H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, sobre un electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro en mezclas acetonitrilo :regulador Tris. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Como puede observarse, no se obtiene señal amperométrica en acetonitrilo puro ya que, como se ha comentado reiteradamente se necesita una cantidad mínima de agua para que se produzca la catálisis enzimática. Se aprecia como la intensidad de corriente en estado estacionario aumenta a medida que lo hace el porcentaje de fase acuosa hasta alcanzar un 10%, a partir de cuyo valor la corriente disminuye ligeramente. Como ya se comentó para el electrodo del grafito-Teflón (apartado III.5.3.6.) Este comportamiento es similar al observado para estudios de catálisis enzimática en disolución empleando disolventes orgánicos (Valivety et al., 1992), en los que se demostró la necesidad de la existencia de una pequeña cantidad de agua para obtener una velocidad apreciable de la reacción enzimática. En este tipo de estudio, a menudo, se alcanza un máximo para dicha velocidad en función del contenido de agua, a partir del cual disminuye. Se considera que el aumento inicial refleja la cantidad de agua esencial para la actividad enzimática, mientras que la disminución posterior es, posiblemente, debida a que se producen cambios en la naturaleza de la interfase que pueden afectar la velocidad de la reacción enzimática. En nuestro caso es obvio que el porcentaje adecuado de fase acuosa para que se produzca la reacción enzimática es el **10 %**, por lo que se eligió como óptimo para estudios posteriores.

III.6.3.6.2. Influencia del potencial aplicado

Se evaluó la influencia del potencial que se aplica al biosensor compuesto en el intervalo de -0.15 a $+0.10 \text{ V}$ sobre la intensidad de corriente en estado estacionario para una concentración de H_2O_2 de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en el medio acetonitrilo:fase acuosa (90 :10). En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos, así como los valores de RSD calculados para cinco medidas realizadas a un mismo potencial. La figura 46 muestra, a su vez, la representación gráfica de dichos valores.

Tabla 13. Variación de la intensidad de corriente en estado estacionario con el potencial aplicado sobre un electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro en un medio acetonitrilo:tampón Tris 0.02 mol l⁻¹ de pH 7.4 (90 :10). [H₂O₂]= 1.0x10⁻⁵ mol l⁻¹

E, V	i, nA	RSD (%)
-0.15	5.8 ± 0.3	5.0
-0.10	11.5 ± 0.7	6.1
-0.05	13.9 ± 1.0	7.1
0.00	14.3 ± 1.3	7.1
0.05	16.0 ± 1.7	12.5
0.10	15.6 ± 2.2	12.5

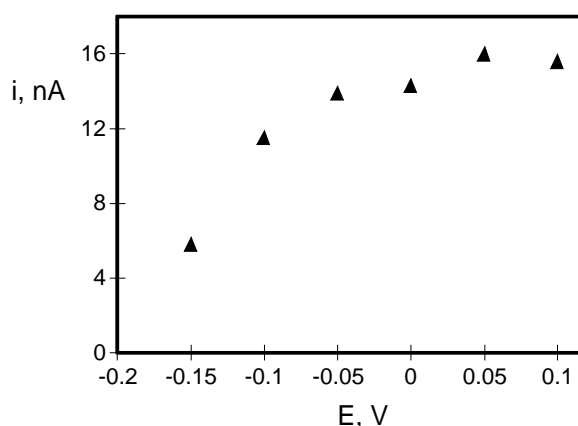


Figura 47. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de la corriente en estado estacionario obtenida con el electrodo compuesto de HRP-Ferrocianuro para una concentración de 1.0x10⁻⁵ mol l⁻¹ de H₂O₂ en CH₃CN:Tampón Tris 0.02 mol l⁻¹, pH 7.4 (90 :10).

Como se puede observar, la intensidad de corriente en estado estacionario es prácticamente constante en el intervalo de potenciales entre -0.05 y +0.10 V. Sin embargo, los valores de la desviación estándar relativa son considerablemente mayores a los potenciales más positivos. Además, tanto el ruido de fondo en los amperogramas (Figura 48) como el tiempo que se precisa para alcanzarse una línea base estable son también mayores a medida que el potencial se hace más positivo. Por otro lado, a potenciales más negativos de -0.05 V, se observa una disminución progresiva de la respuesta del biosensor, como consecuencia de la reducción electroquímica del H₂O₂, que se produce a potenciales menos negativos que en los medios predominantemente acuosos.

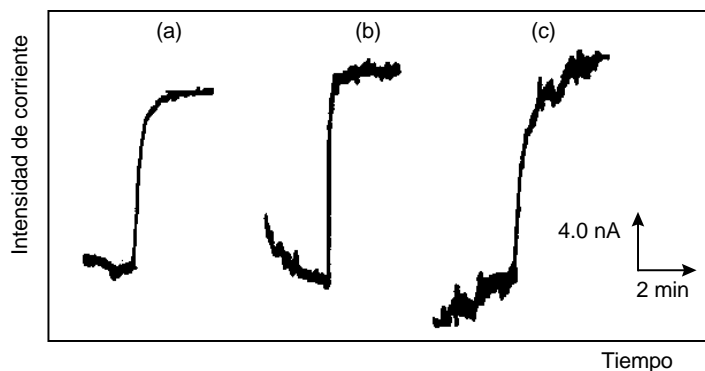


Figura 48. Registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro para H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{Tris}$ 0.02 molL^{-1} , pH 7.4 (90 :10). (a) -0.10 V, (b) -0.05 V, (c) 0.00 V.

Por todo lo anterior, se ha elegido como potencial a aplicar al electrodo de RVC-resina epoxi-peroxidasa-ferrocianuro en este medio un valor de **-0.05 V**.

III.6.4. ESTABILIDAD DE LOS BIOSENSORES EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE TRABAJO

Como ya se dijo para los electrodos enzimáticos de grafito-Teflón, uno de los aspectos prácticos más importantes a estudiar cuando se desarrolla un biosensor es su estabilidad, sobre todo en medios de trabajo predominantemente acuosos, debido a la solubilidad de la enzima en estos medios. Para los electrodos compósitos de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno o ferrocianuro, los aspectos estudiados relacionados con la estabilidad de los biosensores son de nuevo repetibilidad de medidas sucesivas sin pulir el electrodo, repetibilidad de la señal amperométrica cuando se regenera la superficie del electrodo mediante pulido, reproducibilidad de las señales amperométricas obtenidas con diferentes electrodos y tiempo de utilización de un biosensor individual. Todos estos estudios se van a presentar de forma conjunta para todos los medios ensayados, con objeto de comparar mejor los resultados obtenidos.

Todas las medidas se realizaron para H_2O_2 a un nivel de concentración adecuado al medio de trabajo correspondiente, aplicando un potencial constante de 0.00 V, excepto en el medio acetonitrilo:agua, que fue de -0.05 V.

III.6.4.1. REPETIBILIDAD DE LAS MEDIDAS SIN REGENERACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA.

En la Tabla 14 se recogen los valores de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos para 10 disoluciones diferentes de H_2O_2 en cada uno de los medios de trabajo. Se muestra el valor medio de cada serie, el intervalo de confianza correspondiente para un nivel de significación de 0.05 y el valor de la desviación estándar relativa.

La repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas en las disoluciones micelares y en las emulsiones aceite/agua se tuvieron que evaluar a diferentes concentraciones que en el regulador fosfato y en las mezclas acetonitrilo:agua ya que, tanto la cinética de la reacción como los intervalos de linealidad varían (como se verá en los apartados III.6.5. y III.6.6.) de un medio a otro de tal manera que, para una misma concentración de sustrato, la enzima puede saturarse antes o después. Así, tanto en las disoluciones micelares como en las emulsiones, las mejores condiciones para estudiar las variables del electrodo se encontraron a concentraciones de sustrato diferentes de las de las disoluciones reguladoras de fosfato y el medio predominantemente orgánico.

Tabla 14. Intensidad de corriente en estado estacionario para medidas sucesivas realizadas con el electrodo compuesto enzimático sin regeneración de la superficie electródica.

Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4, $[\text{H}_2\text{O}_2]=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$. Medio acetonitrilo :agua : 90% CH_3CN -10% Tampón Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4 $[\text{H}_2\text{O}_2]=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap}=-0.05 \text{ V}$. Disolución micelar : 0.05% Triton X-100 en regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 $[\text{H}_2\text{O}_2]=5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$. Emulsiones aceite-agua: 0.05% Triton X-100 y 2% AcOEt en regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4 $[\text{H}_2\text{O}_2]=5.0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

Medidas	Disolución reguladora de fosfato	Disolución micelar	Emulsiones aceite/agua	Medio CH_3CN :Agua
1	12.2	5.0	3.8	16.2
2	12.2	4.8	3.6	14.4
3	11.8	4.6	3.2	14.4
4	11.4	4.6	4.0	15.8
5	11.4	4.6	4.0	14.9
6	11.0	4.4	3.8	14.0
7	10.2	4.6	3.6	14.9
8	10.6	4.6	4.0	16.2
9	10.6	4.4	3.6	14.0
10	10.2	4.4	3.8	14.5
i, nA	11.1 ± 0.6	4.6 ± 0.1	3.8 ± 0.2	15.0 ± 0.7
RSD, %	7.1	4.3	6.6	5.6

Como puede observarse, los valores de la desviación estándar relativa fueron menores del 10 % en todos los casos y son similares a los que se obtienen con otros tipos de biosensores compósitos, lo que pone de manifiesto una buena repetibilidad de las medidas amperométricas sin necesidad de regenerar la superficie del electrodo. No obstante, tanto en las disoluciones reguladoras de fosfato como en las disoluciones micelares, pudo observarse una ligera disminución de la intensidad de corriente en el estado estacionario a medida que se realizaron las medidas. Esta disminución es más acusada en las primeras medidas, lo que parece sugerir la existencia de una especie de proceso de "lavado" de la superficie electródica, en el que algunas moléculas de enzima que no están bien inmovilizadas se disuelven al poner

el electrodo en contacto con la disolución. No obstante, la disminución de la intensidad de corriente con respecto a la señal inicial para la medida nº 10, realizada en el regulador de fosfato es menor que el valor elegido como límite inferior ($x-3s$) para proceder a la regeneración de la superficie electródica. Además, a medida que se fueron realizando más experiencias, la disminución de la señal es menor y tiende a hacerse constante para las últimas medidas, lo que parece confirmar la hipótesis del “lavado” de la superficie electródica. En las disoluciones micelares, el comportamiento es totalmente similar. Por otro lado, este aspecto de la repetibilidad de las medidas no influye en la linealidad de los calibrados por posible pérdida de señal para las diferentes adiciones, como se deduce de los coeficientes de correlación obtenidos en las curvas de calibrado (apartado III.6.6.). Por lo tanto, este efecto de disminución de la señal se podrá corregir, cuando se analicen diferentes muestras, aplicando el método de adiciones estándar, pero no será posible aplicar el método del calibrado externo con estos electrodos en estos dos medios aunque no haya efectos de matriz.

Sin embargo, en el medio acetonitrilo :agua, no se observa una disminución de la señal a medida que se efectúan las medidas, al nivel de concentración de H_2O_2 estudiado. Esto indica una menor pérdida de enzima de la superficie del electrodo en este medio, es decir, no se observa el efecto de “lavado” encontrado en los medios predominantemente acuosos, lo que resulta lógico si se tiene en cuenta que la enzima es escasamente soluble en el medio predominantemente orgánico.

III.6.4.2. REPRODUCIBILIDAD DE LAS MEDIDAS REGENERANDO LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA POR PULIDO

Se realizaron tres medidas sucesivas de intensidad de corriente en estado estacionario para H_2O_2 1.0×10^{-5} mol l^{-1} en regulador fosfato y en la mezcla acetonitrilo :agua y 5.0×10^{-6} mol l^{-1} en las disoluciones micelares y en las emulsiones aceite-agua, después de regenerar la superficie del electrodo por pulido. Se efectuaron diez pulidos en cada caso.

Los resultados obtenidos en todos los medios de trabajo ensayados se muestran en la Tabla 15. Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación de 0.05.

Los valores de la desviación estándar relativa son en todos los casos de aproximadamente el 8% para los diez valores medios de la corriente en cada serie, lo que indica que el electrodo compuesto enzimático proporciona respuestas amperométricas reproducibles tras ser sometido al proceso de regeneración de la superficie electródica y que la enzima está distribuida uniformemente en el seno de la matriz del RVC.

Tabla 15. Reproducibilidad de las señales amperométricas obtenidas tras regenerar la superficie del electrodo mediante pulidos para un electrodo compuesto enzimático de HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4, $[\text{H}_2\text{O}_2]=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$; disolución micelar: 0.05% Triton X-100 en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4 y emulsiones aceite/agua: 0.05% Triton X-100 y 2% AcOEt en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4 $[\text{H}_2\text{O}_2]=5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ $E_{ap}=0.00 \text{ V}$; y para un electrodo de peroxidasa-ferrocianuro en medio acetonitrilo:agua: 90% CH_3CN -10% Tampón Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4, $[\text{H}_2\text{O}_2]=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap}=-0.05 \text{ V}$.

Medidas	Disolución reguladora de fosfato	Disolución micelar	Emulsiones aceite/agua	Medio CH_3CN :Agua
1	10.6	4.6	4.0	15.1
2	10.8	4.9	3.6	15.1
3	9.8	4.7	3.4	13.1
4	12.2	3.8	4.2	16.5
5	10.8	4.5	4.1	14.8
6	11.5	4.8	3.6	16.8
7	11.8	4.4	4.0	15.0
8	12.9	4.9	3.8	16.3
9	10.5	3.8	4.2	17.5
10	12.0	5.0	3.2	14.5
i, nA	11.3 ± 0.6	4.5 ± 0.3	3.8 ± 0.2	15.5 ± 0.9
RSD, %	7.9	8.9	7.9	6.7

III.6.4.3. TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE UN BIOSENSOR

Se evaluó el período de vida útil de un biosensor realizando tres medidas diariamente de disoluciones diferentes de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en regulador de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. El biosensor se almacenó a 4°C en seco una vez efectuadas las medidas.

La Figura 49 muestra los resultados obtenidos para las medidas realizadas durante 15 días consecutivos sin regeneración de la superficie del electrodo. Como puede observarse, se produce una disminución acusada de la intensidad en estado estacionario Principalmente en los primeros cuatro días, disminuyendo en menor medida posteriormente. Sin embargo, puede verse como la señal inicial pudo recuperarse por pulido de la superficie electródica, obteniéndose un valor de la intensidad de corriente en estado estacionario similar a la del primer día, lo que confirma la reproducibilidad de las señales con la regeneración de la superficie electródica.

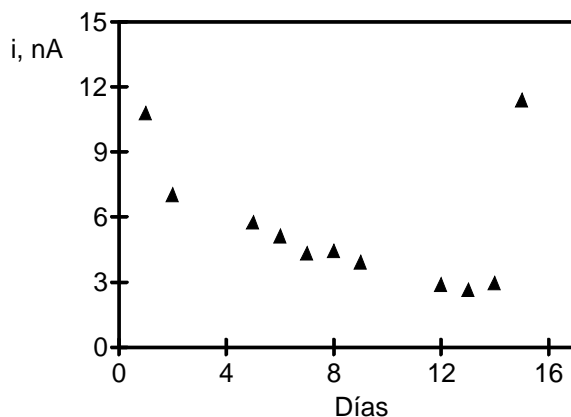


Figura 49. Estabilidad del electrodo compuesto de peroxidasa-ferroceno con el tiempo. Concentración de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

Este comportamiento puede observarse también en la Figura 50 (a). Se realizaron medidas durante 5 días consecutivos sin regenerar la superficie eléctrica, mientras que el sexto día se procedió a llevar a cabo dicha regeneración. Como ya se ha comentado, se produce una disminución de la señal con el tiempo, lo que indica que con este método de inmovilización la enzima pierde parte de su actividad durante el tiempo en el que está almacenada. Sin embargo, la señal inicial se recupera con la regeneración de la superficie eléctrica por pulido hasta aproximadamente 20 días. Con objeto de averiguar el motivo de dicha pérdida de actividad de la enzima, se realizaron medidas para diferentes disoluciones de H_2O_2 en distintos días, procediéndose al pulido de la superficie del electrodo antes de llevar a cabo las medidas cada día. En la Figura 50 (b) se muestran los resultados obtenidos.

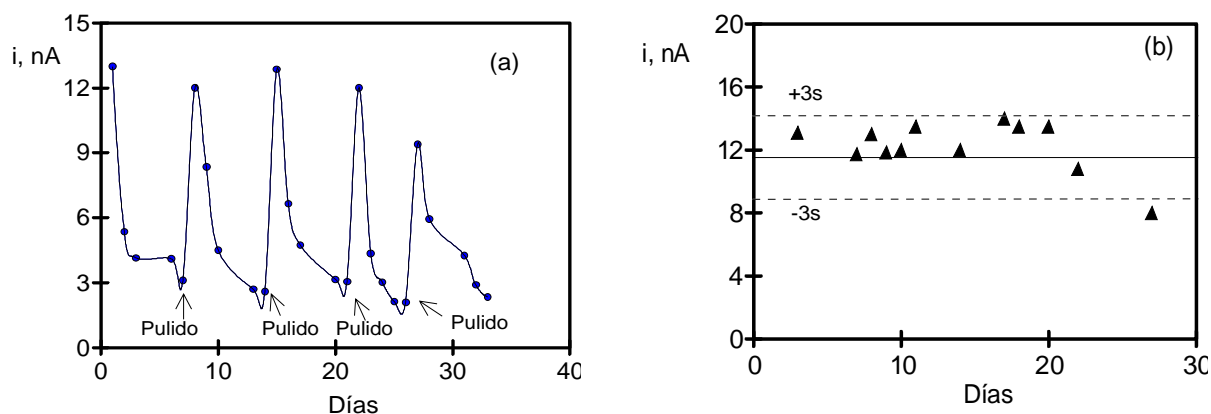


Figura 50. Estabilidad del electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-peroxidasa-ferroceno con el tiempo, (a) con regeneración con pulido cada cinco días (b) con regeneración por pulido cada día. Concentración de H_2O_2 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

Como se puede apreciar, las señales amperométricas poseen una reproducibilidad aceptable (RSD= 7.4 %) hasta el día 20, a partir del cual la señal inicial no pudo ser recuperada, comportamiento análogo al mostrado en la Figura 49. Por lo tanto, puede concluirse que la estabilidad del electrodo con el tiempo no depende del número de pulidos al

que se someta la superficie electródica, sino que depende del tiempo de almacenamiento del biosensor. No obstante, puede decirse que el tiempo de vida útil del electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-Ferroceno es similar, o incluso mayor que el de otros electrodos compósitos enzimáticos construidos con resina epoxi como aglutinante, que han sido reportados en la bibliografía (Alegret, 1996).

Más que la utilización de resina epoxi como aglutinante, pensamos que es la forma de inmovilización y las características del soporte conductor empleado lo que produce que, a partir de cierto tiempo, no se pueda recuperar la señal inicial ni regenerando la superficie electródica por pulido. De hecho, ya se ha mencionado la necesidad de pretratar el RVC para obtener señales reproducibles con el tiempo (Blaedel y Wang, 1980b ; Strohl y Curran, 1980). Además del material que constituye el soporte electródico, el paso del tiempo puede afectar a la enzima, ya que su estabilidad depende en gran medida de su inmovilización. Así, podría ocurrir que la fuerza con que la enzima se adsorbe al RVC recién pretratado se pierde a partir de aproximadamente los 20 días en los que se ha observado que se puede trabajar con resultados reproducibles. El comportamiento con el tiempo en los demás medios de trabajo es similar al comentado para la disolución reguladora de fosfato, lo que permite concluir que es necesario pulir el electrodo cada día antes de comenzar a trabajar en cualquiera de los medios utilizados, siendo el tiempo de vida útil del electrodo, tanto del construido con ferroceno como con ferrocianuro, de aproximadamente 20 días.

III.6.4.4. REPRODUCIBILIDAD DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS OBTENIDAS CON DIFERENTES ELECTRODOS.

El hecho de que el biosensor pierda actividad con el tiempo o con el número de medidas, hace necesaria la regeneración de la superficie electródica para recuperar dicha actividad, pero una vez que el biosensor deja de ser operativo debe ser sustituido por otro nuevo. Por lo tanto es fundamental evaluar la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas con electrodos diferentes construidos de forma idéntica. En este caso, solo se emplearon las disoluciones de regulador fosfato y las mezclas acetonitrilo :agua como medios de trabajo, ya que el mediador utilizado en ambos casos es diferente.

Se utilizaron siete electrodos diferentes en el medio regulador fosfato y cuatro en el medio acetonitrilo :agua. Con todos ellos se realizaron medidas de disoluciones de H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} y $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en la mezcla acetonitrilo :agua. En la Tabla 16 se recogen los resultados obtenidos, habiéndose calculado el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05. La desviación estándar relativa obtenida para la corriente en estado estacionario fue de 8.3% en las disoluciones de regulador fosfato y de

7.1% en la mezcla acetonitrilo :agua (90 :10) lo que indica que el proceso de fabricación de los electrodos enzimáticos compósitos es reproducible y fiable.

Tabla 16. Valores de la intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos con diferentes electrodos compósitos. Concentración de peróxido de hidrógeno $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en tampón fosfato 0.05 mol L^{-1} , $\text{pH}=7.4$. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$ y $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en acetonitrilo :agua. $E_{ap}= -0.05 \text{ V}$.

Electrodo	i, nA	i, nA	RSD %
Medio acuoso			
1	32.0	36 ± 3	8.3
2	38.0		
3	40.0		
4	34.0		
5	36.0		
6	34.0		
7	39.0		
Medio acetonitrilo :agua			
1	14.1	14 ± 2	7.1
2	16.0		
3	12.5		
4	14.0		

III.6.5. CALCULO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA REACCIÓN

Un aspecto importante a considerar cuando se desarrollan electrodos enzimáticos es el conocimiento de las variables cinéticas de la reacción que tiene lugar, con objeto de poder predecir el intervalo lineal y la sensibilidad que se podrá obtener, además de poder conocer la eficiencia catalítica para diferentes sustratos. Por lo tanto se determinaron V_m (velocidad máxima aparente) y K_m (constante de Michaelis-Menten aparente) y k_{cat}' (constante catalítica aparente).

El cálculo de los parámetros cinéticos se realizó utilizando los datos de la intensidad de corriente obtenidos según la metodología expuesta en el apartado III.4.3.2. En el medio acetonitrilo :regulador Tris (90 :10), se calcularon dichos parámetros tanto para el electrodo compósito enzimático construido con ferroceno como con ferrocianuro. Las representaciones de la intensidad de corriente en estado estacionario en función de la concentración de sustrato en los diferentes medios de trabajo se muestran en la Figura 51. Como se puede observar, se obtienen las curvas de saturación típicas en las que existe un primer tramo lineal útil analíticamente, para producirse posteriormente una curvatura debida a la saturación de la enzima. La cinética de la reacción enzimática es más lenta para el peróxido orgánico que para el peróxido de hidrógeno, como se puede deducir de dichas representaciones, considerando sus escalas.

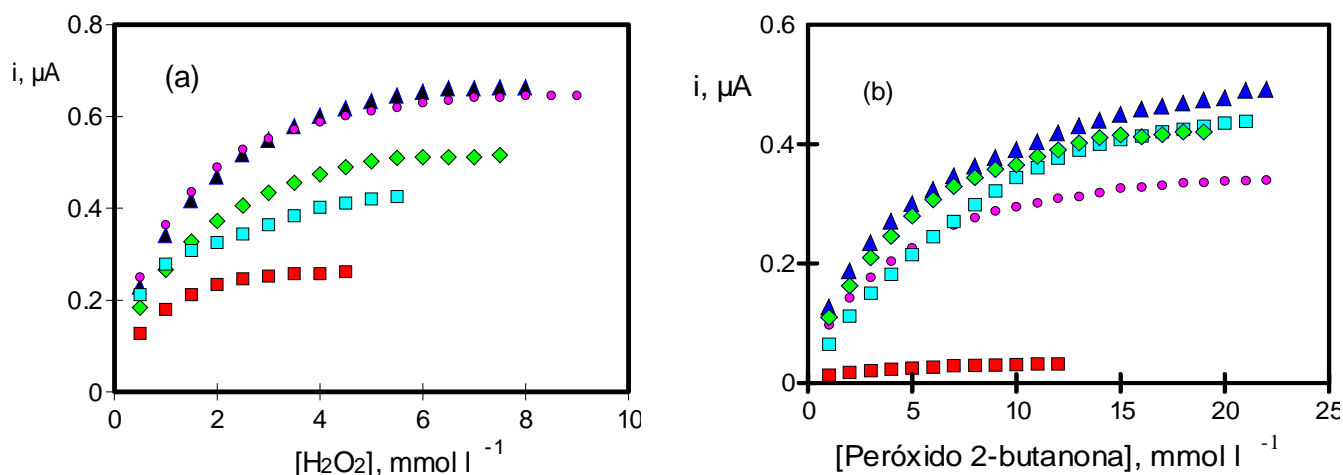


Figura 51 . Curvas de saturación de la enzima para adiciones sucesivas de $50 \mu\text{l}$ de peróxido de hidrógeno 0.1 mol l^{-1} (a) y $20 \mu\text{l}$ de peróxido de 2-butanona 0.5 mol l^{-1} (b), empleando el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno en diferentes medios de trabajo: (\blacktriangle): disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4, (\blacklozenge): 0.05% Triton X-100 en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4 ; (\blacklozenge): 0.05% Triton X-100 y 2% AcOEt en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4 ; (\blacksquare): 90% acetonitrilo-10% Tampón Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4 ($E_{ap}=0.00 \text{ V}$) y el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro en (\blacktriangle)90% acetonitrilo-10% Tampón Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4. ($E_{ap}= -0.05 \text{ V}$).

Antes de llevar a cabo el cálculo de las constantes cinéticas, se verificó que las reacciones enzimáticas con los dos sustratos obedecían a una cinética del tipo Michaelis-Menten. Para ello, se procedió a calcular el parámetro “x” de la ecuación de Hill a partir de las representaciones que se muestran en la Figura 52. Los valores de x (pendiente con signo cambiado de los gráficos de Hill) obtenidos (Tabla 17). son en todos los casos muy próximos a 1, tanto para el peróxido de hidrógeno como para el peróxido de 2-butanona, lo que indica que las reacciones enzimáticas implicadas siguen una cinética del tipo Michaelis-Menten en todos los medios de trabajo, así como cuando se emplea ferrocianuro como mediador para la mezcla acetonitrilo:regulador en lugar de ferroceno. La determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_m se realizó a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk (Figura 53) y los valores de K_m y V_m se recogen en la Tabla 17.

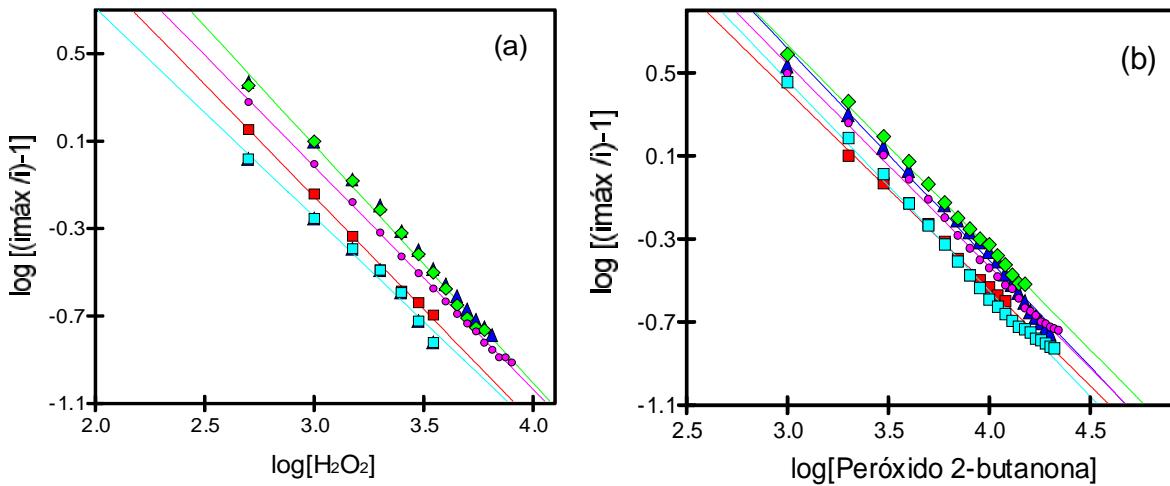


Figura 52. Gráficos de Hill para el peróxido de hidrógeno (a) y peróxido de 2-butanona (b) obtenidos con el electrodo compuesto RVC-HRP-resina epoxi-ferroceno en los medios de trabajo : (♦): disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4, (◆): 0.05% Triton X-100 en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4 ; (●) : 0.05% Triton X-100 y 2% AcOEt en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4 ; (■) : 90% acetonitrilo-10% Tampón Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4 ($E_{ap}=0.00 \text{ V}$) y el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro en (■)90% acetonitrilo-10% Tampón Tris 0.02 mol l^{-1} , pH 7.4. ($E_{ap}= -0.05 \text{ V}$).

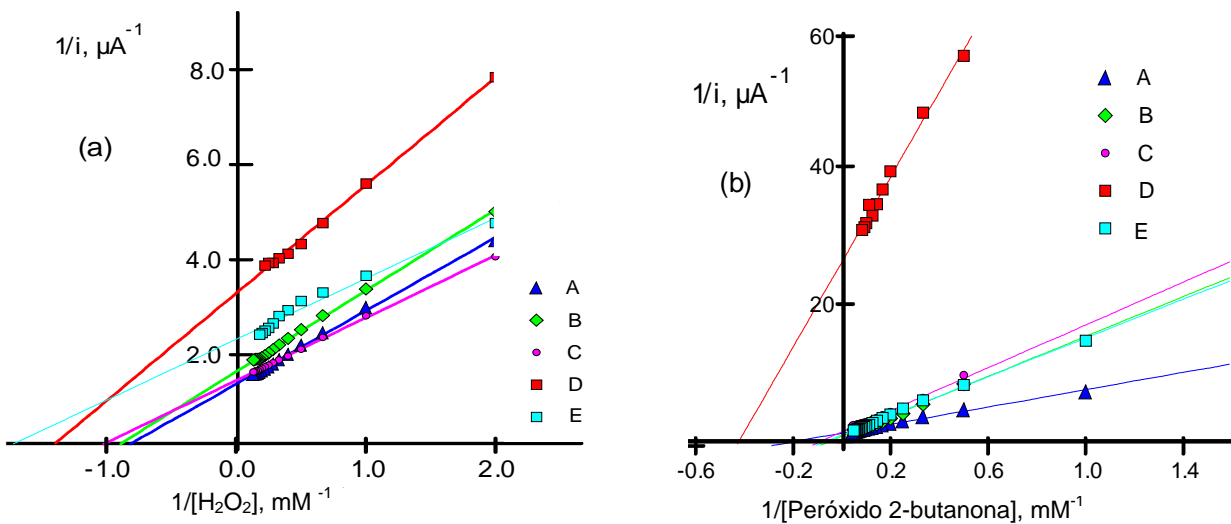


Figura 53. Representaciones de Lineweaver-Burk para (a) H_2O_2 y (b) peróxido de 2-butanona en las mismas condiciones experimentales que se indican en la Figura 52.

El cálculo de la constante catalítica aparente (k_{cat}') se realizó a partir de la siguiente ecuación (Iwuoha, Saenz de Villaverde et al., 1997):

$$k_{cat}' = V_m / (nFA)$$

donde n es el número de electrones transferidos en la reacción electroquímica, F es la constante de Faraday y A es el área efectiva del electrodo. Osteryoung et al. (Sieszynski et al., 1984) calcularon el área superficial para diferentes tamaños de poro del RVC utilizado para la construcción de electrodos compuestos RVC-resina epoxi. En nuestro caso, para un tamaño de poro de 100 ppi (100 poros por pulgada), el área electroquímicamente activa es de 0.7 mm^2 . Los

valores así obtenidos de k_{cat}' , así como la relación k_{cat}'/K_m para cada uno de los peróxidos, en los diferentes medios de trabajo estudiados, se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17. Parámetros cinéticos obtenidos con el electrodo de RVC-resina epoxi-peroxidasa-ferroceno para peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona en diferentes medios de trabajo.

Medio	V_m μA	K_m , mol l ⁻¹	k_{cat}' , mol cm ⁻² s ⁻¹	k_{cat}'/K_m , cm l s ⁻¹	x
Peróxido de hidrógeno					
Disolución reguladora, pH 7.4	0.75	1.2×10^{-3}	1.2×10^{-9}	1.0×10^{-6}	1.07
Disolución micelar Triton X-100	0.68	1.1×10^{-3}	1.0×10^{-9}	1.0×10^{-6}	1.09
Emulsión aceite/agua	0.72	1.0×10^{-3}	1.1×10^{-9}	1.2×10^{-6}	1.00
CH ₃ CN :H ₂ O	0.31	0.7×10^{-3}	0.5×10^{-9}	0.7×10^{-6}	1.00
CH ₃ CN :H ₂ O*	0.43	0.5×10^{-3}	0.6×10^{-9}	1.2×10^{-6}	1.00
Peróxido de 2-butanona					
Disolución reguladora, pH 7.4	0.56	4.4×10^{-3}	8.6×10^{-10}	1.9×10^{-7}	1.02
Disolución micelar Triton X-100	0.54	4.6×10^{-3}	8.2×10^{-10}	1.8×10^{-7}	0.96
Emulsión aceite/agua	0.40	3.7×10^{-3}	6.2×10^{-10}	1.7×10^{-7}	0.98
CH ₃ CN :H ₂ O	0.04	3.0×10^{-3}	0.6×10^{-10}	0.2×10^{-7}	0.99
CH ₃ CN :H ₂ O*	0.47	2.9×10^{-3}	7.2×10^{-10}	2.5×10^{-7}	0.99

* Electrodo RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro

De los valores de K_m se puede deducir que con el peróxido de hidrógeno se tendrá un intervalo de linealidad menor pero una mayor sensibilidad que con el peróxido de 2-butanona en todos los medios estudiados.

A la vista de los resultados obtenidos, puede decirse que, empleando H₂O₂ como sustrato la formación del complejo ES es muy similar en todos los medios acuosos y predominantemente acuosos, ya que los valores de K_m son muy similares tanto en el regulador fosfato como en las disoluciones micelares y en las emulsiones aceite:agua. Además, las diferencias entre estos medios tampoco van a influir en la segunda etapa de la reacción enzimática, como se deduce de los valores muy similares de V_m y k_{cat}' obtenidos en los tres medios, lo que indica que la velocidad de formación de los productos de la reacción enzimática es prácticamente la misma en dichos medios. Sin embargo, cuando se utilizó peróxido de 2-butanona como sustrato, se observó una ligera disminución de los valores de K_m , V_m y k_{cat}' para las emulsiones aceite:agua, cuando se los compara con los obtenidos en las disoluciones acuosa y micelar. Esta pequeña diferencia puede ser debida a la escasa solubilidad del peróxido de 2-butanona en agua. Puesto que la reacción enzimática tiene lugar en los microdominios acuosos cerca de la superficie electródica, la concentración de sustrato en ese microdominio acuoso dependerá del valor de la constante de reparto del peróxido de 2-butanona entre la fase acuosa y la fase orgánica. Esto implica que parte de este compuesto

permanezca en los microdominios orgánicos, produciendo así una disminución de los valores de K_m y V_m .

Por otro lado, cuando se comparan los valores de K_m y V_m en medio regulador fosfato y en un medio predominantemente no acuoso como la mezcla acetonitrilo:regulador Tris empleando en ambos casos ferroceno como mediador, se observa una notable disminución de dichos parámetros en la mezcla acetonitrilo: regulador Tris. Ésto indica que el complejo ES es más estable en el medio predominantemente orgánico, pero que la generación de productos es más rápida en el medio acuoso que en el medio predominantemente orgánico para los dos sustratos estudiados. Sin embargo, cuando se emplea ferrocianuro como mediador en este medio, se observa un aumento en V_m y una ligera disminución en el valor de K_m , lo que indica que, como es lógico, el mediador utilizado en cada caso va a influir sobre las constantes cinéticas de la reacción enzimática, ya que interviene tanto en dicha reacción como en la electródica.

Finalmente, se calculó el cociente k_{cat}'/K_m , el cual permite evaluar la eficiencia del proceso de biosensorización para los diferentes medios (Iwuoha, Saenz de Villaverde et al., 1997). Cinéticamente, el valor de k_{cat}'/K_m establece un límite inferior a la constante de velocidad para la asociación de enzima y sustrato (Wangikax et al, 1993).

$$v = [E] [S] k_{cat}'/K_m$$

A partir los valores obtenidos (Tabla 17), puede deducirse que la reacción enzimática tiene una eficiencia similar en todos los medios de trabajo estudiados para un mismo sustrato, cuando se emplea ferroceno como mediador en los medios acuoso y predominantemente acuosos y ferrocianuro en la mezcla acetonitrilo:regulador Tris. Esta eficiencia disminuye apreciablemente cuando se utiliza ferroceno como mediador en el medio predominantemente orgánico.

III.6.6. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Como condiciones experimentales elegidas para la determinación de peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona en los diferentes medios de trabajo se han escogido las optimizadas para el peróxido de hidrógeno. Puesto que la señal amperométrica monitorizada correspondió siempre a la reducción electroquímica del mediador, independientemente del peróxido ensayado, y los medios de trabajo fueron los mismos para ambos peróxidos, el mismo potencial aplicado optimizado para H_2O_2 se utilizó también para peróxido de 2-butanona. En las Figuras 54 y 55, se muestran las curvas de calibrado correspondientes obtenidas con el electrodo de RVC-resina epoxi-peroxidasa-ferroceno y con ferrocianuro en la mezcla acetonitrilo :regulador Tris.

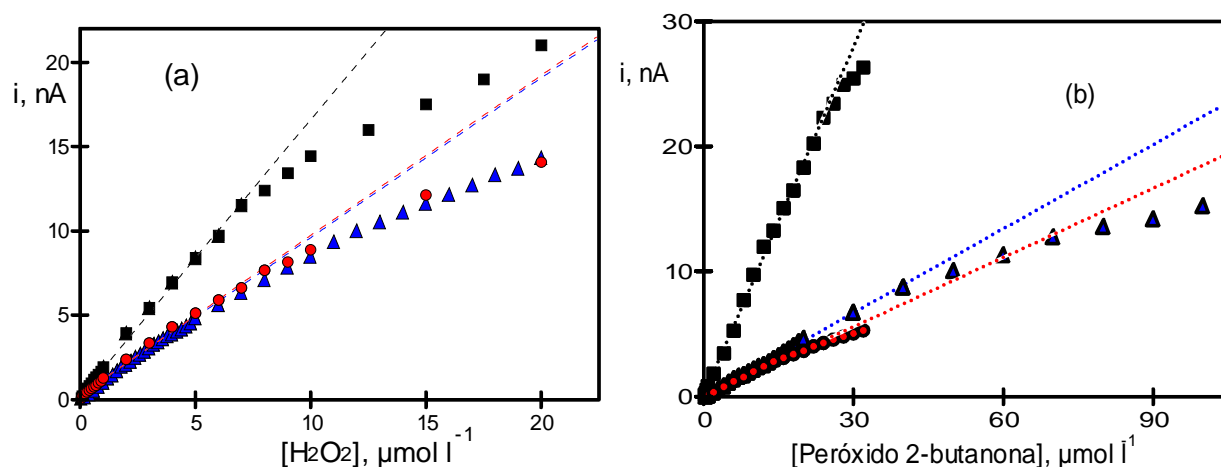


Figura 54. Curvas de calibrado para H_2O_2 (a) y peróxido de 2-butanona (b) obtenidas con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno en : (■) disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, (●) : 0.05% Triton X-100 en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 ; (▲) : 0.05% Triton X-100 y 2% AcOEt en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

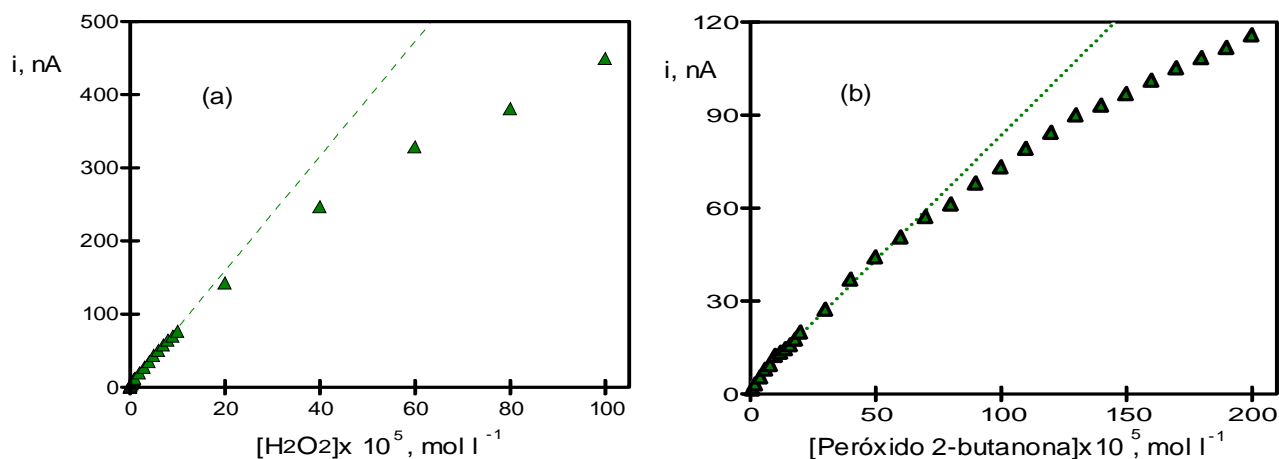


Figura 55. Curvas de calibrado para peróxido de hidrógeno (a) y peróxido de 2-butanona (b) obtenidas con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro en el medio acetonitrilo :regulador Tris (90 :10). $E_{ap}= -0.05 \text{ V}$

El intervalo dinámico lineal de concentraciones se ha determinado mediante regresión por mínimos cuadrados, considerando que no existe pérdida de linealidad cuando el coeficiente de correlación es mayor de 0.998.

En la Tabla 18 se recogen las características de la parte lineal de los calibrados para los dos peróxidos en los distintos medios de trabajo.

Tabla 18. Características de los calibrados para el peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona con un electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno para los medios predominantemente acuosos y de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro para el medio acetonitrilo:regulador Tris.

Medio	Intervalo linealidad mol l ⁻¹	Pendiente nA/mol l ⁻¹	Ordenada en el origen, nA	r
Peróxido de hidrógeno				
Regulador fosfato	(0.05-7.0)x10 ⁻⁶	(1.64±0.04)x10 ⁶	0.2±0.1	0.999
Disoluciones micelares	(0.1-8.0)x10 ⁻⁶	(0.9±0.3)x10 ⁶	0.3±0.1	0.998
Emulsión aceite-agua	(0.2-6.0)x10 ⁻⁶	(0.95±0.03)10 ⁶	0.10±0.08	0.998
CH ₃ CN :regulador Tris	(0.5-90)x10 ⁻⁶	(0.78± 0.03)x10 ⁶	3±1	0.998
Peróxido de 2-butanona				
Regulador fosfato	(0.2-23)x10 ⁻⁶	(0.92±0.02)x10 ⁶	0.08±0.02	0.999
Disoluciones micelares	(0.5-24)x10 ⁻⁶	(0.18±0.08)x10 ⁶	0.05±0.01	0.998
Emulsión aceite-agua	(0.5-40)x10 ⁻⁶	(0.22±0.04)x10 ⁶	-0.03± 0.06	0.999
CH ₃ CN :regulador Tris	(10.0-700)x10 ⁻⁶	(0.080±0.002)x10 ⁶	3.1±0.7	0.998

Como puede observarse en la Tabla 18, los intervalos de linealidad para el peróxido de hidrógeno son similares en todos los medios de trabajo, si bien el límite inferior es claramente menor en el medio regulador fosfato que en los demás, mientras que el límite superior es mayor en la mezcla acetonitrilo :regulador Tris. Además, la sensibilidad es notablemente mejor en el regulador fosfato. En el caso del peróxido de 2-butanona, el intervalo de linealidad en el medio emulsionado aceite-agua es aproximadamente el doble que en regulador fosfato y en las disoluciones micelares. Esto es debido, como ya se ha comentado, a que parte del peróxido de 2-butanona está disuelto en los microdominios orgánicos. Así mismo, el intervalo de linealidad en la mezcla acetonitrilo :regulador Tris es prácticamente de dos órdenes de magnitud, pero en este caso la sensibilidad es considerablemente menor.

Por otra parte, en la Tabla 19 se recogen las características analíticas obtenidas para ambos peróxidos. Los límites de determinación y de detección se han calculado empleando los criterios 10s y 3s_b/m definidos en el apartado III.5.6. Los valores de s_b se estimaron, en cada caso, como la desviación estándar (n=10) de las señales obtenidas para disoluciones diferentes de los sustratos a los niveles de concentración que se muestran en la Tabla 19. Además, se calcularon los valores de RSD para los mismos niveles de concentración.

Tabla 19. Características analíticas para la determinación de peróxido de hidrógeno y de peróxido de 2-butanona con los electrodos compósitos de RVC-resina epoxi-HRP

Medio	Nivel de concentración mol l ⁻¹	Límite determinación, mol l ⁻¹	Límite detección, mol l ⁻¹	RSD, %
Peróxido de hidrógeno				
Regulador fosfato	1.0x10 ⁻⁷	9.2x10 ⁻⁸	2.7x10 ⁻⁸	6.2
Disoluciones micelares	1.0x10 ⁻⁷	1.1x10 ⁻⁷	3.2x10 ⁻⁸	6.6
Emulsión aceite-agua	4.0x10 ⁻⁷	8.8x10 ⁻⁷	2.6x10 ⁻⁷	8.0
CH ₃ CN :regulador Tris	1.0x10 ⁻⁶	1.3x10 ⁻⁶	3.8x10 ⁻⁷	7.7
Peróxido de 2-butanona				
Regulador fosfato	1.0x10 ⁻⁶	7.6x10 ⁻⁷	2.3x10 ⁻⁷	8.1
Disoluciones micelares	1.0x10 ⁻⁶	4.2x10 ⁻⁷	1.3x10 ⁻⁷	7.7
Emulsión aceite-agua	2.0x10 ⁻⁶	1.5x10 ⁻⁶	4.4x10 ⁻⁷	8.7
CH ₃ CN :regulador Tris	2.0x10 ⁻⁵	1.6x10 ⁻⁵	4.7x10 ⁻⁶	7.4

Por lo que respecta a la precisión de las medidas (Tabla 19), puede decirse que es muy similar para ambos sustratos en todos los medios de trabajo. En cuanto a los límites de detección, éstos son considerablemente mejores para el peróxido de hidrógeno en las disoluciones acuosas y micelares que en los medios que contienen fase orgánica. Sin embargo, para el peróxido de 2-butanona, los valores obtenidos son similares en los medios acuosos y en las emulsiones aceite-agua y todos ellos mejores que el calculado en la mezcla acetonitrilo :regulador Tris. No obstante, debe decirse que los límites de detección conseguidos con este tipo de electrodo compósito enzimático son, en general, considerablemente mejores que los encontrados en la bibliografía para biosensores construidos con resina epoxi como aglutinante del grafito.

III.6.7. ELECTRODOS COMPÓSITOS DE RVC-RESINA EPOXI-HRP-FERROCENO/ /FERROCIANURO COMO DETECTORES AMPEROMÉTRICOS EN SISTEMAS EN FLUJO

La buena estabilidad de los electrodos, así como la rapidez de la respuesta del biosensor de RVC-resina epoxi.HRP-ferroceno y de RVC-resina epoxi.HRP-ferrocianuro a los cambios en la concentración de sustrato, los hacen susceptibles de ser utilizados como detectores amperométricos en sistemas en flujo. Para todos los estudios realizados se utilizó la célula de flujo de tipo “wall-jet” de gran volumen que se muestra en la Figura 1 (apartado III.4.1.2.). La disolución portadora fue el medio correspondiente en cada caso, y el potencial utilizado para llevar a cabo la detección amperométrica el mismo aplicado para efectuar las medidas en discontinuo en disoluciones agitadas.

III.6.7.1. OPTIMIZACIÓN DEL CAUDAL

La influencia del caudal de la disolución portadora sobre los parámetros característicos del fiagrama (intensidad de pico, i_p ; tiempo de residencia, T y anchura de pico a la semialtura, $W_{1/2}$) se evaluó utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato a un nivel de concentración de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno y empleando como disolución portadora la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} a pH 7.4. Se inyectaron volúmenes de **100 μl** y el potencial aplicado fue de 0.00 V. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20 y se representan en la Figura 20.

Tabla 20. Influencia del caudal sobre i_p (intensidad de pico); $W_{1/2}$ (anchura de pico a semialtura) y T (tiempo de residencia) obtenidos utilizando un electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno como detector amperométrico en un sistema de inyección en flujo.

CAUDAL, ml min^{-1}	i_p , nA	$W_{1/2}$, min	T, min
0.3	22.8	1.72	5.31
0.7	17.9	0.46	2.06
1.0	13.5	0.26	1.60
1.4	11.2	0.20	1.26
1.7	8.8	0.18	1.11
2.0	7.0	0.15	1.06
2.5	5.4	0.15	0.99
2.7	5.8	0.15	0.60

Como se puede observar, la altura de pico del fiagrama disminuyó al aumentar la velocidad del caudal, comportamiento característico de los sistemas FIA que utilizan biosensores enzimáticos como detectores y que se ha discutido con anterioridad.

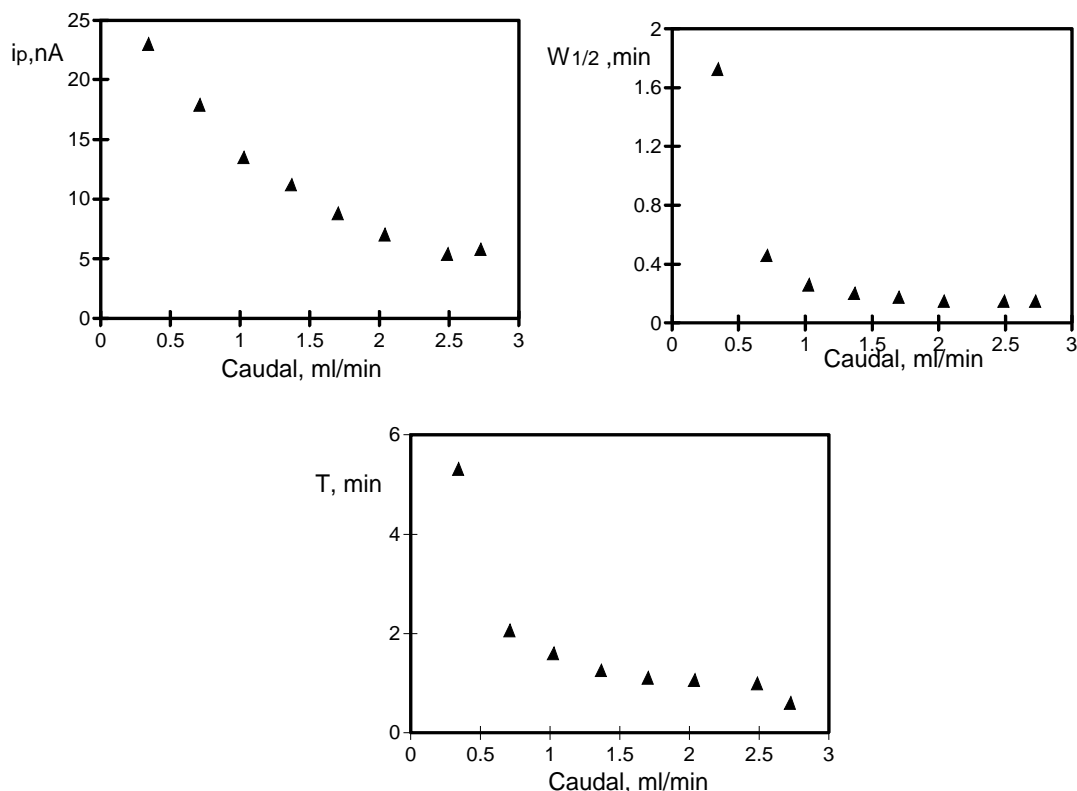


Figura 56. Influencia del caudal sobre i_p (intensidad de pico), $W_{1/2}$ (anchura de pico a la semialtura) y T (tiempo de residencia) obtenidos con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno como detector amperométrico en un sistema de inyección en flujo. Disolución oortadora: regulador de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.0 \text{ V}$

Por otro lado, y como era de esperar, tanto la anchura de pico ($W_{1/2}$) como el tiempo de residencia (T) disminuyen al aumentar la velocidad del portador. Teniendo en cuenta estos factores se ha elegido un caudal de 1.0 ml min^{-1} , donde se obtiene una buena altura de pico y la anchura de pico no varía demasiado para caudales próximos. Así mismo, el tiempo de residencia es prácticamente mínimo al trabajar con el caudal obtenido como óptimo.

III.6.7.2. REPETIBILIDAD DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS MEDIANTE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

Empleando las condiciones que se han elegido como óptimas en los apartados anteriores, se ha procedido a evaluar la repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas por inyección en flujo utilizando como detector el biosensor desarrollado. Para ello, se han realizado 15 inyecciones sucesivas de $100 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrógeno correspondiente $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en los diferentes medios que se han empleado como disolución portadora (Figura 57), y que son: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) (a), disolución micelar de Tritón X-100 0.05 % (b); medio emulsionado aceite-agua con 0.05 % de Tritón X-100 y 2 % de acetato de etilo en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) (c); medio acetonitrilo:agua en una proporción 90:10 (disolución Tris 0.01 mol l^{-1} , pH 7.4) (d) El potencial

aplicado ha sido de 0.00 V excepto para la mezcla acetonitrilo :agua, medio en el que ha sido -0.05 V. En la figura 57 se incluyen también los coeficientes de variación obtenidos para cada uno de los medios de medida. Como puede observarse, el biosensor desarrollado responde rápidamente a los cambios dinámicos en la concentración del sustrato en la disolución portadora.

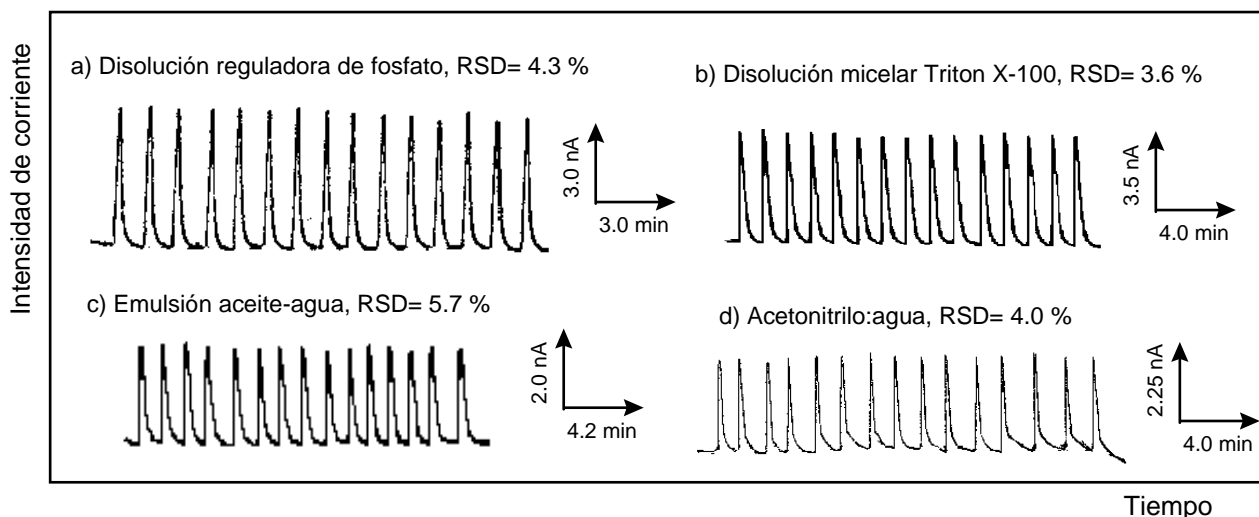


Figura 57. Diagramas obtenidos para 15 inyecciones sucesivas de H_2O_2 a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ obtenidas con los electrodos de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) (a), disolución micelar de Tritón X-100 0.05 % (b) y medio emulsionado aceite-agua (c) y con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro en medio acetonitrilo:agua (d).

Caudal= 1.00 ml min^{-1} . Volumen de inyección= $100 \mu\text{l}$.

A pesar de las condiciones hidrodinámicas existentes en la célula de flujo, la respuesta permanece prácticamente constante a lo largo de la serie, indicando una buena inmovilización de la enzima en la matriz electródica. Lo que se puede confirmar por el cálculo de las desviaciones estándar relativas que se muestran en la figura, y que no supera en ningún caso un valor del 6.0 %. No se llevaron a cabo más estudios de estabilidad del electrodo debido a que, obviamente, la reproducibilidad de las señales amperométricas con los pulidos, la reproducibilidad para diferentes biosensores y la estabilidad con el tiempo de utilización y almacenaje, darían resultados similares a los obtenidos cuando se utiliza el método de análisis en discontinuo, visto anteriormente.

III.6.7.3. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Los calibrados obtenidos para la determinación de peróxido de hidrógeno mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica, sobre un electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno para los medios predominantemente acuosos y de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro para el medio acetonitrilo :agua se representan en la Figura 58. Los intervalos de concentración estudiados son $(0.1-10.0) \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} a pH 7.4, disolución 0.05% de Triton X-100 en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} y medio emulsionado aceite-agua formado por 2% de acetato de etilo y 0.05% de Triton X-100 en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} y $(0.5-20.0) \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ para la mezcla acetonitrilo disolución reguladora Tris 0.01 mol l^{-1} , pH 7.4.

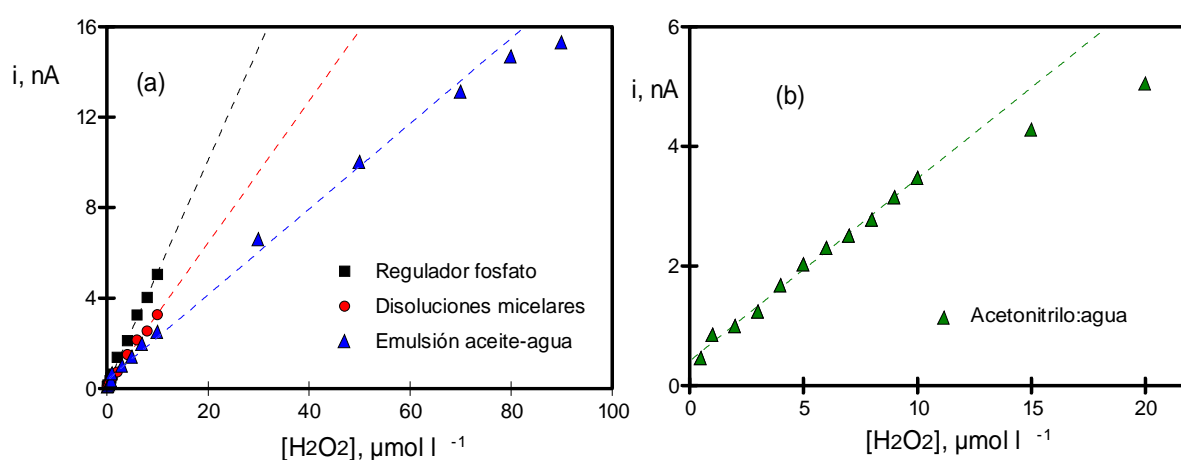


Figura 58. Calibrados para la determinación de peróxido de hidrógeno mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica sobre un electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno (a) para los medios predominantemente acuosos ($E_{ap}=0.00 \text{ V}$) y RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro (b) para la mezcla acetonitrilo :agua ($E_{ap}= -0.05 \text{ V}$).

En la Tabla 21 se muestran los intervalos de linealidad, pendientes y ordenadas en el origen obtenidas en análisis por inyección en flujo para los medios estudiados. Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación de 0.05.

Tabla 21. Intervalos de linealidad, pendientes y ordenadas en el origen de los calibrados para el H_2O_2 con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno para los medios predominantemente acuosos ($E_{ap}=0.0 \text{ V}$) y el de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro para el medio $\text{CH}_3\text{CN}/\text{agua}$ ($E_{ap}= -0.05 \text{ V}$) mediante análisis por inyección en flujo. Caudal : 1.0 ml min^{-1} , VoL. inyección : $100 \mu\text{l}$.

Medio	Intervalo linealidad mol l^{-1}	Pendiente $\mu\text{A/mol l}^{-1}$	Ordenada en el origen, μA	r
Tampón fosfato	$(0.1-10.0) \times 10^{-6}$	$(0.50 \pm 0.03) \times 10^3$	0.10 ± 0.01	0.998
Micelas Tritón X-100	$(0.1-10.0) \times 10^{-6}$	$(0.31 \pm 0.02) \times 10^3$	0.13 ± 0.01	0.998
Emulsión aceite-agua	$(0.1-80.0) \times 10^{-6}$	$(0.187 \pm 0.008) \times 10^3$	0.5 ± 0.2	0.998
$\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$	$(0.5-10.0) \times 10^{-6}$	$(0.31 \pm 0.2) \times 10^3$	0.4 ± 0.1	0.998

Los RSD, así como los límites de detección y determinación que se recogen en la Tabla 22 se han calculado según los criterios indicados en el apartado III.5.6. para los diferentes medios estudiados al nivel de concentración que se indica en dicha Tabla.

Tabla 22. Límites de determinación y detección para la determinación de peróxido de hidrógeno mediante análisis por inyección en flujo en los medios estudiados. Las condiciones experimentales son las que se indican en la Tabla 21.

Medio	Concentración, mol l ⁻¹	Límite determinación, mol l ⁻¹	Límite detección, mol l ⁻¹	RSD, %
Tampón fosfato	1.0x10 ⁻⁷	1.8x10 ⁻⁷	5.4x10 ⁻⁸	8.2
Micelas Tritón X-100	3.0x10 ⁻⁷	6.4x10 ⁻⁷	1.9x10 ⁻⁷	8.1
Emulsión aceite-agua	1.0x10 ⁻⁷	2.2x10 ⁻⁷	8.0x10 ⁻⁸	7.6
CH ₃ CN :H ₂ O	5.0x10 ⁻⁷	1.3x10 ⁻⁶	3.9x10 ⁻⁷	8.2

Como se puede observar, los intervalos de linealidad, son algo más amplios que los que se obtuvieron en las medidas en discontinuo, pero no aumentan tanto como cabría esperar para un sistema de medida en continuo. Además, a pesar de que los valores de las pendientes son mucho mayores en discontinuo que en FIA, los límites de determinación y detección no resultan tan distintos como podría pensarse. En cuanto a la comparación de resultados dependiendo del medio de medida, no se observa tampoco ninguna diferencia importante cuando se comparan con las medidas realizadas en discontinuo. Así pues, se puede concluir que los electrodos de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno/ferrocianuro proporcionan características analíticas muy similares trabajando en discontinuo y en FIA, por lo que la elección del modo de medida dependerá solo de la rapidez con que se quieran realizar las medidas, volumen de disoluciones de trabajo de que se disponga, etc.

III.7. COMPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS COMPÓSITOS ENZIMÁTICOS DE MATRICES GRAFITO-TEFLÓN Y RESINA EPOXI

Ya se ha comentado a lo largo de esta Memoria que los electrodos compósitos enzimáticos presentan importantes ventajas con respecto a otros diseños de biosensores. Como se ha comprobado en los apartados anteriores, tanto los electrodos enzimáticos construidos con matrices de grafito-Teflón como de RVC-Resina Epoxi presentan buenas características en cuanto a sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad. No obstante, cada una de estas matrices presenta una serie de diferencias con respecto a la otra que merecen ser comentadas.

El primer punto a considerar, es la estabilidad de los electrodos. Se ha demostrado que en ambas matrices las enzimas se distribuyen de forma homogénea, y que mediante un simple pulido es posible recuperar las propiedades iniciales del biosensor. Sin embargo, la matriz de RVC-resina epoxi requiere ser pulida todos los días y tiene un tiempo de vida determinado, independientemente del uso que se haya hecho del electrodo. Por el contrario, el tiempo de vida útil de los electrodos enzimáticos de grafito-Teflón depende fuertemente de los cambios de temperatura que sufren en el proceso de almacenamiento/utilización, si bien en general dicho periodo de tiempo es mayor. Cuando la actividad de la enzima se pierde de forma significativa y no se puede recuperar por pulido, en el caso de los biosensores de grafito-Teflón hay que sustituir la porción de pastilla utilizada como electrodo por una nueva. Sin embargo, en el caso del RVC-resina epoxi, se tiene que construir un electrodo nuevo, siendo el tiempo necesario para ello mucho más largo debido al tiempo de curado de la resina, que el de fabricación de las pastillas de grafito-Teflón. Así mismo, es importante tener en cuenta que los biosensores basados en RVC muestran una pequeña caída en la intensidad de corriente en el estado estacionario con las medidas en medios acuosos debido al “efecto lavado” comentado en el apartado III.6.4.1. Este comportamiento no se produce con los biosensores de grafito-Teflón, dadas las características de inmovilización de la enzima.

A pesar de estas desventajas que presenta la matriz de RVC-resina epoxi con respecto a la de grafito-Teflón, es importante tener en cuenta que la relación señal/ruido que presenta es excelente y hace que las medidas se puedan realizar muy fácilmente, ya que se acortan los tiempos de espera hasta alcanzar una línea base estable, posee muy poco ruido de fondo y permite medir intensidades de corriente bajas sin ningún problema. Ya se ha comentado que es muy difícil conseguir un electrodo compósito basado en grafito-Teflón, u otro tipo de materiales, que presente un área superficial conductora tan pequeña como la del material compósito de RVC-resina epoxi, ya que sería muy difícil establecer el contacto entre dicha fase conductora. La estructura rígida y tridimensional del RVC lo permite, de ahí que la relación señal/ruido sea mayor que con otros electrodos compósitos. La estructura del RVC también permite la posibilidad de conocer el área efectiva de la superficie del electrodo, mientras que en

la matriz de grafito-Teflón es muy difícil conocer como está distribuida en realidad la fase conductora con respecto a la fase aislante.

Hay que destacar también el hecho de que, para el peróxido de hidrógeno en medio acuoso, el límite de detección es mejor en un orden de magnitud con el biosensor de RVC cuando se compara con el obtenido con la matriz de grafito-Teflón. Sin embargo, esta mejora en el límite de detección solo se debe a la buena relación señal/ruido, ya que los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para el electrodo de grafito-Teflón son bastante mayores, siendo por lo tanto más sensible a los cambios de concentración en la disolución de trabajo, debido a que hay una área activa mayor desde el punto de vista electroquímico.

Con respecto a la posibilidad de utilización de estas matrices electródicas en los diferentes medios de trabajo, se ha visto que los electrodos de RVC-resina epoxi están bastante más limitados, ya que presentan problemas de rigidez dependiendo del disolvente que se utilice, y no tienen las amplias posibilidades de aplicación de las matrices de grafito-Teflón. Por lo que respecta al comportamiento de cada uno de los electrodos en los diferentes medios que se han podido utilizar con ambas matrices, hay que decir que éste es aparentemente similar en lo que se refiere a estabilidad. En la figura 59 se comparan las pendientes y los límites de detección obtenidos para el peróxido de hidrógeno y el peróxido de 2-butanona en todos los medios estudiados: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, micelas formadas con 0.05 % de Triton X-100 en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , emulsión aceite-agua de Triton X-100 y acetato de etilo en disolución reguladora de fosfato, y mezcla acetonitrilo-disolución acuosa de tampón Tris 0.02 mol l^{-1} (pH 7.4). En los medios predominantemente acuosos se utilizó ferroceno y en el medio predominantemente ferrocianuro como mediador.

De la Figura 59 puede deducirse lo siguiente :

- En el medio constituido por la disolución reguladora de fosfato el límite de detección obtenido para H_2O_2 con el electrodo de RVC es un orden de magnitud menor que con el biosensor de grafito-Teflón. Sin embargo, los valores son más parecidos para el peróxido de 2-butanona.
- En la mezcla acetonitrilo :agua, por el contrario, se obtienen mejores límites de detección tanto para peróxido de hidrógeno, como para peróxido de 2-butanona con la matriz de grafito-Teflón.
- A pesar de que con el electrodo de RVC-resina epoxi la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida con el ferrocianuro también es mayor que con el ferroceno, en la mezcla acetonitrilo :agua no se observa que haya una mejora en la sensibilidad tan acusada como se puede dar con el electrodo de grafito-Teflón, ya que las pendientes en este medio

con la matriz de RVC son menores tanto para el peróxido de hidrógeno como para el peróxido de 2-butanona con respecto a los medios acuosos.

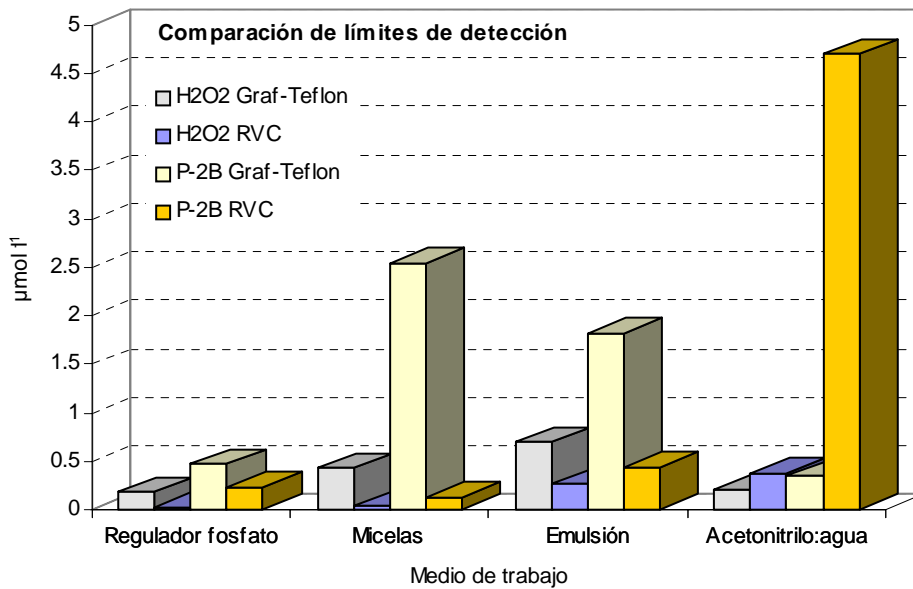
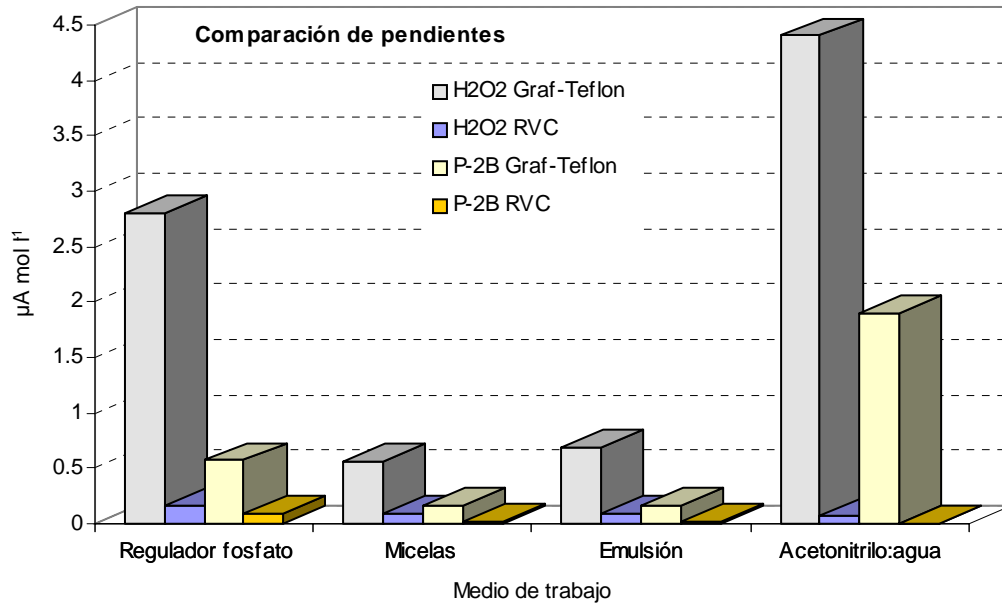


Figura 59. Comparación de las pendientes y límites de detección obtenidos en discontinuo para el peróxido de hidrógeno y el peróxido de 2-butanona en los medios de trabajo estudiados con biosensores construidos con matrices de grafito-Teflón y RVC-resina epoxi.

En los medios micelares y emulsionados, la sensibilidad disminuye para el electrodo de grafito-Teflón con respecto a la disolución reguladora de fosfato. En el caso del electrodo de RVC también se observa una disminución, pero menos drástica. En cuanto a los límites de detección obtenidos, van siendo peores al ir pasando del medio totalmente acuoso, a las micelas y la emulsión, siendo la variación muy parecida para los dos tipos electrodo, aunque empeoran mucho más para el peróxido de 2-butanona con el electrodo de grafito-Teflón.

Parece evidente, que la matriz de RVC se ve mucho más afectada por el medio orgánico que la matriz de grafito-Teflón. Para conocer un poco mejor si realmente es debido a la matriz o a la reacción enzimática, en la figura 60 se han comparado las constantes de Michaelis y las velocidades máximas aparentes obtenidas para peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-butanona en los distintos medios de trabajo. Se ha observado lo siguiente :

- En los medios predominantemente acuosos, los valores de la constante de Michaelis para peróxido de hidrógeno son bastante similares con los dos electrodos, lo que quiere decir que la afinidad de la enzima por el sustrato es bastante parecida independientemente del tipo de biosensor empleado. Sin embargo, para el peróxido de 2-butanona la K_m es mayor con el electrodo de grafito-Teflón, de ahí que se hayan obtenido peores límites de detección con esta matriz. En el medio predominantemente orgánico, se observa que para los dos electrodos se dificulta la formación del complejo ES en comparación con el medio acuoso. Cuando se utiliza el electrodo de RVC-resina epoxi, el valor de la K_m para el peróxido de hidrógeno y, sobre todo para el peróxido de 2-butanona en acetonitrilo :agua es más alto que el obtenido con el electrodo de grafito-Teflón, lo que se traduce en que los límites de detección serán más altos con la matriz de RVC. En cualquier caso, el hábito del comportamiento de cada uno de los electrodos con el medio y el sustrato es muy similar.
- En cuanto a las velocidades máximas, ya vimos en el apartado III.5.5.2. que no se podían utilizar como punto de comparación entre los medios predominantemente acuosos y predominantemente orgánicos, porque se emplean mediadores diferentes, pero en este caso si se pueden comparar los valores de velocidad máxima entre las dos matrices electrónicas empleadas, porque se ha utilizado ferrocianuro con las dos. Como se puede observar, los valores de velocidad máxima para el electrodo de grafito-Teflón en acetonitrilo :agua son mucho más altos que para el de RVC-resina epoxi, el cual incluso proporciona valores menores que en los medios predominantemente acuosos. Así pues, en estas condiciones el comportamiento de ambas matrices es completamente diferente, ya que con la matriz de grafito-Teflón la velocidad de formación de los productos es mucho más favorable que con la de RVC-resina epoxi para los dos sustratos estudiados. En los medios predominantemente acuosos, aunque tampoco se puede hacer una comparación

cuantitativa porque cada electrodo contiene una cantidad de enzima diferente, se observa que el comportamiento de cada electrodo con dichos medios es similar.

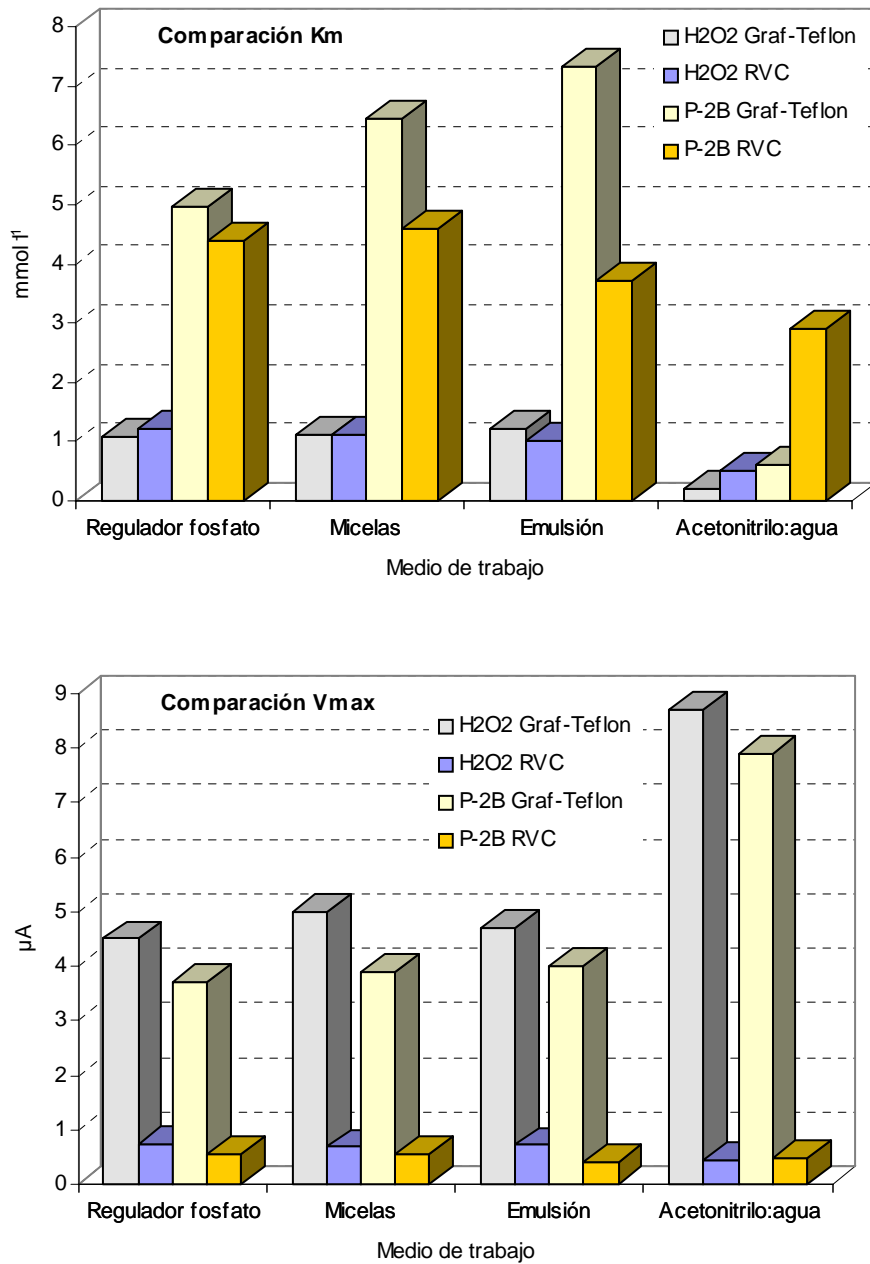


Figura 60. Comparación de las constantes de Michaelis y velocidad máxima obtenidos para el peróxido de hidrógeno y el peróxido de 2-butanona en medio acuoso y en la mezcla acetonitrilo-agua.

Así pues, en lo que a parámetros cinéticos se refiere, únicamente se ha encontrado diferencia de comportamiento de la matriz de RVC con respecto a la de grafito-Teflón en medio acetonitrilo :agua, lo que confirma que los medios predominantemente orgánicos producen un efecto negativo en la matriz de RVC-Resina Epoxi. Esto puede atribuirse a la diferente

hidrofobicidad de las matrices empleadas. Según lo visto, la matriz de RVC será menos hidrofóbica, de ahí que cuando se realizan medidas en medios más hidrofóbicos se obtengan peores características analíticas y disminuya la velocidad de formación de productos a partir de la reacción enzimática. Esto podría explicar también que el comportamiento del peróxido de 2-butanona sea mucho peor con la matriz de RVC que con la de grafito-Teflón.

Esta podría ser también la causa de que la disminución de la señal obtenida para el peróxido de hidrógeno midiendo en acetonitrilo :agua con el electrodo compósito de RVC-resina epoxi-HRP-ferrocianuro, se produzca a potenciales menos negativos de lo que lo hace cuando se mide con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro.

Como se ha visto, cada una de las matrices presenta unas características determinadas que podrán convenir o no para la resolución de un problema analítico concreto. Así, la matriz de RVC-Resina epoxi supone una buenísima alternativa para ser utilizada como sensor de alarma en medidas de campo, ya que además de que las medidas presentan una excelente estabilidad, es capaz de detectar concentraciones muy bajas con una instrumentación muy sencilla. La matriz de grafito-Teflón, sin embargo, es un tipo de electrodo mucho más estable y robusto con el que se debe buscar más la exactitud de la medida, y que presenta muchas posibilidades debido a que es posible su utilización prácticamente en cualquier medio de trabajo. Por esta razón, se ha elegido esta última matriz como la base de los diferentes biosensores que se presentan en esta Memoria, aunque también se han desarrollado electrodos con matriz de RVC con objeto de demostrar su aplicabilidad.

III.8. BIBLIOGRAFÍA ELECTRODOS COMPÓSITOS DE PEROXIDASA

- “ACS Committee in Environmental Improvement: Principles of Environmental Analysis”, *Analytical Chemistry*, 55, 2210 (1983).
- Adeyoju, O., Iwuoha E.I., Smyth, M.R. (1995), *Electroanalysis*, 7, 924.
- Alegret, S. (1996). “Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing”. *Analyst*, 121, 1751-1758.
- Barlett, P.N., Pletcher, D., Zeng, J. (1997). “Approaches to the Integration of electrochemistry and biotechnology. I. Enzyme-modified reticulated vitreous carbon electrodes”. *J. Electrochem. Soc.*, Vol. 144, No 11. 3705-3710.
- Barlett, P.N., Tebbutt, P., Whitaker, R.G. (1991). *Prog. React. Kinet.*, 16, 55.
- Bethod A., García Alvarez Coque, C., “Micellar Liquid Chromatography” *Chromatographic Science Series*. Volume 83. Marcel Dekker Inc.
- Bifulco, L., Cammaroto C., Newman, J.D., Turner, A.P.F. (1994). *Anal. Lett.*, 27,1443.
- Blaedel, W.J., Wang, J. (1980a). “Mixed immobilized Enzyme-Porous electrode reactor”. *Analytical Chemistry*, 52, 1426-1429.
- Blaedel, W.J., Wang, J. (1980b). “Rotated porous carbon disk electrode”. *Analytical Chemistry*, 52, 76-80.
- Bogdanovskaya, V.A., Tarasevich. M.R., Hintsche R., Scheller, F., (1988). *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19, 581.
- Campanella, L., Martini, U., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1996). “A new catalase enzyme sensor able to determine the hydrogen peroxide directly in chloroform”. *Analisis*, 24, 294-298.
- Chen, X., Zhang, J.Z., Wang, B.Q., Cheng, G.J., Dong, S.J. (2001). “Hydrogen peroxide biosensor based on sol-gel-derived glasses doped with Eastman AQ polymer”. *Analytica Chimica Acta*. 434 (2), 255-260.
- Cornish-Bowden A., Wharton, C.W. (1988) “Enzyme Kinetics”. Ed. IRL Press
- Cosnier, S., Lambert, F., Stoytcheva, M. (2000). “A composite clay glucose biosensor based on an electrically connected HRP”. *Electroanalysis*, 12, no.5, 356-360.
- Darder, M., Takada, K., Pariente, F., Lorenzo, E., Abruña, H.D. (1999). “Dithiobissuccinimidyl propionate as an anchor for assembling peroxidases at electrode surfaces and its application in a H₂O₂ biosensor”. *Analytical Chemistry*, 71, 5530-5537.
- Dominguez, R., Serra, B., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (2001). “Chiral analysis of amino acids using electrochemical composite bienzyme biosensors”. *Analytical Biochemistry*, 298 (2) : 275-282.
- Dunford H.B., Adeniran, A.J. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.*, 251, 536.
- Ennis, J.N., Buxton, P.C. (1998). “The use of Constant Potential Amperometry to determine the Oxidation Rate of [R-(Z)- α -(methoxyimino)-1-azabicyclo[2.2.2]octane-3-acetonitrile by dimethyldioxirane”. *Current Separations*, 17 :3, 75-77.

- Epton, R., Hobson M.E., Marr, G. (1978). *J. Organomet. Chem.*, 149.
- Everse J., Everse K.E., Grishan, M.B. (1991), *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Vol. 1 ad 2, CRC Press, Boca Raton, p. 620.
- Gamburzev, S., Atanasov P., Ghindilis A.L., Wilkins E., Kaisheva, A., Iliev, I. (1997). "Bifunctional hydrogen peroxide electrode as an amperometric transducer for biosensors". *Sensors and Actuators B*, 43, 70-77.
- García Moreno, E., Ruiz, M.A., Barbas C., Pingarrón, J.M. (2001). "Determination of organic peroxides in reversed micelles with poly-N-methylpyrrole horseradish peroxidase amperometric biosensor". *Analytica Chimica Acta*, 448 (1-2) :9-17.
- Garguilo, M.G., Huynh, N., Proctor, A., Michael, A.C., (1993). *Analytical Chemistry*, 65, 523.
- Gaspar, S., Zimmermann, H., Gazaryan, I., Csöregi, E., Schuhmann, W. (2001). "Hydrogen peroxide biosensors based on direct electron transfer from plant peroxidases immobilized on self-assembled thiol monolayer modified gold electrodes". *Electroanalysis*, 13, No. 4. 284-288.
- Gerlache M., Girousi, S., Quarin, G., Kauffmann, J-M. (1998). "Pulsed electrochemical detection of H₂O₂ on gold". *Electrochimica Acta*, Vol. 43. No. 23, pp 3467-3473.
- Guo, Y., Dong., S. (1997) "Organic phase enzyme electrodes based on organohydrogel". *Analytical Chemistry.*, 69, 1904-1908.
- Hasebe, K., Osteryoung, J. (1975). *Anal. Chem.* 47, 2414.
- Heider, G.H., Sasso, S.V., Huang, K., Yacynych, A.M. (1990). "Electrochemical platinization of reticulated vitreous carbon electrodes to increase biosensor response". *Analytical Chemistry*, 62, 1106-1110.
- Iwuoha, E.I., Smyth, M.R. and Lyons M.E.G. (1997). "Organic phase enzyme electrodes :kinetics and analytical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 12, No. 1 pp. 53-75.
- Iwuoha E.I., Saenz de Villaverde, D., Peña Garcia, N., Malcolm, M.R., Pingarrón, J.M. (1997). "Reactivities of organic phase biosensors. 2. The amperometric behaviour of horseradish peroxidase immobilised on a platinum electrode modified with an electrosynthetic polyaniline film". *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 12, No. 8, pp 749-761.
- Jaraba, P., Agüi, L., Yañez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M. (1998). "NADH amperometric sensor based on poly(3-methylthiophene)-coated cylindrical carbon fiber microelectrodes : application to the enzymatic determination of L-lactate". *Electrochimica Acta*, 43 (23) : 3555-3565.
- Johnston, D.A., Cardosi, M.F., Vaughan, D.H. (1995). *Electroanalysis*, 7, 520.
- Jönsson-Pettersson, G. (1991). "Reagentless Hydrogen Peroxide and Glucose sensors based on Peroxidase immobilized on Graphite Electrodes". *Electroanalysis*, 3, 741-750.).
- Jönsson, G., Gorton, L. (1989). *Electroanalysis*, 1, 465.
- Khayyami, M., Johansson, G., Kriz, D., Xie B., Larsson, PO, Danielsson, B. (1996). "Flow-injection determination of trace hydrogen peroxide or glucose utilizing an amperometric biosensor based on glucose oxidase bound to a reticulated vitreous carbon electrode". *Talanta*, 43, 957-962.

- Khayyami, M., Peña Garcia, N., Larsson, P.O., Danielsson, B., Johansson, G. (1997). "An Amperometric Lactate Sensor Based on a NAD⁺-Analog and Lactate Dehydrogenase Coimmobilized on Reticulated Vitreous Carbon". *Electroanalysis*, 9, No. 7, 523-526.
- Khayyami, M., Pita, M.T.P., Garcia, N.P, Johansson G., Danielsson B., Larsson P.O. (1998). "Development of an amperometric biosensor based on acetylcholine esterase covalently bound to a new support material". *Talanta*. 45(3) 557-563.
- Kinoshita, H., Torimura, M., Kano, K., Ikeda, T. (1997). "Peroxidase based amperometric sensor of hydrogen peroxide generated in oxidase reaction : application to creatinine and creatine assay". *Electroanalysis*, 9, No. 16. 1234-1238.
- Kulys, J., Pesliakienė, M., Samalius, A. (1981). *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 8 , 81.
- Lange, M.A., Chambers, J.Q. (1985). "Amperometric determination of glucose with a ferrocene-mediated glucose oxidase/polyacrylamide gel electrode". *Analytica Chimica Acta*, 175. 89-97.
- Laval, J.M., Bourdillon, C., Moiroux, J. (1984). "Enzymic electrocatalysis : electrochemical regeneration of NAD⁺ with immobilized lactate dehydrogenase modified electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* 106(17), 4701-4706.
- Lindgren, A., Tanaka, M., Ruzgas, T., Gorton L., Gazaryan, I., Ishimori, K., Morishima, I. (1999). "Direct electron transfer catalysed by recombinant forms of horseradish peroxidase : insight into the mechanism". *Electrochemistry Communications*, 1,171-175.
- Liu, B.H., Liu, Z.J., Chen, D.D., Kong J.L., Deng, J.Q. (2000). "An amperometric biosensor based on the conimmobilization of horseradish peroxidase and methylene blue on a beta-type zeolite modified electrode". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 367 (6) 539-544.
- Liu, H., Qian, J., Liu, Y., Yu, T., Deng, J. (1995a). *Anal. Proc.*, 32 (1995) 475.
- Liu, Y., Liu, H., Qian, J., Deng, J., Yu T. (1995b). *Anal. Chim. Acta*, 316, 65.
- Liu, S.Q., Ju, H.X. (2002) "Renewable reagentless hydrogen peroxide sensor based on direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on colloidal gold-modified electrode". *Analytical Biochemistry*. 307 (1) :110-116.
- Liu, H., Ying, T., Sung, K., Li, H., Qi, D. (1997). "Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode". *Analytica Chimica Acta* 344, 187-199.
- Mao, L., Yamamoto, K. (2000) "Glucose and choline on-line biosensors based on electropolymerized Meldola's Blue". *Talanta*, 51, 187-195.
- Moody, A., Setford, S., Saini, S. (2001) "Peroxidase enzyme sensor for on-line monitoring of disinfection processes in the food industry". *Analyst*, 126(10) :1733-1739.
- Moore, A.N.J., Katz, E., Willner, I. (1996). "Electrocatalytic reduction of organic peroxides in organic solvents by microperoxidase-11 immobilized as a monolayer on a gold electrode". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 417, 189-192
- Morales, M.D., Morante, S., Escarpa, A., Gonzalez, M.C., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (2002). "Design of a composite amperometric enzyme electrode for the control of benzoic acid content in food". *Talanta*, 57(6) :1189-1198.

- Ohara, T.J., Vreeke, M.S., Battaglini, Heller, A. (1993). *Electroanalysis*, 5, 825.
- Pantano, P., Morton, T.H., Kuhr, W.G. (1991). *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1832.
- Popescu, I.C., Cosnier, S., Labbé, P. (1997). "Peroxidase-glucose oxidase-poly(amphiphilic pyrrole) bioelectrode for selectively mediated amperometric detection of glucose". *Electroanalysis*, 9, No. 13. 998-1004.
- Popescu, I.C., Csöregi E., Gorton L. (1996). "Peroxidase-modified carbon paste microelectrode as amperometric FI-detector for peroxidases in partial aqueous media". *Electroanalysis*, 8, no. 11. 1014-1019.
- Puig, D., Ruzgas, T., Emnéus, J., Gorton, L., Marko-Varga, G., Barceló, D. (1996). "Characterization of Tyrosinase-Teflon/Graphite Composite electrodes for the determination of catechol in Environmental Analysis". *Electroanalysis*, 8, No. 10, 885-890.
- Rajendran, V., Csöregi, E., Okamoto, Y., Gorton L. (1998). "Amperometric peroxide sensor based on horseradish peroxidase and toluidine blue O-acrylamide polymer in carbon paste". *Analytica Chimica Acta*, 373, 241-251.
- Ramanathan, K., Johnsson, B.R., Danielsson, B. (2001). "Sol-gel based thermal biosensor for glucose". *Analytica Chimica Acta*. (427) 1-10.
- Ramirez Garcia S., Céspedes, F., Alegret, S. (2001). "Development of conducting composite materials for electrochemical sensing in organic media". *Electroanalysis*, 13, No.7. 529-535.
- Razola, S.S., Aktas, E., Vire, J.C., Kauffmann J.M. (1999). "Reagentless enzyme electrode based on phenothiazine mediation of horseradish peroxidase for subnanomolar hydrogen peroxide determination". *Analyst*, 125(1) 79-85.
- Razumas, V.J., Gudavicius, A.V., Kulys J.J. (1986). *J. Electroanal. Chem.* 198, 81.
- Reviejo A.J., Liu F., Pingarrón, J.M. (1994). "Amperometric biosensors in reversed micelles". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 374, 133-139
- Rosen, M.J. (1978). "Surfactants and Interfacial Phenomena" A Iley-Interscience Publication. John Wiley & Sons.
- Ruan C., Yang, F., Xu, J., Lei, C., Deng, J. (1997). "Immobilization of methylene blue using α -zirconium phosphate and its application within a reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor". *Electroanalysis*, 9, no. 15. 1180-1184.
- Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton L., Marko-Varga G. (1996). "Peroxidase-modified electrodes :Fundamentals and application". *Analytica Chimica Acta* 330, 123-138.
- Shan Lin, M., Luan Jan, B. (1997). *Electroanalysis* 9, 340.
- Schubert, F., Saini S., Turner A.P.F., Scheller F. (1992). *Sensors Actuators*, B7, 408.
- Scott, D.L., Paddock, R.M., Bowden, R.F. (1992) *J. Electroanal. Chem.*, 341, 307.
- Serra, B., Benito, B., Agüi, L., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (2001). "Graphite-Teflon-peroxidase composite electrochemical biosensors. A tool for the wide detection of phenolic compounds". *Electroanalysis*, 13 (8-9) : 693-700.

- Serra B., Jiménez, S., Mena M.L., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (2002). "Composite electrochemical biosensors :a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, 17(3) :217-226.
- Serra, B., Mateo E., Pedrero, M., Reviejo, A.J, Pingarrón, J.M. (1999a). "Graphite-Teflon-tyrosinase composite electrodes for the monitoring of phenolic compounds in predominantly non-aqueous media". *Analisis*, 27 N°7, 592-599.
- Serra B., Reviejo A.J., Parrado C., Pingarrón, J.M. (1999b) "Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-Lactate : Application to food samples". *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 505-513.
- Sleszynski, N., Osteryoung, J., Carter, M. (1984). "Arrays of very small voltammetric electrodes based on reticulated vitreous carbon". *Analytical Chemistry*, 56, 130-135.
- Strohl, A.N., Curran, D.J. (1980). *Analytica Chimica Acta*, 108, 379-383.
- Tatsuma, T., Okawa Y., Watanabe, T. (1989) *Anal. Chem.*, 61.
- Thanachasai, S., Rokutanazono, S., Yoshida, S., Watanabe, T. (2002). "Novel hydrogen peroxide sensors based on peroxidase-carrying poly{pyrrole-co-[4-(3-pyrrolyl)butanesulfonate]} (Py-PS) copolymer films". *Analytical Sciences*, 18(7) :773-777.
- Tian, F.M., Xu, B., Zhu, L.D., Zhu, G.Y. (2001). "Hydrogen peroxide biosensor with enzyme entrapped within electrodeposited polypyrrole based on mediated sol-gel derived composite carbon electrode". *Analytica Chimica Acta*. 443 (1) 9-16.
- Tianqing, L., Rong G., Genping, S. (1999). "Determination of the micellar properties of Triton X-100 by voltammetry method". *J. Dispersion Science and Technology*, 20(4), 1205-1221.
- Ugarova N.N., Lebedeva, O.V., (1978) *Biokhimiya*, 43, 1731.
- Valdés García, M.A., Tuñón Blanco, P., Ivaska, A. "A poly(o-aminophenol) modified electrode as an amperometric hydrogen peroxide biosensor". *Electrochimica Acta*. Vol. 43. No. 23 pp 3533-3539.
- Valivety, R., Halling, P.J., Macrae, A.R. (1992). "Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1118, 218-22.
- Vreeke, M., Maidan R., Heller A. (1992) *Anal. Chem.*, 64, 3084.
- Wang, J., Freiha, B., Naser, N., González Romero E., Wollenberger, U., Ozsoz, M., Evans, O. (1991). "Amperometric biosensing of organic peroxides with peroxidase-modified electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 254, 81-88.
- Wang, J., Lin, M.S. (1989) *Electroanalysis*, 1, 43.
- Wang, J., Naser, N., Agnes L., Wu, H., Chen, L. (1992). *Analytical Chemistry*, 64, 1285.
- Wang, J., Reviejo, A.J. (1993). "Enzymic Assays of Organic Peroxides in Microemulsion Systems". *Analyst*, Vol. 118, 1149-1151),
- Wang, J., Reviejo, A.J., Angnes, L. (1993). *Electroanalysis*, 5 , 575.

- Wang, J., Varughese K., (1990). *Anal. Chem.*, 62, 318.
- Wang, B., Zhang, J., Cheng, G., Dong, S. (2000). "Amperometric enzyme electrode for the determination of hydrogen peroxide based on a hydrogen peroxide based on sol-gel/hydrogel composite film". *Analytica Chimica Acta*, 407, 111-118.
- Wangikax, P.P., Graycar, T.P., Estell, D.A., Clark, D.S., Dordic, J.S. (1993). "Protein and solvent engineering of subtilisins BPN' in nearly anhydrous organic medium. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 12231-12236.
- Wieck, H., Heider, G.H., Yacynych, A.M., (1984). "Chemically modified reticulated vitreous carbon electrode with immobilized enzyme as a detector in flow-injection determination of glucose". *Anal. Chim. Acta.* 158(1) 137-141.
- Wieck H.J., Shea C., Yacynych A.M. (1982). "Reticulated Vitreous Carbon electrode materials chemically modified with immobilized enzyme". *Analytica Chimica Acta*, 142, 277-279.
- Xu, J.J., Zhou, D-M, Chen H.Y. (1998). "A reagentless hydrogen peroxide biosensor based on the coimmobilization of thionine and horseradish peroxidase by their cross-linking with glutaraldehyde on glassy carbon electrode". *Electroanalysis*, 10, No. 10. 713-716.
- Yabuki, S., Mizutani, F., Hirata, Y. (2000). "Hydrogen peroxide determination based on a glassy carbon electrode covered with polyion complex membrane containing peroxidase as mediator". *Sensors and actuators-B-Chemical*. 65(1-3) 49-51.
- Yaaropolov, A.I., Tarasevich, M.R., Varfolomeev, S.D. (1978). *Bioelectrochem. Bioenerg.* 5 ,18.
- Yu, J.H., Ju H.X. (2002) "Preparation of porous titania sol-gel matrix for immobilization of horseradish peroxidase by a vapor deposition method". *Analytical Chemistry*, 74 (14) : 3579-3583.
- Zhang, Y.L., Jin, S.Z., Zhang C-X, Shen, H-X. (2001). "Studies on electrocatalytic kinetic behavior of horseradish peroxidase and assay for hydrogen peroxide at salt bridge supported bilayer lipid membrane". *Electroanalysis*, 13, no.2. 137-142.
- Zhang, Z., Lei, C., Sun, W., Liu, H., Deng, J. (1996). "Electrochemical immobilization of horseradish peroxidase on an electro-activated glassy carbon electrode". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 419, 85-91.
- Zhu, M., Han, S., Yuan, Z. (2000). "β-cyclodextrin polymer as the immobilization matrix for peroxidase and mediator in the fabrication of a sensor for hydrogen peroxide". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 480, 255-261.
- Zulfikar, Brynn Hibbert, D., Alexander, P.W. (1995). "A tubular graphite-epoxy electrode incorporating horseradish peroxidase as a potentiometric sensor for hydrogen peroxide". *Electroanalysis*, 7, No.8, 722-725.

Tabla VII. Biosensores amperométricos basados en la peroxidasa

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencias
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de C vitrificado+película compósita de grafito-arcilla+3,4-dihidroxibenzaldehído	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0	Polímero Monitorización de reducción de H ₂ O ₂ E _{ap} = 0.0 V vs SCE	---	---	---	Cosnier, et al., 2000
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento durante electropolimerización de pirrol	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de carbono virificado modificado con polipirrol+enzima	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0	Monitorización de reducción de H ₂ O ₂ E _{ap} = -0.1 V vs SCE	Pendiente : 13.7 mA M ⁻¹	---	---	Popescu, et al., 1997
HRP / H ₂ O ₂	Entrecruzamiento con glutaraldehído +BSA y cubierto con Nafion	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo carbono vitrificado modificado con azul de Meldola electropolimerizado	Discontinuo y flujo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Azul de Meldola Monitorización reducción de H ₂ O ₂ a -0.2 V vs Ag/AgCl	---	Discontinuo : Sin variaciones durante 7 días (3-4 horas/día) Flujo : sin pérdidas de actividad durante 24 horas	---	Mao y Yamamoto, 2000
HRP / H ₂ O ₂	Entrecruzamiento con glutaraldehído y BSA y deposición en el electrodo Pt-Nafion	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de carbono vitrificado modificado con Nafion	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Metasulfato de N-metilfenazina Monitorización del mediador a -0.20V vs SCE	I. L. : 0.1 x 10 ⁻⁶ a 2.5x10 ⁻³ mol l ⁻¹ LD : 75x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹	88.2% y 82.4 % de actividad tras 1 mes y 2 meses de almacenamiento respectivamente	---	Liu et al., 1997
HRP / H ₂ O ₂	Enlace covalente con el modificador electródico	Voltamperometría cíclica Electrodo de oro modificado con N-succinimidil-3-tiopropionato	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Complejos fendiona de Os y Ru en disol	Comparación mediadores	---	---	Darder et al., 1999
HRP / H ₂ O ₂	Entrecruzamiento simultáneo con glutaraldehído de HRP y mediador	Voltamperometría cíclica Amperometría Electrodo de carbono vitrificado modificado con fosfato α-Zr	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Azul de metileno E _{ap} = -0.22 V vs Ag/AgCl	I.L : 2 x 10 ⁻⁶ a 5x10 ⁻³ mol l ⁻¹ LD : 3x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	---	---	Ruan et al., 1997

Tabla VII. Biosensores amperométricos basados en la peroxidasa (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencias
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Voltamperometría cíclica Amperometría Electrodo de pasta de C cubierto con poli(o-aminofenol)	Discontinuo y flujo Tampón acetato 0.1 mol l ⁻¹ pH 5.0	Ferroceno E _{ap} = +0.05 V vs Ag/AgCl	I.L : 1 x 10 ⁻⁸ a 1x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹ LD : 8.5x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹	Disminución de 43% de la señal tras 7 días	---	Valdés García et.al.,
HRP / H ₂ O ₂	Entrecruzamiento simultáneo con glutaraldehído de HRP y tionina	Voltamperometría cíclica Amperometría Electrodo de carbono vitrificado	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 5.8	Tionina E _{ap} = -0.19 V vs SCE	I. L: 3.4x 10 ⁻⁶ a 2x10 ⁻³ mol l ⁻¹ LD : 1x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	Disminución de 30% de la señal tras almacenar a 4 °C en seco y 60% almacenando en tampón fosfato	---	Xu et al., 1998
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico en membrana compósita de β-ciclodextrina y colorantes catiónicos	Voltamperometría cíclica Amperometría Electrodo de carbono vitrificado cubierto con membrana	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹	β-CPD E _{ap} = -0.21 V vs SCE	I.L : 1.1x 10 ⁻⁶ a 1x10 ⁻³ mol l ⁻¹ LD : 0.5x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	94% de actividad tras 1 mes de almacenamiento en seco a 4°C y 90.1% tras 2 meses	---	Zhu et al., 2000
HRP / H ₂ O ₂	Enlace por fuerzas electrostáticas con ácido laurico	Voltamperometría cíclica Puente salino con membrana lipídica bicapa	Discontinuo Tampón fosfato 0.02 mol l ⁻¹	---	Estudios cualitativos	---	---	Zhang et al., 2001
Peroxidasa de tabaco, HRP / H ₂ O ₂	Interacciones electrostáticas entre las enzimas y la monocapa	Voltamperometría cíclica Electrodo de oro modificado con monocapas de tiol ensambladas	Discontinuo Tampón fosfato 0.001 mol l ⁻¹ pH 7.0	---	Comparación cualitativa de las dos enzimas	---	---	Gaspar et al.,2001
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento en la superficie del electrodo con la membrana de diálisis	Amperometría Electrodo de pasta de C cubierto con membrana de diálisis	Discontinuo Tampón Tris 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.4	Ferroceno E _{ap} = 0.1 V vs SCE	I. L.: hasta 15x 10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ LD : 10x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹	---	---	Kinoshita, et al., 1997
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento durante electropolimerización de polipirrol	Amperometría Electrodo compósito carbono-sol gel	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Acido ferroceno carboxílico	I. L: hasta 0.2 x 10 ⁻³ mol l ⁻¹ LD : 5.0x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹	---	---	Tian et al., 2001

Tabla VII. Biosensores amperométricos basados en la peroxidasa (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencias
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Amperometría Electrodo compósito carbono-sol gel dopado con ácido poliestersulfónico	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Tionina (incorporado por fuerzas electrostáticas con el ácido sulfónico)	LD : 5.0x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹ 11.36 μA mM ⁻¹	----	---	Chen, et al., 2001
HRP / H ₂ O ₂	Entrecruzamiento con glutaraldehido	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo pasta C	Discontinuo Tampón acetato 0.1 mol l ⁻¹ pH 4.5	Fenotiazina E _{ap} = 0.0 V vs Ag/AgCl	I.L : 2 x 10 ⁻⁹ a 10 x 10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ LD : 1x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹	Más de 180 medidas	---	Razola, et al., 1999
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento simultáneo con mediador en la zeolita	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de carbono vitrificado modificado con zeolita tipo β	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Azul de metileno	I.L : 2.5 x 10 ⁻⁶ a 4x 10 ⁻³ mol l ⁻¹ LD : 0.3x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	Estable en operación continua	---	Liu et al., 2000
HRP / H ₂ O ₂	Adsorción y recubrimiento con membrana	Amperometría Electrodo de carbono vitrificado cubierto con membrana de poli-L-lisina y sulfonato de poliestireno	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 6.5	Ferroceno	I. L: Hasta 10x 10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ LD : 0.5x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	---	---	Yabuki, et al., 2000
Catalasa / H ₂ O ₂	1. Atrapamiento tras hidratación en membrana permeable a gas y membrana de diálisis. 2. Mezcla con alúmina hidratada y membranas 3. Inmovilización en gel k-carrageenan y membrana	Amperometría Electrodo de difusión de gas para oxígeno cubierto con las membranas	Discontinuo Cloroformo anhidro		vs inmovilización : 1. 30-380x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ Pte:0.323 mA μmol ⁻¹ L 2. 400-1050x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ Pte: 0.0286 mA μmol ⁻¹ L 3. 30-105x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ Pte : 2.47 mA μmol ⁻¹ L	Inmovilización 3 : Sensibilidad, tiempo de respuesta e intervalo lineal satisfactorios durante todo el tiempo de vida (15 días)	---	Campanella, et al., 1996
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Amperometría Electrodo compósito grafito-epoxi	FIA Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ pH 7.0	E(mV)= 45.6log[H ₂ O ₂]+ 297.8	I.L. : 7.5x10 ⁻⁷ a 5.0x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹ L. D : 3.8x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	5 meses almacenado a 4 °C	Suero Zumos Refrescos	Zulficar et al., 1995

Tabla VII. Biosensores amperométricos basados en la peroxidasa) (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencias
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento durante electropolimerización de fenol	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de carbono vitrificado activado electroquímicamente	Discontinuo Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ pH 7.0	Polifenol E _{ap} = 0.0 V vs SCE	I.L. : 5.0x10 ⁻⁸ a 1.0x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹ L. D : 2.0x10 ⁻⁸ mol l ⁻¹	2 meses almacenado a 4 °C en tampón fosfato	---	Zhang et al., 1996
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Voltamperometría cíclica. Amperometría Electrodo de carbono vitrificado modificado con mezcla sol gel (híbrido orgánico-inorgánico-HRP por adsorción)	Discontinuo y FIA Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ pH 7.5 + ferrocianuro 0.05 mol l ⁻¹	Ferrocianuro potásico E _{ap} = -0.05 V vs Ag/AgCl	I.L. : hasta 3.4x10 ⁻³ mol l ⁻¹ L.D : 5.0x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	92% actividad tras 110 días almacenado a 4 °C (uso intermitente)	Leche	Wang et al., 2000
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico de HRP y el mediador en membrana de acetato de celulosa	Amperometría Electrodo screen-printed modificado con la membrana	Flujo continuo	Dimetilferroceno	L.D. : 49.5 μM	4 días manteniendo una precisión de ±16%	Residual de H ₂ O ₂ en procesos de desinfección	Moody et al., 2001
HRP oxidada con peryodato / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Voltamperometría cíclica Amperometría Electrodos pasta C (con aceite y cera de parafina) modificados con polímero redox de acrilamida-mediador	FIA Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Azul de toluidina O E _{ap} = -0.05 V vs Ag/AgCl	Aceite: 0.18 AM ⁻¹ cm ⁻² I.L. : 1.0 a 30x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ L.D : 50x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹ Cera: 0.08AM ⁻¹ cm ⁻² I.L. : 1.0 a 10x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ L. D: 50x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹	30 días de medida	---	Rajendran, et al., 1998
HRP / H ₂ O ₂	Electropolimerización	Amperometría Electrodo de SnO ₂ modificado con los polímeros	Discontinuo Medio acuoso	Comparación Py-PS con PPy	I.L. Py-PS : 10 ⁻⁷ a 10 ⁻³ M I.L. Ppy : 10 ⁻⁷ a 10 ⁻⁴ M	Py-S : mantiene el 60% de la respuesta inicial a las 3 semanas pero el Ppy 0%	---	Thanachasai et al., 2002
HRP / H ₂ O ₂	Atrapamiento físico	Electrodo de pasta de carbono modificado con oro coloidal	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹	---	I.L. : 0.48-50 μM L.D. : 0.21 μM	---	---	Liu y Ju, 2002

			pH 7.0					
--	--	--	--------	--	--	--	--	--

Tabla VII. Biosensores amperométricos basados en la peroxidasa) (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencias
HRP / H ₂ O ₂	Deposición en vapor	Amperometría Electrodo de carbono vitrificado modificado con una fina película de sol-gel de titanio	Discontinuo	Catecol	I.L. : 0.08 a 0.56 mM. L.D. 1.5 µM	Larga estabilidad de almacenamiento	---	Yu y Ju, 2002
HRP y fungal peroxidasa / H ₂ O ₂ y peróxido de 2-butanona	Adsorción	Amperometría Microelectrodos de pasta de C modificados con lactitol	Flujo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0+ NaCl 0.01 mol l ⁻¹ Mezclas acetonitrilo-agua	Monitorizan la reducción de H ₂ O ₂ a -0.05 V vs Ag/AgCl	I. L.: 2 x 10 ⁻⁶ a 2x10 ⁻³ mol l ⁻¹ LD : 0.2x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹	---	---	Popescu et al, 1996
HRP / Peróxido de 2-butanona e hidroperóxido de butilo	Atrapamiento en organohidrogel de dimetilformamida	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodos de carbono vitrificado y grafito	Discontinuo Butanol, cloroformo, clorobenceno	E _{ap} = -0.2 V vs Ag/AgCl	Cloroformo : P-2B : I.L : 8 x 10 ⁻⁶ - 5x 10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ LD : 5x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ Hidroperóxido de butilo : I. L: 5 x 10 ⁻⁵ a 1x 10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ LD : 2x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹	---	---	Guo y Dong, 1997
HRP / Peróxidos orgánicos	Atrapamiento físico	Amperometría Electrodos pasta C y compósitos grafito-epoxi	Discontinuo y FIA Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ pH 7.4 y mezcla 40% CH ₃ CN-tampón fosfato	1x10 ⁻³ mol l ⁻¹ o-fenilendiamina E _{ap} = -0.2 V vs Ag/AgCl	LD HRP-CPE en tampón : Peróx. 2-butanona : 3.1x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ Hidroperóxido cumeno : 3.3x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ Hidroperóxido tert-butilo: 1x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹ Peroxiacetato tert-butilo : 3.0x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹	Electrodo pasta de carbono poca estabilidad en disol-ventes orgánicos comparado con grafito-epoxi	Agua de bebida	Wang et al.1991
HRP / Peróxido de lauroilo	Atrapamiento físico	Amperometría Electrodo compuesto grafito-resina epoxi	Discontinuo Acetonitrilo + 0.15 mol l ⁻¹ TBAP	E _{ap} = -0.32 V vs Ag/Ag ⁺	I.L. : 1.0x10 ⁻⁵ a 1.0x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	---	---	Ramirez García, 2001

Tabla VII. Biosensores amperométricos basados en la peroxidasa (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencias
HRP / Peróxidos orgánicos	Electropolimerización de N-metilpirrol	Amperometría	Discontinuo Micelas inversas : AcOEt 4% fosfato 0.05 mol l ⁻¹ pH 7.4, 0.1 M AOT	---	I.L. : Peróxido 2-butanona : 5-85 µM Tert-butilhidroperóxido : 2-48 mM L.D. : Peróxido 2-butanona:0.086 µM Tert-butilhidroperóxido : 0.03 mM	---	Loción corporal Recuperaciones : 100%	García Moreno et al., 2001
HRP / Peróxido de lauroilo	Atrapamiento físico	Amperometría Electrodo compósito grafito-resina epoxi	Discontinuo Acetonitrilo + 0.15 mol l ⁻¹ TBAP	E _{ap} = -0.32 V vs Ag/Ag ⁺	I.L. : 1.0x10 ⁻⁵ a 1.0x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	---	---	Ramirez García, 2001

Abreviaturas :

I.L. : Intervalo lineal

LD : Límite de detección

HRP : Peroxidasa

SCE : Electrodo de calomelanos

TBAP : Perclorato de tetrabutilamonio

Ppy : Polipirrol

Py-PS : Copolímero de poli{pirrol-co-[4-(3-pirrolil)butanosulfonato]}

IV. ELECTRODOS BIENZIMÁTICOS

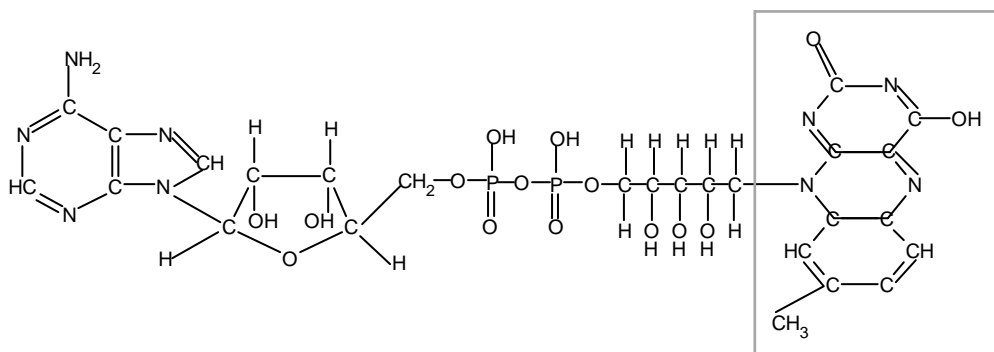
No todas las reacciones catalizadas por enzimas incluyen compuestos monitorizables como H^+ , oxígeno o peróxido de hidrógeno, por lo que solo un número limitado de sustancias puede ser determinado utilizando sensores monoenzimáticos (Scheller y Schubert). Sin embargo, es posible desarrollar biosensores enzimáticos en los que se empleen dos o más enzimas, haciendo uso de lo que se conoce como "reacciones enzimáticas acopladas". Con ellas, se pretende conseguir alguno o varios de los objetivos siguientes (Pingarrón y Sánchez Batanero, 1999) :

- a) Un aumento de sensibilidad, utilizando una enzima auxiliar que regenere el analito, es decir, que dé lugar a un reciclado del sustrato (Yao et al., 2001) .
- b) Que la enzima auxiliar actúe catalíticamente sobre alguno de los productos de la reacción enzimática principal con el fin de obtener un nuevo producto que se detecte con mayor facilidad.
- c) Eliminación de interferencias. Puede ocurrir que alguno de los productos de la reacción enzimática principal actúe sobre la actividad enzimática, inhibiéndola, que existan otros inhibidores en disolución o incluso que haya sustratos interferentes ; en estos casos, la enzima auxiliar puede catalizar una reacción de dichas sustancias interferentes de manera que no se vea afectada la reacción enzimática con el sustrato de interés. (Tzang et al., 2001).

El acoplamiento de reacciones enzimáticas en biosensores es un campo ampliamente estudiado, dada la gran cantidad de posibilidades de aplicación que permite. Así, por lo que respecta a las deshidrogenasas pueden citarse, por ejemplo los acoplamientos de malato deshidrogenasa con p-hidroxibenzoato hidroxilasa para la determinación de malato (Gajovic et al., 1999). La lipoamida deshidrogenasa acoplada a la lactato deshidrogenasa se ha empleado para determinar lactato utilizando diferentes mediadores (Colon y Guadalupe 1998), y se puede determinar adrenalina utilizando biosensores con el sistema enzimático lacasa-glucosa deshidrogenasa (Szeponik et al., 1997). Otros ejemplos de sistemas bienzimáticos son el acoplamiento de colina oxidasa y acetilcolinesterasa (o butirilcolinesterasa), que permite la determinación de paraoxon y otros compuestos organofosforados (Curulli et al. 2001 ; Chen et al., 1998), o el de salicilato hidroxilasa con polifenol oxidasa (Cosnier et al., 2001) para evitar interferencias en la determinación de salicilato. Como se ha comentado, en algunas ocasiones se utilizan sistemas bienzimáticos para aumentar la sensibilidad con respecto a un sustrato ; por ejemplo T. Yao y colaboradores (Yao et al., 2001) emplean un reactor con L-glutamato oxidasa y glutamato deshidrogenasa para amplificar la sensibilidad del L-glutamato por recirculación con objeto de determinar trazas de este compuesto en células de cerebro de rata. Otro sistema bienzimático muy interesante es el de la combinación superóxido dismutasa-peroxidasa (Lvovich y Scheeline, 1997), con el que se pueden determinar radicales superóxido.

Dentro de la clasificación general de las enzimas, las oxidorreductasas son aquellas que catalizan reacciones de oxidación-reducción. Cuando el aceptor de electrones es el oxígeno, se denominan **oxidasa**s (Núñez de Castro, I. "Enzimología"), y una característica común a este tipo de enzimas es que producen peróxido de hidrógeno en la oxidación de sus sustratos (Ruzgas et al., 1996). Por lo tanto, el acoplamiento de oxidasa con peroxidasa se emplea en multitud de ocasiones para evitar los problemas asociados al elevado potencial que se necesita para llevar a cabo la monitorización directa del H_2O_2 . Por otro lado, se minimizan los problemas de inhibición que se producen con algunas enzimas por acumulación del peróxido de hidrógeno generado en las inmediaciones de la enzima, como ocurre por ejemplo con la colesterol oxidasa (Piñeiro-Avila et al., 1998). Cuando se utiliza un mediador para la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 , es recomendable evitar que el mediador reaccione con la oxidasa ya que, en caso contrario, los electrones transferidos entre el centro activo de la oxidasa y la peroxidasa disminuyen la sensibilidad del electrodo bienzimático (Ohara et al., 1993).

Un gran número de oxidasa, entre las que se incluyen las utilizadas en los trabajos de esta Memoria, pertenecen al grupo de las *flavoproteínas*, que se caracterizan por contener un grupo flavin-adenin-dinucleótido (FAD), cuya estructura oxidada se muestra en el siguiente esquema (el recuadro corresponde a la parte oxidable/reducible) :



Esquema 6 . Estructura de FAD

En la Tabla X se muestran ejemplos de biosensores amperométricos basados en el acoplamiento de diferentes oxidasa con la peroxidasa. No se ha incluido ningún trabajo con glucosa oxidasa, xantina oxidasa, colesterol oxidasa ni alcohol oxidasa, dado que son las enzimas que se han empleado para desarrollar los biosensores bienzimáticos que se describen en esta Memoria, tratándose con mayor profundidad en sus capítulos correspondientes.

En la Tabla x solo se han incluido referencias recientes, y se ha tratado de buscar ejemplos de oxidasa y diferentes aplicaciones de las mismas, pero evidentemente este campo es amplísimo y aquí solo se recogen algunos ejemplos de lo que puede llegar a ser la combinación oxidasa-peroxidasa. Este tipo de electrodos bienzimáticos suele estar más enfocado a la aplicación en muestras reales.

Tabla X. Biosensores bienzimáticos basados en el acoplamiento oxidasa-peroxidasa

Enzimas/ Analito	Método inmovilización	Tipo de electrodo	Mediador / E _{ap}	Muestra	Referencia
Amino-HRP / Aminas biogénicas	Adsorción Entrecruzamiento	Grafito+polímero redox de Os	Os / -50 mV vs Ag/AgCl	Pescado	Niulescu et al., 2000
D y L Aminoácido oxidasa-HRP / Amoniácidos	Atrapamiento físico	Grafito-Teflón	Ferroceno / 0.0 V vs Ag/AgCl	Uvas de moscatel	Dominguez et al., 2001
Piruvato oxidasa- HRP / Piruvato	Atrapamiento	Pasta de carbono modificada con trihalosa o lactitol	0.0 V vs Ag/AgCl	Células de mamíferos	Bergmann et al., 1999
Lactato oxidasa-HRP / L-lactato	Atrapamiento físico	Grafito-Teflón	Ferroceno / 0.0 V vs Ag/AgCl	Vinos Yogurt	Serra et al., 1999
Oxalato oxidasa - HRP / oxalato	Entrecruzamiento con glutaraldehído	Electrodo pasta de C modificado con gel de sílice cubierto con óxido de titanio	Azul de toluidina	---	Pérez et al., 2001
Glutamato oxidasa - HRP / Glutamato	Atrapamiento físico	Electrodo modificado con hidrogel redox	-0.05 V vs Ag/AgCl	Cerebro de rata	Collins et al., 2001
L-Glutamato oxidasa aislada y purificada- HRP / Glutamato	Entrecruzamiento a un polímero con éter de diglicidil-polietilenglicol	Electrodo modificado con polímero redox (PVI19- dmeOs) y las enzimas	-0.05 V vs Ag/AgCl	---	Mikeladze et al., 2002
Glutamato oxidasa - HRP/ Neurotoxinas	Entrecruzamiento	Barra de grafito modificada con polímero redox con Os 2+/3+.	Os 2+/3+	Guisantes	Belay et al., 1997
Sarcosina oxidasa - HRP / Creatinina y creatina	Atrapamiento con membrana de diálisis	Electrodo de pasta de C	Ferroceno	---	Kinoshita et al., 1997
Piranosina oxidasa- HRP / Monosacáridos	Covalente con aditivos lactitol y polietilenimina	Electrodo de pasta de C	-0.05 V vs Ag/AgCl	---	Liden et al., 1998
Lisina oxidasa- HRP/ Lisina	Química en membranas	Electrodo compuesto grafito-metacrilato	Hidroquinona	Muestras farmaceu- ticas	Saurina et al., 1999
Galactosa oxidasa- HRP / Galactosa	Adsorción	Electrodo de grafito	Ferroceno +0.150 V vs SCE	---	Tkac et al., 1999
Galactosa oxidasa- HRP + galactosidasa / Lactosa	Adsorción Adición de estabili- zantes como inositol o dextran	Electrodo de barra de grafito	Ferroceno	Productos lácteos	Tkac et al., 2000
Galactosa oxidasa- HRP / Dihidroxiacetona	Adsorción	Electrodo de grafito	Ferroceno	Cultivo	Tkac et al., 2001
Histamina oxidasa - HRP / Histamina	Atrapamiento en gel	Electrodo de C modificado con una bicapa de gel de Os-polivinilpiridina	Os 0.0 V vs Ag/AgCl	Células de rata	Niwa et al., 2000
Colina oxidasa- HRP / Colinesterasa	Adsorción en el carbono activado	Electrodo screen-printed	---	Pesticidas organo- fosforados	Espinosa et al., 1997

HRP : Peroxidasa

SCE : Electrodo de calomelanos

IV.1. BIOSENSOR DE GLUCOSA

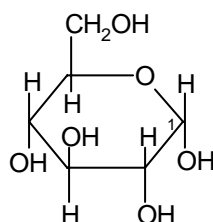
OBJETIVO

Diseño, desarrollo y optimización de un electrodo compuesto bienzimático de grafito-

Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa ferroceno para la determinación de glucosa en mostos y vinos en modo tanto en discontinuo como en flujo.

IV.1.2. INTRODUCCIÓN

La D-glucosa es la hexosa más común. Está presente en muchas plantas, y es el azúcar de la sangre. La glucosa que se puede encontrar en animales y plantas es la α -glucopiranososa monohidratada dextrógira que es un constituyente del almidón, celulosa, sucrosa y multitud de glicósidos, a partir de los cuales puede obtenerse mediante hidrólisis ácida o enzimática.



α - y β - glucopiranososa

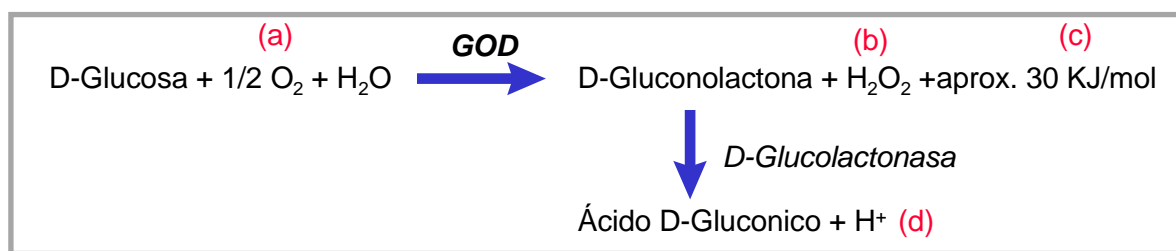
Como todas las hexosas, puede existir de diferentes formas. En forma de aldehído solo existe en disolución, aunque se conocen algunos derivados estables del aldehído. La L-glucosa es aquella cuyas posiciones de cada H u OH están traspuestas. En la glucopiranososa, el carbono 1 es asimétrico, por lo que existen dos estereoisómeros, dependiendo de si el grupo OH está por debajo (α) o por encima (β) del átomo relativo de carbono. Finalmente, la glucofuranosa es inestable y solo se conoce en disolución. La β -glucofuranosa tiene el 1-OH en el mismo lado que el CH(OH)CH₂OH. (Sharp, 1990) y, desde el punto de vista analítico, es un compuesto muy estudiado por diversas razones. La glucosa es esencial para el crecimiento de diferentes tipos de células, habiéndose demostrado que es un precursor en la síntesis de amino ácidos nutricionales no esenciales, pirimidinas, purinas, hidratos de carbono y lípidos de las células (Huang et al., 1993 ; Eagle et al., 1958).

Por otro lado, el consumo de glucosa también es un indicador de la actividad metabólica celular. Puede haber consecuencias indeseables por un exceso en la concentración de glucosa, como una represión catabólica. Hay que tener en cuenta también que, dentro de los azúcares, sólo la glucosa ingresa directamente en el metabolismo energético dependiente de la insulina y se utiliza en todos los tejidos. La administración de glucosa y galactosa por vía oral provoca un rápido aumento de la glucemia y de la secreción de insulina, por lo que debe evitarse el consumo por los diabéticos (Belitz y Grosch, 1992). Por tanto, también es muy importante el control de la glucosa en alimentos, ya sea como mero control de calidad de

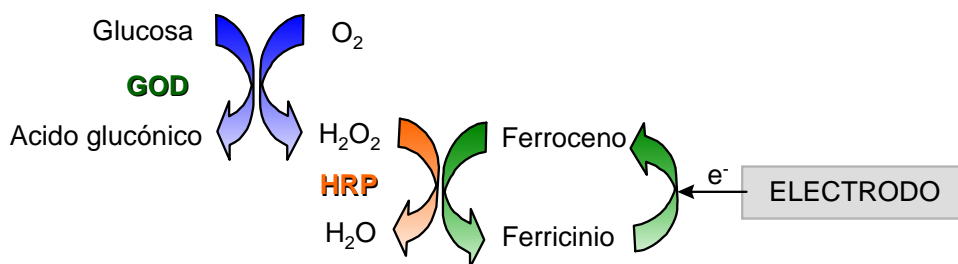
determinados productos, o para conocimiento del alimento en cuestión con objeto de informar sobre su contenido y evitar así posibles problemas de salud.

Los métodos clásicos para la determinación de azúcares se basan en la determinación de la actividad óptica (polarimetría) o en la reducción de una disolución alcalina de cobre (que tiene múltiples variantes diseñadas para problemas específicos). Para la glucosa, por ejemplo, existen los métodos de Munson-Walker, modificación de Zerban-Sattler al método de Steinhoff (método 29.184-29.185 de la AOAC) y la modificación de Sichert-Bleyer (método 29.187-29.189 de la AOAC). Sin embargo, estos métodos están sujetos a tantas interferencias que hay que recurrir a la separación de cada uno de los azúcares por cromatografía de gases o en capa fina, o al empleo de métodos enzimáticos (Hart y Fisher, 1991).

Las enzimas específicas de la glucosa son la glucosa oxidasa (GOD), la glucosa deshidrogenasa (GDH) y la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G-6-PDH). De ellas, la más extendida para aplicaciones analíticas es la glucosa oxidasa, que oxida la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, proporcionando multitud de posibilidades de monitorización (Wagner y Schmid, 1990).



Por lo que respecta a la determinación de glucosa a través de la detección amperométrica del peróxido de hidrógeno generado, ésta se puede llevar a cabo bien mediante la monitorización directa del H_2O_2 , o bien a través de la monitorización electroquímica de un mediador de la reacción enzimática de la peroxidasa. Esta última alternativa ha sido escogida para desarrollar el biosensor de glucosa que se describe en este capítulo, y que está basado en la coinmovilización de glucosa oxidasa, peroxidasa y ferroceno en una matriz compósita de grafito-Teflón. El esquema de las reacciones enzimáticas y electródica que tienen lugar es :



Esquema 7

Dentro de la multitud de alimentos en los que es interesante determinar o controlar el nivel de glucosa (frutas, zumos, helados, harinas, etc.), se eligieron mostos y vinos como

muestras a las que aplicar el biosensor. El mosto es el zumo de la uva antes de fermentar y hacerse vino y, como es sabido, el alcohol que contiene el vino se produce como consecuencia de la descomposición bacteriana de los azúcares de ese mosto. En los mostos, el contenido de azúcar suele conocerse como glucosa y se calcula mediante la siguiente expresión : $A = 2.5 ({}^{\circ}\text{Oe}) - X$, donde ${}^{\circ}\text{Oe}$ (grados Oechsle) es el peso específico del mosto a 20°C, y X es el contenido de ácido (como ácido tartárico) en g/l. El contenido en azúcar de un mosto puede estar entre 120 y 250 g/l.

La uva contiene de un 15 a un 25 por 100 de azúcares compuestos de glucosa y de fructosa. En las uvas perfectamente maduras, estos dos azúcares se encuentran en cantidades casi iguales. Sin embargo, siempre hay un poco más de fructosa que de glucosa : la relación glucosa-fructosa es aproximadamente de 0.95. Durante la fermentación esta relación disminuye porque la mayor parte de las levaduras hacen fermentar especialmente la glucosa. En la siguiente Tabla se muestra un ejemplo de la variación de la glucosa durante el proceso de fermentación (González Salgueiro, 1993):

	Glucosa, g/l	Fructosa, g/l	Glucosa/fructosa
Mosto antes de la fermentación	123	126	0.97
Alcohol formado 0.7°	111	125	0.88
Alcohol formado 5.3°	57	103	0.55
Alcohol formado 12.4°	8	32	0.25

En cualquier caso, una monitorización cuidadosa de la glucosa durante el proceso de fabricación del vino permitirá controlar la fermentación y facilitar así la elaboración de un producto final de mayor calidad. Tradicionalmente, la refractometría se ha empleado como método de análisis de azúcares en mostos, y el método de Rebelein en vinos (Hart y Fisher, 1991).

IV.1.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Dentro de los electrodos enzimáticos el mayor número de biosensores desarrollados corresponde sin lugar a dudas a los que se basan en la inmovilización de glucosa oxidasa, dada la alta estabilidad de esta enzima y la gran utilidad de estos sensores en el mercado de los análisis de glucosa en sangre (O'Connell y Guibault, 2001). De hecho, la glucosa oxidasa se suele emplear como enzima modelo para el desarrollo de un gran número de sensores enzimáticos cuya metodología se emplea posteriormente para diseñar otros biosensores con diferentes enzimas. Por ello, desde 1962, año en el que se reportó el primer biosensor de glucosa oxidasa, el seguimiento de las publicaciones de estos biosensores puede servir como indicador de la evolución de los biosensores amperométricos en general. La glucosa oxidasa no transfiere electrones directamente a electrodos convencionales, debido a que una gruesa capa proteica rodea su centro FAD, hecho bastante común entre las flavoproteínas. Dicha capa introduce una separación espacial en la pareja dador/aceptor de electrones y, por lo tanto, existe una barrera intrínseca a la transferencia de electrones. Por ello, la minimización de esa distancia es crucial para asegurar un funcionamiento óptimo de esta enzima cuando se trabaja con biosensores amperométricos (Wang, 2001). Así, desde los primeros diseños en los que la monitorización estaba enfocada al empleo de electrodos de Clark, se ha pasado a la utilización de diferentes mediadores, así como al acoplamiento con peroxidasa.

Debido a los numerosos artículos publicados sobre electrodos de glucosa oxidasa, en las Tablas XI y XII solo se recogen los que se consideraron más significativos en los dos últimos años, si bien también se ha incluido algún artículo anterior a este período dado su interés en el desarrollo de este tipo de biosensores.

En la Tabla XI se recogen ejemplos de electrodos en los que la glucosa oxidasa está inmovilizada ella sola, mientras que en la Tabla XII se recogen los artículos de biosensores bienzimáticos de glucosa oxidasa-peroxidasa. La diferencia principal entre estos dos tipos de sensores es que con los electrodos bienzimáticos se trabaja a potenciales mucho más bajos, lo que evita una gran cantidad de interferencias cuando se analizan muestras reales. Esto hace que los trabajos encontrados con electrodos monoenzimáticos estén enfocados a diseñar transductores que disminuyan el sobrepotencial del proceso redox del peróxido de hidrógeno. Así, se utilizan diferentes mediadores, como ferroceno, osmio, azul de Prusia, azul de Meldola, etc. si bien con la mayoría de ellos no se llegan a alcanzar los bajos valores de potencial a los que se trabaja con los electrodos de peroxidasa. También se puede observar en la Tabla XII, que los electrodos bienzimáticos emplean muchas veces mediadores, pero en lugar de utilizarlos para modificar los potenciales de trabajo, se hace para amplificar la señal.

Se aprecia, así mismo, cómo el método de inmovilización que predomina es el atrapamiento, bien sea físico (matrices electródicas compósitas, hidrogeles, etc.), o mediante electropolimerización, por lo que la tendencia es huir de los enlaces covalentes (aunque también hay casos en los que se buscan diferentes alternativas a los agentes de unión covalente tradicionales -Piro et al., 2000-) y de los entrecruzamientos (que aun así se siguen empleando). Dentro de la inmovilización utilizando electropolimerización, se suele aprovechar este “soporte enzimático” para obtener otras propiedades ventajosas, bien sea mediando las reacciones electroquímicas, confiriendo mayor estabilidad a las matrices electródicas (Cosnier et al., 2000b) , introduciendo un factor selectivo (los polímeros no conductores suelen tener

mayor capacidad “anti-interferencia” (Xu et al., 2000) o incluso empleando polímeros ópticamente activos que permiten un reconocimiento estereoselectivo de sustratos quirales (Cosnier et al., 2000a).

Características similares son las que se consiguen con el empleo de membranas. Si bien los primeros sensores que se desarrollaron se basaban en el uso de membranas que modificaban electrodos convencionales (lo que suponía tiempos de respuesta largos), en la actualidad se están empleando materiales que minimizan los tiempos de respuesta, utilizándose películas poliméricas no porosas cuyo papel principal es prevenir que interferentes activos alcancen la superficie del electrodo.

Como ya se dijo, la glucosa oxidasa es una enzima que suele emplearse como “patrón” para el diseño de nuevos electrodos enzimáticos. Esto es lo que hace que la gran parte de los trabajos reportados no tengan aplicaciones reales. De entre los que si se aplican, aunque existen algunas aplicaciones a la determinación de glucosa en alimentos y en el control de la fermentación, la mayor parte de los electrodos de glucosa están enfocados a la determinación de este analito en suero y sangre. De ahí que los trabajos más recientes sobre biosensores enzimáticos de glucosa oxidasa con aplicación a muestras reales busquen la miniaturización de los dispositivos de medida y la posibilidad de monitorización de varios analitos de forma simultánea.

Una aplicación muy importante de los electrodos de glucosa oxidasa radica en el acoplamiento de esta enzima con invertasa o mutarrotasa para la determinación de diferentes polisacáridos a través de la detección de glucosa (Guemas et al., 2000 ; Eshkenazi et al., 2000).

A pesar del altísimo número de publicaciones sobre sensores de glucosa oxidasa que aparecen cada año, esta enzima sigue siendo una fuente inagotable de temas de investigación en el desarrollo de biosensores ya que, como se demuestra en la tabla de antecedentes, ofrece multitud de posibilidades para contrastar y probar estrategias para el diseño de nuevos biosensores.

IV.1.4. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1.4.1. INSTRUMENTACIÓN

IV.1.4.1.1.- APARATOS

Las medidas amperométricas tanto en discontinuo como en análisis por inyección en flujo se realizaron con un potencióstato BAS CV-27 (Bioanalytical Systems, Inc) conectado a un registrador x-t Linseis L250 E. El sistema de inyección en flujo estaba constituido por una bomba peristáltica WIZ y una válvula de inyección Omnifit 1106 con volúmenes de inyección variables.

Otros aparatos utilizados fueron : agitador magnético Ikamag Ret, pH-metro de precisión Metrohm E-510 calibrado de la forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.00 y 7.02 a 25.0 ± 0.5 °C, prensa de infrarrojos Carver.

IV.1.4.1.2.- ELECTRODOS Y CÉLULAS DE TRABAJO

- Electrodo compósitos enzimáticos de grafito-Teflón-glucosa oxidasa-peroxidasa ferroceno preparados según se detalla en el apartado IV.1.4.3.2.
- Electrodo de referencia : Electrodo de Ag/AgCl/KCl (3 M) BAS RE-1 tanto en discontinuo como para las medidas en FIA.
- Electrodo auxiliar: Electrodo de punta de platino tanto en discontinuo como para las medidas en FIA.

Células electroquímicas :

- Célula BAS modelo VC-2 para las medidas realizadas en discontinuo.
- Célula de tipo “wall-jet” de gran volumen para las medidas mediante análisis por inyección en flujo diseñada en nuestro Grupo de Investigación. (Figura 1 del apartado III.4.1.2.).

IV.1.4.2. REACTIVOS

Para la preparación del electrodo compuesto bienzimático se utilizó:

- Grafito Ultra “F” purity (Carbone of America) como fase conductora.
- Teflón (politetrafluoroetileno) (Aldrich) como fase aislante.
- Peroxidasa (HRP) EC 1.11.1.7 (Type II-from Horseradish) de actividad 180 unidades por miligramo de sólido (Sigma).
- Glucosa oxidasa (GOD) EC 1.1.3.4 (Type X-S-from Aspergillus niger) de actividad 181.600 unidades por gramo de sólido (Sigma).
- Ferroceno (Merck) , como mediador.

Como sustrato se empleó D(+) Glucosa (Panreac). Otros reactivos utilizados fueron fosfato disódico anhidro (Panreac) y fosfato monosódico dihidratado (Merck) para preparar las disoluciones reguladoras.

En los estudios de interferencias se emplearon :D(-)Fructosa (Sigma), etanol (Panreac), metanol (Scharlau), ácido tartárico (Merck), ácido málico (Merck), ácido cítrico (Merck), ácido succínico (Merck), ácido acético (Carlo Erba), ácido fórmico (Carlo Erba) y ácido láctico (Sigma).

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad para el análisis.

El agua empleada en todos los casos se obtuvo mediante un sistema Millipore Milli-Ro.

Las muestras analizadas fueron :

- Mosto blanco y mosto rojo de la marca “Greip”.
- Vino blanco de mesa "Montemelo" de Cuenca.
- Vino tinto de mesa "Don Opas" de Valdepeñas D.O. (12% Vol.).

IV.1.4.3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

IV.1.4.3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4 :

Se prepara disolviendo las cantidades apropiadas de las sales disódica y monosódica, ajustando posteriormente el pH con $\text{NaOH } 2 \text{ mol l}^{-1}$.

- Disolución patrón de glucosa:

Se prepara una disolución 0.10 mol l^{-1} de glucosa disolviendo la cantidad apropiada pesada exactamente en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Disoluciones más diluidas se prepararon por dilución con dicha disolución reguladora de fosfato.

IV.1.4.3.2. PREPARACIÓN DEL ELECTRODO COMPÓSITO BIENZIMÁTICO DE GLUCOSA

Se mezclan 0.26 g de grafito y 0.014 g (2520 U) de peroxidasa y 0.014 g (2542 U) de glucosa oxidasa, pesados exactamente, mediante agitación mecánica durante 2 horas en una suspensión de 0.4 ml de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 a una temperatura de 4 °C. Tras la agitación, se evapora el agua por paso de una corriente de Argon, añadiéndose seguidamente 0.016 g de ferroceno, disueltos en 0.4 ml de acetato de etilo. A continuación se evapora el acetato de etilo por paso de una corriente de Argon. Posteriormente se mezcla manualmente el grafito modificado con las enzimas y con el mediador (lo que supone una cantidad de 0.3 g) con 0.7 g de teflón. Se procede, seguidamente, a la compresión mecánica de la mezcla en forma de pastillas utilizando una prensa de IR y aplicando una presión de 10.000 Kg/cm^2 durante 10 minutos. La pastilla madre así obtenida tiene 1.3 cm de diámetro y 0.4 cm de espesor.

Se obtienen a continuación pastillas más pequeñas, de 3.0 mm de diámetro, con ayuda de un troquel colocándose cada pastilla en el extremo de un tubo de teflón. El contacto eléctrico se establece mediante un tornillo de acero inoxidable de punta plana que se introduce por el otro extremo del tubo de teflón, como se indicó en el apartado III.5.2.

IV.1.4.3.3. OBTENCIÓN DE LOS AMPEROGRAMAS EN DISCONTINUO

Tras mantener el biosensor almacenado a 4 °C es necesario, antes de realizar las medidas, que alcance la temperatura ambiente. Para ello se deja el electrodo fuera del refrigerador el tiempo necesario.

Para obtener los amperogramas en discontinuo, se sumerge el biosensor en la célula de medida que contiene 5.0 ml de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, con agitación mecánica constante. Se aplica el potencial deseado (0.00 V) y se espera a que la corriente fondo se estabilice. A continuación, se añade con una micropipeta el volumen deseado de la disolución patrón del compuesto a estudiar y se registra la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. Se siguen realizando adiciones de pequeños volúmenes con la micropipeta hasta que se obtienen todas las señales deseadas. Entre uno y otro experimento no fue necesario aplicar ningún tratamiento, ni físico ni químico al electrodo.

IV.1.4.3.4. MEDIDAS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

El electrodo bienzimático se coloca en la célula de flujo tipo "wall-jet", de gran volumen, por la que circula la disolución portadora. A través de la válvula se inyecta la disolución de trabajo del analito en estudio en la corriente del portador y se registran las señales amperométricas al valor del potencial deseado aplicado previamente. La disolución portadora fue la de regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

IV.1.4.3.5. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MOSTOS Y VINOS

IV.1.4.3.5.1. Preparación de las muestras

En el caso de las muestras de mosto, la preparación para las medidas en discontinuo, consistió en una simple dilución. Se tomaron 1.6 ml de muestra y se diluyeron a 25.0 ml con la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Por lo que respecta a las muestras de vino, no fue necesario ningún tipo de tratamiento previo a la medida.

En el caso de las medidas mediante inyección en flujo se necesitó realizar una dilución previa tanto para el mosto como para el vino. Así, para las muestras de mosto, se tomaron 0.6 ml de la disolución obtenida de diluir 1.6 ml de mosto en 23.4 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 y se diluyeron a 50.0 ml con la misma disolución reguladora. Para las muestras del vino, se tomaron 10.0 ml y 2.5 ml de vino blanco y tinto, respectivamente, y se diluyeron a 50.0 ml con la disolución reguladora de fosfato de pH 7.4.

IV.1.4.3.5.2. Obtención de las señales amperométricas

IV.1.4.3.5.2.1. Amperogramas en discontinuo

- *Método de adiciones estándar*

La determinación de glucosa en mostos mediante este método se llevó a cabo tomando una alícuota de 20 μl de la disolución de la muestra, preparada según se explica en el apartado anterior y transfiriéndola a la célula de medida que contiene 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} pH 7.4. Las medidas amperométricas se realizaron con agitación mecánica constante, aplicando un potencial de 0.00 V, y registrando la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. A continuación se efectuaron adiciones sucesivas de alícuotas

de 20 μl de una disolución patrón de glucosa 0.025 mol l^{-1} hasta que se obtuvieron las señales deseadas.

Para las muestras de vino blanco y tinto se añadieron 500 y 100 μl respectivamente, de la muestra sin tratar, a la célula de medida que contiene 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. A continuación se efectuaron adiciones sucesivas de alícuotas de 20 μl de la disolución patrón de glucosa 0.025 mol l^{-1} .

- *Método de calibración externo*

La determinación se lleva a cabo realizando un calibrado en el intervalo de concentración 1.0×10^{-4} - $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, por adición de alícuotas 20 μl de una disolución patrón de glucosa 0.025 mol l^{-1} , a la célula de medida que contiene 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Sobre una nueva disolución de trabajo se realizó la adición de la muestra, previamente tratada como se indica en el apartado IV.1.4.3.4.1., registrándose la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario.

La concentración de glucosa se obtuvo por interpolación de la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida para cada muestra en la recta de calibrado.

IV.1.4.3.5.2.2. Inyección en flujo con detección amperométrica

- *Método de adiciones estándar*

Se tomaron volúmenes iguales de la disolución a analizar, preparada según se indica en el apartado IV.1.4.3.4.1., y se añadió a todos excepto a uno (adición cero) cantidades conocidas de glucosa, de forma que se cubra el margen de linealidad (1.0×10^{-4} - $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), procediéndose a enrasar al mismo volumen con la disolución portadora constituida por disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Tras esperar a la estabilización de la línea base, se realizaron inyecciones de volumen constante de cada disolución.

- *Método de calibración externo*

Se prepararon disoluciones de glucosa de concentraciones adecuadas, para cubrir el margen de linealidad, a partir de la disolución patrón de D(+)Glucosa. Se realizaron inyecciones de cada una de ellas, obteniéndose el fiagrama correspondiente. La representación de la intensidad de la corriente en función de la concentración de D(+)Glucosa nos permitió obtener la recta de calibrado.

A continuación se realizaron inyecciones de cada una de las muestras. La señal amperométrica obtenida se interpola en la recta de calibrado, obteniéndose la concentración de glucosa.

IV.1.5. ELECTRODO COMPÓSITO DE GRAFITO - TEFLÓN - GLUCOSA OXIDASA - PEROXIDASA - FERROCENO

Las mismas condiciones experimentales y de composición de la matriz compósita optimizadas para el electrodo de grafito-Teflón-HRP-Ferroceno se han utilizado con el biosensor compósito enzimático. Las respuestas amperométricas obtenidas con este biosensor se muestran en la Figura 61, en la que se recoge el registro intensidad-tiempo obtenido con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno, para adiciones sucesivas de 50 μl de una disolución patrón de glucosa 0.1 mol l^{-1} .

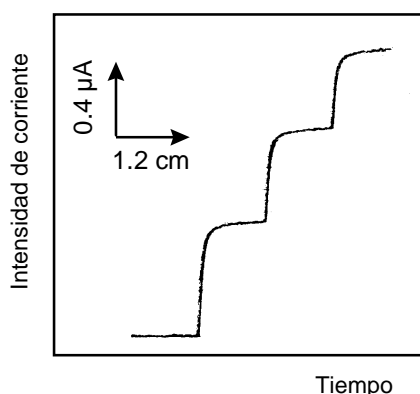


Figura 61. Registro intensidad-tiempo obtenido con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno para adiciones sucesivas de $50 \mu\text{l}$ de disolución patrón de glucosa 0.1 mol l^{-1} en 5.0 ml de una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Como se puede apreciar, el electrodo bienzimático mostró una respuesta rápida a los cambios en la concentración de glucosa, lo que indica que el H_2O_2 generado en la reacción enzimática principal, se reduce rápidamente mediante la reacción enzimática secundaria (Esquema 7). Como ya se ha comentado, esta rápida respuesta está favorecida por la ausencia de barreras difusivas en la superficie del electrodo y por el hecho de que las enzimas y el mediador están en íntimo contacto entre ellos y con las partículas de grafito. Se comprobó que no había diferencias entre las señales obtenidas con disoluciones de glucosa recién preparadas y con disoluciones en las que se había permitido que se estableciera un equilibrio en la mutarrotación de los anómeros de la glucosa.

IV.1.5.1. ESTABILIDAD DEL ELECTRODO BIENZIMÁTICO

La estabilidad del biosensor de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno se evaluó desde diferentes aspectos: repetibilidad de las medidas sin pulir el electrodo, reproducibilidad de la señal amperométrica cuando se regenera la superficie del electrodo mediante pulido, período de vida útil de un biosensor y reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos.

En la Tabla 23 se recogen los valores de la intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos en cada uno de los ensayos realizados, para una concentración de glucosa de $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 a un potencial de 0.00 V . La repetibilidad de las medidas amperométricas sucesivas sin regeneración de la superficie electródica se evaluó a partir de 10 medidas en disoluciones diferentes de trabajo. El valor de la desviación estándar relativa obtenido mostró una buena repetibilidad de las medidas sucesivas sin regenerar la superficie del biosensor por pulido.

En cuanto a la reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica por pulido, se realizaron 10 series de 3 medidas cada una procediendo al pulido de la superficie

con papel abrasivo de SiC durante 5 segundos entre cada serie. El valor de la desviación estándar relativa para los valores medios de la corriente de cada serie, 8.0 %, permite concluir que es posible obtener medidas reproducibles con el biosensor al regenerar su superficie, lo que indica que tanto las enzimas como el mediador se encuentran distribuidos de forma homogénea en todo el volumen de la matriz electródica.

Tabla 23. Valores de la corriente en estado estacionario y de la desviación estándar relativa obtenidos en los diferentes estudios sobre estabilidad del electrodo compuesto bienzimático de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno. Glucosa $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

	i, μA		RSD, %	
Repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica	0.56	0.54	4.7	
	0.54	0.56		
	0.56	0.58		
	0.60	0.62		
	0.56	0.60		
i media= $0.57 \pm 0.02 \mu\text{A}$				
Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica por pulido	0.57	0.61	8.0	
	0.54	0.55		
	0.52	0.63		
	0.52	0.56		
	0.49	0.58		
i media= $0.56 \pm 0.03 \mu\text{A}$				
Tiempo de vida útil del electrodo	2 meses			
Reproducibilidad de las medidas con diferentes electrodos (*Nº pastilla.Nº electrodo)	Pastilla	Electrodo*	i, μA	RSD %
	1	1.1	0.57	3.6
		1.2	0.54	
Efecto del periodo de almacenamiento	Más de 7 meses a 4 °C sin pérdida de actividad			

Para establecer el tiempo de vida útil del electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno, se construyó un gráfico de control para los valores medios de tres medidas de la intensidad de corriente en el estado estacionario realizadas cada día, en disoluciones de glucosa diferentes a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. El valor central del gráfico de control, $0.57 \mu\text{A}$, el del límite superior $0.65 \mu\text{A}$, y el del límite inferior, $0.49 \mu\text{A}$, se calcularon de la forma habitual ya comentada en capítulos anteriores. La superficie del electrodo no se regeneró por pulido hasta que el valor medio de las tres medidas realizadas en un mismo día se situaba fuera de los límites de control. Después de efectuar el pulido, la intensidad de corriente en estado estacionario volvía a estar dentro de los límites de control, lo que confirma

la buena reproducibilidad de las señales amperométricas tras el pulido de la superficie electródica.

Como se puede apreciar en la figura 62, el biosensor bienzimático de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno pudo utilizarse durante 4 ó 5 días sin necesidad de regenerar la superficie electródica, de modo análogo a lo que ocurría con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-Ferroceno. A partir de aproximadamente 60 días no se pudo recuperar la señal amperométrica por pulido de la superficie electródica, al igual que lo observado con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno.

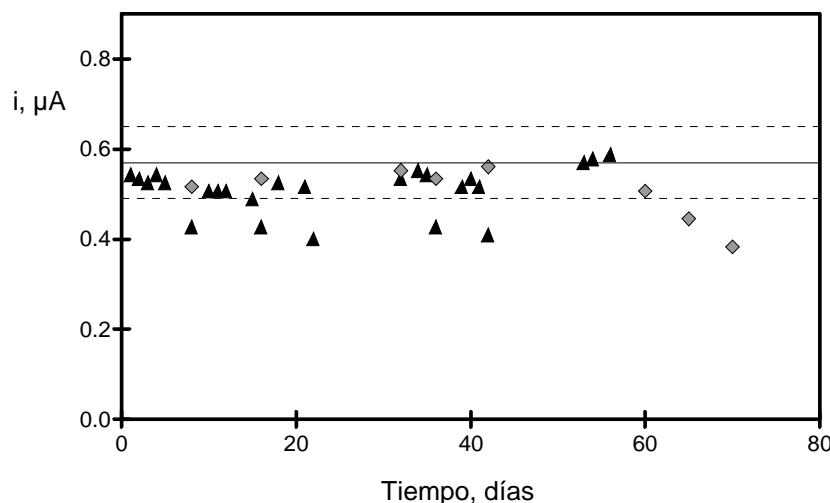


Figura 62. Gráfico de control para el electrodo compuesto de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno. Glucosa $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, (▲) valores medios de tres medidas de corriente realizadas cada día; (◆) valor obtenido después de regenerar la superficie del electrodo por pulido.

Por lo que respecta a la reproducibilidad obtenida para las medidas realizadas con electrodos diferentes, hay que decir que solo se necesitó construir una pastilla madre para llevar a cabo todos los estudios realizados con este biosensor de glucosa. En la Tabla 23 se recogen los valores de intensidad de corriente en el estado estacionario obtenidos para las medidas realizadas ($n=3$) con los dos electrodos que se construyeron a partir de ésta. El valor de RSD obtenido fue menor del 4%, lo que indica que el proceso de fabricación de los electrodos es reproducible y fiable.

En cuanto al período de almacenamiento de la pastilla madre en seco a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se obtuvieron respuestas de intensidad similares a las que se recogen en la Tabla 23 cuando se efectuaron con un electrodo construido a partir de una pastilla almacenada durante 7 meses, demostrando que no existió pérdida de actividad enzimática aparente durante dicho tiempo.

IV.1.5.2. CURVA DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

En las condiciones experimentales optimizadas previamente para el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno en medio acuoso se obtuvo la curva de calibrado para glucosa que aparece en la Figura 63.

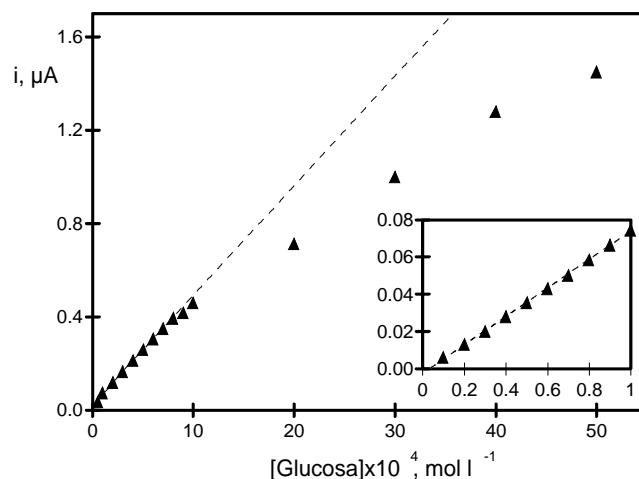


Figura 63. Curva de calibrado obtenida en el intervalo de concentración 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-3} mol l⁻¹ para glucosa con el electrodo de grafito-teflón-GOD-HRP-ferroceno. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹, pH 7.4. $E_{ap} = 0.00$ V.

El intervalo lineal de concentraciones está comprendido entre 1.0×10^{-5} y 8.0×10^{-4} mol l⁻¹ ($r=0.999$), con valores de la pendiente y de la ordenada en el origen de (610 ± 2) μA mol⁻¹ l y $(3 \pm 9) \times 10^{-4}$ μA respectivamente. La desviación estándar relativa, calculada a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones diferentes de glucosa 1.0×10^{-5} mol l⁻¹ fue de 7.3% y los límites de detección y determinación, calculados según los criterios ya expuestos tomando como estimador de s_b la desviación estándar de las medidas de glucosa 1.0×10^{-5} mol l⁻¹, fueron 1.9×10^{-6} mol l⁻¹ y 6.5×10^{-6} mol l⁻¹, respectivamente. Si se compara el límite de detección obtenido con el biosensor bienzimático de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno se observa que es similar a los que se consiguen con los biosensores más sensibles que se han reportado.

IV.1.5.3. INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA UTILIZANDO COMO DETECTOR EL ELECTRODO DE GRAFITO-TEFLÓN-GLUCOSA OXIDASA-PEROXIDASA-FERROCENO

El electrodo bienzimático se utilizó como detector amperométrico en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA), con la célula electroquímica de flujo del tipo "wall jet" que se muestra en el apartado III.4.1.2. y empleando como disolución portadora regulador fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4. Las experiencias se han llevado a cabo con las mismas variables hidrodinámicas que se eligieron para el electrodo enzimático de HRP-ferroceno, es decir, caudal de 0.93 ml min⁻¹ y un volumen de inyección de 150 μl. Todas las medidas han sido efectuadas a un potencial aplicado constante de 0.00 V, elegido previamente para monitorizar

la reacción enzimática de reducción de H_2O_2 catalizada por la enzima HRP, utilizando ferroceno como mediador.

IV.1.5.3. 1. REPETIBILIDAD DE LAS MEDIDAS SIN REGENERACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA

La repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas por inyección en flujo con el electrodo de grafito-teflón-GOD-HRP-ferroceno, se evaluó realizando 20 inyecciones sucesivas de 150 μl de una disolución de glucosa $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 (Figura 64). Como puede observarse, el biosensor bienzimático también responde rápidamente a los cambios dinámicos en la concentración del sustrato, alcanzándose una velocidad de inyección de 30 muestras por hora. Además, la respuesta fue prácticamente constante a lo largo de la serie de inyecciones realizadas, con un valor de RSD para la corriente de pico de 1.4 %, lo que indica una buena inmovilización de las enzimas en la matriz electródica a pesar de las condiciones hidrodinámicas empleadas. No se llevaron a cabo más estudios de estabilidad del electrodo por las razones ya comentadas en el caso del electrodo de grafito-teflón-HRP-ferroceno (apartado III.5.7.3.)

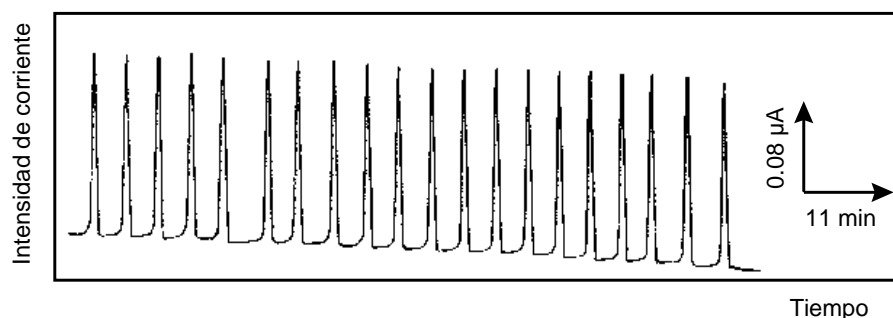


Figura 64. Diagramas obtenidos con el electrodo bienzimático de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno para 20 inyecciones sucesivas de glucosa $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Portador: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. Caudal 0.93 ml min^{-1} . $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.1.5.3.2. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Se construyó un calibrado para glucosa en el intervalo de concentración 1.0×10^{-5} - $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (Figura 65). Como ejemplo, en la Figura 66 se muestra el diagrama obtenido en el intervalo de concentraciones de 1.0×10^{-4} - $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

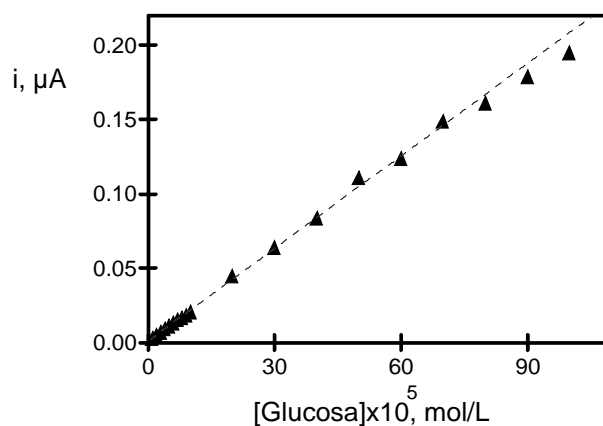


Figura 65. Calibrado para glucosa mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica sobre un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno utilizando como portador un regulador de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

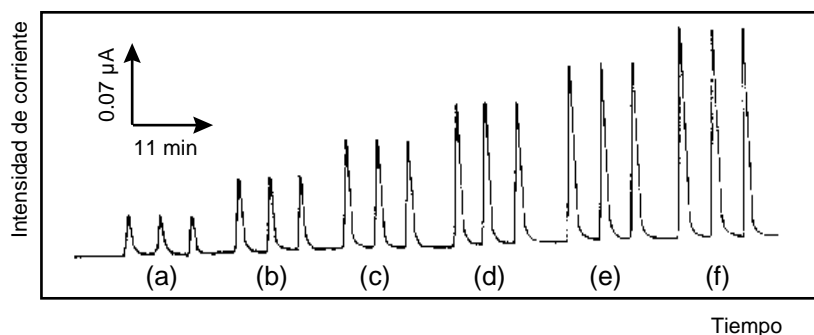


Figura 66. Diagramas obtenidos por inyección de $150 \mu\text{l}$ de disoluciones de glucosa : a) $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, b) $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, c) $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, d) $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, e) $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ y f) $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 sobre un electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno. Caudal= 0.93 ml min^{-1} , $E_{ap}= 0.00 \text{ V}$.

El intervalo lineal se estableció, como siempre, para aquellas concentraciones que proporcionaban un coeficiente de correlación de, al menos, 0.998, estando comprendido entre $(0.1-8.0) \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ($r=0.999$) con una pendiente de $200 \pm 3 \mu\text{A mol}^{-1} \text{ l}$ y una ordenada en el origen de $(2 \pm 1) \times 10^{-3} \mu\text{A}$. El intervalo de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen se calculó para un nivel de significación de 0.05.

La desviación estándar relativa que se tomó como estimador de s_b para el cálculo de los límites de determinación y detección se obtuvo a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones diferentes de glucosa $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. El valor de RSD correspondiente fue de 6.9%, y los límites de detección y determinación de $2.8 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ y $9.2 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ respectivamente. El intervalo lineal en análisis por inyección en flujo es similar al obtenido en discontinuo, así como los límites de detección y determinación respectivos.

IV.1.5.4. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRAS DE MOSTOS Y VINOS

Como aplicación de los métodos desarrollados, se procedió a la determinación de muestras de mostos y vinos. Como es bien conocido los mostos contienen una elevada concentración de glucosa ($0.44-0.72 \text{ mol l}^{-1}$ ó 8-13%), mientras que en los vinos, dicho nivel de

concentración es mucho menor (2.8×10^{-3} - 5.6×10^{-3} mol l⁻¹ ó 0.05-0.1%) (Hart y Fisher, 1991). Por consiguiente, el electrodo compuesto bienzimático se aplicó a la determinación de glucosa tanto en mostos como en vinos con objeto de demostrar su utilidad para el análisis de muestras que contienen glucosa tanto a niveles de concentración altos como bajos. Las muestras elegidas para llevar a cabo estos análisis han sido: mosto blanco y mosto rojo ambos de la marca "Greip", vino blanco de mesa de la marca "Montemelo" de la provincia de Cuenca y vino tinto de la marca "Don Opas" de Valdepeñas. Se aplicaron los métodos de análisis en discontinuo y por inyección en flujo. Previamente, se llevó a cabo un estudio de interferencias.

IV.1.5.4.1. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Para llevar a cabo este estudio se eligieron una serie de sustancias, posibles interferentes, de entre todos los componentes presentes en mostos y vinos (Tabla 24) (Lobo Castañón, 1996). Se evaluó la influencia de estos compuestos sobre la señal obtenida para glucosa (2.0×10^{-4} mol l⁻¹) con el biosensor bienzimático, para diferentes niveles de concentración de interferente (2.0×10^{-4} , 1.0×10^{-3} y 2.0×10^{-3} mol l⁻¹), mediante el método desarrollado en discontinuo. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 24.

Tabla 24. Estudio de interferencias sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario de glucosa 2.0×10^{-4} mol L⁻¹ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹, pH 7.4. E_{ap}= 0.00 V.

INTERFERENTE	C _{INTERFERENTE} , mol l ⁻¹	(G:I)*	E _r , %
Fructosa	2.0×10^{-3}	1:10	---
Etanol	2.0×10^{-3}	1:10	---
Metanol	2.0×10^{-3}	1:10	---
Ácido tartárico	2.0×10^{-4}	1:1	---
	1.0×10^{-3}	1:5	6.9
	2.0×10^{-3}	1:10	10.3
Ácido málico	2.0×10^{-4}	1:1	---
	1.0×10^{-3}	1:5	3.1
	2.0×10^{-3}	1:10	6.3
Ácido cítrico	2.0×10^{-4}	1:1	---
	1.0×10^{-3}	1:5	9.3
	2.0×10^{-3}	1:10	15.6
Ácido succínico	2.0×10^{-4}	1:1	---
	1.0×10^{-3}	1:5	---
	2.0×10^{-3}	1:10	5.7
Ácido acético	2.0×10^{-3}	1:10	---
Ácido fórmico	2.0×10^{-3}	1:10	---
Ácido láctico	2.0×10^{-3}	1:10	---

* G= Glucosa e I= Interferente

Como se puede observar, en las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de glucosa, ni la fructosa, ni los alcoholes (metanol y etanol), ni los ácidos acético, fórmico y láctico, afectan la señal analítica del analito para ninguna de las relaciones de concentración ensayadas. Sin embargo, la presencia de los otros cuatro ácidos estudiados: tartárico, málico, cítrico y succínico, si tuvo influencia sobre la corriente en el estado

estacionario de la glucosa para las relaciones superiores a 1 :1 que se muestran en la Tabla 24. Estas interferencias están causadas por la reducción electroquímica de estos ácidos a 0.00 V. Con el fin de evaluar como influyen estas interferencias sobre la determinación de glucosa en mostos y vinos, se han recogido en la Tabla 25 los intervalos de concentración usuales de cada uno de los interferentes en el mosto o vino embotellado, y los intervalos de concentración de los mismos en la célula de medida, después de realizar el tratamiento de las muestras (diluciones) que se indicó en el Apartado IV.1.4.3.5.1. También se recogen los correspondientes intervalos de concentración (muestra embotellada y en la célula de medida) para la glucosa.

Tabla 25. Niveles de concentración usuales en los que se encuentra la glucosa y algunos interferentes estudiados en mostos y vinos.

INTERFERENTE	[INTERFERENTE] MOSTO, mol l ⁻¹		[INTERFERENTE] VINO, mol l ⁻¹	
	(I)	(II)	(I)	(II)
	min-máx	min-máx	min-máx	min-máx
ÁCIDO TARTÁRICO	(1.3-6.7)x10 ⁻²	(3.3-17)x10 ⁻⁶	(6.7-40)x10 ⁻²	(1.3-8.0)x10 ⁻⁴
ÁCIDO MÁLICO	(9.6-76)x10 ⁻³	(2.4-20)x10 ⁻⁶	(0-5.8)x10 ⁻²	(0-1.1)x10 ⁻³
ÁCIDO CÍTRICO	(4.7-24)x10 ⁻⁴	(1.2-6.1)x10 ⁻⁷	(0-2.4)x10 ⁻³	(0-4.8)x10 ⁻⁵
ÁCIDO SUCCÍNICO	(4.2-13)x10 ⁻³	(1.1-3.3)x10 ⁻⁶	(4.2-13)x10 ⁻³	(8.5-26)x10 ⁻⁵
GLUCOSA	0.44-0.72	(1.1-1.8)x10 ⁻⁴	(2.8-5.6)x10 ⁻³	(5.4-11)x10 ⁻⁵

- (I) Intervalo de concentraciones de interferente en el mosto y vino embotellados.
 (II) Intervalo de concentraciones de interferente en la célula de medida.

Cuando se comparan los datos de la Tabla 25 con las relaciones de concentración a los que se produce interferencia (Tabla 24), se puede asegurar que, en el caso de los mostos, la relación de concentración glucosa :interferente será siempre mayor que 1:1 y, por lo tanto, las sustancias ensayadas no interferirán. En el caso de las muestras de vino, la concentración de ácido cítrico y succínico presente no es suficiente para dar lugar a una interferencia apreciable sobre la respuesta de la glucosa. Sin embargo, los niveles de concentración a los que pueden estar presentes el ácido tartárico y el ácido málico, implican que la relación mínima glucosa :interferente sería de aproximadamente 1 :15 en ambos casos. Suponiendo que se den estas condiciones, que son las peores posibles, el error relativo que se produciría en la corriente en estado estacionario de la glucosa sería del orden del 10%.

Todos estos resultados demuestran la buena selectividad del electrodo compuesto bienzimático para la determinación de glucosa en esta clase de muestras.

IV.1.5.4.2. ANÁLISIS EN DISCONTINUO

La determinación de glucosa en las muestras indicadas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento extremadamente simple expuesto en el apartado IV.1.4.3.5., en el que solo se necesitó hacer en algunos casos diluciones con objeto de que la concentración de glucosa estuviera dentro del intervalo de linealidad del calibrado.

Cuando se comparó el valor de la pendiente del calibrado obtenido aplicando el método de adiciones estándar ($450 \pm 7 \mu\text{A mol}^{-1} \text{l}$) con el del calibrado con patrones de glucosa ($610 \pm 2 \mu\text{A mol}^{-1} \text{l}$), se observaron diferencias significativas entre ambos ($t_{\text{cal}}=21.980$ y $t_{\text{tab}}=2.776$), por lo que se utilizó el método de adiciones estándar para minimizar el efecto matriz en los análisis. A modo de ejemplo, en la Figura 67, se recogen los amperogramas correspondientes a una de las muestras de mosto blanco.

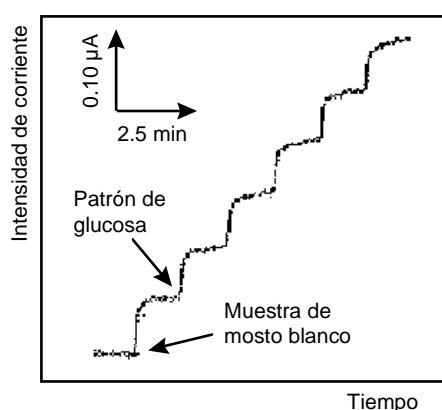


Figura 67. Registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo bienzimático de grafito-Teflon-GOD-HRP-ferroceno en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4, para la adición de una alícuota de muestra de mosto blanco y posteriores adiciones sucesivas de $20 \mu\text{l}$ de glucosa patrón 0.025 mol l^{-1} . $E_{\text{ap}}=0.0 \text{ V}$.

En la Tabla 26 se recogen los resultados obtenidos para cinco determinaciones de glucosa para cada una de las muestras analizadas, calculándose el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05. Como se puede apreciar, todos los resultados obtenidos están comprendidos en el intervalo de concentración usual para glucosa en este tipo de muestras (8-13 % para mostos y 0.05-0.1 % para vino), con excepción del vino blanco para el que se obtuvo un contenido de glucosa ligeramente menor que el valor más bajo del intervalo esperado.

Tabla 26. Determinación de glucosa en muestras de mosto y vino empleando el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno.

Muestra	Glucosa, mol l^{-1}	Glucosa, %	RSD, %
Mosto blanco	0.45 ± 0.04	8.1 ± 0.8	8.1
Mosto rojo	0.51 ± 0.04	9.1 ± 0.8	7.5
Vino blanco	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	0.029 ± 0.002	4.5

Vino tinto	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	0.09 ± 0.01	7.4
------------	--------------------------------	-----------------	-----

IV.1.5.4.3. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

El sensor bienzimático se utilizó como detector para llevar a cabo la determinación de glucosa en las muestras de mostos y vinos en un sistema de análisis por inyección en flujo. La existencia de efecto matriz implicó de nuevo la utilización del método de adiciones estándar, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado IV.1.4.3.5.2.2. A modo de ejemplo, en la Figura 68 se muestran los fiagramas obtenidos con una muestra de mosto blanco. Los resultados obtenidos para cinco determinaciones de cada una de las muestras analizadas se recogen en la Tabla 27.

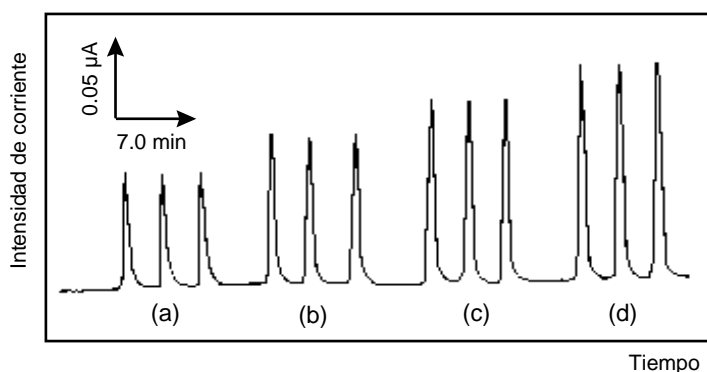


Figura 68. Fiagramas obtenidos aplicando el método de adiciones estándar para una muestra de mosto blanco (a) ; muestra de mosto blanco con disolución patrón de glucosa en concentraciones de $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (b), $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (c) y $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (d) en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Caudal= 0.93 ml min^{-1} . $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. $V_{inyección} = 150 \mu\text{l}$

Tabla 27. Determinación de glucosa en muestras de mostos y vinos empleando el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno como detector en análisis por inyección en flujo.

Muestra	Glucosa, mol l^{-1}	% Glucosa	RSD, %
Mosto blanco	0.47 ± 0.02	8.4 ± 0.4	3.6
Mosto rojo	0.48 ± 0.01	8.6 ± 0.3	1.2
Vino blanco	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	0.033 ± 0.003	2.6
Vino tinto	$(5.4 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	0.10 ± 0.01	6.1

Si se comparan los resultados obtenidos mediante FIA y en discontinuo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos. Por lo que se refiere a la precisión, puede verse que los valores de RSD son considerablemente menores por FIA.

Con objeto de evaluar la exactitud del método propuesto, se llevaron a cabo estudios de recuperación añadiendo una cantidad conocida de glucosa a las muestras (0.280 mol l^{-1} para las muestras de mosto, $2.24 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ para vino blanco y $7.22 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ para vino tinto). Las

recuperaciones obtenidas para cinco determinaciones se recogen en la Tabla 28, pudiendo comprobarse que se obtuvieron buenos resultados en todos los casos.

Tabla 28. Valores de recuperación de glucosa en muestras de mostos y vinos ($n=5$). $E_{ap}=0.0$ V

Muestra	Glucosa añadida, mol l ⁻¹	Recuperación, %
Mosto blanco	0.280	99 ± 5
Mosto rojo	0.280	103 ± 5
Vino blanco	2.24x10 ⁻³	104 ± 6
Vino tinto	7.22x10 ⁻³	96 ± 6

IV.1.6. CONCLUSIONES

Todos los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que los electrodos compósitos de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno constituyen biosensores robustos que pueden ser utilizados para aplicaciones reales tanto en discontinuo como en FIA. Estos electrodos bienzimáticos se fabrican fácilmente por simple inclusión física de las enzimas en la matriz del electrodo sin necesidad de realizar enlaces covalentes, son fácilmente regenerables por pulido y presentan una buena estabilidad y un largo tiempo de vida operacional. Además, se ha demostrado que con este electrodo compósito bienzimático es posible determinar glucosa en muestras como mostos y vinos, con un tratamiento de la muestra extremadamente simple consistente solamente en una dilución.

IV.1.7. BIBLIOGRAFÍA. BIOSENSOR DE GLUCOSA

Belitz y Grosch. (1992). "Química de los Alimentos". 2ª Edición. Editorial. *Acribia*.

Bridge, K.A., Higson, S.P.J. (2001). "Polyacrylonitrile Thin-film composite membranes for the optimization of a whole blood glucose sensor". *Electroanalysis*, 13, No.3, 191-198.

- Campuzano, S., Gálvez, R., Pedrero, M., De Villena F.J.M., Pingarrón, J.M. (2002). "Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers with tetrathiafulvalene ad glucose oxidase at a gold disk electrode". *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 526(1-2) :92-100.
- Cosnier, S., Marks, R.S., Lellouche, J.P., Perie, K., Fologea D., Szumerits, S. (2000a). "Electrogenerated poly(chiral dicarbazole) films for the reagentless grafting of enzymes". *Electroanalysis*, 12, No. 14.
- Cosnier, S., Lambert, M., Stoytcheva, M. (2000b). "A composite clay glucose biosensor based on an electrically connected HRP". *Electroanalysis*, 12, no.5, 356-360.
- Cosnier, S., Lepellec, A., Guidetti, B., Rico-Lattes, I. (1998). "Enhancement of biosensor sensitivity in aqueous and organic solvents using a combination of poly(pyrrole-ammonium) and poly(pyrrole-lactobionamide) films as host matrices". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 449, 165-171.
- Cui, G., Yoo, J.H., Woo, B.W., Kim, S.S., Cha, G.S., Nam, H. (2001). "Disposable amperometric glucose sensor electrode with enzyme-immobilized nitrocellulose strip". *Talanta* 54, 1105-1111.
- Danilowicz, C., Cortón, E., Battaglini, F., Calvo, E.J. (1998). "An Os(byp)₂CIPyCH₂NHPoly-(allylamine) hydrogel mediator for enzyme wiring at electrodes". *Electrochimica Acta*, Vol 43. No. 23, pp. 3525-3531.
- Eagle, H., Barban, S., Levy, M., Schulze, H.O. (1958). *J. Biol. Chem*, 233, 551.
- Eshkenazi, I., Maltz, E., Zion, B., Rishpon, J. (2000). "A three cascaded enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk". *Journal of dairy Science*. 83(9) 1939-1945.
- Faviano, S., Tran-Minh, C., Piro, B., Dang, L.A., Pham, M.C., Vittori, O. (2002). "Poly 3,4-ethylenedioxythiophene as an entrapment support for amperometric enzyme sensor". *Materials Science and Engineering C Biomimetic and Supramolecular Systems*. 21(1-2). Special Iss. SI :61-67.
- Gavalas, V.G., Chaniotakis, N.A. (2000). "Polyelectrolyte stabilized oxidase based biosensors :effect of diethylaminoethyl-dextran on the stabilization of glucose and lactate oxidases into porous conductive carbon". *Analytica Chimica Acta* ; 404, 67-73.
- González Salgueiro, A. (1993). "Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. Ediciones *Mundi-Prensa*.
- Gouda, M.D., Thakur, M.S., Karanth, N.G. (2001). "Stability studies on immobilized glucose oxidase using an amperometric biosensor-effect of protein based stabilizing agents." *Electroanalysis*, 13, No. 10. 849-855.
- Guemas, Y., Boujtita, M., El-Murr, N. (2000). "Biosensor for determination of glucose ad sucrose in fruit juices by flow injection analysis". *Applied Biochemistry and biotechnology*; 89 (2-3) : 171-181.
- Hart, F.L., Fisher, H.J. (1991). "Análisis moderno de los alimentos". Editorial *Acribia*.
- Huang, Y.L., Khoo, S.B., Yap, M.G.S. (1993). "Flow injection analysis-wall jet electrode system for monitoring glucose and lactate in fermentation broths". *Analytica Chimica Acta*, 283, 763-771.

- Ju, H., Zhou, D., Xiao, Y., Chen, H. (1998). "Amperometric biosensor for glucose based on a nanometer sized microband gold electrode coimmobilized with glucose oxidase and poly(o-phenylenediamine). *Electroanalysis*, 10, no. 8. 541-545.
- Kosela, E., Elzanowska, H., Kutner, W. (2002). "Charge mediation by ruthenium poly(pyridine) complexes in "second-generation" glucose biosensors based on carboxymethylated beta-cyclodextrin polymer membranes". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* ; 373(8) : 724-734.
- Liu, H., Ying, T., Sung, K., Li, H., Qi, D. (1997). "Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode". *Analytica Chimica Acta* ; 344, 187-199.
- Luiz de Mattos, I., Lukachova, L.V., Gorton, L., Laurell, T., Karyakin, A.A. (2001). "Evaluation of glucose biosensors based on Prussian Blue and lyophilised, crystalline and cross-linked glucose oxidases (CLEC^R). *Talanta* ; 54, 963-974.
- Lobo Castañón, M.J. (1996). "Biosensores amperométricos basados en deshidrogenasas dependientes de NAD⁺/NADH". Tesis doctoral. Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo..
- Mao, L., Yamamoto, K. (2000). "Glucose and choline on-line biosensors based on electropolymerized Meldola's Blue". *Talanta* 51, 187-195.
- Miao, Y., Chia, L.S., Goh, N.K., Tan, S.N. (2001). "Amperometric Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan matrix cross-linked with glutaraldehyde". *Electroanalysis*, 13, No. 4. 347-349.
- Min, R.W., Rajendran, V., Larsson, N., Gorton, L., Planas, J., Hahn-Hägerdal, B. (1988). "Simultaneous monitoring of glucose and L-lactic acid during a fermentation process in an aqueous two-phase system by on-line FIA with microdialysis sampling and dual biosensor detection". *Analytica Chimica Acta* 366 (1988) 127-135.
- Moscone, D., D'Ottavi D., Compagnone, D., Palleschi, G. (2001). "Construction and analytical characterization of Prussian Blue-based carbon paste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors. *Analytical Chemistry*, 73, 2529-2535.
- Mousty, C., Galland, B., Cosnier, S. (2001). "Electrogeneration of a hydrophilic cross-linked polypyrrole film for enzyme electrode fabrication. Application to the amperometric detection of glucose". *Electroanalysis*, 13, No.3. 186-190.
- Nakabayashi, Y., Wakuda, M., Imai, H. (1998). "Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as an electron transfer mediator". *Analytical Sciences*. Vol. 14.1069-1076.
- O'Connell, P.J., Guibault, G.G. (2001). "Future Trends in Biosensor research". *Analytical Letters*, 34(7), 1063-1078.
- Pravda, M., O'Halloran, M.P., Kreuzer, M.P., Guilbault, G.G. (2002). "Composite glucose biosensor based on screen-printed electrodes bulk modified with Prussian blue and glucose oxidase". *Analytical Letters* ; 35(6) :959-970.
- Piro, B., Do, V.A., Le, L.A., Hedayatullah, M., Pham, M.C. (2000). "Electrosynthesis of a new enzyme-modified electrode for the amperometric detection of glucose". *Journal of Electroanalytical Chemistry* ; 486, 133-140.

- Popescu, I.C., Cosnier, S., Labbé, P. (1997). "Peroxidase-glucose oxidase-poly(amphiphilic pyrrole) bioelectrode for selectively mediated amperometric detection of glucose". *Electroanalysis*, 9, No. 13. 998-1004.
- Puig-Lleixa, C., Jimenez, C., Bartroli, J. (2001). "Acrylated polyurethane-photopolymeric membrane for amperometric glucose biosensor construction". *Sensors and actuators-B-Chemical*. 72(1) : 56-62.
- Sharp, D.W.A. (1990). "Dictionary of Chemistry". Ed. *The Penguin*
- Trojanowicz, M., Miernik, A. (2001). "Bilayer lipid membrane glucose biosensors with improved stability and sensitivity". *Electrochimica Acta*, 46 (2001) 1053-1061.
- Wang, J. (2001). "Glucose biosensors : 40 yerars of advances and challenges". *Electroanalysis*, 13, No.12 ; 983-988.
- Wang, J., Mo, J.W., Li, S., Porter,, J. (2001). "Comparison of oxygen-rich and mediator-based glucose-oxidase-carbon paste electrodes". *Analytica Chimica Acta* ; 441, 183-189.
- Wang, J., Zhang, X. (2001). "Needle-type dual microsensor for the simultaneous monitoring of glucose and insulin". *Analytical Chemistry*, 73, 844-847.
- Wang, J., Zhang, X., Chen, L. (2000). "Comparison of glucose enzyme electrodes based on dispersed rhodium particles and cupric hexacyanoferrate within carbon paste transducers". *Electroanalysis*, 12, no. 16. 1277-1281.
- Wagner, G., Schmid, R.D. (1990). "Biosensors for food analysis". *Food biotechnology*, 4(11), 215-240.
- Xu, J.J., Chen, H.Y. (2000). "Amperometric Glucose sensor based on a glucose oxidase immobilized in electrochemically generated poli(etacridina)". *Analytica Chimica Acta* ; 423, 101-106.
- Xu, J.J., Zhang, X.Q., Yu, Z.H., Chen, H.Y. (2001). "A stable glucose biosensor prepared by co-immobilized glucose oxidase into poli(p-clorofenol) on a platinum electrode". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 369 (6) 486-490.
- Yabuki, S., Mizutani, F. Hirata, Y. (2001). "Glucose-sensing electrode based on glucose oxidase attached polyion complex membrane containing peroxidase and ferrocene". *Electroanalysis*, 13, No. 5. 380-383.
- Zhang, C.X., Gao, Q., Aizawa, M. (2001). "Flow injection analytical system for glucose with screen-printed enzyme biosensor incorporating Os-complex mediator". *Analytica Chimica Acta*. 426 (1) : 33-41.
- Zhang, C., Haruyama, T., Kobatake, E., Aizawa, M. (2001). "Disposable electrochemical capillary-fill device for glucose sensing incorporating a water-soluble enzyme/mediator layer". *Analytica Chimica Acta*; 442, 257-268.

IV.2. BIOSENSOR DE HIPOXANTINA

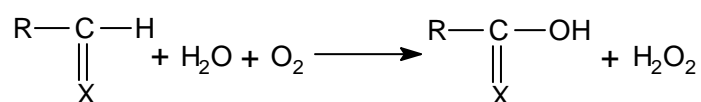
OBJETIVO

Desarrollo de un biosensor compuesto bienzimático de grafito-Teflón basado en la coinmovilización de las enzimas xantina oxidasa (XOD) y peroxidasa (HRP) para la determinación de hipoxantina en pescado.

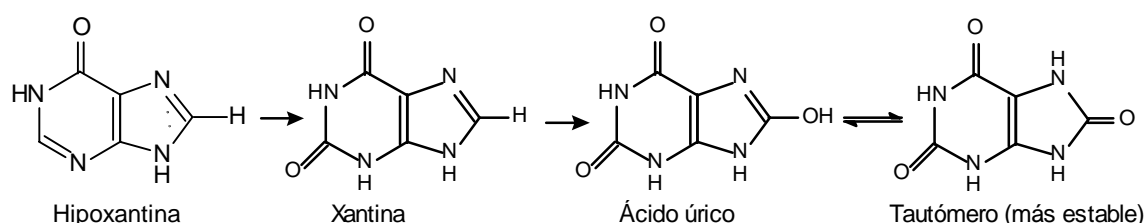
IV.2.2. INTRODUCCIÓN

Los componentes nitrogenados no proteicos son los que contribuyen en mayor medida a la rápida alteración de las cualidades organolépticas y sanitarias del pescado después de su muerte. Entre ellos, los nucleótidos como el ATP están entre los más afectados por la degradación del pescado fresco. En este proceso de degradación se producen bases púricas como la hipoxantina (Hx) (Mulchandani et al., 1989), por lo que su detección y cuantificación puede ser utilizada como un índice de la frescura del pescado. En este contexto, se han propuesto diferentes índices para el control de dicha frescura (Gómez-Guillén et al., 1992 ; Okuma et al., 1992), en los que la concentración de hipoxantina es uno de los parámetros incluidos. Por lo tanto, la hipoxantina es una de las sustancias que son monitorizadas en el análisis de pescado y productos pesqueros. La mayoría de los métodos analíticos empleados para la determinación de hipoxantina están basados en su reacción enzimática de oxidación catalizada por xantina oxidasa (XOD), habiéndose desarrollado diferentes biosensores para esta aplicación y para la determinación del índice de frescura en pescado, como se pondrá de manifiesto en los Antecedentes Bibliográficos.

La xantina oxidasa es una de las enzimas más complicadas del grupo de las flavoproteínas (Hu y Liu, 1997a), ya que su actividad catalítica se atribuye a una compleja interacción del sustrato con los dos metales de transición, hierro y molibdeno, además de intervenir también los sulfuros y FAD de la enzima. La reacción enzimática que tiene lugar se puede esquematizar en general de la siguiente manera, donde X= N u O :



La hipoxantina se oxida, mediante la reacción catalizada por XOD, a xantina en una primera etapa y a ácido úrico posteriormente según el siguiente esquema :



Los biosensores electroquímicos para la monitorización de esta reacción pueden fundamentarse en tres procesos : (a) monitorización del consumo de O₂, (b) monitorización de la oxidación electroquímica del ácido úrico generado y (c) monitorización de la reducción del H₂O₂ generado bien directamente, o bien catalizada por la enzima peroxidasa, lo que puede llevarse a cabo con o sin mediador. La vía (c) es la estrategia empleada más frecuentemente, ya que permite obtener la mayor sensibilidad y no tiene los problemas del método (a), en el que el O₂ consumido se monitoriza con un electrodo de Clark, por lo que hay que mantener la concentración de O₂ constante en cada experimento. Por otro lado, se minimizan las interferencias potenciales que se podrían producir con la monitorización del ácido úrico, la cual

se realiza a potenciales mayores de 0.5 V, ya que las medidas se podrán efectuar a potenciales cercanos a 0.00 V.

IV.2.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los antecedentes bibliográficos que se dan a continuación se refieren, en primer lugar, a los métodos empleados para proporcionar información sobre la frescura del pescado. Posteriormente, se presentan en forma de Tabla, los antecedentes que se han considerado más interesantes sobre biosensores electroquímicos de xantina oxidasa. En esta Tabla se recogen los sustratos, los mediadores y enzimas empleados, los métodos de inmovilización de la enzima y en su caso el mediador empleado en el electrodo, la estabilidad del biosensor y sus características analíticas, así como el tipo de muestra al que se ha aplicado.

Por lo que se refiere a los métodos generales que permiten evaluar la frescura del pescado, éstos se basan fundamentalmente en la determinación de los productos generados en la degradación de los componentes nitrogenados no protéicos. Así, se han determinado el nitrógeno básico volátil (Kawabata et al., 1953), amonio (Ota et al., 1952), aminas (Yamada, 1968), ácidos volátiles (Suzuki, 1953) y la concentración de nucleótidos (Saito et al., 1959). Existen otros parámetros físicos y químicos orientativos de la frescura del pescado, entre los cuales se encuentran la medida de la actividad catalítica (Mori y Hata, 1949), el pH (Yamamoto y Sonehera, 1953), la resistencia eléctrica (Nagamatsu, 1960) y la intensidad de fluorescencia (Ono et al., 1962). Sin embargo, estos métodos requieren procedimientos tediosos. Las técnicas más empleadas comúnmente para la determinación del valor de K (índice de frescura en %) son las cromatográficas (Lee et al., 1982 ; Randerath, 1996) habiéndose propuesto también métodos de análisis basados en ensayos colorimétricos (Uda et al., 1983).

Entre los métodos de evaluación de la frescura del pescado mencionados, la determinación de nucleótidos producidos por la descomposición del ATP se considera como el indicador más fiable y útil debido a que, inmediatamente después de la muerte del pescado, el ATP contenido en sus músculos se descompone secuencialmente por acción enzimática, siendo varios los biosensores que llevan a cabo esta medida. Con ellos se consigue una mayor eficiencia y rapidez en los análisis, además de poder ser aplicados a pequeñas cantidades de muestra. La gran mayoría de estos biosensores para determinar nucleótidos se basan en el empleo de xantina oxidasa. En la Tabla XIII se recogen algunos trabajos de biosensores amperométricos que utilizan esta enzima. Se ha intentado reflejar la evolución de estos sensores y recoger diferentes matrices electródicas, mediadores, tipos de inmovilización, etc. con objeto de ilustrar las múltiples posibilidades de aplicación que presenta esta enzima.

Como se ha comentado anteriormente, la XOD es una de las enzimas más complejas dentro de las oxidasas denominadas flavoenzimas, ya que su actividad catalítica se atribuye a

una compleja interacción del sustrato con hierro, molibdeno, sulfuros y FAD (Hu y Liu, 1997a). En la Tabla XIII se recoge un ejemplo en el que se elimina el grupo FAD con CaCl_2 , en cuyo caso la enzima se denomina deflavo xantina oxidasa. En esas condiciones, la enzima no reacciona con O_2 para la oxidación de la hipoxantina, pero empleando un mediador como 1,1'-dimetilferricinio, los metales Mo y Fe de la enzima hacen que su capacidad catalítica permanezca intacta (Zhao y Luong, 1994 ; Luong y Thatipamala, 1996). Esto evita uno de los principales problemas encontrados con los biosensores que emplean oxidasas y mediadores, ya que el oxígeno puede verse implicado en la oxidación enzimática del sustrato compitiendo con el mediador, lo que puede hacer que la señal medida sea mucho menor (Zhao y Luong, 1994). La inmensa mayoría de los trabajos, sin embargo, emplean mediadores sin necesidad de eliminar el FAD de la enzima.

Como puede observarse, el sustrato más utilizado con diferencia para estudiar la degradación del ATP con el tiempo, es la hipoxantina, cuya cantidad depende del tipo de pescado y que tras la muerte de la célula suele encontrarse en un intervalo de concentraciones de 0.3-6 $\mu\text{mol/g}$ (Mascini, 1994). Además, la descomposición enzimática de inosina a hipoxantina es la etapa determinante de la velocidad y la hipoxantina se va acumulando en el tejido del pescado (Tuzhi et al., 1995), mientras que ATP, ADP, AMP e IMP aumentan mucho entre 5 y 24 horas después de la muerte y luego disminuyen (normalmente los pescados se obtienen en el mercado como mínimo después de ese período de tiempo (Karube et al., 1984). De todas formas, para hacer una evaluación de la frescura de un pescado en las primeras horas posteriores a su muerte, sería necesario determinar cada nucleótido de la cadena, y para eso hay trabajos en los que se combina la acción de la XOD, NP y NT para poder determinar el índice K de frescura del pescado.

El problema que suele plantearse con los biosensores en los que se determina más de un nucleótido a la vez, es poder discriminar qué proporción de la señal corresponde a cada uno de ellos, para lo que suelen emplearse calculos matemáticos que complican demasiado el análisis cuando lo más sencillo sería aplicar una cromatografía (Karube et al., 1984). Dentro de estos trabajos multienzimáticos, son muchos los que emplean reactores para luego monitorizar los productos de la reacción o el consumo de oxígeno.

Por lo que respecta a la monitorización, la Tabla XIII muestra solo algunos ejemplos de la gran cantidad de posibilidades de detección que presenta un biosensor amperométrico como éste. Hay trabajos con electrodos de Clark, muchos de ellos modificados con membranas en las que se inmoviliza la XOD, otros con HRP para monitorizar la reacción de esta enzima con el peróxido de hidrógeno, detectores de ácido úrico, etc. Por otro lado, la modificación de estos electrodos pasa por membranas de muy diferentes tipos, polímeros, matrices que no necesitan grafito, etc.

En cuanto a la aplicabilidad de estos biosensores a muestras reales, hay que decir que en la Tabla XIII no se han incluido todos los tipos de pescado que pueden ser analizados.

IV.2.4. PARTE EXPERIMENTAL

IV.2.4.1. INSTRUMENTACIÓN

IV.2.4.1.1.- APARATOS

Las medidas se han realizado con un potenciostato BAS CV-27 (Bioanalytical Systems, Inc) conectado a un registrador x-t Linseis L250 E.

Otros aparatos utilizados han sido : agitador magnético Ikamag Ret, pH-metro de precisión Metrohm E-510 calibrado de forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.00 y 7.02 a 25.0 ± 0.5 °C, baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, prensa de infrarrojos Carver y estufa P-Selecta. También se ha utilizado un termostato de circulación de agua P-Selecta y una centrifuga P Selecta Meditronic. Para las medidas realizadas por espectrofotometría se ha utilizado un espectrofotómetro UV-Visible de matriz de diodos HP 8453.

IV.2.4.1.2.- ELECTRODOS Y CÉLULAS DE TRABAJO

- Electrodo compuesto enzimático de grafito-Teflón-xantina oxidasa-peroxidasa-ferroceno preparado según se describe en el apartado IV.1.3.3.2.
- Electrodo de referencia : Ag/AgCl/KCl (3 M) BAS RE-1.
- Electrodo auxiliar: Punta de platino.
- Célula electroquímica BAS modelo VC-2.

IV.2.4.2. REACTIVOS

Para la preparación del electrodo compuesto enzimático se ha utilizado :

- Grafito de pureza Ultra "F" (Carbone of America) como fase conductora.
- Teflón (politetrafluoroetileno, Aldrich), como fase aislante.
- Peroxidasa (HRP) EC 1.11.1.7 (Type II-from Horseradish) de actividad 180 unidades por miligramo de sólido (Sigma).
- Xantina oxidasa (XOD) EC 1.1.3.22 de actividad 0.067 unidades por miligramo de sólido (Sigma).
- Ferroceno (Merck).

Como sustrato se ha empleado hipoxantina (Fluka), y para preparar la disolución reguladora de fosfato se han utilizado fosfato disódico anhidro (Panreac) y fosfato monosódico dihidratado (Merck). Otros reactivos utilizados fueron hidróxido sódico y ácido perclórico (Panreac).

En el estudio de interferencias se han empleado: ácido ascórbico (Merck), D(+)-Galactosa (Sigma), L-Metionina (Sigma), L-alanina (Merck) y ácido oxálico (Probus).

Todos los reactivos utilizados han sido de calidad para análisis.

El agua empleada se obtuvo de un sistema Millipore Milli-Ro.

La muestra analizada fue sardina.

IV.2.4.3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

IV.2.4.3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

– Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4 :

Se prepara disolviendo las cantidades apropiadas de las sales disódica y monosódica, ajustando posteriormente el pH con NaOH 2 mol l⁻¹.

– Disolución patrón de hipoxantina :

Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de hipoxantina, pesada exactamente, en una disolución de NaOH 0.01 mol l⁻¹ para alcanzar una concentración de 10⁻² mol l⁻¹, con ayuda de agitación ultrasónica. Las disoluciones patrón más diluidas se prepararon por dilución apropiada con la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4.

– Disolución de HClO₄ 0.6 mol l⁻¹ :

Se prepara diluyendo el volumen necesario de HClO₄ al 60% en agua desionizada hasta el volumen correspondiente.

– Disolución de hidróxido potásico (0.557 mol l⁻¹)-fosfato (0.2 mol l⁻¹) : Se disuelven 27.22 g de dihidrogeno fosfato potásico en alrededor de 250 ml de agua y se añaden 171 ml de hidróxido sódico 1 mol l⁻¹. El pH de esta disolución, próximo a 7.6, se ajusta a este valor con ácido fosfórico o hidróxido sódico. A continuación, se añaden 557 ml de hidróxido potásico 1 mol l⁻¹ y se enrasa a 1 litro con agua.

– Tampón fosfato 0.25 mol l⁻¹ (pH 7.6) : Esta disolución se prepara como la disolución reguladora de fosfato indicada anteriormente, pero pesando las cantidades adecuadas a la concentración de esta nueva disolución.

– Disolución patrón de XOD de 0.064 U/ml : Se prepara disolviendo 0.0038 g de enzima en 4.0 ml de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹, pH 7.6.

IV.2.4.3.2.- PREPARACIÓN DEL ELECTRODO COMPÓSITO BIENZIMÁTICO DE HIPOXANTINA

Las pastillas se fabricaron en este caso con un contenido de Teflón del 60% por el siguiente procedimiento: se mezclan 0.24 g de grafito con las cantidades de enzimas escogidas (0.1776 g de xantina oxidasa y 0.0089 g de peroxidasa (1602 U)), pesadas exactamente, agitándose mecánicamente durante tres horas en una suspensión de 0.30 ml de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH=7.4 a 4 °C. A continuación, se evapora el

agua por paso de una corriente de argón, y se añaden 0.0096 g de ferroceno, pesados exactamente, disueltos en 0.30 ml de acetato de etilo, continuando la agitación durante aproximadamente 15 minutos (en el caso de los electrodos que no contienen el mediador, este último paso no se realiza). Se evapora el disolvente orgánico por paso de una corriente de argón y la pasta así formada se mezcla manualmente con teflón en polvo (0.36 g para un porcentaje de teflón del 60%). Se procede, seguidamente a la compresión mecánica de la mezcla en forma de pastillas utilizando la prensa de IR a 10000 kg/cm² de presión durante 10 minutos, obteniéndose una pastilla de dimensiones similares a las mencionadas en el apartado III.5.2. También en este caso, se prepararon pastillas más pequeñas de 3 mm de diámetro y se colocaron en la punta de la carcasa de Teflón que se muestra en la figura 1 del apartado III.4.1.2.

Para los electrodos construidos con diferente porcentaje de Teflón, se varió la proporción de grafito y Teflón de manera adecuada, manteniendo constante la cantidad de xantina oxidasa.

IV.2.4.3.3. OBTENCIÓN DE LOS AMPEROGRAMAS

Tras mantener el biosensor almacenado a 4 °C es necesario, antes de realizar las medidas, alcanzar la temperatura ambiente. Para ello se deja el electrodo fuera del refrigerador el tiempo necesario.

Para obtener los amperogramas en discontinuo, se sumerge el biosensor en la célula de medida que contiene 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4, con agitación mecánica 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 apropiado de la disolución patrón del compuesto a estudiar y se registra la corriente hasta que ésta alcance el estado estacionario. Se siguen realizando adiciones de pequeños volúmenes constantes con la micropipeta hasta obtener todas las señales deseadas. Entre los distintos experimentos no fue necesario hacer ningún tratamiento, ni físico ni químico al electrodo.

IV.2.4.3.4. DETERMINACIÓN DE HIPOXANTINA EN TEJIDO MUSCULAR DE SARDINAS

El procedimiento empleado para la extracción de hipoxantina en el tejido muscular de sardinas es una modificación del método recomendado por el Comité de Métodos Analíticos para el análisis de productos pesqueros (Analytical Methods Committee, 1979), el cual ha sido empleado como método de referencia para la validación de la metodología propuesta en este trabajo.

El procedimiento seguido es el siguiente : se pesan exactamente alrededor de 5 g de músculo de sardina. A continuación, la muestra se maceró en 50.0 ml de ácido perclórico 0.6 mol l⁻¹ durante 1 hora. Después de centrifugar a 4000 rpm durante 1 hora, se tomó una alícuota de 30 µl del extracto sobrenadante y se transfirió a la célula electroquímica que

contenía 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Las medidas se realizan mediante amperometría en disoluciones agitadas aplicando un potencial constante de 0.00 V. La determinación de hipoxantina se llevó a cabo aplicando el método de adiciones estándar, el cual implicó la adición de alícuotas sucesivas de 3 μl de una disolución patrón de hipoxantina $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$.

IV.2.4.3.4.1. Determinación de hipoxantina en tejido muscular de sardinas por el método de referencia

El método de referencia empleado se basa en la conversión de la hipoxantina, mediante la enzima xantina oxidasa, a ácido úrico, el cual se monitoriza espectrofotométricamente a 290 nm. Para llevar a cabo este método, se pesaron 5 g de muestra, se maceraron con 50 ml de HClO_4 0.6 mol l^{-1} y se filtró. Del filtrado se toma una alícuota de 5 ml a la que se añaden 5 ml de la disolución de hidróxido potásico-tampón fosfato. Una vez eliminado el precipitado de perclorato, se comprueba que el pH esté entre 7.0 y 7.6. Finalmente, se transfirió 1 ml del extracto neutralizado a un tubo de ensayo y se añadieron 1.5 ml de agua, 2.0 ml de tampón fosfato 0.25 mol l^{-1} (pH 7.6) y 0.5 ml de la disolución enzimática. Esta disolución final se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos y se procede a realizar la medida espectrofotométrica a 290 nm. Dado que la enzima también absorbe a la longitud de onda a la que se monitoriza el ácido úrico producido, se deben preparar los blancos correspondientes. Así pues, para realizar el análisis correctamente, se deberán preparar las siguientes disoluciones :

- Tubo 1 : 1.0 ml extracto + 2.0 ml de tampón fosfato 0.25 mol l^{-1} + 2.0 ml de agua.
- Tubo 2 : 1.0 ml extracto + 2.0 ml de tampón fosfato 0.25 mol l^{-1} + 1.5 ml de agua + 0.5 ml disolución enzimática.
- Tubo 3 : 2.0 ml de tampón fosfato 0.25 mol l^{-1} + 2.5 ml de agua + 0.5 ml disolución enzimática.
- Tubo 4 : 2.0 ml de tampón fosfato 0.25 mol l^{-1} + 3 ml de agua

El aumento de absorbancia a 290 nm causado por el ácido úrico, vendrá dado por la expresión : $\Delta A = B + D - C - A$, donde A, B, C y D son las absorbancias de los tubos 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

IV.2.5. ELECTRODO BIENZIMÁTICO DE GRAFITO - TEFLÓN - XANTINA OXIDASA - PEROXIDASA - FERROCENO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIPOXANTINA

IV.2.5.1. OPTIMIZACIÓN DEL PORCENTAJE DE TEFLÓN EN LA MATRIZ ELECTRÓDICA

Como una etapa previa al desarrollo del electrodo bienzimático, el contenido de material aislante, Teflon, en la matriz electródica se optimizó construyendo electrodos compósitos que contenían solo XOD. De esta forma, solo se monitoriza la reacción principal, es decir, la oxidación de hipoxantina a ácido úrico catalizada por la XOD. Dicha monitorización se llevó a cabo mediante la oxidación electroquímica del ácido úrico generado como producto de la reacción enzimática.

La elección del potencial aplicado para detectar esta oxidación se realizó a partir del voltamperograma cíclico de una disolución patrón de ácido úrico $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 sobre un electrodo compósito de grafito-Teflón (figura 69). Como puede apreciarse, se obtuvo un pico de oxidación bien definido a 0.50 V. La contribución del H_2O_2 , que también se forma como producto en la reacción enzimática, a la respuesta voltamperométrica resulta despreciable como se deduce de los voltamperogramas (b) y (c) de la Figura 69, obtenidos con disoluciones que contenían 1.0×10^{-1} y $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ de H_2O_2

respectivamente. Por lo tanto, se eligió un potencial de 0.6 V para la monitorización amperométrica de la reacción.

Una vez elegido el potencial de trabajo, se procedió a fabricar el electrodo de xantina oxidasa, como se indica en el apartado IV.2.4.3.2., con diferentes proporciones de Teflón (40-70%). Se realizaron series de 10 medidas en diferentes disoluciones de hipoxantina $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) para cada uno de los electrodos.

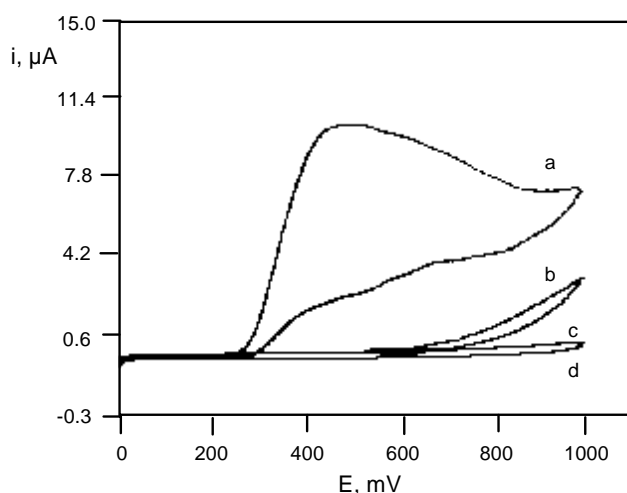


Figura 69. Voltamperograma cíclico de ácido úrico (a) $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en medio fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 sobre un electrodo compuesto de grafito-(40%) teflón ; (b) y (c) 1.0×10^{-1} y $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ de H_2O_2 en el mismo electrolito soporte, respectivamente ; (d) voltamperograma de fondo.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 29. Como se puede observar, la señal amperométrica en el estado estacionario permanece prácticamente constante para los electrodos que contenían 40, 50 y 60% de Teflón. Sin embargo, dicha corriente decrece acusadamente para los electrodos contruidos con un 70% de Teflon. Por otro lado, los valores de RSD disminuyeron al aumentar el porcentaje de Teflón. Además, como era de esperar, tanto la corriente de fondo como el tiempo necesario para alcanzar una línea base estable disminuyeron a medida que aumenta el contenido de Teflón. Este comportamiento, unido a la mayor resistencia mecánica de los electrodos contruidos con un **60% de Teflón**, hizo que fuera éste el contenido de Teflon elegido para estudios posteriores.

Tabla 29. Influencia del porcentaje de teflón en el electrodo compósito de grafito-Teflón-XOD sobre la intensidad de corriente en estado estacionario para una concentración de hipoxantina $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4). $E_{ap} = 0.6 \text{ V}$.

Porcentaje de teflón	i, μA	RSD, %
40 %	0.22 ± 0.03	7.9
50 %	0.22 ± 0.02	6.5
60 %	0.20 ± 0.01	4.0
70 %	0.14 ± 0.04	3.0

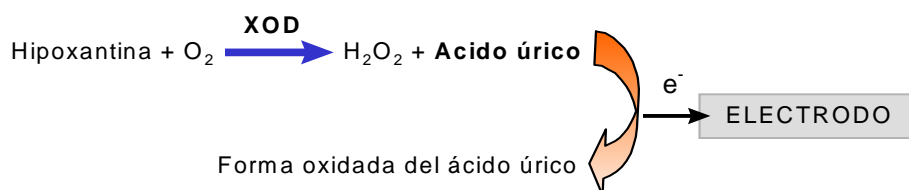
IV.2.5.2. ELECCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO Y EFECTO DEL POTENCIAL APLICADO

Lógicamente la detección amperométrica de hipoxantina a un potencial de 0.6 V, al cual se alcanza la máxima corriente de difusión del proceso de oxidación del ácido úrico, conlleva una pobre selectividad, debido a que a este valor tan positivo del potencial muchas otras sustancias orgánicas (por ejemplo el ácido ascórbico), que pueden estar presentes en muestras en las que se quiera determinar hipoxantina, son oxidables electroquímicamente. Si se considera que en la reacción enzimática también se genera peróxido de hidrógeno y que la reducción de H_2O_2 catalizada por la peroxidasa utilizando ferroceno como mediador, se puede llevar a cabo a un potencial de 0.00 V con un electrodo compósito de grafito-Teflón-HRP-ferroceno (ver apartado III.5.3.3.), se consideró la construcción de un electrodo compósito amperométrico bienzimático, en el que las enzimas XOD y HRP, junto con el mediador ferroceno se incorporaran en la matriz de grafito-Teflón para la detección selectiva de hipoxantina.

La inmovilización de xantina oxidasa, peroxidasa y ferroceno en el seno del electrodo puede dar lugar a diferentes reacciones electrónicas producidas por distintas especies electroactivas generadas en las dos reacciones enzimáticas involucradas. Por lo tanto, se investigó cómo variaba la intensidad de corriente en estado estacionario para la hipoxantina con el potencial, sobre electrodos compósitos construidos con diferentes componentes. Los criterios para elegir el sistema enzimático fueron : a) que la señal analítica máxima aparezca a potenciales cercanos a cero y b) entre éstos, aquel que proporcione la intensidad de corriente en estado estacionario mayor.

El medio de trabajo fue una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, y la concentración de hipoxantina $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en todos los casos. Los distintos biosensores preparados contenían los siguientes componentes :

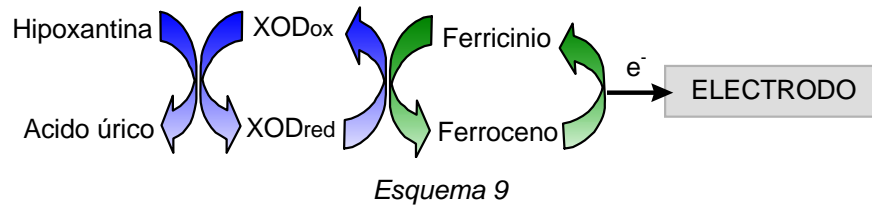
1. Electrodo I formado por grafito-Teflón-Xantina oxidasa. (Esquema 8) La señal amperométrica obtenida corresponde a la oxidación electroquímica de ácido úrico comentada anteriormente.



Esquema 8

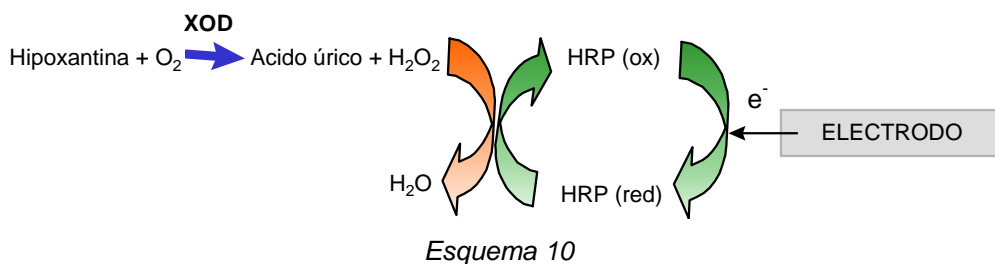
2. Electrodo II formado por grafito-Teflón-Xantina oxidasa-ferroceno. (Esquema 9) La

señal que se monitoriza es la oxidación electroquímica del ferroceno (Okuma, et al., 1991).

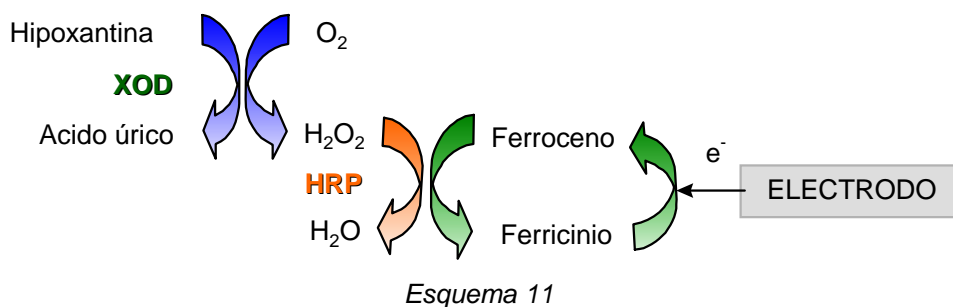


Aunque la especie que interviene como mediador en la reacción enzimática es el ferricinio, la especie inmovilizada en la matriz electródica es el ferroceno (no se puede obtener ferricinio comercialmente). Esto es posible debido a que el potencial al que aparece la señal amperométrica es lo suficientemente positivo como para que el ferroceno existente en la superficie del electrodo se haya oxidado a ferricinio, el cual se transforma de nuevo en ferroceno mediante la reacción enzimática.

3. Electrodo III formado por grafito-Teflón-Xantina oxidasa-HRP. (Esquema 10) En este caso, la señal amperométrica corresponde a la reducción de la peroxidasa en su forma oxidada a peroxidasa en su forma reducida (Jönsson y Gorton, 1989).



4. Electrodo IV formado por grafito-Teflón-xantina oxidasa-HRP-ferroceno. (Esquema 11). Como puede apreciarse, la señal corresponde a la reducción electroquímica de ferricinio.



Los resultados obtenidos para la corriente en estado estacionario de la hipoxantina cuando se varía el potencial aplicado se muestran en la figura 70.

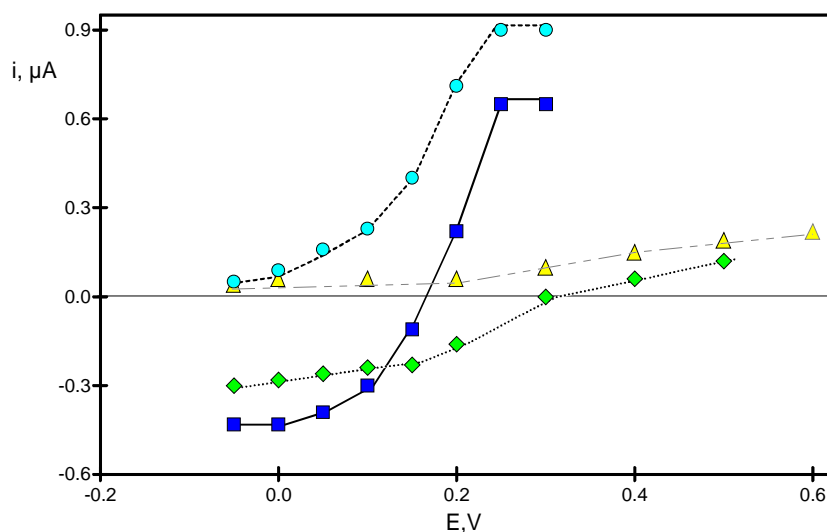


Figura 70. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario para hipoxantina $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en medio regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) sobre electrodos de : grafito-Teflón-XOD (\blacktriangle), grafito-Teflón-XOD-ferroceno (\bullet), grafito-Teflón-XOD-HRP (\blacklozenge) y grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno (\blacksquare).

En todos los casos se empleó una cantidad fija de mediador y HRP (ver Parte Experimental) suficiente para asegurar un exceso con respecto al sustrato. Observando la figura 70, se aprecia como para el electrodo I, la corriente de oxidación no parece alcanzar una meseta en el intervalo de potencial considerado. Además, dicha corriente alcanza un pequeño valor. Por otro lado, con el electrodo II se obtuvo una corriente de oxidación en estado estacionario considerablemente mayor, como consecuencia de la presencia del mediador, pero la meseta de corriente se alcanza a potenciales relativamente altos. En cuanto al electrodo formado con XOD y HRP (III), en el que el proceso electródico corresponde a la reducción de la HPR oxidada, la mayor intensidad en estado estacionario se alcanzó a potenciales menores de 0.15 V. Sin embargo, cuando el ferroceno está también presente en la matriz electródica (electrodo IV), la señal amperométrica aumentó significativamente a 0.00 V, potencial al cual se produce la reducción del ferricinio. Con este electrodo se observó también otra señal a potenciales más positivos, correspondiente al mismo proceso de oxidación que se da en el electrodo de XOD-ferroceno. Esta señal de oxidación del ferroceno es mayor que la de reducción del ferricinio, pero el potencial al que se alcanza la meseta es tan alto que podrían interferir sustancias capaces de oxidarse a esos valores de potencial.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, el sistema enzimático elegido para el desarrollo del biosensor amperométrico de hipoxantina fue el de ambas enzimas, **XOD y HRP**, y **ferroceno** como mediador. Como potencial se eligió un valor de **0.00 V**, ya que con él, se

pueden minimizar posibles interferencias. Además, tal y como se discutirá más adelante, si todavía se puede oxidar alguna sustancia a 0.00 V, sería posible aplicar potenciales más negativos al electrodo. Por otro lado, ya que también se genera ácido úrico en la reacción, trabajar a un potencial tan bajo asegura que dicho ácido no se oxide.

En cuanto al contenido de las enzimas y el mediador empleados para la fabricación del electrodo bienzimático, solo se evaluó el de xantina oxidasa para obtener una intensidad de corriente suficientemente sensible. Para ello, se fabricaron dos electrodos diferentes con 0.1776 y 0.0888 g de xantina oxidasa, manteniendo constantes los contenidos de peroxidasa, ferroceno, y la proporción de grafito-teflón. En la figura 71 se muestran las curvas de calibrado obtenidas con cada uno de los electrodos.

Tanto la ordenada en el origen como la pendiente son prácticamente iguales con las dos cantidades de enzima. Solo varía ligeramente el límite superior del intervalo de linealidad, siendo más alto con un contenido mayor de xantina oxidasa, por lo que se eligió 0.1776 g de XOD como la cantidad de enzima para construir los biosensores.

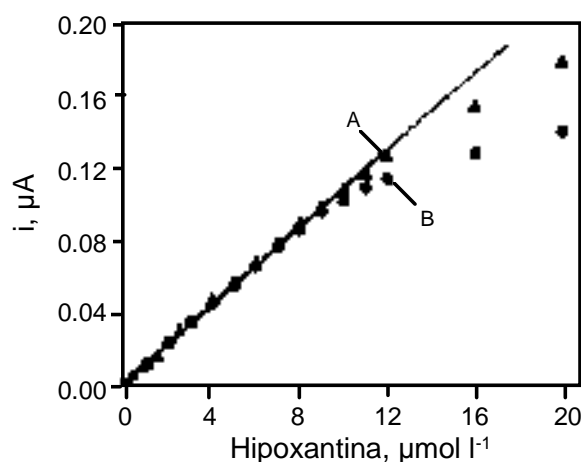


Figura 71. Variación de la intensidad de corriente en estado estacionario con la concentración de hipoxantina obtenidas con electrodos de grafito-Teflón-XOD-HRP-Ferroceno con (A) 0.1776 y (B) 0.0888 g de XOD. Disolución de trabajo : reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ (pH 7.4). E_{ap} = 0.00 V.

IV.2.5.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Como se puede apreciar en la Figura 72, la corriente en estado estacionario para hipoxantina 4.0×10^{-5} mol l⁻¹ aumentó regularmente con el aumento de temperatura en todo el intervalo estudiado. Sin embargo, se ha establecido que los biosensores de xantina oxidasa proporcionan un menor tiempo de vida útil a medida que aumenta la temperatura (Karube et al., 1984), por lo que como compromiso entre sensibilidad y estabilidad se eligió una temperatura de trabajo de **(30 ± 1)°C**.

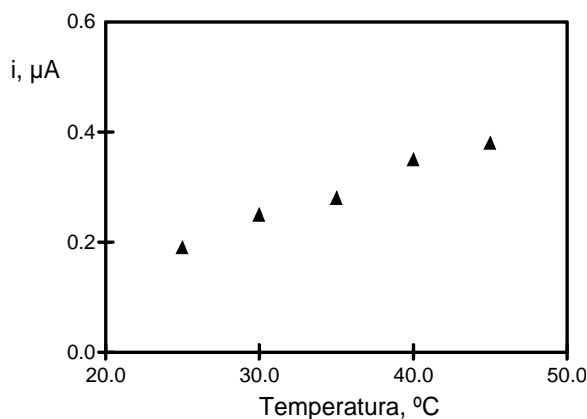


Figura 72. Influencia de la temperatura sobre la respuesta amperométrica de hipoxantina $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.2.5.4. EFECTO DEL pH

Se varió el pH de la disolución reguladora de fosfato en el intervalo comprendido entre 6.0 y 9.9. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la figura 73. Puede apreciarse como se obtiene una intensidad de corriente máxima entre pH 7.0 y 8.0, disminuyendo la señal analítica por encima y por debajo de estos valores. Se eligió, un **pH de 7.4** para estudios posteriores ya que éste fue también elegido para el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferroceno en medios acuosos (apartado III.5.3.2.).

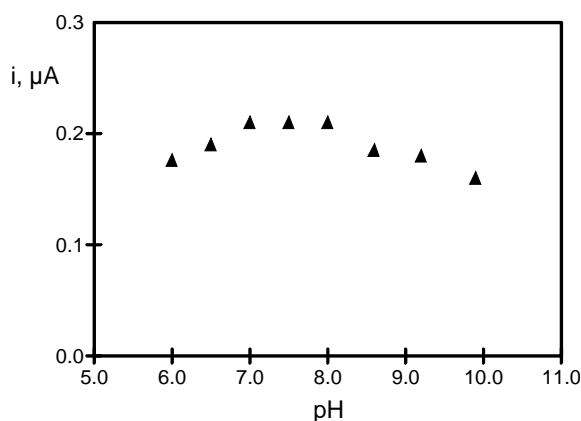


Figura 73. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente obtenida con el electrodo de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno para una concentración de hipoxantina $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} . $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$, $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$

A modo de ejemplo, en la figura 74 se muestra un registro corriente-tiempo obtenido con el electrodo de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno, en las condiciones experimentales

mencionadas, para adiciones sucesivas de 20 μl de una disolución patrón de hipoxantina $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ a 5.0 ml de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Como puede apreciarse, el biosensor muestra una respuesta rápida a los cambios en la concentración de sustrato, como consecuencia de la metodología de inmovilización de las enzimas utilizada.

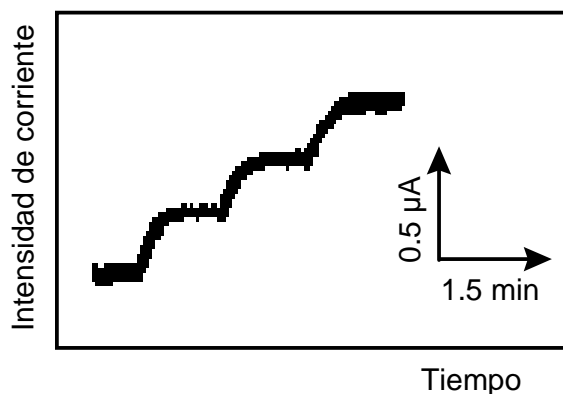


Figura 74. Registros intensidad-tiempo obtenidos con un electrodo de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno para adiciones sucesivas de 20 μl de hipoxantina $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ a una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$, $T=(30 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$

IV.2.5.5. ESTABILIDAD DEL ELECTRODO COMPÓSITO BIENZIMÁTICO

Al igual que se hizo para los electrodos compósitos de peroxidasa, se han evaluado los aspectos relacionados con la estabilidad del biosensor para el electrodo bienzimático: repetibilidad de las medidas sin pulir el electrodo, reproducibilidad de la señal amperométrica cuando se regenera la superficie del electrodo mediante pulido, tiempo de utilización de un biosensor individual, reproducibilidad de las medidas obtenidas con electrodos enzimáticos diferentes y efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre, con la que se fabrican distintos electrodos. Todos estos estudios se realizaron para una concentración de hipoxantina de $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ aplicando un potencial constante de 0.00 V. En la Tabla 30 se recogen los valores de intensidad de corriente en el estado estacionario obtenidos para cada uno de los experimentos realizados, así como los valores de la desviación estándar calculadas para cada uno de ellos.

Tabla 30. Estabilidad del electrodo compósito bienzimático de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno. Concentración de hipoxantina: $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4). $E_{ap}=0.00 \text{ V}$. $T^a=(30 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$

	i, μA		RSD, %
	Repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica	0.23	0.22
0.25		0.24	
0.22		0.23	
0.24		0.23	
0.24		0.24	
i media= 0.23 ± 0.01			
Reproducibilidad de las medidas	0.22	0.24	
	0.26	0.22	

regenerando la superficie electródica por pulido (Tres medidas independientes por pulido)	0.24	0.22	7.0	
	0.26	0.23		
	0.26	0.25		
	i media= 0.24 ± 0.01			
Tiempo de vida útil del electrodo	1 mes			
Reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos (*Nº pastilla.Nº electrodo)	Pastilla	Electrodo *	i, µA	RSD %
	1	1.1	0.25 ± 0.01	5.4
		1.2	0.23 ± 0.01	
		1.3	0.241 ± 0.009	
2	2.1	0.26 ± 0.01		
3	3.1	0.23 ± 0.01		
Efecto del periodo de almacenamiento	6 meses a 4 °C sin pérdida de actividad			

Los valores de la desviación estándar relativa obtenidos sin pulir (4.3%) y puliendo la superficie del electrodo (7.0%) indican una buena repetibilidad de las medidas y que ambas enzimas se encuentran distribuidas uniformemente en la matriz electródica.

En la figura 75 se muestra el gráfico de control correspondiente al electrodo bienzimático, en el que se establecen los límites superior e inferior como el valor medio de la intensidad de corriente correspondiente a la serie de medidas realizadas sin regeneración de la superficie electródica ($0.23 \mu\text{A}$) \pm tres veces la desviación estándar ($+3s=0.26 \mu\text{A}$, $-3s= 0.20 \mu\text{A}$). Como se puede observar, al igual que ocurría con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferroceno, se puede utilizar el mismo electrodo de grafito-teflón-XOD-HRP-ferroceno durante 4-5 días sin necesidad de regenerar la superficie electródica. Por otro lado, se observa como cuando la respuesta amperométrica para hipoxantina es menor que el límite inferior del gráfico de control, la señal inicial puede recuperarse por pulido. No obstante, transcurrido **1 mes** no fue posible recuperar la señal mediante este procedimiento. Este período de tiempo es inferior al observado con el biosensor de grafito-Teflón-HRP-ferroceno, lo que se debe lógicamente, a la menor estabilidad de la enzima XOD con respecto a la HRP. Si se compara este período de vida útil del electrodo bienzimático con los reportados para otros biosensores amperométricos, se puede afirmar que el electrodo desarrollado en este trabajo se encuentra entre los biosensores de hipoxantina más estables debido, probablemente, a la matriz electródica empleada.

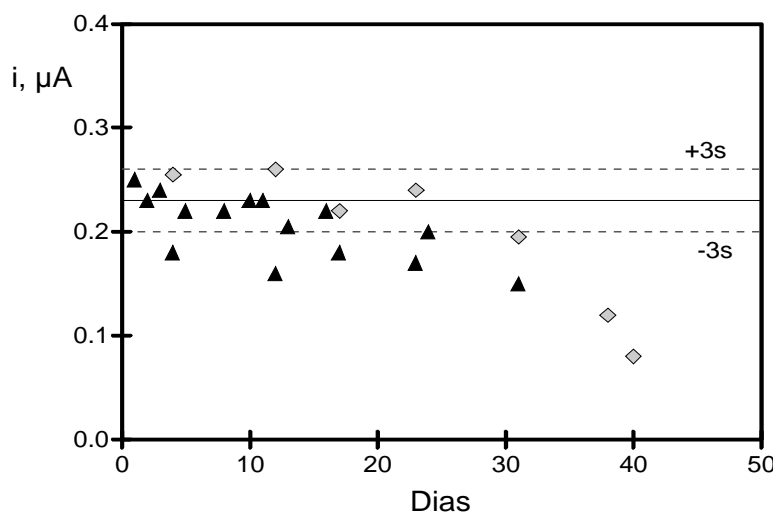


Figura 75. Gráfico de control para el electrodo compuesto de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno. Medidas realizadas para una concentración de hipoxantina de $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4). $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. $T^a = (30 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$

Como se ha dicho ya repetidamente, el hecho de que los biosensores tengan un tiempo limitado de vida útil, hace necesaria la evaluación de la reproducibilidad de las medidas obtenidas a partir de diferentes electrodos fabricados a partir de la misma o de diferentes pastillas madre. Como se deduce de los resultados que se muestran en la Tabla 30 para cinco electrodos diferentes, tres de ellos construidos a partir de la misma pastilla madre, y los otros dos de dos pastillas madre diferentes, el valor de RSD para todas las medidas realizadas con los 5 electrodos fue de 5.4 %, mientras que el correspondiente a los tres electrodos fabricados con la misma pastilla fue de 4.2%. Estos resultados indican que el procedimiento de fabricación de los electrodos compósitos bienzimáticos es perfectamente reproducible, tanto cuando se fabrican a partir de la misma pastilla como a partir de pastillas diferentes.

Finalmente, se evaluó el efecto del período de almacenamiento de la pastilla madre. Esta pastilla pudo ser almacenada a $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ durante más de seis meses sin pérdida aparente de actividad. Este tiempo de almacenamiento es similar al ensayado con las pastillas de grafito-Teflón-HRP-ferroceno, lo que confirma una vez más que el procedimiento de inmovilización empleado con este tipo de matrices es adecuado para la fabricación de biosensores amperométricos estables.

Todos estos resultados ilustran adecuadamente la robustez y estabilidad de los electrodos compósitos bienzimáticos de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno.

IV.2.5.6. CURVA DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Empleando las condiciones experimentales indicadas en los apartados anteriores, se construyó la curva de calibrado para hipoxantina que aparece en la figura 76, en el intervalo de concentraciones de 5.0×10^{-7} a $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

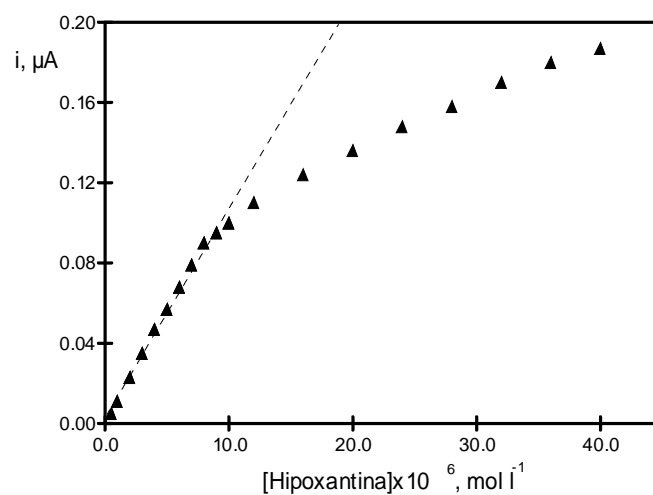


Figura 76. Curva de calibrado obtenida con el electrodo compuesto bienzimático de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4). $E_{ap}=0.00 \text{ V}$, $T^a=(30 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$

Como era de esperar, se obtuvo una curva típica de los sistemas enzimáticos, es decir,

a concentraciones bajas de hipoxantina se obtiene una relación lineal con la intensidad de corriente en estado estacionario, mientras que para concentraciones más elevadas se pierde dicha linealidad como consecuencia de la saturación de la enzima. Una vez más, como criterio para estimar el intervalo de linealidad de la curva de calibrado se consideró que el coeficiente de correlación, calculado a partir de la regresión por mínimos cuadrados, no fuera mayor de 0.998. Según ello, se obtuvo un intervalo lineal de 5.0×10^{-7} - 1.0×10^{-5} mol l⁻¹ ($r=0.9989$) con una pendiente y una ordenada en el origen de $(1.1 \pm 0.1) \times 10^4$ $\mu\text{A l mol}^{-1}$ y 0.00 ± 0.01 μA , respectivamente.

Los límites de determinación y detección se calcularon de acuerdo con el criterio de diez veces la desviación estándar y de $3s_b/\text{pte}$, respectivamente. Como estimador de s_b se tomó la desviación estándar ($n=10$) de las señales de hipoxantina a un nivel de concentración de 5.0×10^{-7} mol l⁻¹ (RSD=6.2%). Los valores obtenidos fueron 3.1×10^{-7} mol l⁻¹ para el límite de determinación y 9.0×10^{-8} mol l⁻¹ para el límite de detección.

Si se comparan estos valores con los existentes en la bibliografía, puede decirse que son similares e incluso menores, lo que constituye una ventaja añadida del biosensor desarrollado.

IV.2.5.7. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

El efecto de la presencia de sustancias interferentes potenciales sobre la respuesta amperométrica de la hipoxantina se evaluó en las condiciones experimentales especificadas anteriormente utilizadas para la determinación de dicho analito. Las sustancias estudiadas que pueden estar presentes en las muestras en las que se desea determinar hipoxantina, fueron : aminoácidos (como alanina y metionina), azúcares (como galactosa, glucosa y ribosa), ácido ascórbico y ácido oxálico (Househam et al. 1987).

Ninguna de estas sustancias influyó en la señal amperométrica de hipoxantina (4.0×10^{-6} mol l⁻¹) incluso para una relación de concentración de analito a interferente de 1 :100, con excepción del ácido ascórbico, cuya oxidación sobre electrodos de grafito-Teflón comienza a producirse a potenciales muy próximos a 0.00 V. Así, el ácido ascórbico produce errores relativos en la medida de la intensidad de corriente en estado estacionario de la hipoxantina de -70% y -120%, para relaciones de hipoxantina :ácido ascórbico de 1 :5 y 1 :10 respectivamente. Sin embargo, no se observó un error relativo apreciable cuando la relación de concentraciones fue 1:1.

Con objeto de minimizar la interferencia del ácido ascórbico, y teniendo en cuenta la variación de la señal de la hipoxantina con el potencial que se mostraba en la Figura 70, se estudió cómo variaba la influencia de este interferente sobre la señal analítica de la hipoxantina al cambiar el potencial constante aplicado (Figura 77). Como cabía esperar, la interferencia producida por el ácido ascórbico disminuyó a medida que el potencial era más negativo, y para

un potencial aplicado de -0.05 V, el error relativo para una relación analito :ácido ascórbico de 1 :5 era ahora del -40% . Estos resultados indican que, dependiendo de las sustancias interferentes que puedan estar presentes en una muestra dada, se puede evitar o cuando menos minimizar sus efectos interferentes con una elección adecuada del potencial a aplicar al electrodo bienzimático de hipoxantina. Obviamente, aunque no se ha estudiado en este trabajo, si cualquier especie interferente fuera reducida electroquímicamente a 0.00 V, sería posible aplicar potenciales más positivos al electrodo bienzimático con objeto de minimizar dicha interferencia.

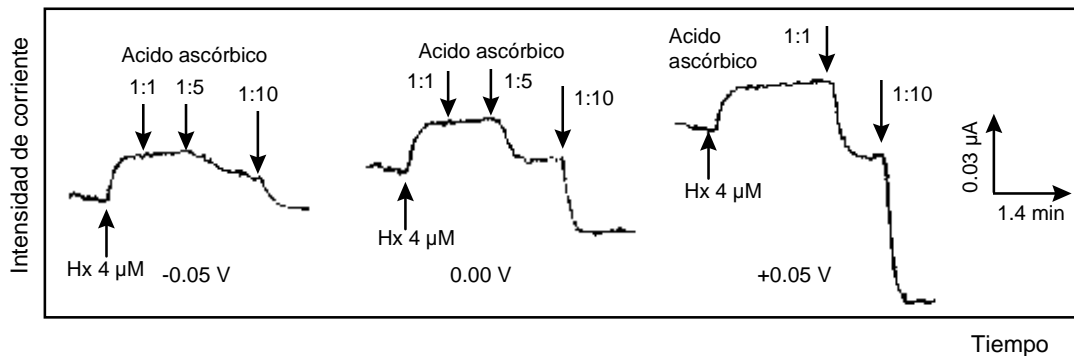


Figura 77. Registros intensidad-tiempo obtenidos con un electrodo compuesto de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno a diferentes potenciales aplicados, para una adición de $20 \mu\text{l}$ de una disolución patrón de hipoxantina $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, seguido de adiciones sucesivas de $20 \mu\text{l}$ de una disolución patrón de ácido ascórbico $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$.

Todos estos resultados demuestran la buena selectividad del electrodo compuesto desarrollado para la determinación de hipoxantina.

IV.2.5.8. DETERMINACIÓN DE HIPOXANTINA EN TEJIDO MUSCULAR DE SARDINAS

La aplicabilidad del electrodo compuesto bienzimático de XOD y HRP al análisis de muestras reales de pescado, se evaluó determinando el contenido de hipoxantina en tejido muscular de sardinas siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado IV.2.4.3.4. Además, el método se validó comparando los resultados con los obtenidos aplicando el método espectrofotométrico recomendado para la determinación de hipoxantina en pescado por el Comité de Métodos Analíticos (Analytical Methods Committee, 1979).

Se encontraron diferencias significativas entre la pendiente del calibrado construido utilizando el método de adiciones estándar $[(0.5 \pm 0.1) \times 10^4 \mu\text{A l mol}^{-1}]$ y la pendiente del calibrado externo obtenido con disoluciones patrón de hipoxantina $[(1.1 \pm 0.1) \times 10^4 \mu\text{A l mol}^{-1}]$, por lo que se dedujo la existencia de efecto matriz ($t_{\text{cal}}=4.240 > t_{\text{tab}}=2.069$). Por consiguiente, se utilizó el método de adiciones estándar para minimizar dicho efecto matriz.

En la figura 78 se muestran los registros i - t correspondientes a una de las muestras de sardina analizadas con el biosensor compuesto bienzimático de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno. Para aplicar el método de adiciones estándar se añadieron sobre la muestra alícuotas sucesivas de $3 \mu\text{l}$ de una disolución patrón de hipoxantina $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, como se

indicaba en el apartado IV.2.4.3.4. de la Parte Experimental.

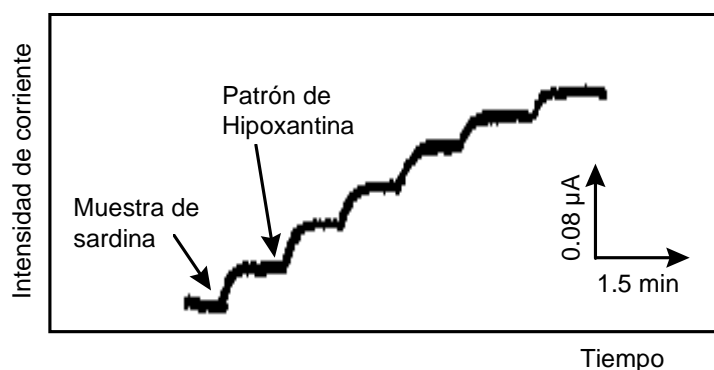


Figura 78. Registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo bienzimático de xantina oxidasa en la determinación de hipoxantina en sardina por el método de adiciones estándar en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$, $T^a=(30\pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.

Las muestras de sardina se almacenaron a 4°C durante diferentes periodos de tiempo, determinándose entonces el contenido de hipoxantina. Los resultados obtenidos para cinco replicados de cada muestra se resumen en la Tabla 31, habiéndose calculado el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05. De acuerdo con la bibliografía encontrada sobre la determinación de hipoxantina, el nivel de concentración en las muestras se expresa en $\mu\text{mol g}^{-1}$ de muestra. Como puede observarse en la Tabla 31, la cantidad de hipoxantina encontrada aumentó con el tiempo de almacenamiento de la muestra, si bien a partir de aproximadamente el décimo día, este aumento era considerablemente menor. Este comportamiento es coincidente con el observado por Karube et al. (Karube et al., 1984).

Tabla 31. Determinación de hipoxantina en tejido muscular de sardinas después de almacenarlo a 4°C durante diferentes períodos de tiempo con el electrodo compuesto bienzimático de XOD-HRP. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$, $T^a=(30\pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.

Tiempo de almacenamiento, días	Hipoxantina, $\mu\text{mol g}^{-1}$
0	1.6 ± 0.3
6	2.8 ± 0.3
8	3.1 ± 0.2
13	4.1 ± 0.2
23	5.4 ± 0.5

Para evaluar la exactitud del método propuesto, se compararon estos resultados con los obtenidos utilizando el método de referencia y aplicando el test de la t de Student. Esta comparación se realizó también con una segunda muestra de sardina diferente (muestra 2). Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 32.

Tabla 32. Comparación de los resultados obtenidos para la determinación de hipoxantina en tejido muscular de sardinas utilizando el electrodo bienzimático de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno y un

método espectrofotométrico de referencia. $E_{ap}=0.00$ V, $T^a=(30\pm 1)$ °C.

Muestra	Hipoxantina, $\mu\text{mol g}^{-1}$			
	Tiempo de almacenam., días	Método de referencia	Método propuesto	t_{exp}
1	8	3.2 ± 0.2	3.1 ± 0.2	0.86
	23	5.1 ± 0.4	5.4 ± 0.5	1.34
2	21	6.0 ± 0.3	6.3 ± 0.3	1.73

Los valores de la t_{exp} obtenidos son, en todos los casos, menores que los tabulados para el mismo nivel de significación, lo que indica que no hay diferencias significativas entre los dos métodos y, por consiguiente, la ausencia de errores determinados a un nivel de probabilidad del 95 %. Esto pone de manifiesto que el método de análisis basado en el empleo del electrodo compuesto bienzimático de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno proporciona resultados comparables a los del método de referencia utilizado, siendo mucho más sencillo que otros métodos recogidos en la bibliografía, como pueden ser los cromatográficos. Si se compara el biosensor desarrollado en este trabajo con otros electrodos enzimáticos de XOD, es de destacar el excelente límite de detección obtenido, lo que permite su aplicación en el análisis de cualquier muestra de pescado.

IV.2.6. CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que el electrodo compuesto bienzimático de grafito-Teflón-XOD-HRP-ferroceno constituye un biosensor amperométrico robusto para la determinación de hipoxantina en muestras de pescado. Este bioelectrodo compuesto es muy fácil de construir mediante simple inclusión física de las enzimas y del mediador en el seno del electrodo, sin necesidad de enlaces covalentes, siendo este procedimiento además muy reproducible. Con estos biosensores es posible la regeneración de su superficie por pulido y presentan un período de vida útil grande y muy buena estabilidad. Además, tanto la sensibilidad como la selectividad del método desarrollado para hipoxantina son similares, o incluso mejores, que las obtenidas con otras metodologías disponibles más complicadas, habiéndose demostrado su exactitud comparando los resultados obtenidos para una muestra real con los proporcionados por un método de referencia recomendado.

IV.2.7. BIBLIOGRAFÍA BIOSENSOR DE HIPOXANTINA

Amine, A., Kauffmann, J.M., Palleschi, G. (1993). "Investigation of the bath injection analysis technique with amperometric biocatalytic electrodes using a modified small-volumen cell". *Analytica Chimica Acta*, 273, 213-218.

Analytical Methods Committee. Recommended General Methods for the Examination of Fish and Fish Products. (1979). *Analyst*, 104 (5), 434.

Arai, G., Takahashi, S., Yasumori, I. (1996). "Xantine and hipoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized in poly(mercapto-p-benzoquinone) film". *Journal of Electroanalytical Chemistry* ; 410, 173-179.

Carsol, M.A., Mascini, M. (1998). "Development of a system with enzyme reactors for the determination of fish freshness". *Talanta* ; 47 (2) 335-342.

Carsol, M.A., Volpe, G., Mascini, M. (1997). "Amperometric detection of uric acid and hypoxanthine with xanthine oxidase immobilized and carbon based screen-printed electrode. Application for fish freshness determination". *Talanta*, 44 (11) : 2151-2159.

Cheng, Q., Peng, T.Z., Yang, L.J. (1998). "Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness". *Analytica Chimica Acta*. 369 (3) : 245-251.

Gómez-Guillén, M.C., Beltrán, A., Moral, A. (1992). "El valor k como índice de calidad del pescado. II. Métodos de determinación". *Alimentaria*. 29-34.

González, E., Pariente, F., Lorenzo, E., Hernandez, L. (1991). "Amperometric sensor for hypoxanthine and xanthine based on the detection of uric acid". *Analytica Chimica Acta*, 242, 267-273.

- Hasebe, Y., Gokan, A., Uchiyama S. (1995). "Chemically amplified xanthine and hypoxanthine sensors based on substrate recycling between the enzyme-substrate complex and substrate". *Analytica Chimica Acta* ; 302, 21-27.
- Househam, B.C., Van den Berg, C.M.C., Riley, J.P. (1987) *Anal. Chim. Acta*, 200, 291.
- Hu, S., Liu, C.C. (1997a). "Development of a Hypoxanthine biosensor based on immobilized xanthine oxidase chemically modified electrodes". *Electroanalysis*, 9, No.5. 372-377.
- Hu, S., Liu, C.C. (1997b). "A bienzyme sensor for the determination of hypoxanthine and inosine". *Electroanalysis*. 9 (15) : 1174-1179.
- Hu, S.S., Xu, C.L., Luo, J.H., Cui, D.F. (2000). "Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode". *Analytica Chimica Acta*, 412 (1-2) : 55-61.
- Jönsson, G., Gorton L. (1989). *Electroanalysis*, 1, 465.
- Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E., Toyama, K. (1984). "Determination of fish freshness with an enzyme sensor system". *J. Agric. Food Chem.* 32, 314-319.
- Kawabata, T., Terui, H. (1953). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 19, 741.
- Kilinc, E., Erdem, A., Gokgunec, L., Dalbasti, T., Karaoglan, M., Ozsoz, m. (1998). "Buttermilk based cobalt phthalocyanine dispersed ferricyanide mediated amperometric biosensor for the determination of xanthine". *Electroanalysis*, 10(4) : 273-275.
- Korell, U., Spichiger, U.E. (1994). "Kinetic studies on membraneless amperometric biosensors prepared from xanthine oxidase, organic conducting salt, and silicone oil". *Electroanalysis* 6, 305-315.
- Lee, E :H :, Oshima, T. Koizumi, (1982) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 48 (2), 255.
- Luong, J.H.T., Thatipamala, R. (1996) "Kinetics and performance of a mediated biosensor for hypoxanthine using deflavo xanthine oxidase". *Analytica Chimica Acta*, 319, 325-333.
- Mao, L.Q., Xu, F., Xu, Q., Jin, L.T. (2001). "Miniatured amperometric biosensor based on xanthine oxidase for monitoring hypoxanthine in cell culture media". *Analytical Biochemistry*, 292 (1) 94-101.
- Mao, L.Q., Yamamoto, K. (2000). "Amperometric on-line sensor for continuous measurement of hypoxanthine based on osmium-polyvinylpyridine gel polymer and xanthine oxidase bienzyme modified glassy carbon electrode". *Analytica Chimica Acta*, 415 (1-2) 143-150.
- Mascini, M. (1994). *Life Chem. Rep.*, 11, 289.
- Moody, G.J., Sanghera G.S., Thomas, J.D.R. (1987). "Chemically Immobilised Bi-enzyme electrodes in the redox mediated mode for the flow injection analysis of glucose and hypoxanthine". *Analyst*, vol.112, 65-70.
- Mori, T., Hata, M. (1949). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 15, 407.
- Mulchandani, A., Luong, J.H.T., Male, K.B. (1989). "Development and application of a biosensor for hypoxanthine in fish extract". *Analytica Chimica Acta*, 221, 215-222.

- Nagamatsu, M. (1960) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 26, 771.
- Nguyen, A.L., Luong, J.H.T., Yacynych, A.M. (1991). "Retention of enzyme by electropolymerized film : a new approach in developing a hypoxanthine biosensor". *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 37, 729-735.
- Niu, J.J., Lee, J.Y. (2000). "Bulk modified amperometric biosensors for hypoxanthine based on sol-gel technique". *Sensors and actuators B Chemical*. 62 (3) : 190-198.
- Okuma, H., Takahashi, H., Sekimukai, S., Kawahara, K., Akahoshi, R. (1991). "Mediated Amperometric biosensor for hypoxanthine based on a hydroxymethylferrocene-modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*, 244, 161-164.
- Okuma, H., Takahashi, H., Yazawa, S., Sekimukai, S., Watanabe, E. (1992). "Development of a system with double enzyme reactors for the determination of fish freshness". *Analytica Chimica Acta*, 260, 93-98.
- Okuwa, H., Watanabe, E. (2002). "Flow system for fish freshness determination based on double multienzyme reactor electrodes". *Biosensors and Bioelectronics*. 17(5) : 367-372.
- Ono, T. Nagayama, F., Yoshigane, T., Muto, Y. (1962) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 28, 936.
- Ota, F., Nakamura, T. (1952). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 18, 15.
- Pei, J.H., Li, X.Y. (2000). "Xanthine ad hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl₆ chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection". *Analytica Chimica Acta*; 414 (1-2) : 205-213.
- Randerath, K. (1996) Academic Press, Inc. New York, 285.
- Saito, T. Arai, A., Matsuyoshi, M. (1959) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 24, 749.
- Suzuki, T. (1953) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 19, 102.
- Tuzhi, P., Liju, Y., Huiping, L.I. (1995). "A sensitive enzyme biosensor with silk membrane for estimating the fish freshness". Proceedings of International sixth Beijing Conference ad exhibition on instrumental analysis. *F. Electroanalytical Chemistry*. Oct. 24-27, (Beijing, China).
- Uda, F. Hayashi, E., Uchiyama, H., Kakuda, K. (1983), *Bull. Tokai reg. Fish Res. Lab.*, 111 (8), 55.
- Volpe, G. Mascini, M. (1996). "Enzyme sensors for determination of fish freshnes". *Talanta* ; 43, 283-289.
- Yao, T., Satomura, M., Wasa, T. (1992). "Amperometric flow-injection method for determination of biogenic diamines and hypoxanthine by combined use of immobilized enzyme reactors and a peroxidase electrode". *Analytica Chimica Acta*, 261, 161-165.
- Watanabe, E., Endo, H., Toyama, K. (1988). "Determination of inosine-5'-monophosphate in the presence of inosine and hypoxanthine with an enzyme sensor". *Appl. Microbiol. Biotechnol* 29 : 341-345.
- Yamada, K. (1968). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 34, 541.

Yamamoto, M., Sonehera, M. (1953). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 19, 761.

Zen, J.M., Lai, Y.Y., Ilangovan, G., Kumar, A.S. (2000). "Electrocatalytic oxidation of hypoxanthine on a Nafion/lead-ruthenium oxide pyrochlore modified". *Electroanalysis*, 12 (4) : 280-286.

Zhao, S., Luong, J.H.T. (1994). "Characterization of a mediated Amperometric Biosensor for hypoxanthine using DeFlavo Xantine Oxidase". *Electroanalysis*, 6, 830-837.

IV.3. BIOSENSOR DE COLESTEROL

IV.3.1. OBJETIVO

Desarrollo de un biosensor compuesto bienzimático amperométrico en el que las enzimas colesterol oxidasa (COD) y peroxidasa (HRP) se incorporan, junto con el mediador ferrocianuro potásico, en una matriz de grafito-Teflón para determinar colesterol en muestras de alimentos empleando como medio de medida emulsiones agua-aceite o micelas inversas.

IV.3.2. INTRODUCCIÓN

El colesterol, cuya estructura se muestra en la figura 79 está presente en todas las células animales y es particularmente abundante en el tejido nervioso y en el hígado. Cantidades variables de este esteroide se encuentran en las grasas animales, pero no en las vegetales (Kaplan y Pesce).

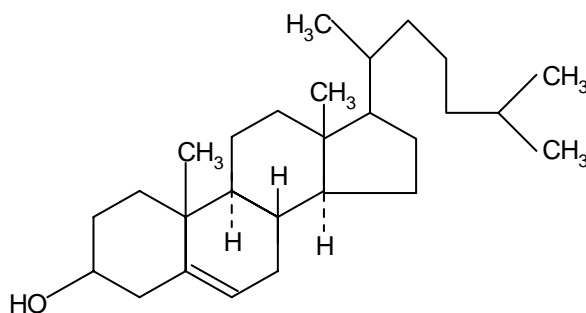


Figura 79. Estructura de la molécula de colesterol

Es un alcohol esteroide que contiene un grupo hidroxilo en el C-3 del primer anillo y una cadena alifática ramificada de 8 o más átomos de carbono en el C-17. Los esteroides se encuentran como alcoholes libres o como ésteres de ácidos grasos de cadena larga del grupo hidroxilo del C-3. El colesterol es insoluble en agua, pero fácilmente extraíble de tejidos con cloroformo, éter o alcohol en caliente (Kaplan y Pesce). La presencia del grupo alcohol químicamente reactivo constituye la base de numerosos ensayos para la cuantificación del colesterol. El grupo alcohol puede reaccionar con ácidos minerales fuertes (como el ácido sulfúrico) y con sales, para formar un cromógeno. La reacción de Burchard-Liebermann es el ejemplo más frecuentemente utilizado de este tipo de reacción química. Este grupo hidroxilo puede ser también específicamente oxidado por la enzima colesterol oxidasa. Esta reacción constituye la base de los ensayos enzimáticos cada vez más utilizados para la determinación del colesterol y en la que se basa el biosensor desarrollado en este trabajo.

El colesterol es precursor de muchos otros esteroides existentes en los tejidos animales, como los ácidos biliares, compuestos que actúan como detergentes colaborando en la emulsificación y absorción de los lípidos en el organismo, los andrógenos u hormonas sexuales masculinas, los estrógenos u hormonas sexuales femeninas, las hormonas progestacionales y las hormonas adrenocorticales. Además de ser un compuesto importante en el organismo humano, la acumulación de colesterol en sangre debido a su excesiva ingestión produce enfermedades fatales como arterosclerosis, trombosis cerebral y enfermedades coronarias. La aparición de colesterol en la sangre ocurre por dos vías: síntesis celular endógena y por los alimentos ingeridos en la dieta (Brasco et al., 1990), por lo que la determinación de colesterol en alimentos es importante para controlar la cantidad de este compuesto que se puede ingerir por dicha vía.

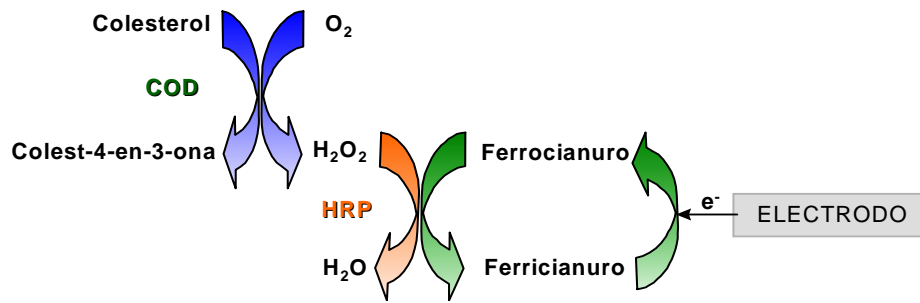
La determinación de colesterol total incluye las formas libres y esterificadas del esteroide. En el suero o plasma, por ejemplo, dos tercios del colesterol total se encuentran en la forma esterificada y el resto en la forma libre. Esto tiene ciertas implicaciones analíticas, ya que en algunas reacciones el desarrollo de color es más intenso con los ésteres de colesterol que con las formas libres. Esto a su vez puede conducir a una gran desviación positiva. Por tal razón, el conocimiento de la química de los diversos métodos de análisis del colesterol y el reconocimiento de sus limitaciones son de fundamental importancia en la selección del método a emplear en el laboratorio. Con mucha frecuencia las consideraciones giran en torno a factores como simplicidad, velocidad, conveniencia y, por otro lado, exactitud y precisión. Para realizar el análisis de colesterol total en alimentos se han propuesto métodos analíticos gravimétricos (Krug et al., 1994 ; Vaghela y Kilara, 1995) y espectrofotométricos (Lee et al., 1994 ; Braco et al., 1992), cromatográficos (Massom y Townshend, 1985; Maraschiello et al., 1996 ; Bordier et al., 1996), así como biosensores fundamentalmente transductores ópticos y amperométricos (Tabla XIV).

Por otra parte, ya se ha indicado en la Introducción General (apartado III.4.), que el empleo de micelas inversas como medio de trabajo para los biosensores amperométricos permite la determinación enzimática de sustancias escasamente solubles en agua, como es el caso del colesterol, pudiéndose controlar fácilmente el contenido de agua necesario para la hidratación de la enzima. A. Gupte y colaboradores han demostrado (Gupte et al., 1995) que la oxidación enzimática de colesterol a colestenoa ocurre en un 100% y que la colestenoa oxidasa retiene actividad de forma apreciable en micelas inversas, siendo incluso más estable en este medio que en agua. Se ha demostrado también que el empleo de micelas inversas acelera la extracción supercrítica de colesterol en muestras de alimentos (Jiménez-Carmona y Luque de Castro, 1998). Parece entonces evidente que una estrategia adecuada para el desarrollo de un biosensor de colesterol para alimentos, es el empleo de micelas inversas o emulsiones aceite/agua como medio predominantemente no acuoso.

Considerando específicamente los biosensores basados en la enzima colestenoa oxidasa (COD), ésta cataliza la oxidación de colesterol por el oxígeno molecular a 4-colesteno-3-ona y H_2O_2 . Por lo tanto, la reacción enzimática puede monitorizarse electroquímicamente bien por la disminución del contenido de oxígeno en la disolución o bien por la reducción amperométrica del peróxido de hidrógeno formado. Como ya se ha visto en esta Memoria, un diseño adecuado para esta última posibilidad es la coinmovilización de COD con peroxidasa y un mediador adecuado, lo que permitirá la utilización de bajos valores de potencial para la detección del peróxido de hidrógeno, minimizando así muchas interferencias potenciales por parte de sustancias electroactivas presentes usualmente en las muestras que contienen colesterol.

Como ya se ha dicho repetidamente, las matrices compósitas rígidas de grafito y Teflón son especialmente apropiadas para coinmovilizar en la matriz electródica varias enzimas, así como el mediador, para la construcción de electrodos multienzimáticos. Además, una de las ventajas más importantes de este tipo de matrices electródicas compósitas es su compatibilidad con medios orgánicos o predominantemente orgánicos, como se ha puesto de manifiesto en esta Memoria con el biosensor de grafito-Teflón-peroxidasa-ferrocianuro.

Todas estas características ventajosas se han aprovechado para desarrollar un electrodo compósito de grafito-Teflón bienzimático (colesterol oxidasa y peroxidasa) para la determinación de colesterol total y libre en alimentos empleando como medio de trabajo un sistema de micelas inversas formado con acetato de etilo como disolvente orgánico en el que el colesterol es soluble, e inmovilizando asimismo en la matriz electródica ferrocianuro como mediador, que es insoluble en medios orgánicos. En el siguiente esquema se muestra la serie de reacciones implicadas:



Esquema 12

Como alimentos a los que aplicar el biosensor se eligieron mantequilla, manteca de cerdo y yema de huevo, por tratarse de matrices con unas características suficientemente distintas como para tener que plantear diferentes tratamientos, y por contener cantidades muy diferentes de colesterol, como se muestra a continuación (Répertoire général des aliments. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1991) :

Muestra	Colesterol, contenido medio (mg/100 g alimento)
Yema de huevo	1400
Mantequilla	250
Manteca de cerdo	95

IV.3.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Aunque existen artículos en los que se utiliza la enzima colesterol deshidrogenasa para la determinación de colesterol (Yamamoto et al., 1996), la gran mayoría de los biosensores amperométricos desarrollados para este fin se basan en el empleo de colesterol oxidasa (COD), la cual como ya se ha dicho cataliza la oxidación de colesterol en presencia de O_2 a 4-colesten-3-ona y peróxido de hidrógeno. En la Tabla XIV se recogen los antecedentes bibliográficos ordenados por antigüedad, habiéndose incluido trabajos bastante antiguos con objeto de poder apreciar la evolución de este tipo de biosensores. Mencionar, así mismo, que la hidrólisis de los ésteres para llevar a cabo la determinación del colesterol total se puede realizar con una etapa previa de saponificación química similar a la de los métodos tradicionales, o empleando la enzima colesterol esterasa, que hidroliza los ésteres dando lugar al colesterol libre y ácidos grasos (Kaplan y Pesce).

Son muchos los trabajos en los que se intenta mejorar la sensibilidad y rebajar el potencial aplicado para la monitorización del H_2O_2 . Para ello se han empleado diferentes mediadores, como la tionina (Nakaminami, et al., 1999) o polímeros de Os como el $[Os(bpy)_3Cl_2](PF_6)_2$ (6COL). También se han utilizado sistemas en los que además de derivados del pirrol, se emplean aditivos tales como arcillas tipo laponita para mejorar la sensibilidad (Besombes et al., 1995). Sin embargo, el empleo de sistemas que involucran la coinmovilización de colesterol oxidasa con peroxidasa y un mediador (ferrocianuro o ferroceno normalmente) (Ball et al., 1986 ; Charpentier y Murr, 1995) permite rebajar el potencial aplicado, además de aumentar la sensibilidad de la determinación. Mediante la reducción de

H₂O₂ por la reacción enzimática secundaria se evita, además la acumulación gradual de peróxido de hidrógeno en la capa de hidratación de la enzima, lo que provocaría la inactivación de la enzima colesterol oxidasa (Piñeiro-Avila et al., 1998, Valencia González y Díaz García, 1994).

La escasa solubilidad del colesterol en medio acuoso, hace necesaria su extracción de los alimentos en los que se quiere determinar con disolventes orgánicos, o el empleo de medios en los que el colesterol sea soluble y en los que, además, sea posible realizar las medidas necesarias. Un medio muy utilizado son las microemulsiones formadas con Tritón X-100 como agente emulsificante el cual, como se puede observar en la tabla, es el más empleado en cuanto a detección amperométrica se refiere. Sin embargo, este medio no es útil para aplicar este tipo de sensores a muestras de alimentos, donde se requiere una extracción del colesterol, de ahí que solo se haya encontrado un sensor amperométrico, que trabaja en un medio cloroformo/hexano (Hall y Turner, 1991), que haya sido aplicado realmente a alimentos, mientras que la inmensa mayoría de los biosensores reportados se han aplicado a suero, que requiere un medio predominantemente acuoso. Cuando se trabaja con detección colorimétrica, por el contrario, se emplean mucho más disolventes orgánicos (Braco et al., 1992 ; Piñeiro-Avila et al., 1998, Valencia González y Díaz García, 1994) y de ahí que las aplicaciones reales sean más numerosas.

IV.3.4. PARTE EXPERIMENTAL

IV.3.4.1. INSTRUMENTACIÓN

IV.3.4.1.1. APARATOS

Las medidas amperométricas se realizaron con un potenciostato BAS CV-27 (Bioanalytical Systems, Inc) conectado a un registrador x-t Linseis L250 E.

Otros aparatos utilizados fueron un agitador magnético Ikamag Ret, un pH-metro de precisión Metrohm E-510 calibrado de forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.00 y 7.02 a 25.0 ± 0.5 °C, un baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, una prensa de infrarrojos Carver, una estufa P-Selecta, un rotavapor Laborota 4000 (Heidolph), un termostato de circulación de agua P-Selecta y una centrifugadora P Selecta Meditronic .

Para las medidas espectrofotométricas realizadas utilizando el método de referencia se empleó un espectrofotómetro UV-Visible de matriz de diodos HP 8453 y HP 8452 A.

IV.3.4.1.2.- ELECTRODOS Y CÉLULA ELECTROQUÍMICA

- Electrodo compósito enzimático de grafito-Teflón-colesterol oxidasa-peroxidasa-ferrocianuro preparado como se detalla en el apartado IV.3.4.3.2.
- Electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl (3 M) BAS RE-1
- Electrodo auxiliar de punta de platino.
- Célula electroquímica BAS modelo VC-2.

IV.3.4.2. REACTIVOS

Para la preparación del electrodo compósito enzimático se utilizó :

- Grafito Ultra "F" purity (Carbone of America) como fase conductora.

- Teflón (politetrafluoroetileno), como fase aislante.
- Peroxidasa (HRP) EC 1.11.1.7 (Type II-from Horseradish) de actividad 200 unidades por miligramo de sólido (Sigma).
- Colesterol oxidasa (COD) EC 1.1.3.6 (especie *Streptomyces*) de actividad 29 unidades por miligramo de sólido (Sigma).
- Ferrocianuro potásico (Sigma) .

Como sustrato se empleó colesterol (5-colesten-3 β -ol) (Sigma), y para preparar el medio de trabajo de micelas inversas se utilizó: fosfato disódico anhidro (Panreac) y fosfato monosódico dihidratado (Merck), acetato de etilo (Panreac) y dioctilsulfosuccinato de sodio, AOT (Sigma). Además, se ha utilizado hidróxido sódico, hidróxido potásico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido tricloroacético (Panreac).

En el estudio de interferencias se emplearon : ácido ascórbico (Merck), ácido benzoico (Probus), ácido cítrico (Merck), ácido tartárico (Merck), tert-butilhidroxianisol (BHA) (Sigma), tert-butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma) y ácido L-láctico (Sigma) .

El método de referencia utilizado fue un kit enzimático de Boehringer Mannheim para determinación de colesterol en alimentos.

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

Las muestras analizadas fueron mantequilla (“Arias”), manteca de cerdo (“El Pozo”) y huevos.

IV.3.4.3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

IV.3.4.3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4 : Se prepara disolviendo las cantidades apropiadas de las sales disódica y monosódica, ajustando posteriormente el pH con NaOH 2 mol l⁻¹.
- Emulsiones agua/aceite o micelas inversas de AOT: Estas emulsiones se componen de AOT 0.1 mol l⁻¹ con un 4% de disolución reguladora de fosfato de pH 7.4, en acetato de etilo. Para prepararla se disuelve la cantidad apropiada de tensoactivo en acetato de etilo, añadiéndose seguidamente el volumen correspondiente de la disolución de regulador fosfato. Finalmente se enrasa con acetato de etilo a 250 ml.
- Disolución patrón de colesterol :Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de colesterol, pesada exactamente, en acetato de etilo para obtener una concentración final 0.05 mol l⁻¹.

Las disoluciones más diluidas se prepararon por dilución apropiada de la anterior con el medio de micelas inversas.

- Disolución de hidróxido potásico 1.0 mol l⁻¹ en metanol : Se prepara inicialmente una disolución acuosa de hidróxido potásico 10 mol l⁻¹, para la que se pesa la cantidad necesaria, y se disuelve en el volumen de agua adecuado. A continuación, se mezcla un volumen de esta disolución con 9 volúmenes de metanol para obtener la disolución de hidróxido potásico 1 mol l⁻¹ en metanol. Esta última disolución se prepara diariamente.
- Disolución de ácido clorhídrico 8 mol l⁻¹ : Se disuelve el volumen adecuado de ácido clorhídrico concentrado en un volumen aproximado de agua, y una vez que la disolución se ha enfriado, se completa hasta el volumen deseado con agua destilada.
- Disolución de ácido tricloroacético al 20 % (p/v) : Esta disolución se prepara disolviendo la cantidad adecuada de ácido tricloroacético en agua hasta obtener una concentración de un 20 % (p/v).

IV.3.4.3.2. PREPARACIÓN DEL ELECTRODO COMPÓSITO BIENZIMÁTICO DE COLESTEROL

Las pastillas de grafito-teflón-colesterol oxidasa-peroxidasa-ferrocianuro que se prepararon fueron de 0.3 g, con una proporción de grafito :teflón de 30 :70 en peso. Para su preparación, en primer lugar se mezclaron 0.084 g de grafito, 0.0045 g de peroxidasa, 0.0015 g de colesterol oxidasa y 0.0048 g de ferrocianuro potásico, todas estas cantidades pesadas exactamente, mediante agitación mecánica durante 3 horas en una suspensión de 0.4 ml de la disolución reguladora de fosfato de pH 7.4 a 4 °C. Posteriormente, se evaporó el agua pasando una corriente de Ar y se añadieron 0.21 g de Teflón en polvo, mezclándose manualmente de forma concienzuda. Se procedió seguidamente a la compresión mecánica de la mezcla a 5000 Kg/cm² durante 10 minutos, obteniéndose una pastilla de 8.0 mm de diámetro y 3.5 mm de espesor. Se prepararon a continuación pastillas más pequeñas de 3 mm de diámetro, procediéndose de manera análoga a la especificada en el apartado III.5.2. para obtener finalmente el electrodo.

IV.3.4.3.3. OBTENCIÓN DE LOS AMPEROGRAMAS

Tras mantener el biosensor almacenado a 4 °C es necesario, antes de realizar las medidas, que alcance la temperatura ambiente. Para ello se deja el electrodo fuera del refrigerador el tiempo necesario.

Los amperogramas en disoluciones agitadas de forma constante se obtuvieron sumergiendo el biosensor en la célula de medida que contiene 5.0 ml de micelas inversas. Se aplicó el potencial deseado (+0.10 V) permitiéndose la estabilización de la corriente de fondo. A continuación, se efectuó la adición con una micropipeta del volumen apropiado de la disolución patrón de colesterol, registrándose la corriente hasta alcanzar el estado estacionario.

IV.3.4.3.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN MANTEQUILLA, MANTECA DE CERDO Y YEMA DE HUEVO.

a) Determinación de colesterol en mantequilla

Colesterol libre

Se pesaron exactamente 1.75 g de mantequilla y se disolvieron en 2.5 ml de acetato de etilo, mediante agitación mecánica durante 5 minutos. Se dejó decantar el residuo insoluble, llevándose a cabo la determinación de colesterol libre mediante amperometría a +0.10 V, transfiriendo una alícuota de 100 μl del extracto a la célula electroquímica que contiene la micela inversa como medio de trabajo. Se aplicó el método de adiciones estándar, el cual implicó la adición de alícuotas sucesivas de 50 μl de una disolución patón de colesterol en las micelas inversas $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$.

Colesterol total

La muestra se analizó pesando exactamente 7.5 g de mantequilla, añadiendo 20 mL de una disolución de hidróxido potásico 1 mol l^{-1} en metanol y 10 ml de acetato de etilo. La mezcla se llevó a ebullición a reflujo durante 30 min y, después de alcanzar la temperatura ambiente, se centrifugó 5 min a 4.000 r.p.m. El extracto se transfirió a un matraz de 50 ml enrasándose con acetato de etilo. Se transfirió entonces una alícuota de 200 μl a la célula electroquímica y se procedió de forma análoga a la especificada para el colesterol libre.

b) Determinación de colesterol en manteca de cerdo

Colesterol libre

Se pesaron exactamente 1.75 gramos de manteca, disolviéndose en 2.5 ml de acetato de etilo mediante agitación mecánica durante 5 minutos. El residuo insoluble, se separó trasvasando la mezcla a un tubo de centrifuga de 35 ml, procediendo a centrifugar durante 10 minutos a 4000 r.p.m. Seguidamente, se siguió el mismo procedimiento empleado con las muestras de mantequilla.

Colesterol total

Se pesaron exactamente 3.75 gramos de manteca de cerdo, a los que se añadieron 10 ml de una disolución reciente de KOH en metanol (1.0 mol l^{-1}). Se llevó a reflujo durante 30 minutos y tras dejar enfriar la disolución, se añadieron 15 ml de una disolución de ácido clorhídrico 8 mol l^{-1} . A continuación, se realizaron tres extracciones de colesterol con porciones de 10 ml de n-hexano.

Una vez mezclados los tres extractos, se evaporó el n-hexano hasta sequedad en un rotavapor, y el residuo sólido se disolvió en 10 ml de la disolución de micelas inversas formada con acetato de etilo, 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 y 0.1 mol l^{-1} AOT. Se transfirió una alícuota de 50 μl a la célula electroquímica, aplicándose el método de adiciones estándar para la determinación del colesterol total.

c) Determinación de colesterol en yema de huevo

Se procedió en primer lugar a la separación de la yema de huevo de la clara, homogeneizándose posteriormente la yema.

Colesterol libre

Para la determinación del colesterol libre, se pesaron exactamente 4.84 gramos de yema de huevo, disolviéndolos en 25 ml de acetato de etilo. A continuación, se agitó mecánicamente la mezcla durante 5 minutos y se transfirió una alícuota de 50 μl a la célula electroquímica, analizándose de forma análoga a como se hizo para las muestras de mantequilla.

Colesterol total

Se pesaron 0.5 gramos de yema de huevo, calentándose a reflujo durante 30 minutos con 10 ml de una disolución 1.0 mol l^{-1} de KOH en metanol. Después de enfriar la disolución, se añadieron 15 ml de ácido tricloroacético al 20% (p/v). Se realizaron tres extracciones sucesivas con 10 ml de n-hexano cada una, y tras proceder a la mezcla de los extractos, se siguió el mismo procedimiento que para las muestras de manteca.

d) Determinación de colesterol en mantequilla, manteca de cerdo y yema de huevo utilizando un método de referencia.

Los resultados obtenidos con el electrodo compósito bienzimático se compararon con los que proporcionó un kit enzimático comercial para la determinación de colesterol en alimentos que emplea detección colorimétrica. Tras aplicar el tratamiento adecuado para cada muestra, se oxida el colesterol a colesteno con colesterol oxidasa. En presencia de catalasa, el peróxido de hidrógeno producido en esta reacción, oxida metanol a formaldehído. Este último, reacciona con acetilacetona formando un complejo amarillo (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina) en presencia de iones amonio. La concentración del complejo coloreado formado está relacionada estequiométricamente con la cantidad de colesterol presente en la muestra, midiéndose a través de la variación de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm.

Para realizar las medidas utilizando este kit se requieren las siguientes disoluciones :

- Disolución 1 : Mezcla de tampón amonio fosfato (pH aproximadamente 7.0), metanol (2.6 mol l^{-1}) y catalasa (aproximadamente 220000U).
- Disolución 2 : Acetilacetona (0.05 mol l^{-1}) y metanol (0.3 mol l^{-1}).
- Disolución 3 : Suspensión de colesterol oxidasa de, aproximadamente, 12 U.
- Disolución 4 : Mezcla de 3 partes de la disolución 1, con 2 partes de la disolución 2. Esta disolución se debe mantener a temperatura ambiente una hora antes de usar.

A partir de estas disoluciones, y una vez tratada la muestra, el procedimiento a seguir es el siguiente :

- Disolución blanco de muestra : Se mezclan 5.000 mL de la disolución 4 con 0.4 ml de la muestra.
- Disolución de muestra : Se mezclan 2.5 ml de la disolución blanco de muestra con 0.020 ml de la disolución de colesterol oxidasa (disolución 3).

A continuación, se tapan los recipientes que contienen ambas disoluciones y se incuban en un baño de agua a 37 - 40 °C durante 60 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se espera el tiempo necesario para que las disoluciones adquieran temperatura ambiente, leyéndose las absorbancias de la disolución blanco de muestra y de la disolución de muestra, en la misma cubeta y frente al aire a 405 nm. La diferencia de absorbancia obtenida para las medidas de las dos disoluciones, está relacionada con la concentración de colesterol de la muestra.

Dado que el tratamiento que requieren las muestras para la determinación del colesterol libre y total difiere del empleado con el biosensor de grafito-Teflón-COD-HRP-ferroceno, a continuación se detallan los diferentes tratamientos a los que se deberán someter las muestras :

d.1. Mantequilla.

-*Colesterol libre* : Las muestras se prepararon pesando 1.75 g de mantequilla, disolviéndolas en 2,5 ml de isopropanol, y centrifugando durante 5 min a 4.000 r.p.m.

-*Colesterol total* : Las muestras se prepararon pesando 7.5 g de mantequilla, añadiendo 20 mL de una disolución metanólica de hidróxido potásico 1 mol l⁻¹ y 10 ml de isopropanol. Tras ebullición a reflujo durante 30 min y, después de alcanzar la temperatura ambiente, se trasvasó a un matraz de 50 ml, enrasándose con isopropanol. Finalmente, se centrifugó durante 5 min a 4.000 r.p.m.

d.2. Manteca de cerdo.

- *Colesterol libre* : Se pesaron 8 gramos de muestra y se disolvieron en isopropanol. Se pesaron 4 ml de una disolución de ácido clorhídrico 8 mol l⁻¹ y se completó el volumen hasta 50.0 ml con el disolvente orgánico.

- *Colesterol total* : Se pesaron 2 gramos de manteca de cerdo, llevándose a reflujo durante 25 minutos en 10 ml de una disolución reciente de KOH 1.0 mol l⁻¹ en metanol. Tras dejar enfriar, la disolución se trasvasó a un matraz de 25 ml, al que se añadió 1 ml de una disolución de ácido clorhídrico 8 mol l⁻¹, enrasándose con isopropanol. A continuación, se mantuvo la disolución durante 10 minutos en un baño de hielo, y se filtró.

d.3. Yema de huevo.

- *Colesterol libre* : El contenido de colesterol libre en la yema de huevo se determinó con el kit enzimático colorimétrico disolviendo 3 gramos de yema en 25 ml de isopropanol. A continuación se

agitó la disolución durante 10 minutos, y se centrifugó para poder separar mejor el residuo insoluble.

- *Colesterol total*: Se pesó 1.0 gramo de yema de huevo, que previamente se ha separado de la clara, y se calentó a reflujo durante 30 minutos en una disolución de 20 ml de KOH 1.0 mol l^{-1} en metanol y 10 ml de isopropanol. Tras enfriar la disolución, se trasvasó a un matraz de 50 ml, enrasándose con isopropanol.

IV.3.5. ELECTRODO COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN-COLESTEROL OXIDASA-PEROXIDASA-FERROCIANURO PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN MICELAS INVERSAS

Ya que el electrodo compuesto de grafito-Teflón-peroxidasa-ferrocianuro para la monitorización de H_2O_2 en micelas inversas se desarrolló y optimizó en el capítulo III.5., las variables experimentales como el porcentaje de teflón (70%), y las cantidades de peroxidasa y ferrocianuro inmovilizadas en la matriz del electrodo (1.5% y 1.6%, respectivamente) se mantuvieron constantes en el electrodo de colesterol. Así mismo, la composición de las micelas inversas, es decir, acetato de etilo como fase continua, 4 % de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 como fase dispersa, y 0.1 mol L^{-1} de AOT como agente emulsificante, fue idéntica a la que se ha empleado previamente.

IV.3.5.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

IV.3.5.1.a. CONTENIDO DE COLESTEROL OXIDASA EN LA MATRIZ ELECTRÓDICA

Con objeto de evaluar la influencia de la cantidad de COD inmovilizada en la matriz compósita, se midió la intensidad de corriente en estado estacionario de las señales obtenidas con diferentes electrodos compósitos bienzimáticos, que contenían una cantidad de enzima comprendida entre 0.2 y 0.5%, para colesterol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en las micelas inversas, aplicando un potencial constante de +0.10 V. A medida que aumenta la cantidad de colesterol oxidasa, se observó un aumento de la relación señal/ruido en todo el intervalo estudiado. Por ello, se eligió un porcentaje del **0.5% de COD** para estudios posteriores. No se ensayaron mayores cantidades de enzima inmovilizada en la matriz electródica debido al precio relativamente elevado que tiene, considerando que la señal amperométrica obtenida era adecuada para la determinación de colesterol en muestras reales.

IV.3.5.1.b. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

La influencia de la temperatura a la que se encuentra la emulsión de trabajo sobre la señal obtenida para un nivel de concentración de colesterol de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ se representa en la figura 80.

Como se puede apreciar, la intensidad de corriente en estado estacionario era constante desde $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, aumentando para temperaturas más altas.

Aunque los biosensores de colesterol oxidasa suelen exhibir respuestas más rápidas al aumentar la temperatura, se suele trabajar a temperatura ambiente para evitar problemas operacionales (Charpentier y Murr, 1995). Por lo tanto, puesto que para aumentar el valor de la intensidad de forma significativa habría que aplicar una temperatura demasiado alta, podría ocurrir que, al igual que para el biosensor de hipoxantina el tiempo de vida útil del electrodo disminuyera considerablemente. Teniendo en cuenta los valores utilizados en la bibliografía y que la señal se mantiene constante hasta $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se eligió una temperatura de trabajo de $25 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para realizar los estudios posteriores.

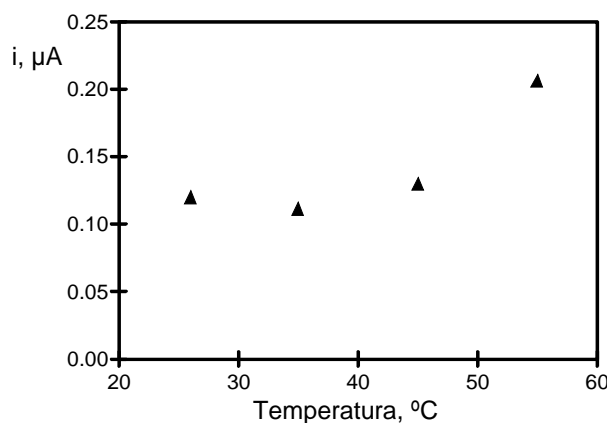


Figura 80 Influencia de la temperatura sobre la respuesta amperométrica de colesterol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en micelas inversas formadas con acetato de etilo, AOT 0.1 mol l^{-1} y disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, obtenida con un electrodo compuesto de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro. $E_{ap} = +0.10 \text{ V}$

IV.3.5.1.c. INFLUENCIA DEL POTENCIAL APLICADO

La dependencia de la respuesta amperométrica del electrodo de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro con el potencial se evaluó para un nivel de concentración de colesterol de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en las micelas inversas, en el margen comprendido entre $+0.25 \text{ V}$ y 0.00 V . Los resultados se muestran en la Figura 81.

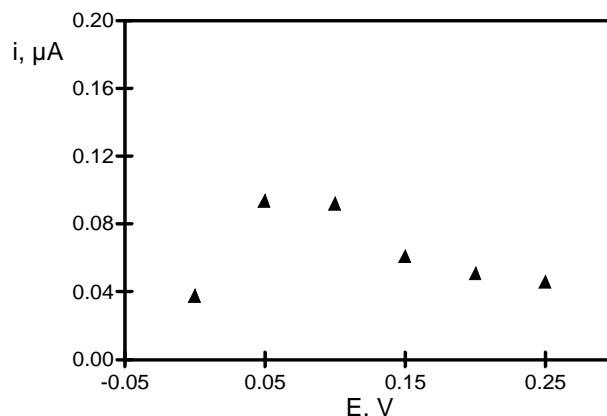


Figura 81. Influencia del potencial aplicado a un electrodo compuesto de grafito-teflón-peroxidasa-colesterol oxidasa-ferrocianuro sobre la respuesta amperométrica para colesterol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Micelas inversas formadas por acetato de etilo, AOT 0.1 mol l^{-1} y disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4)

Como puede observarse, la señal amperométrica alcanza un valor máximo entre +0.05 V y +0.10 V. Para valores de potencial superiores o inferiores a éstos, la intensidad de corriente en el estado estacionario disminuye. La disminución a potenciales menores de 0.05 V es debida, como ya se indicó en el apartado III.5.3.3., a la reducción electródica del H_2O_2 . Sin embargo, esta disminución es más acusada para el biosensor de colesterol que para el de peróxido de hidrógeno, lo que puede atribuirse a que, además, se produce la reducción electródica de O_2 , que es el cofactor de la reacción enzimática catalizada por la colesterol oxidasa, lo que disminuye su concentración en la capa de difusión. Teniendo en cuenta que la respuesta máxima para el H_2O_2 en las micelas inversas se obtuvo con el electrodo de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro a +0.10 V (apartado III.5.3.7.1), se eligió este valor de potencial para llevar a cabo la detección amperométrica.

En la figura 82, se muestra un ejemplo de los amperogramas obtenidos con el electrodo de grafito - teflón (70%) - peroxidasa - colesterol oxidasa - ferrocianuro para adiciones sucesivas de $10 \mu\text{l}$ de una disolución patrón de colesterol 0.05 mol l^{-1} en acetato de etilo al medio de micelas inversas agitadas mecánicamente.

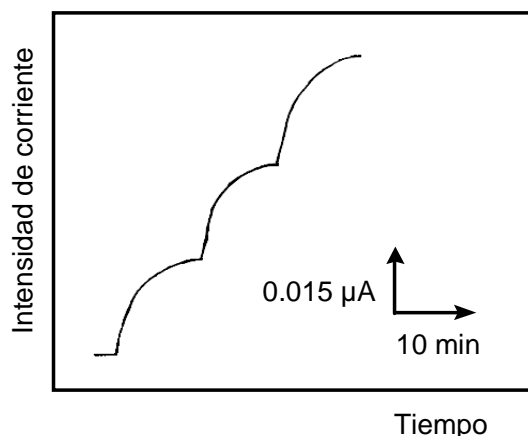


Figura 82 . Registros $i-t$ para adiciones sucesivas de $10 \mu\text{l}$ de una disolución de colesterol 0.05 mol l^{-1} en acetato de etilo sobre 5.0 ml de micelas inversas formadas por 0.1 mol l^{-1} AOT y 4% de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) en acetato de etilo. $E_{ap} = +0.10 \text{ V}$

Como puede observarse, se obtuvieron respuestas bien definidas pero relativamente lentas a los cambios en la concentración de sustrato, alcanzándose la corriente en estado estacionario en 10 minutos. Esta respuesta bastante lenta puede explicarse teniendo en cuenta que las reacciones enzimáticas en las micelas inversas tienen lugar en los microdominios acuosos en la superficie del electrodo, estableciéndose, por tanto, un equilibrio de reparto del colesterol entre los microdominios acuosos y orgánicos. El tiempo necesario para que el colesterol adicionado alcance el estado estacionario va a depender principalmente de su constante de reparto entre ambas fases. Debido a que el colesterol es muy poco soluble en agua, necesitará un tiempo mayor para alcanzar este equilibrio y por tanto la cinética de la reacción enzimática global será más lenta. Este mismo comportamiento ha sido ya observado en micelas inversas para compuestos escasamente solubles en agua empleando un electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa-ferrocianuro (apartado III.5.). En efecto, cuando se registraron los amperogramas para el H_2O_2 (soluble en medio acuoso) y para el peróxido de 2-butanona (escasamente soluble en agua) el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario fue de 1 minuto y 30 segundos y de 2 minutos y 30 segundos, respectivamente (Reviejo et al., 1994). También se ha comprobado en el apartado III.5.5.2. de esta Memoria, que la respuesta obtenida con un electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa-ferroceno en medio acuoso es mucho más rápida que en el medio formado por micelas inversas, alcanzándose el estado estacionario en 5 segundos ya que no existen dos fases y, por tanto, no existen constantes de reparto. A pesar de todo lo comentado, hay que señalar que en la bibliografía se ha publicado que el tiempo necesario para alcanzar la corriente en estado estacionario era de entre 10 y 30 minutos, cuando la determinación de colesterol se llevó a cabo en fase orgánica (en una mezcla cloroformo-hexano) con un electrodo de Clark modificado con COD (Hall y Turner, 1991). Esto indica que el tiempo de respuesta obtenido con el biosensor bienzimático en las micelas inversas puede considerarse como aceptable en este tipo de medios de trabajo.

IV.3.5.2. ESTABILIDAD DEL ELECTRODO COMPÓSITO BIENZIMÁTICO

La estabilidad y el tiempo de vida útil del electrodo de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en las micelas inversas se estableció considerando diferentes aspectos: a) repetibilidad de la señal amperométrica para diferentes medidas sin regenerar la superficie electródica por pulido, b) repetibilidad de la señal amperométrica cuando se regenera la superficie del electrodo por pulido, c) estabilidad de un electrodo compuesto individual con el tiempo, d) reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos, construidos tanto a partir de la misma pastilla como a partir de diferentes pastillas madre y e) efecto del tiempo de almacenamiento. En la Tabla 33 se recogen los valores de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos, así como los valores de la desviación estándar relativa

correspondientes en los estudios mencionados, para una concentración de colesterol de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

La serie de 10 medidas realizadas sin regeneración de la superficie proporcionó un valor de RSD para la corriente en estado estacionario de 5.0 %, lo que indica que no hay diferencias apreciables en las medidas llevadas a cabo con el biosensor sin pulir su superficie. La repetibilidad de la señal amperométrica obtenida después de regenerar la superficie del electrodo por pulido, tras realizar tres medidas sucesivas entre cada uno de los 10 pulidos realizados dio lugar a un valor de RSD de 6.4% para los 10 valores medios de la corriente en estado estacionario de cada serie, lo que indica que las enzimas están repartidas uniformemente en el seno de la matriz electródica. Esto representa una gran ventaja con respecto a trabajos realizados anteriormente en medios predominantemente no acuosos, en los que la enzima era inmovilizada en la superficie del electrodo por simple adsorción, lo que hacía que fuera necesario fabricar un nuevo electrodo cada vez que se perdía actividad enzimática (Reviejo et al., 1994). Ambos estudios indican que no era necesario pulir la superficie del electrodo después de realizar cada experimento, lo que combinado con la capacidad de regeneración del electrodo permitió conseguir largos períodos operacionales con un sólo biosensor.

Tabla 33. Estabilidad del electrodo compuesto bienzimático de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en micelas inversas. Colesterol: $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap} = +0.10 \text{ V}$.

	i, μA		RSD, %	
Repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica	0.117	0.110	5.0	
	0.112	0.108		
	0.102	0.108		
	0.116	0.102		
	0.110	0.117		
i media= $0.110 \pm 0.004 \mu\text{A}$				
Repetibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica por pulido	0.096	0.116	6.4	
	0.102	0.110		
	0.106	0.104		
	0.096	0.110		
	0.114	0.108		
i media= $0.106 \pm 0.005 \mu\text{A}$				
Tiempo de vida útil del electrodo	1 mes			
Reproducibilidad en la fabricación de los electrodos	Pastilla	Electrodo*	i, μA	RSD %
		1.1	0.10 ± 0.01	
	1	1.2	0.11 ± 0.01	
	2	2.1	0.10 ± 0.01	
		2.2	0.10 ± 0.02	

(*Nº pastilla.Nº electrodo)	3	3.1	0.10 ± 0.01	9.7
	4	4.1	0.10 ± 0.01	
		4.2	0.09 ± 0.01	
	5	5.1	0.10 ± 0.02	
		5.2	0.13 ± 0.03	
i media= $0.103 \pm 0.008 \mu\text{A}$				
Efecto del periodo de almacenamiento	2 meses a 4 °C sin pérdida de actividad aparente			

Para establecer el tiempo de vida útil de un electrodo de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro, se construyó un gráfico de control para los valores medios obtenidos realizando diariamente tres medidas de la intensidad de corriente en estado estacionario, para disoluciones diferentes de micelas inversas conteniendo colesterol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. (Figura 83). Al igual que para los gráficos de control ya vistos en esta Memoria, el valor central y los límites superior e inferior se establecieron tomando como período base las medidas de las señales amperométricas obtenidas en el estudio de repetibilidad sin regeneración de la superficie electródica. Así, el valor central del diagrama de control fue de $0.110 \mu\text{A}$, y el de los límites de control superior e inferior de $0.130 \mu\text{A}$ y $0.090 \mu\text{A}$, respectivamente, que corresponden a $x \pm 3s$. Cuando el valor medio de las tres medidas realizadas en un mismo día quedaba por debajo del límite inferior del gráfico de control, se procedió a pulir la superficie del electrodo, restaurándose entonces la señal amperométrica dentro de los límites de control.

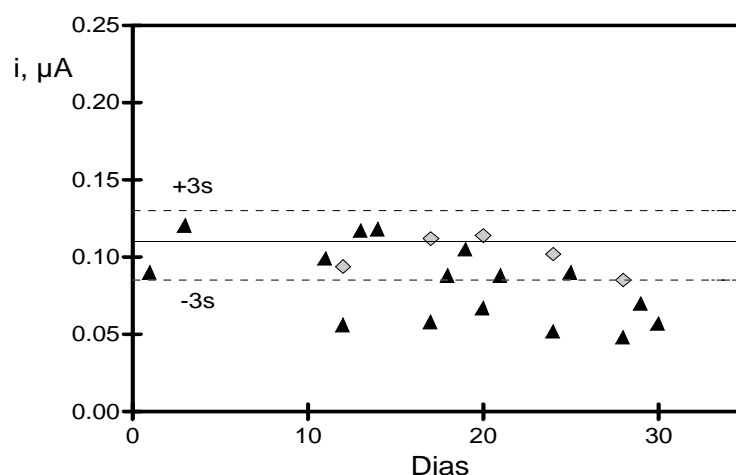


Figura 83. Gráfico de control para la variación de la intensidad de corriente en estado estacionario con el tiempo para colesterol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en micelas inversas con un electrodo de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro. $E_{ap} = +0.10 \text{ V}$. (◆) Pulido de la superficie del electrodo.

A partir de aproximadamente el día 30 no se pudo recuperar la señal por pulido de la superficie electródica, a pesar de haber realizado solo 5 pulidos. Esta pérdida de actividad enzimática se atribuyó nuevamente a los cambios de temperatura sufridos diariamente por el biosensor desde la de almacenamiento (4 °C) a la temperatura de trabajo y viceversa, es decir, los procesos de enfriamiento y calentamiento del electrodo compósito bienzimático afectan a la actividad de la enzima, haciendo que el tiempo de vida útil de un electrodo sea de aproximadamente 1 mes. Es necesario indicar en este punto, que el mismo electrodo compósito bienzimático empleado para construir el gráfico de control fue utilizado así mismo para la realización de todos los demás experimentos llevados a cabo durante ese mes.

En cualquier caso, cuando la respuesta amperométrica no pudo ser recuperada por pulido, resultó necesario construir un nuevo electrodo. Por tanto, la reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes electrodos, fabricados a partir de la misma pastilla madre y a partir de pastillas diferentes, es un aspecto esencial a evaluar para asegurar la utilidad práctica del electrodo bienzimático desarrollado en este medio predominantemente orgánico. En la Tabla 33 se recogen los valores medios de la intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos con cinco pastillas madre distintas. De cada pastilla, se pudo construir un máximo de dos electrodos, y se llevaron a cabo tres medidas amperométricas de disoluciones de colesterol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ diferentes en el medio de micelas inversas. El valor de la RSD para los 10 electrodos fue de 9.7%, indicando que el procedimiento de fabricación de los electrodos compósitos bienzimáticos era fiable, y que se podían obtener respuestas electroanalíticas reproducibles con diferentes electrodos contruidos de la misma manera.

Finalmente, se evaluó el efecto de un período largo de almacenamiento de la pastilla madre a 0 °C en seco. Tras 2 meses de almacenamiento, las respuestas amperométricas obtenidas fueron similares (y reproducibles) a las recogidas en la Tabla 33, indicando que no había pérdida significativa de la actividad enzimática durante ese período de tiempo. Sin embargo, electrodos fabricados a partir de pastillas almacenadas durante períodos más largos de tiempo proporcionaron valores de intensidad menores que los de la Tabla 33. Si se compara este tiempo de almacenamiento con el de las pastillas de grafito-Teflón-HRP-ferrocianuro (trabajando también en micelas inversas) (apartado III.5.4.3.) que fue de 4 meses, debe deducirse que existía una pérdida de actividad de la COD inmovilizada. Esto se debe a que la temperatura recomendada de almacenamiento de la colesterol oxidasa sin inmovilizar es de -20 °C. El almacenamiento de la pastilla con la enzima inmovilizada a 0 °C durante períodos de tiempo muy largos puede producir una disminución de la actividad enzimática. Debido a esto, se tomó la precaución de preparar pastillas madre pequeñas (como ya se comentó también en el apartado IV.3.4.3.2. de la Parte Experimental) con objeto de no hacer un gasto innecesario de colesterol

oxidasa preparando pastillas madre más grandes, que no se pudieran llegar a utilizar en su totalidad.

Todos estos resultados demuestran la robustez del biosensor de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en micelas inversas, mejorando las prestaciones prácticas de los biosensores basados en COD reportados hasta la fecha en bibliografía.

IV.3.5.3. CURVA DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

En las condiciones experimentales elegidas anteriormente para la determinación de colesterol con el electrodo compuesto bienzimático en micelas inversas se construyó la correspondiente curva de calibrado. En la Figura 84, se muestra la dependencia de la intensidad de corriente en estado estacionario con la concentración de colesterol en el intervalo de concentraciones 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-3} mol l⁻¹.

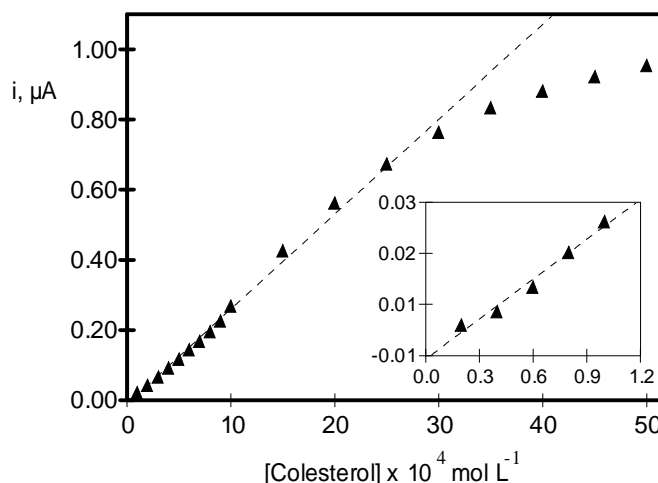


Figura 84. Curva de calibrado para colesterol obtenida con el electrodo de grafito-Teflón-peroxidasa-colesterol oxidasa-ferrocianuro en micelas inversas $E_{ap} = +0.10V$.

Se obtuvo una curva típica de los sistemas enzimáticos, es decir, a concentraciones bajas de colesterol se observó una relación lineal entre la intensidad de corriente y la

concentración de colesterol, mientras que para concentraciones más elevadas se pierde la linealidad como consecuencia de la saturación de la enzima.

Como se ha venido haciendo a lo largo de la Memoria, para determinar el intervalo lineal de la dependencia de la intensidad de corriente en estado estacionario con la concentración de colesterol, se utilizó regresión por mínimos cuadrados, considerando que no hay pérdida de linealidad cuando el coeficiente de correlación obtenido no era menor de 0.998. Siguiendo este criterio, se estableció un intervalo lineal entre 1.0×10^{-5} y $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ($r=0.9983$) con un valor de pendiente y de la ordenada en el origen de $(269 \pm 4) \mu\text{A mol}^{-1} \text{ l}$ y $(-3 \pm 5) \mu\text{A}$ respectivamente. Los intervalos de confianza se calcularon para un nivel de significación de 0.05.

La desviación estándar relativa calculada a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones diferentes de colesterol a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, fue de 7.8%. Los límites de determinación y detección se calcularon siguiendo los criterios empleados en el apartado III.5.6. tomando como estimador de s_b la desviación estándar de medidas anteriores. Los valores obtenidos fueron $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ y $6.2 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, respectivamente, y son comparables a los encontrados en bibliografía para biosensores amperométricos en medio acuoso y considerablemente mejores que los obtenidos con el biosensor enzimático en fase orgánica (Hall y Turner, 1991).

IV.3.5.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE Y TOTAL EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

La utilidad del electrodo bienzimático de COD-HRP para el análisis de alimentos se ha verificado con muestras como mantequilla, manteca de cerdo y yema de huevo. Ya se comentó en la introducción de este capítulo, que el colesterol se encuentra en los alimentos tanto en forma libre como esterificada, por lo que el análisis del colesterol total implica la hidrólisis de los correspondientes esteres. Para ello, se evaluó la posibilidad de construir un electrodo compósito trienzimático, coinmovilizando en la matriz electródica la enzima colesterol esterasa y empleando como compuesto estándar palmitato de colesterol. Las respuestas amperométricas obtenidas con el bioelectrodo trienzimático en las micelas inversas fueron muy lentas (más de 20 minutos para alcanzar el estado estacionario). Este comportamiento era de esperar, por un lado debido al tiempo necesario para que la reacción de hidrólisis se lleve a cabo y, por otro por la baja solubilidad del palmitato de colesterol en agua, lo que como ya se vio afecta la cinética de la reacción enzimática en el medio de micelas inversas. En consecuencia, se descartó la posibilidad de utilizar un electrodo trienzimático con muestras reales, y se llevó a cabo la saponificación en $\text{KOH } 1.0 \text{ mol l}^{-1}$ metanólica (apartado IV.3.4.3.4. de la Parte Experimental) para hidrolizar los ésteres del colesterol en las muestras de alimentos. Como se comentará más adelante, la determinación del contenido de colesterol se llevó a cabo en todos los casos aplicando el método de adiciones estándar para minimizar el

efecto matriz.

Como método de referencia se utilizó un método enzimático colorimétrico con el que se comprobará la exactitud del método desarrollado.

IV.3.5.4.1. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Los componentes habituales de los alimentos que se quieren analizar no se pueden considerar como interferentes potenciales para el análisis amperométrico del colesterol con el electrodo compuesto bienzimático. Sin embargo, en el caso de la mantequilla y de la manteca de cerdo, se pueden encontrar aditivos, conservantes y colorantes que pueden producir algún efecto interferente sobre las medidas de colesterol. Así, se ensayaron diferentes sustancias como agentes interferentes potenciales: ácidos ascórbico, benzoico, cítrico, tartárico y L-láctico, BHA y BHT. El efecto de la presencia de estas sustancias sobre la respuesta amperométrica en estado estacionario del colesterol se evaluó para una concentración de colesterol constante de 2.0×10^{-5} mol l⁻¹ y variando la concentración del compuesto potencialmente interferente.

En la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos, además de los valores de concentración máximos de los compuestos ensayados como posibles interferentes, permitidos por la legislación española (Manual de Legislación para la Inspección de Calidad de Alimentos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Política Alimentaria).

Tabla 34. Estudio de interferencias sobre la intensidad en estado estacionario de colesterol en concentración 2.0×10^{-5} mol l⁻¹ en el medio de micelas inversas. $E_{ap} = +0.10$ V.

INTERFERENTE	Mantequilla	Manteca	Colesterol : interferente	Er,%
	Niveles máximos permitidos			
Ácido ascórbico (E-300)	300 mg/kg	30 mg/kg	1:1	-9.23
Ácido benzoico			1:100	--
Ácido cítrico (E-330)			1:10	2.06
BHA (E-320)	100 mg/kg	100 mg/kg	1:10	-1.47
BHT (E-321)	100 mg/kg	100 mg/kg	1 :100	--
Ácido tartarico (E-334)			1:100	--
Ácido L-Láctico (E-270)			1:10	-2.50

La “declaración de aditivos” obliga a que cuando un producto contenga materias colorantes artificiales, edulcorantes artificiales, agentes conservadores o antioxidantes autorizados, se declaren en los envases que los contengan, conforme a lo que establecen los capítulos correspondientes del Código. Según ello, de las muestras utilizadas para estudiar la aplicabilidad del biosensor desarrollado, el envase de la mantequilla específica que no contiene colorantes, conservantes ni aditivos artificiales, mientras que en el de la manteca de cerdo, se menciona la

presencia de los antioxidantes E-320 (BHA) y E-321 (BHT). Según los niveles máximos permitidos y las cantidades de muestra utilizadas, se encontrarían en la célula de medida a los siguientes niveles de concentración : para la determinación de colesterol libre, el BHA sería $7.8 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, mientras que el BHT estaría presente a una concentración de $6.35 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. En el caso de la determinación de colesterol total, habría $2.1 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ de BHA y $1.7 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ de BHT.

En las condiciones experimentales utilizadas, solo el ácido ascórbico influyó sobre la respuesta amperométrica del colesterol para una relación de concentración analito :interferente de 1 :1, produciendo un error relativo en la intensidad de corriente en estado estacionario de 9.2%. Este error negativo procede de la corriente de oxidación para el ácido ascórbico al potencial aplicado, y puede ser minimizado (en el caso en el que existiera un alto contenido de ácido ascórbico en el alimento a analizar) aplicando un potencial menos positivo al electrodo, de forma análoga a lo comentado para el biosensor de hipoxantina. Por otra parte, ni el ácido benzoico, ni el tartárico, ni el BHT afectaron la respuesta del analito incluso para una relación de concentraciones colesterol :interferente 1:100. El ácido cítrico, el BHA y el ácido L-láctico produjeron errores relativos de +2.1, -1.5 y -2.5 % respectivamente, para una relación de concentración colesterol:interferente de 1 :10. Teniendo en cuenta el contenido máximo de antioxidantes permitido por la legislación en mantequilla y manteca de cerdo, la concentración usual de estos aditivos en las muestras es mucho menor que la necesaria para producir una interferencia significativa en la respuesta del colesterol.

Todos estos resultados demuestran la buena selectividad del electrodo compuesto bienzimático para la determinación de colesterol en alimentos trabajando en un medio de micelas inversas.

IV.3.5.4.2. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE Y TOTAL EN MANTEQUILLA

Se determinó el contenido de colesterol libre y de colesterol total utilizando la metodología descrita en el apartado IV.3.4.3.4.a. En el caso de la determinación de colesterol libre, la simple disolución de la muestra de mantequilla en acetato de etilo fue suficiente para poder extraer el colesterol. Dado el alto contenido en grasas de este tipo de muestras, siempre quedó un residuo sólido claramente separable de la fase líquida en la que se encontraba extraído el colesterol libre.

En cuanto a la determinación de colesterol total, se utilizó el tratamiento general que se emplea en el método de referencia, variando el disolvente isopropanol por acetato de etilo. Aunque en primer lugar se consideró la posibilidad de aplicar estrictamente el tratamiento del método de referencia, se comprobó que la adición de isopropanol a la célula de medida producía un cambio importante en la composición de la emulsión, proporcionando una señal no faradaica, por lo que se optó por realizar la hidrólisis/extracción y posterior dilución de la muestra en acetato de etilo, al ser éste disolvente la fase continua de las micelas inversas utilizadas como medio de trabajo. Por otro lado, también fue necesario optimizar la relación cantidad de muestra :volumen de KOH (1.0 mol l^{-1}

¹) en metanol, con el fin de asegurar la hidrólisis completa de los ésteres del colesterol. Para ello, se fue variando la cantidad de muestra con respecto al volumen del agente saponificador hasta que no se observaron cambios en los resultados del contenido de colesterol en la mantequilla.

Se comprobó también, que la presencia del hidróxido potásico disuelto en metanol en la alícuota de la muestra, no producía ninguna variación en las señales amperométricas. Para ello se adicionó a la célula de medida el mismo volumen empleado para la muestra de una mezcla de KOH metanólica/acetato de etilo en las mismas proporciones utilizadas en el tratamiento de la mantequilla, no observándose ninguna variación en la corriente de fondo al potencial aplicado de +0.10 V. En la Figura 85 se recogen, a modo de ejemplo los registros i-t correspondientes a una de las muestras de mantequilla analizadas para la determinación de (a) colesterol libre y (b) colesterol total utilizando el método de adiciones estándar. Una vez alcanzada la estabilidad en la línea base, se añadió la alícuota del extracto que contiene el analito según se detalla en el apartado IV.3.4.3.4.a., aplicándose el método de adiciones estándar.

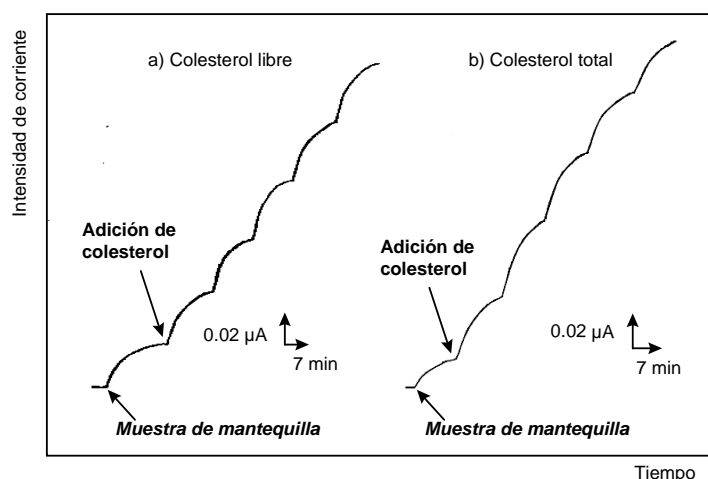


Figura 85. Curvas intensidad-tiempo obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en micelas inversas para la adición de una alícuota del extracto de la muestra de mantequilla y posteriores adiciones de alícuotas de disolución patrón de colesterol en el medio de micelas inversas. $E_{ap} = + 0.10$ V.

Con objeto de comprobar la existencia de efecto matriz se compararon, mediante el criterio de la t de Student, las pendientes obtenidas para la determinación de colesterol libre ($500 \pm 35 \mu\text{A mol}^{-1}$ l) y total ($386 \pm 9 \mu\text{A mol}^{-1}$ l), con el valor de la pendiente del calibrado externo realizado con emulsiones patrón de colesterol ($269 \pm 4 \mu\text{A mol}^{-1}$ l). Tanto en la determinación de colesterol libre ($t_{cal}=6.5$) como de colesterol total ($t_{cal}=10.8$) existen diferencias significativas entre los valores de las pendientes del calibrado realizado con patrones y el realizado por adiciones estándar ($t_{tab}=1.812$), lo que confirma la existencia de efecto matriz y por tanto la necesidad de emplear el método de adiciones estándar. En la Tabla 35, se recogen los contenidos de colesterol libre y total encontrados en las muestras de mantequilla analizadas con el electrodo enzimático y con el kit de ensayo de Boehringer, que implica la hidrólisis metanólica, incubación enzimática (COD) y medida espectrofotométrica. En cada caso se recoge el valor medio de tres determinaciones realizadas

para cada muestra, con sus correspondientes intervalos de confianza calculados para un nivel de significación de 0.05.

Los valores obtenidos con el electrodo bienzimático en las micelas inversas se compararon con los proporcionados por un kit de ensayo comercializado por Boehringer que se ha tomado como método de referencia, comprobándose que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos por ambos métodos aplicando el método de la t de Student, para un nivel de probabilidad del 95%. En ambos casos, el valor de t calculada (1.706 para el colesterol total y 0.38 para el colesterol libre) ha resultado menor que el valor de la t de Student tabulada ($t_{\text{tab}} = 2.306$). Por tanto, se puede concluir que el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-colesterol oxidasa-ferrocianuro permite la determinación tanto de colesterol total como libre en mantequilla, siendo los resultados obtenidos no significativamente diferentes con los proporcionados por el método enzimático-colorimétrico de referencia. Tanto el valor obtenido con el biosensor como con el método de referencia son muy próximos al valor del colesterol total en mantequilla reseñado en la bibliografía.

Tabla 35 . Resultados obtenidos en la determinación de colesterol libre y colesterol total en mantequilla utilizando electrodos compósitos bienzimáticos de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en micelas inversas y mediante un kit de ensayo comercializado por Boehringer ($n=3$ cada muestra)

Electrodo compuesto grafito-teflón-COD-HRP-ferrocianuro		
Muestra	Colesterol total (g/100 g mantequilla)	Colesterol libre (g/100 g mantequilla)
1	0,26 ± 0,01	0,084 ± 0,005
2	0,254 ± 0,001	0,079 ± 0,007
3	0,28 ± 0,01	0,093 ± 0,003
Media	0,26 ± 0,03	0,086 ± 0,008
Método de referencia		
Muestra	Colesterol total (g/100 g mantequilla)	Colesterol libre (g/100 g mantequilla)
1	0,275 ± 0,003	0,08 ± 0,04
2	0,23 ± 0,01	0,09 ± 0,02
3	0,22 ± 0,01	0,08 ± 0,03
Media	0,24 ± 0,03	0.08 ± 0.02

De los resultados de la Tabla 35, puede deducirse que la relación entre el colesterol libre y el total se mantiene constante. Por consiguiente, dado que el tratamiento de la muestra es mucho más sencillo para la determinación del colesterol no esterificado, sería posible determinar únicamente el colesterol libre en este tipo de muestras, y aplicar a continuación el factor correspondiente para obtener el contenido en colesterol total. Esta es una ventaja importante del biosensor bienzimático sobre el método de referencia, ya que, si se analizan los

resultados obtenidos con el kit enzimático comercial para la determinación de colesterol libre, se puede apreciar como se obtienen elevadas desviaciones estándar y por tanto intervalos de confianza muy amplios, probablemente debido a la pobre solubilidad de la mantequilla en el disolvente utilizado para estas determinaciones (isopropanol).

Por otro lado, a pesar de que la hidrólisis metanólica de los ésteres del colesterol es similar en ambos métodos, el tiempo de incubación al que se deben someter las muestras en una disolución de COD, tanto para la determinación de colesterol libre como de colesterol total, en el método enzimático de referencia, da lugar a un tiempo de análisis mucho mayor (aproximadamente 1 hora más), así como a un mayor consumo de reactivos cuando se compara con la metodología aplicada utilizando el electrodo bienzimático compósito en micelas inversas.

IV.3.5.4.3. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE Y TOTAL EN MANTECA DE CERDO

Al igual que para la mantequilla, para la determinación de colesterol libre en muestras de manteca de cerdo, bastó con disolver la cantidad de muestra adecuada en acetato de etilo, si bien en esta ocasión, al ser mayor el contenido en grasa, fue necesario centrifugar para poder separar la fase líquida, que contenía el colesterol libre disuelto, del residuo sólido.

En cuanto al tratamiento de la muestra para la determinación del colesterol total, se pensó, en principio, utilizar el mismo procedimiento que para las muestras de mantequilla. Sin embargo, debido a que el colesterol en manteca de cerdo se encuentra en menor proporción que en mantequilla, fue necesario preconcentrar la fase líquida para obtener señales analíticas medibles. Se intentó entonces extraer el colesterol de la fase metanólica que se obtiene tras la hidrólisis con acetato de etilo, no pudiéndose obtener dos fases bien diferenciadas. Por ello, se empleó otro disolvente menos polar que fuera inmiscible con el metanol, como es el n-hexano. Siguiendo el mismo tratamiento anterior, pero cambiando el disolvente extractante, tampoco se obtuvo una separación de fases, debido a la formación de emulsiones favorecida por la presencia de ácidos grasos en la manteca de cerdo. Para solucionar este inconveniente, una vez realizada la saponificación, y antes de añadir el disolvente extractante, se procedió a precipitar los ácidos grasos mediante su hidrólisis con ácido clorhídrico. Tras esto, se siguió el procedimiento descrito en el apartado IV.3.4.3.4.b. de la Parte Experimental.

En la Figura 86 se recogen, a modo de ejemplo, los registros i-t correspondientes a una de las muestras de manteca de cerdo analizadas, tanto para la determinación de colesterol libre (a) y de colesterol total (b) utilizando el método de adiciones estándar, según se indica en el apartado IV.3.4.3.4.b. de la Parte Experimental.

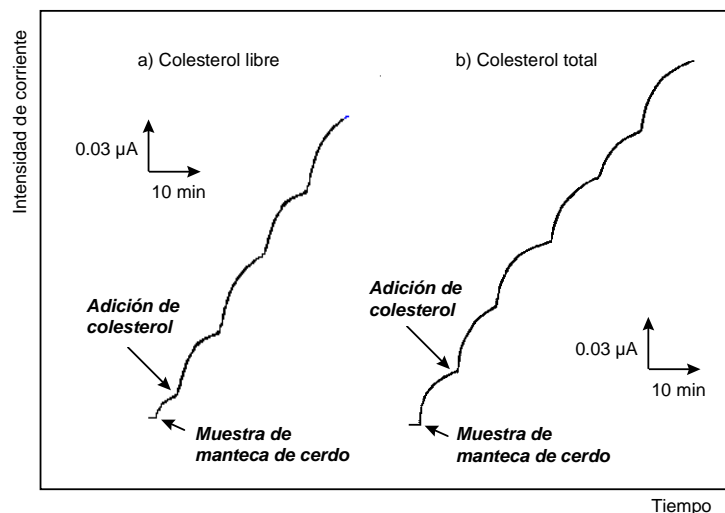


Figura 86. Curvas intensidad-tiempo obtenidas con un electrodo de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en micelas inversas para el análisis de colesterol libre y total en una muestra de manteca de cerdo aplicando el método de adiciones estándar. $E_{ap} = + 0.10 \text{ V}$.

De nuevo, se comprobó la necesidad de aplicar el método de adiciones estándar comparando mediante el test de la *t* de Student el valor de la pendiente del calibrado de colesterol con patrones ($269 \pm 4 \mu\text{A mol}^{-1} \text{ l}$) con los de adiciones estándar ($569 \pm 17 \mu\text{A mol}^{-1} \text{ l}$ y $552 \pm 9 \mu\text{A mol}^{-1} \text{ l}$) para la determinación de colesterol total y libre, respectivamente. Al existir diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes ($t_{cal}(\text{total})=47.32$, $t_{cal}(\text{libre})=19.51$, $t_{tab}=1.812$), se necesitó utilizar el método de adiciones estándar en todas las determinaciones de colesterol en manteca de cerdo que se realizaron.

En la tabla 36 se recogen los valores de la concentración de colesterol total y de colesterol libre obtenidos con el electrodo enzimático y con el método de referencia, para tres muestras diferentes de manteca de cerdo. Para cada muestra se realizaron tres determinaciones, calculándose los intervalos de confianza para un nivel de significación de 0.05.

Para comprobar que no existían diferencias significativas entre los valores obtenidos por ambos métodos, se aplicó el método de la *t* de Student. Ya que el valor de *t* calculada (2.068 para el colesterol total y 0.072 para el colesterol libre) para un nivel de probabilidad del 95% resulta de nuevo menor que el de la *t* tabulada (2.306), se puede concluir que el electrodo compuesto de grafito-teflón-HRP-colesterol oxidasa-ferrocianuro, proporcionó resultados significativamente no diferentes a los obtenidos por el método enzimático colorimétrico de referencia, indicando la buena exactitud del método desarrollado.

Tabla 36. Resultados obtenidos en la determinación de colesterol libre y colesterol total en manteca de cerdo utilizando electrodos compósitos bienzimáticos de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en micelas inversas y mediante un kit de ensayo comercializado por Boehringer ($n=3$ cada muestra)

Electrodo compuesto grafito-teflón-COD-HRP-ferrocianuro		
Muestra	Colesterol total (g/100 g manteca)	Colesterol libre (g/100 g manteca)
1	0,094 ± 0,004	0,047 ± 0,004
2	0,088 ± 0,007	0,047 ± 0,002
3	0,084 ± 0,006	0,045 ± 0,004
Media	0,089 ± 0,008	0,046 ± 0,002
Método de referencia		
Muestra	Colesterol total (g/100 g manteca)	Colesterol libre (g/100 g manteca)
1	0,083 ± 0,006	0,049 ± 0,005
2	0,084 ± 0,006	0,048 ± 0,001
3	0,087 ± 0,009	0,047 ± 0,001
Media	0,085 ± 0,005	0,048 ± 0,001

Por otro lado, la relación entre el colesterol total y el libre es de nuevo constante pero, como cabía esperar, diferente de la obtenida para la mantequilla. Por lo tanto, el conocimiento de dicha relación permitiría determinar el contenido de colesterol total en la manteca de cerdo a partir de la concentración de colesterol libre, para lo que se necesita un tratamiento de la muestra mucho más sencillo y rápido.

IV.3.5.4.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE Y TOTAL EN YEMA DE HUEVO

El biosensor desarrollado se empleó así mismo para determinar colesterol en yema de huevo, al tratarse de un alimento conocido por los altos niveles de este compuesto que contiene. Ya que el colesterol se encuentra en la yema, se procedió en primer lugar a separar la yema de la clara. Como para las muestras anteriores, el tratamiento de la yema de huevo para la determinación del colesterol libre fue muy sencillo, no siendo siquiera necesario centrifugar, al quedar los extractos perfectamente claros y diferenciados. Sin embargo, la determinación del colesterol total supuso otra vez llevar a cabo la hidrólisis con KOH 1 mol l⁻¹ en metanol y posterior extracción del colesterol. Se recurrió de nuevo a la extracción con n-hexano, después de realizar la saponificación con KOH en metanol, ya que, debido sobre todo a la presencia de proteínas y de otros compuestos, cuando se trabajó con acetato de etilo directamente no se obtuvieron señales reproducibles. Por lo tanto, se procedió a eliminar primero las proteínas con ácido tricloroacético, y posteriormente a extraer el colesterol con tres porciones de n-hexano.

Tras mezclar los extractos, se evaporó el disolvente orgánico a sequedad en un rotavapor y el residuo sólido se disolvió completamente en las micelas inversas formadas por acetato de etilo, AOT 0.1 mol l⁻¹ y disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ (pH 7.4). Finalmente, se aplicó el método de adiciones estándar según se indica en el apartado

IV.3.4.3.4.c. de la Parte Experimental. Se utilizó la misma yema de huevo para la determinación de colesterol total y libre con el biosensor y con el método de referencia.

En la Figura 87 se recogen los registros *i-t* correspondientes a una de las muestras de yema de huevo analizadas, tanto para la determinación de colesterol libre (a) como de colesterol total (b) utilizando el método de adiciones estándar. Una vez alcanzada la estabilidad en la línea base, se añadió la cantidad apropiada del extracto de la muestra según se detalla en el apartado IV.3.4.3.4.c. de la Parte Experimental, realizándose después adiciones sucesivas de disolución patrón de colesterol

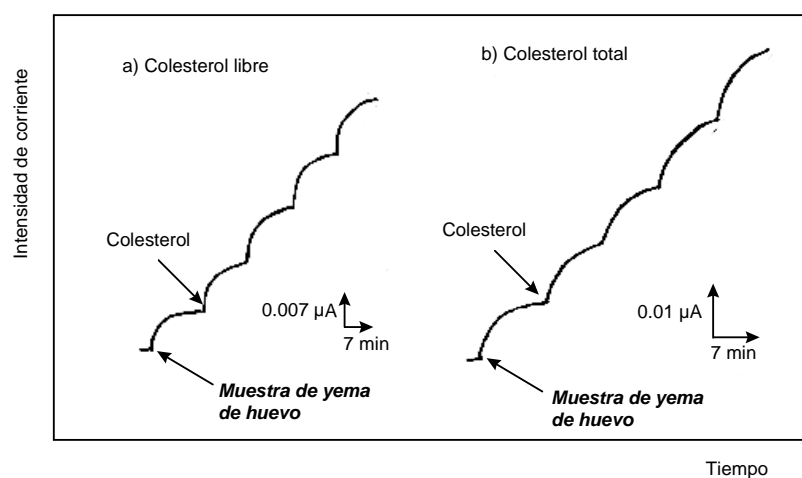


Figura 87. Curvas intensidad-tiempo obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en micelas inversas para el análisis de colesterol libre y colesterol total en una muestra de yema de huevo aplicando el método de adiciones estándar.. $E_{ap} = + 0.10$ V.

En la tabla 37 se muestran los resultados obtenidos con el electrodo enzimático y el método de referencia, para tres muestras diferentes de yema de huevo, llevándose a cabo tres determinaciones con cada una de las muestras.

La existencia de efecto matriz y, por tanto, la necesidad de emplear el método de adiciones estándar se comprobó comparando las pendientes obtenidas para la determinación de colesterol total ($648 \pm 16 \mu\text{A mol}^{-1}$ l) y libre ($198 \pm 3 \mu\text{A mol}^{-1}$ l) por el método de adiciones estándar, con el valor de la pendiente del calibrado con patrones ($269 \pm 4 \mu\text{A mol}^{-1}$ l). Se verificó la existencia de diferencias significativas entre los valores de las pendientes ($t_{\text{cal total}}=22.88$, $t_{\text{cal libre}}=13.20$, $t_{\text{tab}}=1.812$), por lo que se utilizó el método de adiciones estándar para la determinación de colesterol total y libre en yema de huevo.

Como puede verse en la Tabla 41, la determinación de colesterol libre en muestras de yema de huevo por el kit de Boehringer no fue posible debido a la turbidez de las disoluciones obtenidas usando 2-propanol como disolvente extractante.

Por otro lado, la comparación de los valores de la concentración de colesterol total obtenidos por ambos métodos aplicando el ensayo de la t de Student, permitió obtener un valor de t calculada de $t_{cal} = 1.73$, que es menor que el de la t tabulada ($t_{tab} = 2.306$), por lo que se pudo afirmar que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los dos métodos al nivel de significación de 0.05.

Tabla 37 . Resultados obtenidos en la determinación de colesterol libre y colesterol total en yema de huevo utilizando electrodos compósitos bienzimáticos de grafito-Teflón-COD-HRP-ferrocianuro en micelas inversas y mediante un kit de ensayo comercializado por Boehringer (n=3 cada muestra)

Electrodo compósito grafito-teflón-COD-HRP-ferrocianuro		
Muestra	Colesterol total (g/100 g yema huevo)	Colesterol libre (g/100 g yema huevo)
1	1,24 ± 0,04	0,71± 0,04
2	1,15±0,09	0,69±0,01
3	1,26 ± 0,09	0,78±0,01
Media	1,22± 0,07	0,72 ±0,03 g
Método de referencia		
Muestra	Colesterol total (g/100 g yema huevo)	Colesterol libre (g/100 g yema huevo)
1	1,24 ± 0,04	-
2	1,16 ±0,04	-
3	1,16±0,05	-
Media	1,19 ± 0,04 g	-

De nuevo, el empleo del biosensor bienzimático en micelas inversas permite un ahorro de tiempo y reactivos si se compara con los métodos empleados más frecuentemente para la determinación de colesterol, que están basados en reacciones enzimáticas en disolución con colesterol oxidasa y que necesitan largos períodos de incubación antes de realizar la medida analítica. Por otro lado, se observa nuevamente que existe una relación constante entre el nivel de concentración de colesterol libre y total, por lo que es posible realizar la determinación de colesterol libre, que es mucho más rápida y sencilla y aplicar después el factor correspondiente al tipo de muestra analizada para obtener el contenido de colesterol total.

A la vista de todos los resultados obtenidos con las distintas muestras, se puede deducir que el electrodo compósito de grafito-Teflón-colesterol oxidasa-peroxidasa-ferrocianuro es útil

para la determinación de colesterol libre y total en muestras de alimentos. El hecho de trabajar en un medio de micelas inversas, permite además solubilizar adecuadamente las muestras analizadas, siendo ésta una de las principales ventajas del método desarrollado, cuando se compara con el método de referencia empleado. Además de la exactitud de los resultados y el ahorro del tiempo de análisis y de reactivos que se consigue, la posibilidad de determinar el colesterol total a partir del contenido en colesterol libre aplicando un factor característico de las muestras simplifica enormemente el análisis, lo que convierte al biosensor bienzimático en una alternativa fiable y ventajosa al kit enzimático colorimétrico comercial, que es el método que se emplea de forma más general como referencia en los trabajos publicados en la bibliografía sobre la determinación de colesterol basada en la colesterol oxidasa.

IV.3.6. CONCLUSIONES

Todos los resultados comentados a lo largo de este capítulo demuestran que el electrodo compuesto de grafito-Teflón-COD-HRP-Ferrocianuro constituye un biosensor amperométrico robusto adecuado para el análisis de colesterol libre y total en alimentos. La compatibilidad del diseño de este biosensor con un medio predominantemente orgánico permite el empleo de micelas inversas como medio de trabajo para este propósito, lo que implica importantes ventajas desde un punto de vista analítico, cuando la extracción de colesterol de las muestras de alimentos se lleva a cabo con el mismo disolvente empleado para preparar las micelas inversas.

Además, cabe comentar lo novedoso de este trabajo dentro del campo de los biosensores amperométricos dado que, como hemos tenido oportunidad de comprobar en los antecedentes bibliográficos, existe una gran escasez de sensores electroquímicos desarrollados para el análisis de colesterol en medios no acuosos y capaz, además, de resolver de forma sencilla muestras tan complicadas como las que se han empleado en este trabajo.

IV.3.7. BIBLIOGRAFÍA BIOSENSOR DE COLESTEROL

- Bala, C., Rotariu, L.D, Magearu, V. (1997). "An amperometric sensor for cholesterol determination in bile". *J. Med. Biochem.* (12), 143-150.
- Besombes, J.L, Cosnier, S., Labbé, P., Reverdy, G. (1995). "Improvement of the analytical characteristics of an enzyme electrode for free and total cholesterol via laponite clay additives". *Analytica Chimica Acta* ; 317, 275-280.
- Bordier, C.G., Sellier, N., Focault, A.P., Le-Goffic, F. (1996). *Lipids*, 31(5), 521.
- Braco, L., Darós, J.A., De la Guardia, M. (1992). "Enzymatic flow injection analysis in nonaqueous media". *Anal. Chem.*, 64, 129.
- Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi, E.A.. (2001). "Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole hydrogel membrane". *Analytica Chimica Acta*, 448(1-2) :27-36.
- Brasco, L., Dabulis, K., Klibanov, A.M. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 274.
- Cassidy, J.F, Clinton, C., Breen, W., Foster, R., O'Donoghue, E. (1993). "Novel Electrochemical device for the detection of cholesterol or glucose". *Analyst*, Vol 118. 415-418.
- Charpentier, L., Murr, N.E. (1995). "Amperometric determination of cholesterol in serum with use of a renewable surface peroxidase electrode". *Analytica Chimica Acta* ; 318, 89-93.
- Gobi, K.V., Mizutani, F. 2001. "Layer by layer construction of an active multilayer enzyme electrode applicable for direct amperometric determination of cholesterol". *Sensors and Actuators B Chemical*. 80 (3) :272-277.
- Gupte, A., Nagarajan, R., Kilara, A. (1995). "Enzymatic Oxidation of Cholesterol in Reverse Micelles". *Ind. Eng. Chem. Res.* 34, 2910-2922
- Jiménez-Carmona, M.M., Luque de Castro, M.D. (1998). "Reverse Micelle Formation for Acceleration of the supercritical Fluid Extraction of cholesterol from food samples". *Anal. Chem.* 70, 2100-2103.
- Hahn, Y., Olson, C.L. (1979). "Amperometric enzymatic determination of total cholesterol in human serum with tubular carbon electrodes". *Analytical Chemistry*, Vol. 51, No.3 ; 444-448.
- Hall, G.F., Turner, A.P.F. (1991). "An organic phase enzyme electrode for cholesterol". *Analytical Letters*, 24(8), 1375-1388.

- Jiménez-Carmona, M.M., Luque de Castro, M.D. (1998). "Reverse micelle formation for acceleration or the supercritical fluid extraction of cholesterol from food samples". *Analytical Chemistry*, 70, 2100-2103.
- Kaplan, L.A., Pesce, A.J. (1988). "Química Clínica. Técnicas de laboratorio, Fisiopatología, Métodos de análisis". *Editorial Médica Panamericana*.
- Karube, I., Hara, K., Matsuoka, H., Suzuki, S. (1982). "Amperometric determination of total cholesterol in serum with use of immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase". *Analytica Chimica Acta*, 139, 127-132.
- Krug, A., Göbel, R., Kellner, R. (1994). "Flow-injection analysis for total cholesterol with photometric detection". *Anal. Chim. Acta*, 287, 59.
- Lee, M.J., Crook, T., Noel, C., Levinson, U.M. (1994). *Clin. Chem.*, 40(12)2230.
- Maraschiello, C., Diaz, Y., García-Regueiro, J.A. (1996). *J. High Resolut. Chromatogr.* 19(3), 165.
- Massom, M., Townshend, A. (1985). "Determination of cholesterol by flow injection analysis with immobilized cholesterol oxidase". *Anal. Chim. Acta*, 174, 293.
- Motonaka, J., Faulkner, L.R. (1993). "Determination of cholesterol and cholesterol ester with novel enzyme microsensors". *Anal. Chem.* 65, 3258-3261.
- Nakaminami, T., Ito, S.I., Kuwabata, S., Yoneyama, H. (1999). "Amperometric determination of total cholesterol at gold electrodes covalently modified with cholesterol oxidase and cholesterol esterase with use of thionin as an electron mediator". *Analytical Chemistry*. 71, 1068-1076.
- Piñeiro-Avila, G., Salvador A., De la Guardia, M. (1998). "Flow injection determination of free and total cholesterol in animal greases using enzymes in non-aqueous media". *Analyst*. Vol 123 (999-1003).
- Reviejo, A.J., Liu, F., Pingarrón, J.M., Wang, J. (1994). "Amperometric biosensors in reversed micelles". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 374, 133.
- Tatsuma, T., Watanabe, T. (1991). "Oxidase/peroxidase bilayer-modified electrodes as sensors for lactate, pyruvate, cholesterol and uric acid". *Analytica Chimica Acta*, 242, 85-89.
- Vaghela, M.N., Kilara, A. (1995). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72(10) 1117.
- Valencia-González, M.J., Díaz-García, M.E. (1994). "Enzymatic reactor/Room-temperature phosphorescence sensor system for cholesterol determination in organic solvents". *Anal. Chem.* 66, 2726-2731.
- Vidal, J.C., Espuelas, J., García Ruiz, E., Castillo J.R. (2002a). "A polymeric bilayer configuration for a cholesterol amperometric biosensor based on the combination of overoxidized polypyrrole and a polynaphthalene derivative". *Analytical Letters*, 35(5) :837-853.
- Vidal, J.C., García, E., Castillo, J.R. (1999). "In situ preparation of a cholesterol biosensor: entrapment of cholesterol oxidase in an overoxidized polypyrrole film electrodeposited in flow system. Determination of total cholesterol in serum". *Analytica Chimica Acta* ; 385, 213-222.
- Vidal, J.C., García, E., Castillo, J.R. (2001). "Design of multilayer cholesterol amperometric biosensor for preparation and use in flow systems". *Electroanalysis*. 13(3), 229-235.

- Vidal, J.C., García, E., Castillo, J.R. (2002b). "Development of a platinized and ferrocene-mediated cholesterol amperometric biosensor based on electropolymerization of polypyrrole in a flow system". *Analytical Sciences* ; 18(5) :537-542.
- Yao, T., Wasa, T. (1988). "Flow injection system for simultaneous assay of free and total cholesterol in blood serum by use of immobilized enzymes". *Analytica Chimica Acta*, 207, 319-323.
- Yamamoto, T., Ikeda, S., Yoshioka, T., Nankai, S., Iwata J., Joko, S. (1996). "Development of cholesterol sensor". *Chem. Sens.*, 12 (Suppl. A), 129-132.

IV.4. BIOSENSORES DE ALCOHOLES

OBJETIVO

Desarrollo y puesta a punto de biosensores amperométricos compósitos de grafito-Teflón y carbono vítreo reticulado-resina epoxi basados en las enzimas alcohol oxidasa (AOD) y peroxidasa (HRP) para la determinación de alcoholes en bebidas.

IV.4.2. INTRODUCCIÓN

La determinación de alcoholes en alimentos y bebidas es interesante desde muchos puntos de vista, como son el control de calidad para la detección de posibles alteraciones, los procesos naturales que controlan su obtención, o el efecto de los procesos tecnológicos en productos destinados al consumo humano. La determinación del contenido alcohólico de vinos y licores es quizá el campo de mayor interés dada la gran importancia de la producción y comercialización de estos productos. Desde el punto de vista industrial es muy importante la determinación del contenido alcohólico (etanol) en la monitorización de los procesos, sobre todo en la etapa de fermentación y en el control de calidad de bebidas de bajo contenido en alcohol entre otros, con objeto de obtener una calidad óptima del producto terminado. El interés por el contenido alcohólico en alimentos también se debe a otras razones unidas a sus propiedades y que contribuyen a las características de ese alimento. Ese es el caso, por ejemplo, de bebidas alcohólicas en las que el etanol, además de aumentar el tiempo de conservación y producir satisfacción sensorial, tiene además el papel de enfatizar los compuestos aromáticos aumentando su volatilidad. Este caso es similar para los alcoholes superiores, que en vinos tienen efecto en el bouquet (Amelio, 1996).

Por otro lado, dadas las propiedades tóxicas del metanol, es necesario un control de su concentración en bebidas que puedan contenerlo. Otro alcohol que se suele analizar es el 2-butanol, que en licores indica un estropeamiento de las bacterias en los triturados utilizados para destilaciones, mientras que alcoholes superiores indican salud y el origen botánico de los destilados.

También es importante conocer, por diferentes razones, el contenido de alcoholes en otros tipos de alimentos diferentes de las bebidas alcohólicas, como por ejemplo, en la leche, en la que las fracciones volátiles de alcoholes se utilizan como indicadores de calidad, o en aceites vegetales, en los que el componente volátil al que pertenecen los alcoholes se utiliza para evaluar la oxidación durante el almacenamiento.

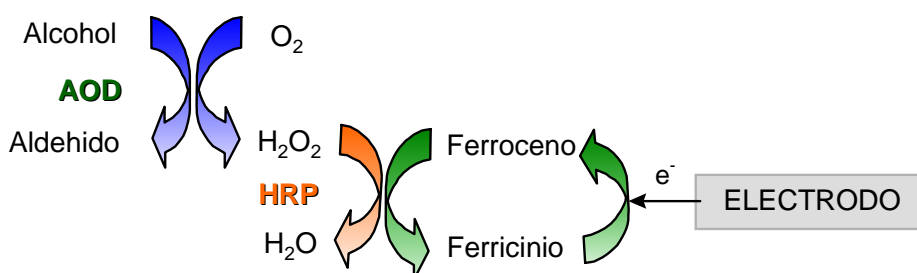
Muchos métodos para analizar alcoholes llevan a cabo la cuantificación a partir de destilados alcohólicos (especialmente cuando el alcohol predominante es el etanol) obtenidos a partir del producto a analizar. Algunos otros explotan las propiedades físicas de estos destilados que cambian en relación con el contenido alcohólico. Como ejemplos pueden citarse los métodos que emplean la cromatografía de gases o la cromatografía de líquidos de alta

eficacia, así como métodos electroquímicos basados en el uso de electrodos de platino y de oro o de electrodos de carbono vitrificado modificado (Cai et al., 1997). Con menos frecuencia se emplean métodos analíticos basados en espectrofotometría, refractometría y electroforesis capilar, tan solo para la determinación de trazas de alcoholes alifáticos. La mayoría de estos métodos presentan limitaciones para determinar bajas concentraciones de alcoholes (Mizgunova et al., 1998), como son la preparación de la muestra en el caso de los métodos cromatográficos o un elevado sobrepotencial de oxidación sobre la superficie de los electrodos cuando se trabaja con detección electroquímica. Dentro de los numerosos métodos de análisis que existen para la determinación de alcoholes, principalmente etanol, los enzimáticos en general son los que proporcionan mejores resultados, ya que emplean una instrumentación sencilla y proporcionan alta sensibilidad y selectividad y tiempos de respuesta cortos.

La enzima alcohol oxidasa (AOD) es específica de alcoholes alifáticos de bajo peso molecular (C1-C6) y cataliza la reacción de oxidación de dichos alcoholes a sus correspondientes aldehidos en presencia de oxígeno (Vijayakumar et al., 1998). Esta enzima difiere en especificidad no solo por la fuente microbiana de la que procede, sino que hay casos en los que incluso procediendo de la misma fuente posee diferentes características dependiendo de la casa comercial que las proporcione. Algunas de las fuentes más empleadas son : *Hansenula polymorpha*, *Candida Boidinii* y *Pichia Pastoris*, que resulta ser la más activa, pero quizá la menos estable. Estas enzimas tienen estructuras similares, conteniendo 8 subunidades y un peso molecular total de 600000 Da (Woodward, 1990). Como ocurre con casi todas las oxidasas, la determinación del alcohol correspondiente puede realizarse monitorizando la cantidad de oxígeno consumido, la cantidad de peróxido de hidrógeno generado o el aldehído formado. Además de los alcoholes, esta enzima puede llegar a responder a la oxidación de aldehidos (como formaldehído, acetaldehído, etc.) (Korpan et al., 2000 ; Dzyadevych et al., 2001) y ácidos carboxílicos (como ácido láctico, acético, etc.) (Nanjo y Guilbault, 1975), lo que hace que en muchas ocasiones en las que se requiera utilizar esta enzima en un sistema detector con muestras reales que contengan estos compuestos, sea necesario acoplar un sistema cromatográfico en el que se puedan separar todos los posibles interferentes antes de alcanzar el detector.

Otra enzima muy empleada para la determinación de alcoholes, pero más específica del etanol, es la alcohol deshidrogenasa (específica de alcoholes aromáticos y alcoholes alifáticos primarios diferentes del metanol). Esta enzima requiere la presencia de la forma β de la nicotinamida adenin dinucleótico (NAD^+) para ser activa, lo que supone que el empleo de ADH en biosensores amperométricos, requiera la aplicación de un elevado sobrepotencial necesario para oxidar al NADH sobre el electrodo y que sea necesario el empleo casi obligado de mediadores. Además, suelen presentar un tiempo de vida corto debido a que el NAD^+ ensucia la superficie de los electrodos.

En este capítulo se han desarrollado dos biosensores bienzimáticos para alcoholes, uno de grafito-teflón- AOD- HRP- ferroceno, y otro de RVC-Resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno en los que se encuentran implicadas dos reacciones enzimáticas. La reacción enzimática principal es la oxidación del alcohol que, catalizada por la enzima alcohol oxidasa (AOD), genera el aldehído correspondiente según el alcohol determinado y peróxido de hidrógeno como productos de reacción. Aprovechando el peróxido de hidrógeno formado se acopla como reacción enzimática secundaria la reducción del mismo catalizada por la peroxidasa (HRP), empleando ferroceno como mediador, monitorizando electródicamente la reducción de ferricinio a ferroceno.(Esquema 13)



Esquema 13

Estos biosensores se aplicaron a la determinación de etanol y metanol en bebidas alcohólicas. Las bebidas alcohólicas se elaboran a partir de líquidos azucarados sometidos a fermentación alcohólica. Los azúcares fermentables por las levaduras, o bien se hallan presentes como tales, o se generan a partir de materias primas mediante procesado, es decir, por escisión hidrolítica de almidones y dextrinas, disacáridos, etc. Las bebidas más importantes son cerveza, vino y aguardiente (Belitz y Grosch, 1992), que son las tres muestras que se analizaron con uno de estos biosensores.

- La *cerveza* es la bebida resultante de la fermentación del mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, cocción y aromatizado con flores de lúpulo, sus extractos y concentrados. El mosto comienza su fermentación en cervezas gracias a la acción de las levaduras añadidas. Las levaduras usan los azúcares del mosto en su crecimiento y multiplicación, dando como resultado la formación de alcohol etílico y anhídrido carbónico (Madrid et al.).
- Según el Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes, el *vino* es la bebida resultante de la fermentación alcohólica completa o parcial de la uva fresca o del mosto. Su graduación alcohólica natural no será inferior a nueve grados, salvo para los vinos enverados, chacolís y vinos dulces naturales. La concentración de etanol en el vino es muy variable. Los vinos de mesa normales contienen entre 55 y 110 g/l ; los vinos ligeros contienen entre 55 y 75 g/l, y los vinos buenos y muy buenos 90-110 g/l. Un contenido de alcohol superior a 144 g/l indica que se agregó etanol. El metanol en los vinos procede de la desmetilación de las pectinas por la pectín-metil-esterasa (Gnekow y Ough, 1976), y su concentración depende

fundamentalmente del grado de maceración de los hollejos (González Raurich, 1986). De cualquier modo, el metanol se halla siempre en muy pequeña cantidad en el vino (38-200 mg/L), como producto de degradación de las pectinas. (Belitz y Grosch, 1992).

- El *aguardiente* se conoce comúnmente como una bebida espirituosa que, por destilación, se saca del vino y de otras sustancias, aunque también puede ser alcohol diluido en agua. Los aguardientes elegidos como muestra para la determinación de etanol y metanol con el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno se ajustan a la definición de aguardientes compuestos que da el Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes (Real Decreto 835/1972). Estos productos son elaborados con aguardientes simples o con otros alcoholes naturales o sus mezclas, aromatizados directamente o en el momento de su redestilación, rebajados con agua y añejados o no, y a los que se les puede incorporar mosto, sacarosa o caramelo. Su graduación alcohólica no será inferior a 30° (lo que corresponde a un contenido de 240 g/l), ni su contenido en azúcares totales, expresado en sacarosa, superior a 100 g/L. Se consideran aguardientes compuestos los aguardientes de frutas, hierbas, cereales, leguminosas, tubérculos, de orujo, etc. Para el trabajo que se presenta en esta Memoria, se eligieron dos tipos de aguardiente de fabricación casera, a los que nos referiremos a lo largo de la Memoria como *orujo blanco* y *orujo de hierbas* para emplear la denominación del lugar de procedencia (Galicia). Los aguardientes, además de etanol, contienen gran número de componentes volátiles que proceden de las materias primas utilizadas o son productos secundarios de la fermentación, entre los que se encuentra el metanol (Belitz y Grosch, 1992). Es importante controlar el contenido de metanol sobre todo en licores destilados puesto que posee propiedades tóxicas que hacen que sea necesario un control de su concentración en las bebidas que puedan contenerlo (Amelio, 1996). El contenido máximo de metanol permitido es de 1.0 g por litro de producto terminado, con excepción de algunos aguardientes que pueden llegar a tener hasta 5 g/l (aguardiente de pera). (Real Decreto 1416/82).

IV.4.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Aunque la mayoría de los sensores basados en la alcohol oxidasa están basados en sistemas de transducción óptica o amperométrica, también se han empleado como

transductores sensores térmicos (Rank et al., 1993). Los sensores ópticos requieren siempre una derivatización del compuesto a monitorizar, por lo general el peróxido de hidrógeno, por lo que los biosensores amperométricos siempre resultan ser más ventajosos porque pueden monitorizar directamente tanto el oxígeno consumido como el peróxido de hidrógeno generado.

En la Tabla XV se recogen algunos de los artículos más relevantes publicados en los últimos años de biosensores amperométricos basados en la alcohol oxidasa. Entre estos trabajos, hay varios en los que se demuestra lo comentado anteriormente sobre la reactividad de la alcohol oxidasa con compuestos diferentes de los alcoholes (Nanjo y Guilbault, 1975). Utilizando tanto alcohol oxidasa como levadura de *Hansenula polymorpha* (Korpan et al., 2000) se puede determinar formaldehído empleando un IFSET con el que además consiguen que no haya respuesta potenciométrica a alcoholes primarios, incluido el metanol. Son varios los trabajos enfocados a comparar el comportamiento de diferentes alcohol oxidasas (Vijayakumar et al., 1996), incluso en algunos trabajos aplicado a muestras reales, como vino (Patel et al., 1998) o en los que se estudia cuáles reaccionan mejor con alcoholes de diferente longitud de cadena alifática (Burfeind, et al., 1996).

Como se refleja en la tabla, las matrices electródicas más comunes en el desarrollo de electrodos de alcohol oxidasa son grafito, carbono vitrificado, platino y pasta de carbono, y es destacable la necesidad de añadir modificadores o aditivos para aumentar la estabilidad de la enzima. Quizá sea destacable el hecho de que los sensores basados en alcohol oxidasa se aplican mucho a muestras reales. Evidentemente abundan los trabajos de determinación de alcoholes en bebidas alcohólicas, aunque también está bastante extendida la utilización de estos biosensores para la monitorización de procesos de fermentación, cuya aplicación más generalizada es la que requiere la determinación de etanol, aunque también existen algunos cultivos en los que el control de metanol es primordial (Guarna et al., 1997). Ya que en el siguiente capítulo de esta Memoria se profundiza en la multidetección de analitos, en esta tabla no se han incluido muchos de los trabajos encontrados en los que se monitorizan varios compuestos a la vez, principalmente en los procesos de fermentación, en los que se monitoriza fundamentalmente etanol, glucosa y ácido láctico.

En algunos trabajos la determinación de los alcoholes se lleva a cabo en fase gaseosa, lo que resulta muy interesante para controles de alcoholemia (Mitsubayashi et al., 1994), o por ejemplo, utilizando células enteras de alga como fuente de la enzima (Naessens y TranMinh, 1998), lo que permite determinar metanol en fase gaseosa sin atrapar previamente los analitos en disolución. Una aplicación muy interesante también, en la que se detecta etanol en forma gaseosa, es la realizada con un kit de etanol basado en alcohol oxidasa y peroxidasa (Smyth et al., 1999). En este trabajo se evalúa el etanol que se produce en la fermentación de frutas y verduras envasadas defectuosamente por efecto del oxígeno, con objeto de determinar si el

empaquetado se ha efectuado de forma correcta.

Otra aplicación interesante de los biosensores de AOD es el acoplamiento de reacciones enzimáticas que producen metanol, con el fin de determinar componentes o aditivos de los alimentos. El aspartamo, por ejemplo, se utiliza como endulzante artificial y su determinación con biosensores se basa en el empleo de α -cimotripsina a través de la cual se genera metanol que se monitoriza por medio de su oxidación con alcohol oxidasa (Compagnone et al., 1997). Otro ejemplo es el de la pectina, que abunda en frutas, vegetales, es un material esencial en jamón y gelatinas y es la mayor fuente de fibra en las dietas. Para su determinación, la enzima pectinesterasa (E.C. 3.1.1.11) genera pectato y metanol que se mide también a través de la enzima alcohol oxidasa (Horie y Rechnitz, 1995).

IV.4.4. PARTE EXPERIMENTAL

IV.4.4.1. INSTRUMENTACIÓN

IV.4.4.1.1. APARATOS

Las medidas amperométricas en discontinuo y mediante análisis por inyección en flujo se realizaron con un potencióstato BAS LC-4C (Bioanalytical Systems, Inc) conectado a un registrador x-t Linseis L250 E. En algunos casos se utilizó un módulo de baja corriente BAS LC-3D. Para las medidas realizadas en cromatografía líquida se empleó un detector electroquímico

EG&G Princeton Applied Research Modelo 400 usando un ordenador equipado con el software Biochrom 200 3.0 para la adquisición de datos.

El sistema de inyección en flujo estuvo constituido por una bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls-3 y una válvula de inyección de volúmenes variables Rheodyne modelo 5020. Para los experimentos de cromatografía líquida se utilizó una bomba JASCO PU-980 y una válvula de inyección Rheodyne 7725i. La columna utilizada en cromatografía líquida fue una Hypersil^R ODS 125x4 mm d.i. con un tamaño de partícula de 5 μm .

Otros aparatos utilizados fueron: agitador magnético Ikamag Ret, pH-metro de precisión Metrohm E-510 calibrado de forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.00 y 7.02 a 25.0 ± 0.5 °C, prensa de infrarrojos Carver y estufa P-Selecta.

Para las medidas realizadas por espectrofotometría se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible de matriz de diodos HP 8453 y HP 8452 A.

IV.4.4.1.2. ELECTRODOS Y CÉLULAS DE TRABAJO

Los electrodos empleados fueron :

- Electrodos compósitos enzimáticos de grafito-Teflón-alcohol oxidasa-peroxidasa-ferroceno y de RVC-resina epoxi-alcohol oxidasa-peroxidasa-ferroceno preparados como se indica en el apartado IV.4.3.3.2.
- Electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl (3 M) BAS RE-1 utilizada tanto en discontinuo como para las medidas en FIA y en cromatografía líquida.
- Electrodo auxiliar de punta de platino.

Como células de trabajo se utilizaron una célula electroquímica BAS modelo VC-2 para las medidas realizadas en discontinuo y una célula de tipo “wall-jet” de gran volumen para las medidas efectuadas mediante análisis por inyección en flujo y cromatografía líquida con detección amperométrica (Figura 1 del apartado III.4.1.2.).

IV.4.4.2. REACTIVOS

Para la preparación del electrodo compósito enzimático de grafito-Teflón se utilizó :

- Grafito Ultra “F” purity (Carbone of America) como fase conductora.
- Teflón (politetrafluoroetileno) (Aldrich), como fase aislante.

Para la preparación del electrodo compósito de RVC-resina epoxi se empleó:

- Carbono vítreo reticulado (RVC) 2x1-100 ppi (Energy Research & Generation Inc.), como fase conductora.

- Resina epoxi [bisfenol-A y N(3-dimetilaminopropil)-1,3-propilendiamina] (Araldit), como fase aislante.

Como elementos comunes a ambos electrodos se utilizaron :

- Alcohol oxidasa (AOD) EC 1.1.3.13 (de *Pichia Pastoris*), de actividad 1430 unidades por ml (55 mg de proteína/ml y 26 U/mg proteína).
 - Peroxidasa (HRP) EC 1.11.1.7 (Type II-from Horseradish) de actividad 180 unidades por miligramo de sólido (Sigma).
 - Ferroceno (Merck) , como mediador.
- Como sustratos se emplearon : metanol para HPLC (Scharlau), etanol para HPLC (Scharlau), 1-Propanol (Prolabo), 2-Propanol (isopropanol) (Panreac), 1-Butanol (Montedison), isobutanol (2-metilpropan-1-ol) (Hopkin y Williams), y 1-pentanol (alcohol n-amílico) (Scharlau).
 - Otros reactivos empleados fueron: fosfato disódico anhidro (Panreac) y fosfato monosódico dihidratado (Merck) para preparar las disoluciones reguladoras.
 - Para el estudio de interferencias se utilizaron: D(-)Fructosa (Sigma), ácido tartárico (Merck), ácido málico (Merck), ácido cítrico (Merck), ácido succínico (Merck), ácido acético (Carlo Erba), ácido fórmico (Carlo Erba) y ácido láctico (Sigma).
 - Para la aplicación de los métodos de referencia se emplearon: dicromato potásico (Probus), sulfato amónico ferroso (Panreac), ferroina (Panreac), ácido cromotrópico (Merck), permanganato potásico (Probus) y sulfito sódico (Merck). Todos los reactivos utilizados han sido de calidad para el análisis.

Las muestras analizadas fueron cerveza con alcohol “Mahou” (4.8% Vol.) y cerveza de bajo contenido en alcohol “Kaliber” (<1% Vol.), vino blanco y vino tinto de mesa “El Sotillo” (12% Vol.), orujo blanco y orujo de hierbas adquiridos en un supermercado.

El agua empleada en todos los casos se obtuvo mediante purificación en un sistema Millipore Milli-Ro.

IV.4.4.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

IV.4.4.3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4 : Se preparó disolviendo las cantidades apropiadas de las sales disódica y monosódica, ajustando posteriormente el pH con NaOH 2 mol l⁻¹. Esta misma disolución se empleó como disolución portadora para las medidas en flujo. La fase móvil utilizada en HPLC fue una disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l⁻¹ de pH 7.4.

- Las disoluciones patrón de cada alcohol se prepararon disolviendo el volumen apropiado de cada alcohol en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} para obtener una concentración 0.10 mol l^{-1} . Las disoluciones más diluidas se prepararon por dilución adecuada con la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, o en la fase móvil cuando se trabaja en HPLC.

Otras disoluciones fueron:

- Disolución de dicromato potásico 0.115 mol l^{-1} : Se disolvieron 33.768 g de reactivo en un litro de agua.
- Disolución de sulfato amónico ferroso 0.344 mol l^{-1} : Se disolvieron 135.1 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado en un litro de agua. Esta disolución se normalizó diariamente con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.
- Disolución de ácido cromotrópico: Se pesaron 50 mg de ácido cromotrópico disolviéndose en 35 ml de agua y 75 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- Disolución de permangato potásico al 5% (p/v)
- Disolución de sulfito sódico 2% (p/v)

IV.4.4.3.2. PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS COMPÓSITOS BIENZIMÁTICOS PARA ALCOHOLES

IV.4.4.3.2.1. Electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno :

Se mezclaron 0.28 g de grafito y 0.014 g (2700 U) de peroxidasa, ambos pesados exactamente, y 200 μl (286 U) de alcohol oxidasa mediante agitación mecánica durante 3 horas en una suspensión de 0.4 mL de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 a una temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Tras la agitación, se evaporó el agua por paso de una corriente de argón, añadiéndose seguidamente 0.016 g de ferroceno, pesados exactamente, en 0.4 ml de acetato de etilo. La mezcla resultante se agitó mecánicamente durante aproximadamente 15 minutos, evaporándose a continuación el acetato de etilo por paso de una corriente de Argón. Posteriormente se mezcló manualmente el grafito modificado con las enzimas y el mediador (lo que supone una cantidad de 0.3 g) con 0.7 g de Teflón (todas estas cantidades pesadas exactamente). La mezcla se prensó en forma de pastillas utilizando una prensa de IR, aplicando una presión de 10.000 Kg/cm^2 durante 10 minutos. La pastilla así obtenida (pastilla madre) tenía 1.3 cm de diámetro y 0.4 cm de espesor. Se prepararon a continuación pastillas más pequeñas, de 3 mm de diámetro, con ayuda de un troquel, montándose el electrodo de la forma esquematizada en el apartado III.5.2.

IV.4.4.3.2.2. Electrodo de RVC-Resina Epoxi-AOD-HRP-ferroceno :

Antes de preparar el electrodo, fue necesario pretratar el RVC de forma análoga a como se explicó en el apartado III.6.2. para la fabricación de un electrodo de RVC-resina epoxi monoenzimático. Una vez pretratado el RVC, la fabricación del electrodo bienzimático se realizó como se indica a continuación :

Se preparó una disolución de ferroceno $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ en acetonitrilo y se sumergió el RVC en un volumen de 150 μl de esta disolución durante 15 minutos. A continuación se evaporó el disolvente por paso de una corriente de Argon. Mediante este procedimiento se adsorbieron 0.5 mg de ferroceno en el cilindro de RVC. Posteriormente el RVC, modificado ya con el ferroceno, se sumergió durante 30 minutos en una disolución de tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 que contenía 270 U de peroxidasa y 50 U de alcohol oxidasa. A continuación, se evaporó también la disolución reguladora por paso de una corriente de Argon. Tras la inmovilización de las enzimas y el ferroceno, se procedió al llenado de los poros de RVC, que previamente se ha colocado en uno de los extremos del tubo de vidrio que se utiliza como soporte, mediante succión lenta de la resina epoxi aplicando vacío. Una vez que la resina alcanzó aproximadamente la mitad de la altura del cilindro de RVC se desconectó la bomba de vacío, procediéndose al curado de la resina durante 15 horas a T^{a} ambiente.

La parte de RVC libre de resina epoxi se utilizó para establecer el contacto eléctrico con el resto del electrodo mediante un hilo de cobre tal y como se mostraba en la figura 35 del apartado III.6.2.

A continuación se retiró la resina epoxi que cubría la superficie inferior del cilindro de RVC mediante un corte transversal con un escarpelo hasta alcanzar la superficie con carbono puliéndose, por último, esta superficie con papel abrasivo de SiC durante 5 s, teniendo de este modo la superficie electródica en condiciones de llevar a cabo las medidas amperométricas.

Cuando fue necesaria la obtención de una nueva superficie electródica tras el uso continuado del electrodo enzimático, éste se pulió con papel abrasivo de SiC durante 5 s. El biosensor se almacenó a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en seco después de su utilización durante una jornada de trabajo.

IV.4.4.3.3. OBTENCIÓN DE LOS AMPEROGRAMAS EN DISCONTINUO

Tras permitir que el biosensor alcance la temperatura ambiente, se sumergió en la célula de medida que contenía 5.0 ml de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, agitándose mecánicamente de forma constante. Tras aplicar el potencial deseado (0.00 V) y permitir la estabilización de la corriente de fondo, se añadió con una micropipeta el volumen deseado de la disolución patrón del compuesto a estudiar, y se registró la corriente hasta alcanzar el estado estacionario. Se siguieron realizando adiciones de pequeños volúmenes con la micropipeta hasta que se obtuvieron todas las señales deseadas. Entre uno y otro experimento no fue necesario someter al electrodo a ningún tratamiento físico ni químico.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos se efectuaron adiciones sucesivas del mismo volumen de la disolución patrón correspondiente hasta no obtener variación apreciable en la intensidad de corriente en estado estacionario.

IV.4.4.3.4. MEDIDAS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

El electrodo enzimático se colocó en la célula de flujo tipo “wall-jet”, de gran volumen, por donde circula el regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 utilizado como disolución portadora. A través de la válvula se inyectó la disolución del analito en la corriente del portador y se registraron las señales amperométricas al valor del potencial aplicado.

IV.4.4.3.5. OBTENCIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS EN HPLC

Se hizo circular la fase móvil por el sistema cromatográfico, aumentando el caudal de forma progresiva hasta obtener el valor escogido, 1.0 ml min^{-1} (P : 1000 PSI). Se aplicó al electrodo de trabajo un potencial de 0.00 V, esperándose el tiempo necesario para obtener una corriente de fondo estable. Se inyectó entonces el volumen apropiado de la disolución de trabajo, registrándose el cromatograma correspondiente.

IV.4.4.3.6. DETERMINACIÓN DE ALCOHOLES EN BEBIDAS

IV.4.4.3.6.1. Preparación de las muestras

IV.4.4.3.6.1.1. Determinación de etanol en cervezas, vinos y aguardientes

La determinación de etanol en todas las bebidas requirió únicamente una dilución como tratamiento de la muestra.

- **Cervezas** : Para las medidas en discontinuo, en el caso de la cerveza con alcohol, se tomaron 1.2 ml y se diluyeron a 5.0 ml con la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Para la cerveza sin alcohol, se tomaron 2.9 ml y se diluyeron a 5.0 ml con la misma disolución reguladora de fosfato.

Para las medidas en flujo, se tomaron 10 μl de cerveza con alcohol y se diluyeron a 10.0 ml con la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Para la cerveza sin alcohol, se tomaron 5.6 ml y se diluyeron también a 10.0 ml con la disolución reguladora.

- **Vinos** : Ya que tanto el vino tinto como el vino blanco poseían el mismo contenido alcohólico (12% vol.) se realizó la misma dilución para ambas muestras. Se tomaron 35 μl del vino correspondiente y se diluyeron a 5.0 ml con la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.
- **Aguardientes** : El contenido alcohólico en estas muestras es tan similar, que se realizó la misma dilución para cada uno de los aguardientes, tomándose 10 μl de orujo y llevándose a 5.0 ml con la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

IV.4.4.3.6.1.2. Determinación de metanol en vinos y aguardientes

Al igual que en el caso anterior, el único tratamiento al que hubo que someter a la muestra fue una simple dilución.

- **Vinos** : Se tomaron 500 μl y se diluyeron a 5.0 ml con la fase móvil utilizada para los experimentos de HPLC.
- **Aguardientes** : Se diluyeron 100 μl de cada uno de los orujos en 5.0 ml de fase móvil.

IV.4.4.3.6.2. **Obtención de los amperogramas para la determinación de alcoholes**

IV.4.4.3.6.2.1. Determinación de etanol en cervezas

a) Amperogramas en discontinuo

- *Método de adiciones estándar*

Se transfirieron 5 μl de disolución para la cerveza con alcohol y 10 μl para la cerveza sin alcohol, preparadas como se indicó en el apartado anterior, a la célula de medida que contenía 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, con agitación mecánica constante, aplicando un potencial constante de 0.00 V. Se registró la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. A continuación se realizaron adiciones sucesivas de alícuotas de 5 μl de una disolución patrón de etanol 0.10 mol l^{-1} sobre la misma célula obteniéndose las señales correspondientes.

- *Método de calibración externo*

La determinación se llevó a cabo construyendo un calibrado en el intervalo de concentración 1.0×10^{-4} - 6.0×10^{-4} mol l^{-1} , en el medio constituido por 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. A continuación, sobre una nueva disolución de trabajo se realizó la adición de una alícuota de la disolución que contenía la muestra, registrándose la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. La concentración de etanol se obtuvo por interpolación de la señal amperométrica obtenida en la recta de calibrado.

b) Inyección en flujo con detección amperométrica

- *Método de adiciones estándar*

Se tomaron volúmenes iguales de la disolución a analizar y se añadieron a todos excepto a uno (adición cero) cantidades conocidas de etanol, de forma que se cubriera el margen de linealidad, enrasándose al mismo volumen con disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Tras esperar el tiempo necesario para alcanzar una línea base estable, se realizaron inyecciones de 50 μl de cada disolución en el portador empleándose el mismo potencial mencionado anteriormente para la detección amperométrica.

- *Método de calibración externo*

Se prepararon, a partir de la disolución patrón de etanol, disoluciones de concentraciones que cubrían el margen de linealidad. Se hicieron inyecciones de cada una de ellas, obteniéndose el diagrama correspondiente. La representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de etanol permitió obtener la recta de calibrado. A continuación se hicieron inyecciones de la disolución de muestra preparada según se indica en el apartado IV.4.4.3.6.1.1. La medida de intensidad de la señal amperométrica obtenida se interpoló en la recta de calibrado.

IV.4.4.3.6.2.2. Determinación de etanol en vinos y aguardientes

En ambos casos se utilizó el método de adiciones estándar. Así, se añadió una alícuota de 20 μl de cada una de las disoluciones de muestra, preparadas como se indica en el apartado IV.4.4.3.6.1.1. a la célula de medida conteniendo 5.0 ml de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. Aplicando un potencial de 0.00 V, se registró la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario, añadiéndose a continuación alícuotas de 20 μl de una disolución patrón de etanol de concentración 0.01 mol l^{-1} hasta obtener todas las señales requeridas.

IV.4.4.3.6.2.3. Determinación de metanol en vinos y aguardientes

El análisis de metanol en bebidas se realizó por cromatografía líquida, por lo que su determinación se hizo, utilizando un calibrado externo. Para ello, se inyectaron 50 μl de las muestras diluidas en las proporciones que ya se comentaron en el apartado IV.4.4.3.6.1.2., registrándose el cromatograma correspondiente con un caudal de la fase móvil de 1.0 ml min^{-1} y un potencial de detección de 0.00 V. La concentración de metanol se obtuvo por interpolación de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos para cada muestra en la recta de calibrado respectiva.

IV.4.4.3.6.2.4. Determinación de etanol en bebidas alcohólicas por un método de referencia.

a) *Determinación de etanol en cervezas y aguardientes*

Como método de referencia para determinación de etanol en cervezas y aguardientes caseros, se utilizó un kit enzimático comercial suministrado por Boehringer, basado en la detección colorimétrica de NADH. La muestra no necesita ningún tratamiento previo. El etanol es oxidado a acetaldehído en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) por el cofactor nicotinamida adenin dinucleótido (NAD^+). El equilibrio de esta reacción está desplazado hacia el etanol y NAD^+ , pero puede desplazarse totalmente a la derecha en condiciones alcalinas y por atrapamiento del acetaldehído formado.

Para ello, el acetaldehído es oxidado cuantitativamente en presencia de alcohol deshidrogenasa (Al-DH) a ácido acético, el NADH formado se determina por colorimetría a una longitud de onda de 334,340 o 365 nm.

Para realizar las medidas por este método se requieren los siguientes reactivos:

- Reactivo 1: Disolución tampón de difosfato potásico a pH aproximado de 9.0.
- Reactivo 2: Tabletas de NAD⁺, cada una contiene aproximadamente 4 mg de acetaldehído deshidrogenasa, 0.8 U
- Reactivo 3: Suspensión de ADH, aproximadamente 7000 U.
- Reactivo 4: Disolución estándar de etanol.

A partir de estos reactivos, el procedimiento es el siguiente:

- Disolución blanco: En una cubeta se adicionan 3.000 ml del reactivo 1, se añade una tableta del reactivo 2 y 0.1000 ml de agua Milli-Q. Se mezcla y se mide la absorbancia (A_1) pasados 3 minutos. Después se añaden 0.050 ml del reactivo 3 y se vuelve a medir la absorbancia (A_2) después de 5 minutos, una vez que ha finalizado la reacción.
- Disolución de muestra: Se sigue el mismo método que el anterior, pero se añaden 0.1000 ml de muestra en vez de agua Milli-Q.

La diferencia de absorbancia $\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$ puede relacionarse con la concentración de etanol en la muestra.

b) Determinación de etanol en vinos

Para evitar los problemas de interferencia que podrían ocasionarse por la coloración del vino utilizando el kit enzimático como método de referencia se empleó un método tradicional como es el de la determinación de alcohol en vinos por oxidación con dicromato (Hart y Fisher, 1991). El procedimiento seguido es el siguiente : se vierten 25 ml de vino en un matraz de destilación y se añaden 50 ml de agua. Se destilan 50 ml, como mínimo, lentamente, recogiendo el destilado en un matraz de 250 ml que contenga alrededor de 100 ml de agua. Una vez finalizada la destilación, se enrasa con agua. Por otro lado, a 20 ml de la disolución patrón de dicromato potásico mencionada en la sección de reactivos, se añadieron 10 ml de H₂SO₄ concentrado, agitándose y enfriándose hasta temperatura ambiente. Se añaden 10 ml del destilado agitando suavemente, se tapa herméticamente el matraz y se deja reposar durante 15 minutos. A continuación se añaden 325 ml de agua, 35 ml de H₃PO₄ al 85 % y 1 ml del indicador (ferroina), y se valora con sulfato amónico ferroso (que había sido normalizado previamente con el mismo dicromato) hasta cambio de color del indicador. El contenido alcohólico del vino en porcentaje, viene dado por la expresión : % alcohol = $20 \times (1 - n/N) \times (\text{ml destilado recogido}) / (\text{ml de destilado oxidados} \times \text{ml de vino destilados})$, donde n = volumen de la disolución reductora empleado y N = Normalidad de la disolución reductora.

Si destilaron 25 ml de vino, se enrasó el destilado a 250 ml, y se oxidaron 10 ml de destilado, la fórmula se reduce a :

$$\% \text{ alcohol (v/v)} = 20 \times (1 - n/N)$$

c) Determinación de metanol en bebidas alcohólicas

En esta ocasión se recurrió a un método espectrofotométrico usualmente empleado por la O.I.V. ("Recopilación de los métodos internacionales de análisis de vinos". O.I.V. Publicaciones del Ministerio de Agricultura) para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas. Se destilan 200 ml de la bebida en cuestión y se diluye el destilado recogido según el grado alcohólico :

10-12% : se toman 100 ml del destilado y se diluye a 200 ml : f=2

12-15% : se toman 100 ml del destilado y se diluye a 250 ml : f=2.5

>15% : se toman 100 ml del destilado y se diluye a 300 ml : f=3, 25-35% :f=6, 35-45% : F=8

Se toman tantos tubos de ensayo como muestras a analizar, además de uno para el patrón y otro para el blanco. En cada tubo se colocan 0.5 ml del destilado, en el del patrón 0.5 ml del patrón (metanol al 0.025% v/v) y en el tubo del blanco 0.5 ml de blanco (etanol al 5% v/v), que es además la solución de dilución. A continuación se añade una gota de ácido fosfórico y 2 gotas de permanganato potásico a cada tubo. Se tapan los tubos y se dejan en reposo durante 10 minutos. El exceso de permanganato se decolora con unas gotas de sulfito sódico. Se añaden 5 ml del ácido cromotrópico y se calienta en baño de agua durante 20 minutos a 70 °C. Se miden las absorbancias de estas disoluciones a 570 nm ajustando el cero con el tubo del blanco.

El porcentaje de metanol viene dado por la expresión :

$$\% \text{ Metanol} = (\text{Absorbancia del problema} / \text{Absorbancia del patrón}) \times 0.025 \times f$$

IV.4.5. ELECTRODO COMPÓSITO DE GRAFITO-TEFLÓN-ALCOHOL OXIDASA-PEROXIDASA-FERROCENO

IV.4.5.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

La optimización de las distintas variables se llevó a cabo mediante amperometría a potencial constante en disoluciones agitadas a una velocidad controlada. En todos los casos se utilizó metanol como sustrato.

IV.4.5.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ELECTRODO COMPÓSITO

Como ya ha ocurrido con el resto de electrodos bienzimáticos desarrollados a lo largo de esta Memoria, tanto el porcentaje de teflón (70%), como la cantidad de peroxidasa y de ferroceno (1.5% y 1.6%, respectivamente) fueron las mismas que las optimizadas para el electrodo compuesto de grafito-Teflón-HRP-ferroceno descrito en el capítulo III.5.3.1. Además, se optimizó el contenido de AOD en la matriz electródica construyendo diferentes biosensores compósitos que contenían distintas cantidades de alcohol oxidasa : 28.6, 100 y 286 U. En la Figura 88 se representan los resultados obtenidos, apreciándose como la señal amperométrica aumentó con la cantidad de enzima utilizada. Se eligió **286 U de AOD** para estudios posteriores, no habiéndose probado con mayores cantidades de enzima por considerar que la sensibilidad obtenida con la cantidad mencionada era suficiente para los objetivos del trabajo y porque supondría un encarecimiento en el precio de los electrodos.

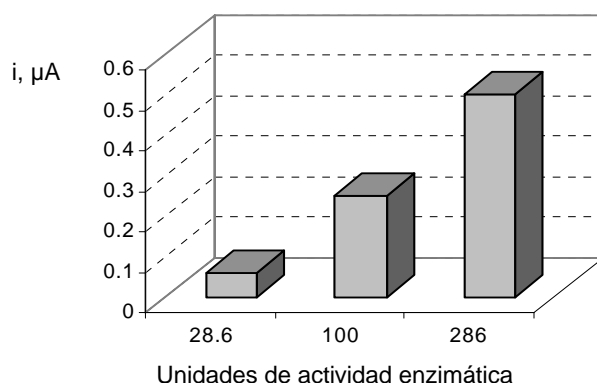


Figura 88. Medidas de intensidad de corriente en estado estacionario realizadas con electrodos compósitos bienzimáticos de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno fabricados con diferentes contenidos de AOD, para tres disoluciones diferentes de metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 ; $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.4.5.1.2. INFLUENCIA DEL pH

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 a un nivel de concentración de metanol de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Como puede observarse en la Figura 89, se obtuvo una respuesta prácticamente constante entre pH 7.0 y 9.5, disminuyendo fuertemente la señal fuera de dicho margen. Se eligió como **pH de trabajo** para estudios posteriores **7.4**, por estar en la meseta de máxima intensidad de corriente y porque es el pH más utilizado en los trabajos precedentes encontrados en la bibliografía.

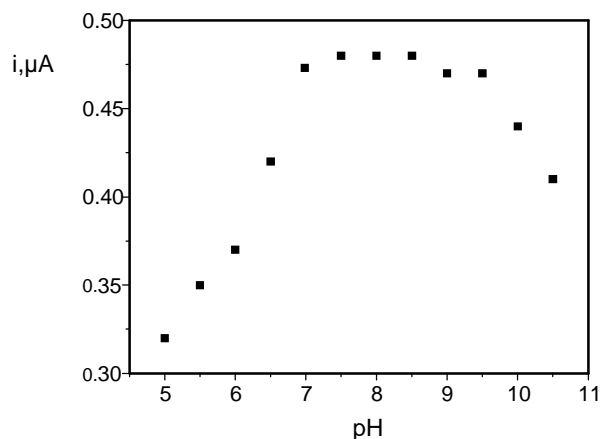


Figura 89. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida con el electrodo de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno para una concentración de metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

IV.4.5.1.3. INFLUENCIA DEL POTENCIAL APLICADO SOBRE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE EN ESTADO ESTACIONARIO

La elección del potencial aplicado al biosensor de alcohol oxidasa, se efectuó teniendo en cuenta la representación de la intensidad de corriente en estado estacionario a diferentes valores del potencial aplicado en el intervalo de -0.30 a 0.30 V , para metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (Figura 90).

Como se puede observar, la señal amperométrica obtenida fue prácticamente constante entre 0.00 y 0.25 V . Para valores superiores e inferiores a los del intervalo considerado, la intensidad de corriente en el estado estacionario disminuía. Dicha disminución a potenciales menores de -0.05 V se ha atribuido a la reducción electrodoica de H_2O_2 y de O_2 que disminuye la concentración de estas dos sustancias en la superficie del electrodo y provoca que se forme menos ferricinio, que es la especie monitorizada. Como consecuencia de ello, se eligió un valor de **potencial de 0.00 V** para estudios posteriores con el propósito de minimizar las posibles interferencias, tanto de procesos de oxidación como de reducción.

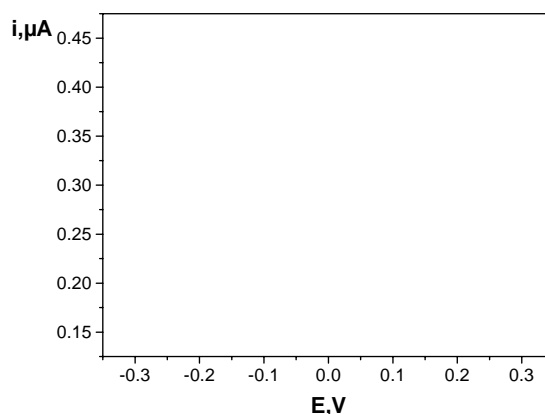


Figura 90. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida con el electrodo compuesto de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno para metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

En la figura 91 se muestran, a modo de ejemplo, algunos de los amperogramas obtenidos con el electrodo de grafito-teflón-AOD-HRP -ferroceno para adiciones sucesivas de $25 \mu\text{l}$ de una disolución patrón de metanol 0.01 mol l^{-1} en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} .

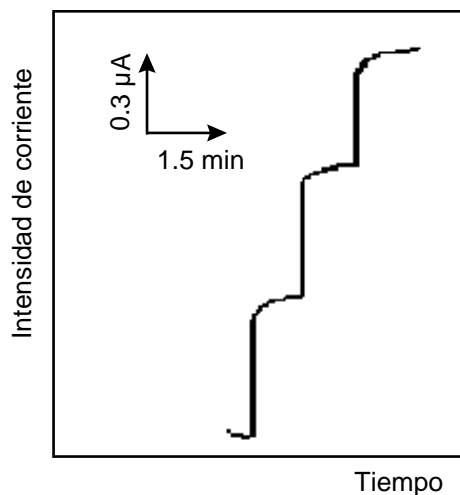


Figura 91. Registros $i-t$ para adiciones sucesivas de $25 \mu\text{l}$ de una disolución de metanol 0.01 mol l^{-1} en 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

Como puede observarse, el biosensor mostró una respuesta rápida a los cambios en la concentración de sustrato. Además, no se observó ninguna señal amperométrica medible tras realizar adiciones sucesivas de metanol cuando se utilizaron electrodos compósitos sin alcohol oxidasa inmovilizada.

IV.4.5.2. ESTABILIDAD DEL ELECTRODO BIENZIMÁTICO

Como se ha realizado para cada uno de los electrodos compósitos desarrollados en esta Memoria, también en este caso se evaluó la estabilidad operacional del biosensor, la cual depende no sólo de las enzimas inmovilizadas y del medio utilizado, sino también del soporte empleado en la inmovilización en el que todos los componentes individuales del bioelectrodo deben estar, en principio, homogéneamente distribuidos.

Los aspectos que se consideraron para evaluar la estabilidad del biosensor fueron: 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, estabilidad del electrodo con el tiempo, reproducibilidad de las medidas obtenidas con

diferentes electrodos y efecto del tiempo de almacenamiento de la pastilla madre con la que se fabrican los distintos electrodos. Los valores de la intensidad de corriente en estado estacionario, de intervalos de confianza calculados para un nivel de significación de 0.05 y de las desviaciones estándar relativas correspondientes se recogen en la Tabla 38.

Tabla 38. Estabilidad del electrodo compuesto bienzimático de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno. Concentración de metanol: $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = +0.00 \text{ V}$.

	i, μA		RSD, %	
Repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica	0.46	0.49	6.1	
	0.52	0.44		
	0.44	0.51		
	0.47	0.52		
	0.50	0.50		
i media= $0.49 \pm 0.02 \mu\text{A}$				
Reproducibilidad de las medidas regenerando la superficie electródica por pulido	0.41	0.52	8.3	
	0.52	0.44		
	0.47	0.52		
	0.50	0.53		
	0.52	0.42		
i media= $0.48 \pm 0.03 \mu\text{A}$				
Tiempo de vida útil del electrodo	15 días			
Reproducibilidad de las medidas obtenidas con electrodos diferentes (*Nº pastilla.Nº electrodo)	Pastilla	Electrodo*	i, μA	RSD %
	1	1.1	0.46	6.5
		1.2	0.41	
		1.3	0.44	
	2	2.1	0.46	
		2.2	0.44	
		2.3	0.48	
	3	3.1	0.45	
		3.2	0.50	
		3.3	0.51	
Efecto del periodo de almacenamiento	Más de 3 meses a 4°C sin pérdida de actividad			

Para evaluar la repetibilidad de las medidas de intensidad de corriente en estado estacionario con el biosensor bienzimático sin regeneración de la superficie electródica, se realizaron 10 medidas de disoluciones diferentes de metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. El valor de la desviación estándar relativa obtenido 6.1%, refleja una buena repetibilidad de las medidas amperométricas sin necesidad de regenerar la superficie del electrodo. Este comportamiento demostró que no se producían pérdidas apreciables de enzima debidas a su solubilización en el medio de trabajo, a pesar de que las enzimas están inmovilizadas por simple atrapamiento físico y que tanto la peroxidasa como la alcohol oxidasa son solubles en la disolución de trabajo.

En cuanto a la reproducibilidad de las medidas tras regenerar la superficie electródica, se realizaron 10 pulidos y 3 medidas sucesivas antes de cada pulido. La desviación estándar relativa obtenida, 8.3% para los 10 valores medios de la corriente en estado estacionario es inferior al 10%, indicando que el electrodo compuesto bienzimático permitió obtener respuestas reproducibles después de aplicar el proceso de regeneración de la superficie electródica y que las enzimas y el mediador se encontraban uniformemente distribuidos en el seno de la matriz electródica.

El valor central, y los límites superior e inferior del gráfico de control que se construyó para establecer el tiempo de vida útil de un electrodo individual, fueron el valor medio obtenido para la serie de 10 medidas amperométricas sin regeneración de la superficie electródica ($0.49 \mu\text{A}$) y $+3s$ ($0.58 \mu\text{A}$) y $-3s$ ($0.40 \mu\text{A}$), respectivamente. Cuando un valor medio de las tres medidas realizadas cada día quedaba fuera de los límites de control, se procedió al pulido del electrodo de modo que la intensidad de corriente en el estado estacionario volvía a quedar dentro de los límites de control

En la Figura 92 se muestran los resultados obtenidos durante 22 días, almacenándose el biosensor a 4°C en seco después de realizar las medidas diarias.

Como puede observarse, fue necesario pulir diariamente el electrodo antes de trabajar para obtener respuestas amperométricas dentro de los límites de control. Este comportamiento es diferente del observado para el resto de electrodos bienzimáticos de grafito-Teflón descritos anteriormente, con los que era posible medir sin necesidad de regenerar la superficie electródica entre 3 y 5 días. Esta diferencia se ha atribuido a la menor estabilidad de la alcohol oxidasa con respecto a las otras enzimas empleadas, de modo que algunos autores proponen la adición al biosensor de estabilizadores de la enzima para obtener medidas reproducibles (Vijayakumar et al., 1998). Sin embargo, puede deducirse de la figura 92 que el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno se pudo emplear sin problemas y sin necesidad de estabilizadores de la enzima al menos durante 15 días.

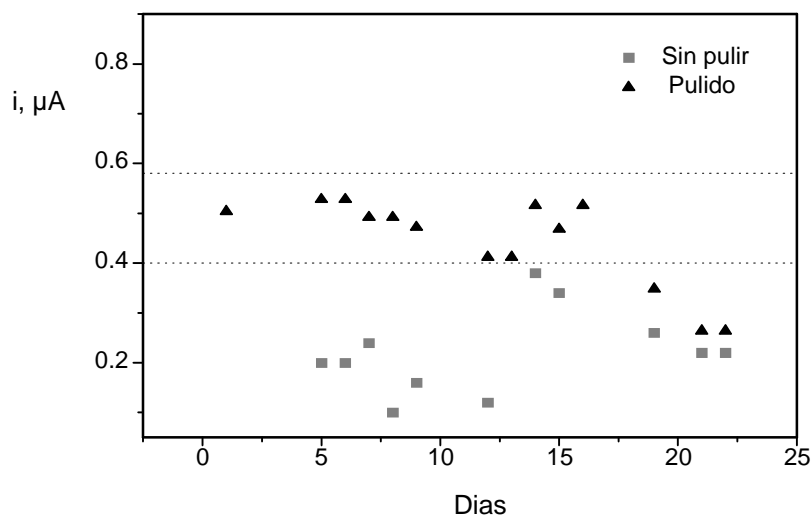


Figura 92. Gráfico de control para la dependencia de la corriente en estado estacionario con el tiempo para metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ medida con un electrodo compuesto de grafito-teflón- AOD - HRP-ferroceno. Reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Cuando el electrodo bienzimático dejaba de ser operativo, debía procederse a su sustitución por otro nuevo, por lo que es esencial evaluar la reproducibilidad de las respuestas obtenidas con diferentes electrodos. Para ello se construyeron tres biosensores diferentes de cada una de las tres pastillas madre distintas y se realizaron con cada uno de ellos tres medidas para disoluciones diferentes de metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. La desviación estándar relativa para las medidas obtenidas con los nueve electrodos fue del 6.5 %, lo que indica que el proceso de fabricación de los electrodos de grafito-Teflón-HRP-AOD-ferroceno es reproducible y fiable.

El último estudio de estabilidad realizado fue el del efecto sobre la actividad de las enzimas de un período de almacenamiento en seco a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ prolongado. Se observó que después de como mínimo 3 meses de almacenamiento, se obtuvieron señales reproducibles y similares a las de la Tabla 38, cuando se fabricó un electrodo a partir de la pastilla almacenada. De esta forma se puso de manifiesto que no había una pérdida apreciable de la actividad de las enzimas inmovilizadas en la matriz compósita como mínimo para dicho tiempo de almacenamiento, lo que demuestra que el método de inmovilización es adecuado. Este resultado es similar al obtenido para los otros electrodos bienzimáticos de grafito-Teflón desarrollados a lo largo de esta Memoria. Este comportamiento pone de manifiesto de forma clara que la pérdida de actividad del biosensor al ser utilizado diariamente, se debe principalmente a los procesos de enfriamiento/calentamiento para el almacenamiento/medida de los electrodos.

IV.4.5.3. RESPUESTA DEL BIOSENSOR BIENZIMÁTICO PARA DIFERENTES ALCOHOLES

Como ya se ha indicado anteriormente, la enzima alcohol oxidasa es catalíticamente activa a alcoholes alifáticos de cadena corta, mientras que la alcohol deshidrogenasa es más específica para alcoholes alifáticos primarios diferentes del metanol y alcoholes aromáticos (Vijayakumar et al., 1998). En la Figura 93 se comparan las respuestas obtenidas con el electrodo compuesto de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno para diferentes alcoholes alifáticos de cadena corta. Las condiciones experimentales fueron las elegidas anteriormente y los niveles de concentración ensayados fueron $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ para metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol y 1-pentanol y $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ para isopropanol e isobutanol. En la figura 94 se comparan las intensidades de corriente en el estado estacionario correspondientes.

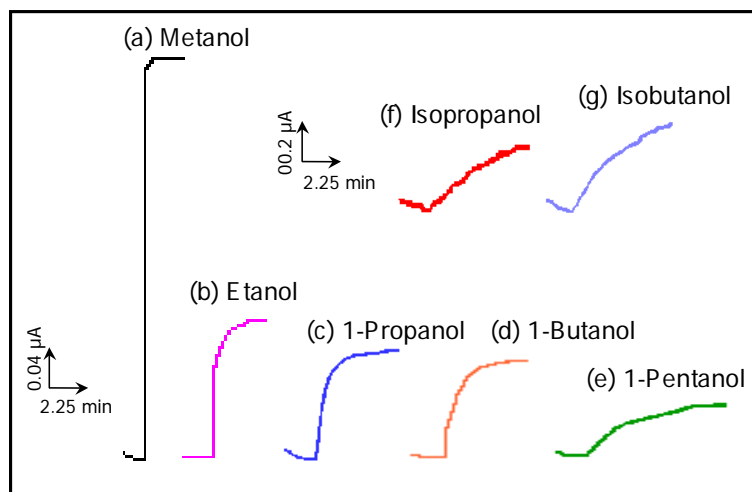


Figura 93. Registros $i-t$ obtenidos con un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno para (a) metanol, (b) etanol, (c) 1-propanol, (d) 1-butanol y (e) 1-pentanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ y (f) isopropanol y (g) isobutanol $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de $\text{pH}=7.4$. $E_{\text{app}}=0.00 \text{ V}$

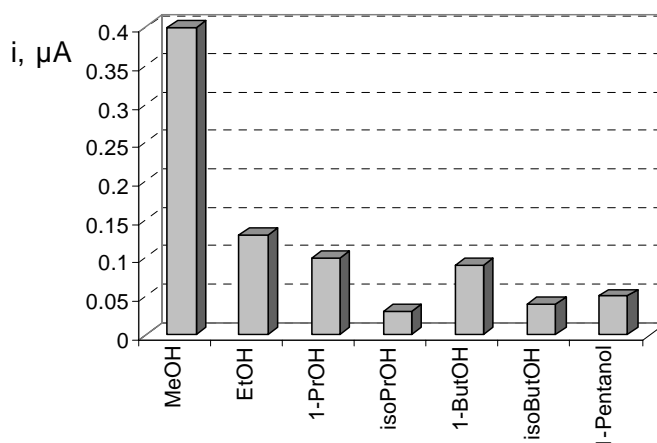


Figura 94. Intensidades en estado estacionario obtenidos con un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno para metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol y 1-pentanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ e isobutanol e isopropanol $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ medidas en las condiciones experimentales indicadas en la figura anterior.

Como puede apreciarse, la intensidad de corriente en el estado estacionario disminuye a medida que aumenta el número de carbonos de la cadena alifática. Esto es debido a que un aumento en la longitud de la cadena supone un mayor impedimento estérico que dificulta el acceso del sustrato al centro activo de la enzima. Si se comparan las señales obtenidas para el 1-propanol con el isopropanol y las del 1-butanol con el isobutanol, también se observa una disminución en la intensidad de corriente. Este comportamiento indica que una mayor ramificación de la cadena alifática provoca un mayor impedimento para alcanzar el centro activo de la enzima, lo que confirma que la disminución de señal está directamente relacionada con el impedimento estérico.

Por otro lado, para alcoholes con cadena alifática ramificada como son el isopropanol y el isobutanol, los resultados obtenidos indican que la mayor proximidad de la ramificación a los grupos -OH da lugar a un mayor impedimento estérico.

La gran diferencia de intensidad de corriente en estado estacionario obtenida para el metanol con respecto al resto de alcoholes estudiados, es debida a que el producto de la oxidación del metanol catalizada por la alcohol oxidasa es el formaldehído, que a su vez se comporta como sustrato de la alcohol oxidasa, lo que produce una amplificación de la señal analítica al generar más peróxido de hidrógeno (Liden et al., 1998b) y, por consiguiente, una mayor respuesta de la que cabría esperar teniendo en cuenta el número de carbonos que lo diferencian del resto de alcoholes.

En conclusión, se puede decir que un aumento del número de carbonos y de la ramificación de la cadena alifática, así como una mayor proximidad de la ramificación de la cadena al grupo -OH, disminuyen la señal analítica, además de disminuir la velocidad de la reacción enzimática como se deduce del tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario para cada uno de los alcoholes estudiados, como se puede deducir de los amperogramas de la figura 93.

IV.4.5.3.1. CALCULO DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA PARA DIFERENTES ALCOHOLES

El tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario está directamente relacionado con la velocidad de reacción enzimática. En este apartado se ha evaluado la influencia de la longitud de la cadena alifática sobre la constante de la reacción catalizada por la enzima alcohol oxidasa para cada uno de los alcoholes mencionados. Para ello, fue necesario demostrar primero que la etapa limitante de la reacción global que tiene lugar en la superficie del electrodo es la reducción del alcohol al correspondiente aldehído catalizada por la enzima alcohol oxidasa. La reacción global que se monitoriza es consecuencia de tres reacciones, dos de ellas catalizadas por enzimas (peroxidasa y alcohol oxidasa) y una electródica (reducción de ferricinio a ferroceno). El sistema ferroceno/ferricinio es reversible, por lo que se supone que la reacción electródica es rápida con respecto a las otras dos reacciones enzimáticas, y por tanto la etapa limitante de la velocidad de la reacción global vendrá dada por una de las dos reacciones enzimáticas. Por consiguiente, debe demostrarse que la etapa limitante es la reacción catalizada por alcohol oxidasa.

En primer lugar se demostró que las reacciones enzimáticas tenían un comportamiento característico de la cinética de Michaelis-Menten. Para ello, se registraron los amperogramas correspondientes a las curvas de saturación obtenidas con el electrodo compuesto de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno tras adiciones sucesivas de 25 μl de disoluciones 0.1 mol l^{-1} de peróxido de hidrógeno (a) y de metanol (b). Estas medidas se realizaron en un volumen de 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 y un potencial aplicado de 0.00 V

(Fig 95). Como se puede observar, el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario para el metanol fue más del doble que para el peróxido de hidrógeno, indicando, de forma cualitativa, que la velocidad de la reacción enzimática es mayor en el caso de la reacción enzimática con H_2O_2 .

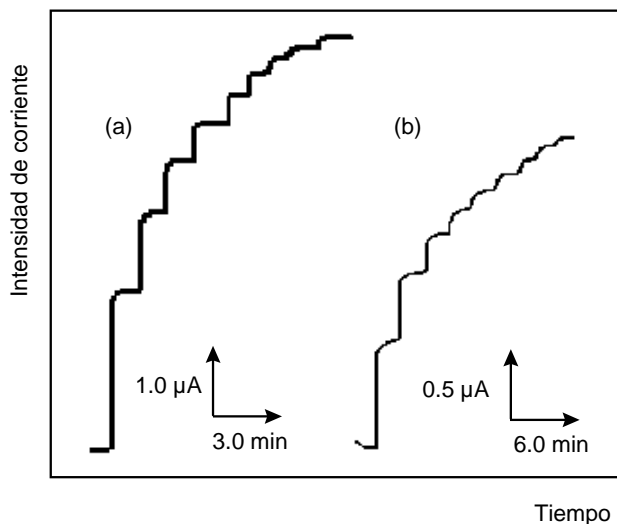


Figura 95. Registros intensidad –tiempo obtenidos con el electrodo compuesto de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4, para adiciones sucesivas de $25 \mu\text{l}$ de disolución patrón de H_2O_2 (a) y metanol (b). $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

Se calculó el parámetro “x” de la ecuación de Hill (Iwuoha et al., 1997) a partir de los correspondientes gráficos, en los que se representa el $\log [(i_{m\acute{x}}/i)-1]$ en función del logaritmo de la concentración de cada uno de los sustratos estudiados (Figura 96).

Los valores obtenidos para H_2O_2 y para metanol fueron 0.98 y 1.01 respectivamente, valores muy próximos a 1, que indican que las reacciones enzimáticas para cada uno de los sustratos se ajustan a una cinética de Michaelis-Menten.

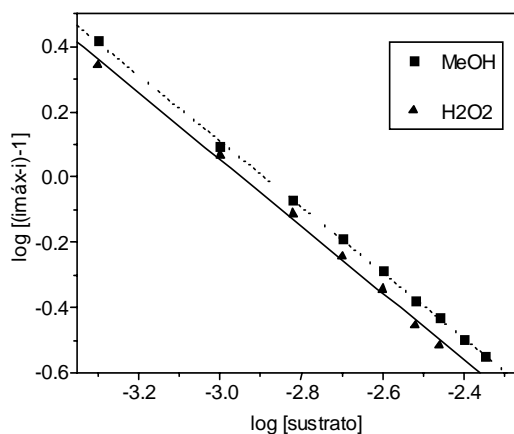


Figura 96. Gráficos de Hill para el metanol y el peróxido de hidrógeno, obtenidos con el grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno en regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4), $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

Una vez que se comprobó que la reacción global es de pseudo primer orden, se procedió a determinar los valores de las constantes de velocidad de reacción para cada uno de los alcoholes estudiados con la alcohol oxidasa, y para el H_2O_2 . Para ello se midió el aumento de intensidad de corriente a distintos tiempos producida por la adición de $100\ \mu\text{l}$ de una disolución $0.1\ \text{mol l}^{-1}$ de cada uno de los sustratos, en $5.0\ \text{ml}$ de disolución reguladora de fosfato $0.05\ \text{mol l}^{-1}$ de pH 7.4. El valor de la pendiente obtenida en la representación del logaritmo neperiano de la intensidad de corriente ($\ln i$) frente al tiempo proporciona la constante de velocidad de la reacción (Ennis y Buxton, 1998).

En las figuras 97, 98 y 99 se muestran, a modo de ejemplo, las variaciones de la intensidad de corriente con el tiempo (a) y el $\ln i$ frente al tiempo, para el intervalo en el que se produce el aumento de intensidad (b), para peróxido de hidrógeno, metanol y etanol, respectivamente.

En la Tabla 39 se recogen los valores de las constantes de velocidad de las correspondientes reacciones enzimáticas para cada uno de los alcoholes estudiados y para el H_2O_2 .

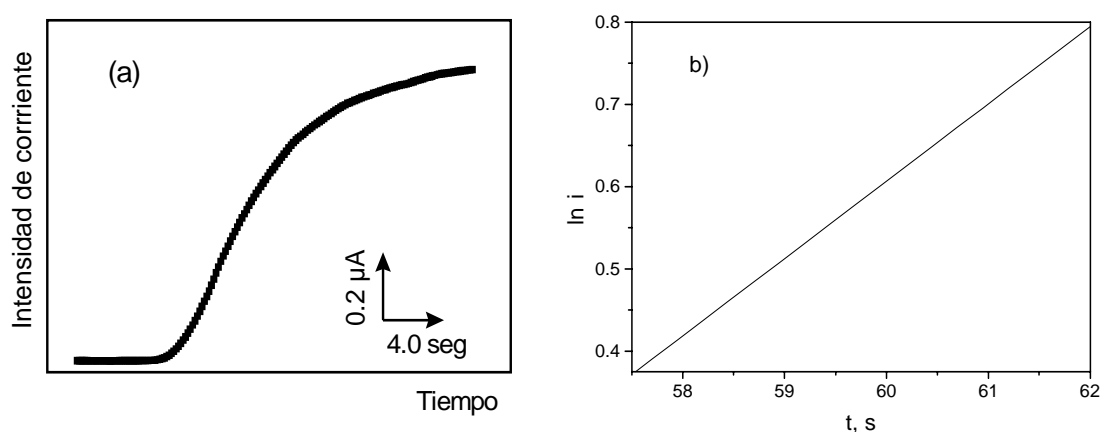


Figura 97. Variación de la intensidad de corriente (a) y del $\ln i$ (b) con el tiempo tras la adición de $100\ \mu\text{l}$ de una disolución de peróxido de hidrógeno $0.1\ \text{mol l}^{-1}$ en $5\ \text{ml}$ de disolución reguladora de fosfato $0.05\ \text{mol l}^{-1}$ de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00\ \text{V}$.

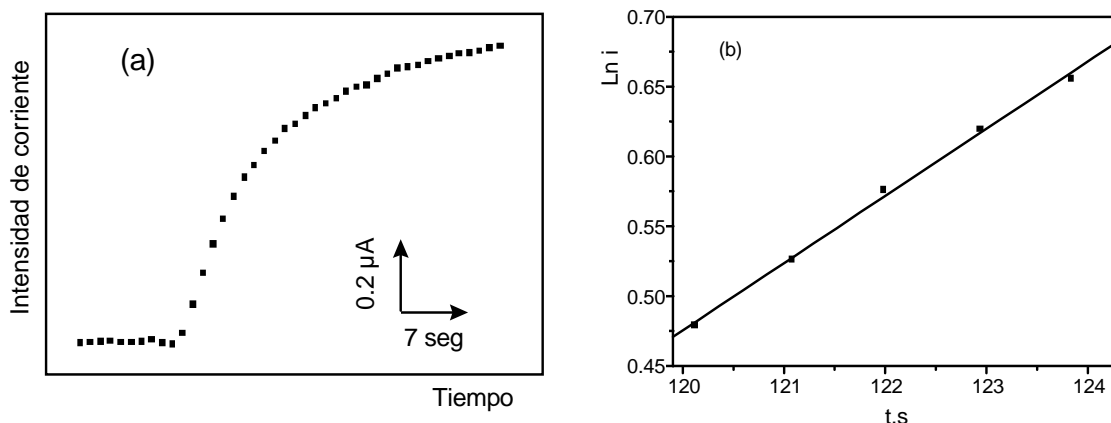


Figura 98. Variación de la intensidad de corriente (a) y del $\ln i$ (b) con el tiempo tras la adición de $100 \mu\text{l}$ de una disolución de metanol 0.1 mol l^{-1} en 5 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

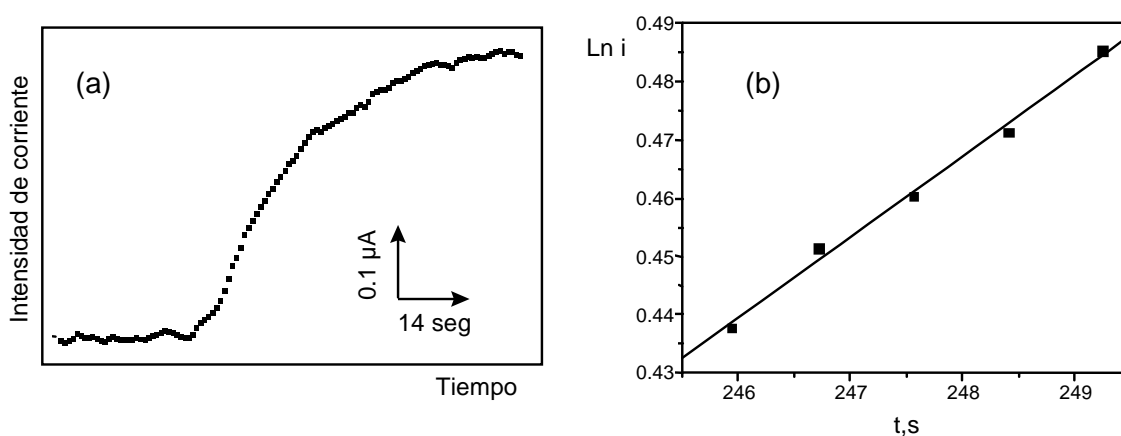


Figura 99. Variación de la intensidad de corriente (a) y del $\ln i$ (b) con el tiempo tras la adición de $100 \mu\text{l}$ de una disolución de etanol 0.1 mol l^{-1} en 5 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Tabla 39. Constantes de velocidad para el peróxido de hidrógeno y diferentes alcoholes obtenidas sobre un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno

Sustrato	Constante de velocidad, $\times 10^3 \text{ s}^{-1}$
Peróxido de hidrógeno	188
Metanol	48.1
Etanol	13.8
1-propanol	7.2
1-butanol	6.7
1-pentanol	4.3
iso-propanol	0.2
iso-butanol	0.5

Como se puede observar, en la constante de velocidad para la reacción enzimática de reducción de peróxido de hidrógeno catalizada por la peroxidasa es considerablemente mayor

que los valores obtenidos para las reacciones enzimáticas acopladas utilizadas para la monitorización de los alcoholes. Por lo tanto, considerando que la reacción global tiene un comportamiento que se ajusta a la cinética de Michaelis- Menten, se puede concluir que la etapa limitante de la velocidad es la reacción enzimática catalizada por la alcohol oxidasa. Por otro lado, como era de esperar, un aumento en el número de átomos de carbono en la cadena alifática de los alcoholes, así como la ramificación de dicha cadena, implicó una disminución en la constante de la velocidad de reacción,. Estos resultados coinciden con las observaciones cualitativas mencionadas con anterioridad.

IV.4.5.4. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

En las condiciones experimentales escogidas anteriormente se obtuvieron curvas de calibrado para metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol 1-pentanol, isobutanol e isopropanol.

En la Figura 100, se muestran las curvas de calibrado para metanol (a) y para etanol (b) en los intervalos de concentración 2.0×10^{-6} - 5.0×10^{-4} mol l⁻¹ y de 2.0×10^{-5} - 5.0×10^{-3} mol l⁻¹ respectivamente. Para propanol y butanol las curvas de calibrado en los intervalos de concentración 2.0×10^{-5} - 5.0×10^{-3} mol l⁻¹ y 4.0×10^{-5} - 5.5×10^{-3} mol l⁻¹ se representan en la Figura 101 a y b, mientras que en la Figura 102 se muestran los obtenidos para 1-pentanol (a) en el intervalo 4.0×10^{-5} - 6.0×10^{-3} mol l⁻¹ y para isopropanol (b) en el intervalo de concentración 5.0×10^{-4} - 2.0×10^{-3} mol l⁻¹. Finalmente, la curva de calibrado para isobutanol en el intervalo de concentración 2.0×10^{-4} - 2.0×10^{-2} mol l⁻¹ se representa en la Figura 103.

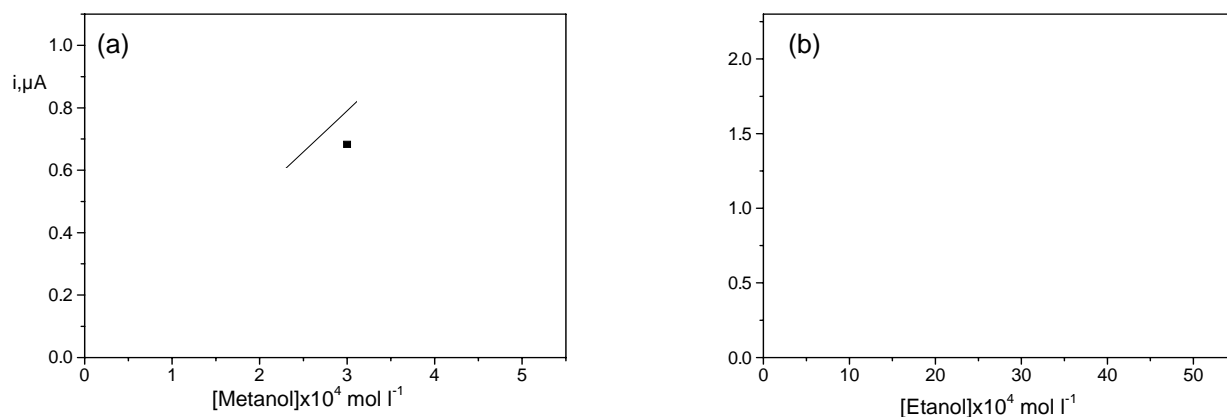


Figura 100.- Curvas de calibrado para metanol en el intervalo 2.0×10^{-6} - $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (a) y para etanol en el intervalo 2.0×10^{-5} - $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (b) obtenidas con el electrodo compuesto bienzimático en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

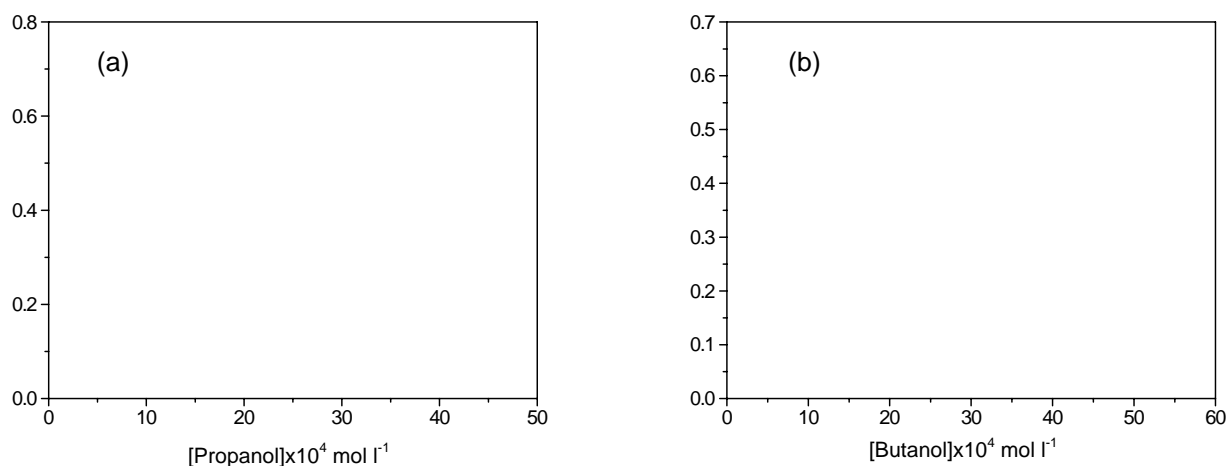


Figura 101. Curvas de calibrado para propanol (a) y butanol (b) en los intervalos 2×10^{-5} - $4.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y 4.0×10^{-5} - $5.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ respectivamente obtenidas con un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

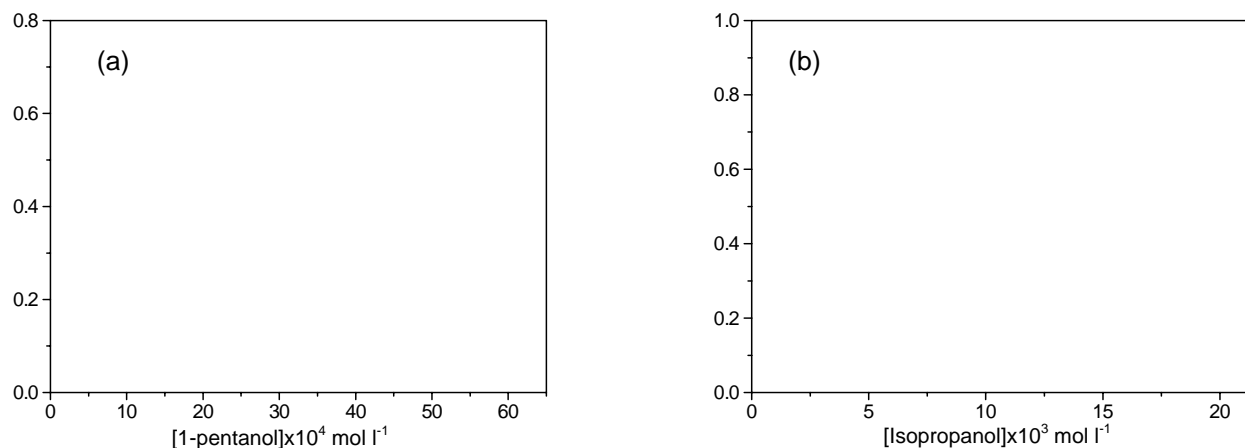


Figura 102. Curvas de calibrado para el 1-pentanol (a) e isopropanol obtenidas con el electrodo compuesto bienzimático en los intervalos de concentración 4.0×10^{-5} - $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y 5.0×10^{-4} - $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ respectivamente en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

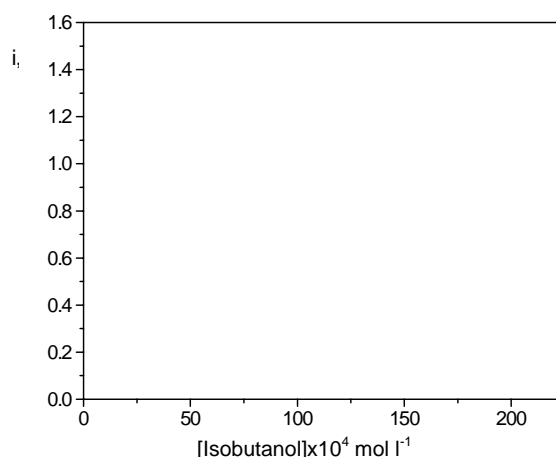


Figura 103. Curva de calibrado obtenida con el electrodo de grafito-teflón-AOD-HRP- ferroceno para isobutanol en el intervalo de concentración 2.0×10^{-4} - 2.0×10^{-2} mol l^{-1} en tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap} = 0.00$ V.

El intervalo lineal de estos calibrados se ha estimado mediante regresión por mínimos cuadrados, considerando que no hay desviación de la linealidad cuando el coeficiente de correlación era mayor o igual de 0.998. En la Tabla 40 se recogen las características analíticas de estos calibrados, estando los intervalos de confianza calculados para un nivel de significación de 0.05.

Una vez más, se observa que la respuesta del electrodo bienzimático de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno depende de la cadena alifática del alcohol correspondiente. Así, como era de esperar, la sensibilidad era mayor para los alcoholes con una cadena alifática más corta, mientras que se obtenía un intervalo de linealidad más amplio para los alcoholes con una cadena más larga.

Tabla 40. Intervalos de linealidad, pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de regresión de los calibrados obtenidos para diferentes alcoholes con el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP- ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00$ V.

Sustrato	Intervalo de Linealidad (mol L^{-1})	Pendiente ($\mu A/mol L^{-1}$)	Ordenada en el origen (μA)	r
Metanol	$(0.2- 15.0) \times 10^{-5}$	$(25.9 \pm 0.3) \times 10^2$	$(37 \pm 16) \times 10^{-4}$	0.9989
Etanol	$(2.0- 200.0) \times 10^{-5}$	$(5.51 \pm 0.03) \times 10^2$	$(84 \pm 23) \times 10^{-4}$	0.9997
1-Propanol	$(2.0-250.0) \times 10^{-5}$	$(2.05 \pm 0.01) \times 10^2$	$(-35 \pm 13) \times 10^{-4}$	0.9995
1-Butanol	$(2.0- 350.0) \times 10^{-5}$	$(1.27 \pm 0.01) \times 10^2$	$(77 \pm 24) \times 10^{-4}$	0.9985
1-pentanol	$(4.0- 500.0) \times 10^{-5}$	$(1.217 \pm 0.008) \times 10^2$	$(0.3 \pm 21) \times 10^{-4}$	0.9995
Isopropanol	$(50-2000.0) \times 10^{-5}$	$(0.478 \pm 0.006) \times 10^2$	$(-407 \pm 57) \times 10^{-4}$	0.9987
Isobutanol	$(20-2000.0) \times 10^{-5}$	$(0.726 \pm 0.008) \times 10^2$	$(-281 \pm 55) \times 10^{-4}$	0.9990

Por lo que se refiere al cálculo de la desviación estándar relativa de los límites de determinación y de detección, se realizó a partir de las medidas correspondientes a 10

disoluciones distintas de cada uno de los alcoholes estudiados a los niveles de concentración indicados en la Tabla 41 según los mismos criterios mencionados para otros biosensores. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 41.

Tabla 41. Características analíticas para la determinación de metanol, etanol, propanol, butanol y 1-pentanol, isopropanol e isobutanol con el electrodo de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno. Condiciones como las de la Tabla 40.

Sustrato	Nivel cc. (mol l ⁻¹)	Límite de determinación (mol l ⁻¹)	Límite de detección (mol l ⁻¹)	RSD (%)
Metanol	2.0x 10 ⁻⁶	1.8x 10 ⁻⁶	5.4x 10 ⁻⁷	9.6
Etanol	2.0x 10 ⁻⁵	1.8x 10 ⁻⁵	5.3x 10 ⁻⁶	10.6
Propanol	2.0x 10 ⁻⁵	2.3x 10 ⁻⁵	6.8x 10 ⁻⁶	9.9
Butanol	4.0x 10 ⁻⁵	3.1x 10 ⁻⁵	9.2x 10 ⁻⁶	8.8
1-Pentanol	4.0x 10 ⁻⁵	5.1x 10 ⁻⁵	1.5x 10 ⁻⁵	10.3
Isopropanol	5.0x 10 ⁻⁴	1.4x 10 ⁻⁴	4.1x 10 ⁻⁵	8.4
Isobutanol	2.0x 10 ⁻⁴	1.1x 10 ⁻⁴	3.2x 10 ⁻⁵	10.3

Como era de esperar, los mejores límites de detección se obtuvieron para los alcoholes con menor número de átomos de carbono en la cadena alifática y, de entre ellos, el metanol es el que presentó un menor límite de detección.

Es de resaltar que los límites de detección obtenidos con el electrodo compuesto bienzimático son, en general, mejores que la mayoría de los encontrados en la bibliografía para biosensores de AOD. Además, dichos límites de detección pueden compararse también ventajosamente con los que proporcionan electrodos comerciales para alcoholes (Universal Sensors) o un kit enzimático (Boehringer) (1.0x10⁻⁵ mol l⁻¹).

IV.4.5.5. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

La buena estabilidad observada con el electrodo de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno en discontinuo, así como su rápida respuesta a los cambios en la concentración para la mayoría de los alcoholes estudiados, sugiere la posibilidad de emplear el biosensor como detector en un sistema en flujo. Para todos los estudios se utilizó la célula de flujo del tipo “wall-jet” de gran volumen que se mostró en el apartado III.4.1.2., empleando como disolución portadora regulador fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4, un volumen de inyección de 50 µl, y un potencial constante de 0.00 V.

IV.4.5.5.1. OPTIMIZACIÓN DEL CAUDAL

Se estudió la influencia del caudal de la disolución portadora sobre los parámetros característicos de los fiagramas (intensidad de pico i_p , tiempo de residencia t_a y anchura de pico a la semialtura, $W_{1/2}$) obtenidos, cuando se realizó la detección amperométrica de metanol a un nivel de concentración de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ con el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno. Los resultados se representan en la Figura 104.

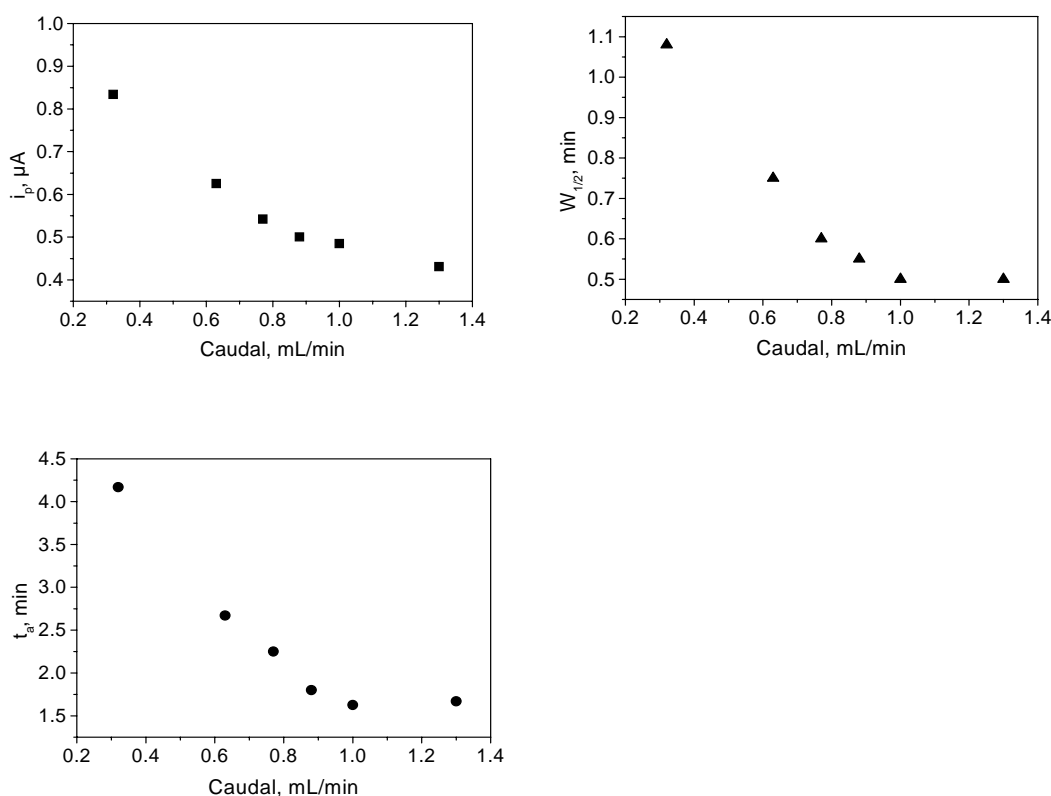


Figura 104. Influencia del caudal sobre i_p (intensidad de pico), $W_{1/2}$ (anchura de pico a la semialtura) y t_a (tiempo de aparición del pico) obtenido para una inyección de metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ con un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno. Disol. portadora: regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} . $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. $V_f = 50 \mu\text{l}$.

Como se puede observar, la altura del pico del fiagrama (i_p) disminuye cuando aumenta el caudal, comportamiento que, como ya se ha comentado, es característico de los sistemas FIA que emplean biosensores enzimáticos como detectores. Por otro lado, y como era de esperar, tanto la anchura de pico ($w_{1/2}$) como el tiempo de residencia (t_a) disminuyen al aumentar el caudal del portador. Teniendo en cuenta estos factores, se eligió un caudal de **1.0 mL/min**, para el que se obtiene una altura de pico adecuada y la anchura de pico no varía demasiado para caudales próximos.

IV.4.5.5.2. REPETIBILIDAD DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS

Empleando las condiciones anteriores, se evaluó la repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas por inyección en flujo utilizando como detector el biosensor bienzimático. Para ello, se realizaron 10 inyecciones sucesivas de 50 μl de metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, 1-pentanol 0.05 mol l^{-1} y 5 inyecciones de isobutanol y de isopropanol 0.25 mol l^{-1} en la disolución portadora. En la Figura 105 se muestran los diagramas obtenidos.

Puede observarse que el biosensor desarrollado respondió de forma rápida a casi todos los alcoholes y, a pesar de las condiciones hidrodinámicas existentes, la respuesta permaneció prácticamente constante a lo largo de las diferentes series para los diferentes alcoholes, lo que indica una buena inmovilización de las enzimas en la matriz electródica. Los valores de la desviación estándar relativa obtenidos para cada una de las series de medidas se recogen en la Tabla 42, y son en todos los casos menores del 6 %.

Además, en dicha Tabla 42 se recogen las velocidades de muestreo para cada uno de los alcoholes. Como se puede apreciar, para 1-pentanol y para los alcoholes con cadena alifática ramificada, la velocidad de muestreo es acusadamente inferior al resto. Este comportamiento es debido a la menor velocidad de la reacción enzimática para dichos alcoholes, lo que provoca que sus picos FIA sean más anchos y que disminuya el número de muestras analizadas por hora.

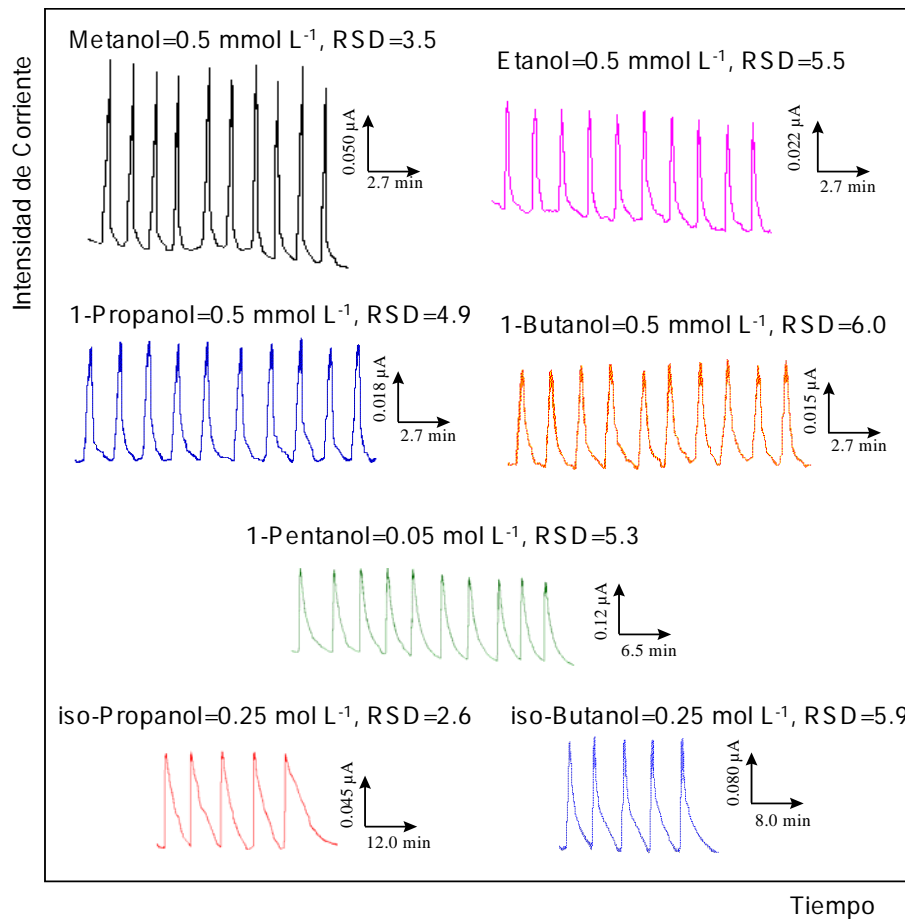


Figura 105. Diagramas obtenidos con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno para 10 inyecciones sucesivas de metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (a), etanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (b), 1-propanol $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (c), 1-butanol $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (d), isobutanol 0.25 mol l^{-1} (e), amílico 0.05 mol l^{-1} (f) e isopropanol 0.25 mol l^{-1} (g). Disolución portadora : regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} . $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. Caudal : 1.0 ml/min . $V_f = 50 \mu\text{l}$.

Tabla 42 . Repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas mediante análisis por inyección en flujo con un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno. Condiciones experimentales similares a las de la Figura 105 .Número de inyecciones=10

Sustrato	Concentración (mol l^{-1})	RSD (%)	Muestras/hora
Metanol	5.0×10^{-4}	3.5	55
Etanol	5.0×10^{-4}	5.5	50
1-Propanol	5.0×10^{-4}	4.9	50
1-Butanol	5.0×10^{-4}	6.0	48
1-Pentanol	0.05	5.3	14
Isobutanol	0.25	5.9	11
Isopropanol	0.25	2.6	11

IV.4.5.5.3. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

De todos los alcoholes estudiados en este trabajo, sólo se realizaron calibrados para metanol y etanol por ser los alcoholes de más interés analítico y los que mejores respuestas han proporcionado. En la figura 106 se muestran los fiagramas obtenidos y el calibrado para el metanol, mientras que en la figura 107 se muestran los correspondientes al etanol.

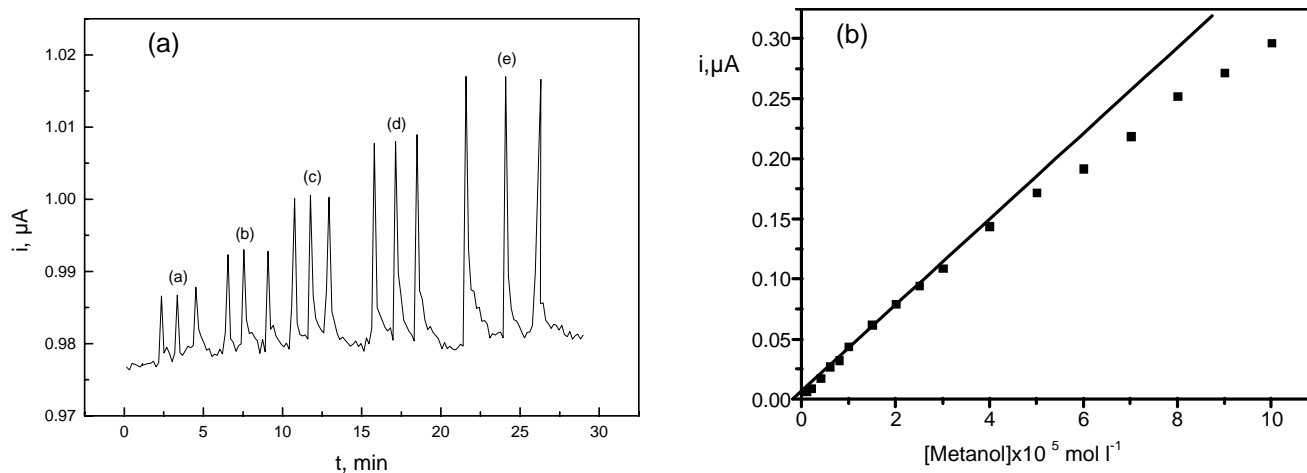


Figura 106. (a) Fiagramas obtenidos para adiciones de: (a) $0.2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $0.4 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (c) $0.6 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $0.8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ y (e) $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ de metanol y (B) curva de calibrado correspondiente en el intervalo 1.0×10^{-5} - $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ mediante análisis por inyección en flujo con un electrodo de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno. Disolución portadora, fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$. Caudal= 1.0 ml/min

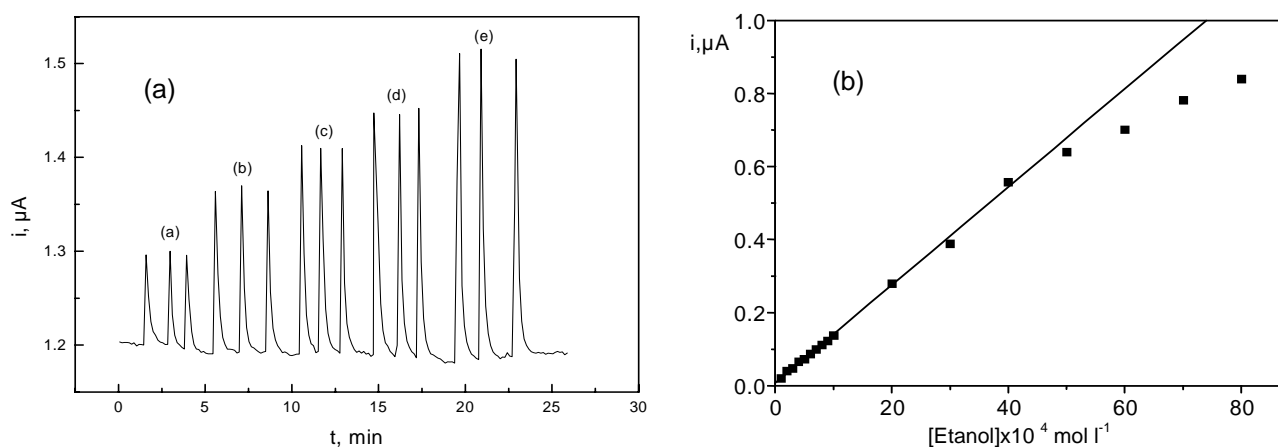


Figura 107. (a) Fiagramas obtenidos para adiciones de: (a) $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (c) $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (e) $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y (b) calibrado de etanol en el intervalo 1.0×10^{-4} - $8 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ mediante análisis por inyección en flujo con un electrodo de grafito-teflón- AOD-HRP - ferroceno, utilizando como disolución portadora una disolución de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$. Caudal= 1.0 ml min^{-1}

En la Tabla 43 se recogen los intervalos de linealidad obtenidos, así como los valores de las pendientes y ordenadas en el origen obtenidas con los intervalos de confianza calculados para un nivel de significación de 0.05.

Tabla 43 . Intervalos de linealidad, pendientes y ordenadas en el origen de los calibrados para el metanol y el etanol mediante análisis por inyección en flujo utilizando como portador disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$. Caudal= 1.0 ml min^{-1}

Sustrato	Intervalo lineal (mol l^{-1})	Pendiente ($\mu\text{A/ mol l}^{-1}$)	Ordenada en el origen $\times 10^2$ (μA)	r
Metanol	$(1.0-40) \times 10^{-5}$	353 ± 8	0.5 ± 0.2	0.998
Etanol	$(10-400) \times 10^{-5}$	134 ± 2	0.7 ± 0.3	0.999

Se calculó la desviación estándar relativa a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones diferentes de metanol de concentración $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ y de etanol $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Los límites de detección y determinación se calcularon según los criterios mencionados en el apartado III.5.6. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 44.

Tabla 44. Características analíticas de la determinación de metanol y etanol mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica con un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno.

Sustrato	Nivel concentración (mol l^{-1})	Límite determinación (mol l^{-1})	Límite detección (mol l^{-1})	RSD (%)
Metanol	2.0×10^{-5}	2.8×10^{-5}	8.5×10^{-6}	8.6
Etanol	1.0×10^{-4}	6.4×10^{-5}	1.9×10^{-5}	3.3

Los límites de detección y determinación obtenidos para metanol y etanol mediante análisis por inyección en flujo con el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno son adecuados para las aplicaciones en las que se va a utilizar este electrodo.

IV.4.5.6. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Antes de realizar la determinación de etanol en las diferentes muestras se procedió a estudiar la influencia que tiene la presencia de otras sustancias que pudieran estar presentes en las distintas muestras de bebidas alcohólicas ensayadas sobre la señal analítica del etanol obtenida mediante amperometría a potencial constante con el biosensor.

Para ello, se eligieron una serie de sustancias potencialmente interferentes: los ácidos cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico, acético, fórmico y ascórbico, glucosa y fructosa. Todos estos compuestos pueden estar presentes como productos naturales en bebidas alcohólicas, excepto el ácido ascórbico, que puede ser adicionado como antioxidante (E-300 y E-301). En todos los casos, se estudió la influencia sobre la señal amperométrica que se obtuvo con el biosensor compósito bienzimático en discontinuo para una concentración de etanol constante de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ y para diferentes niveles de concentración de cada compuesto interferente.

En la Tabla 45 se recogen los niveles de concentración del compuesto interferente a los que se comenzó a apreciar variación en la señal amperométrica para el etanol y, en caso de no producirse variación, los máximos niveles de concentración ensayados.

Tabla 45. Estudio de interferencias sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida para el etanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4 con un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

Interferente	[EtOH] : [Interferente]	% ϵ_r
Metanol	1 :0.1	+10.0
Ácido cítrico	1 :25	--
Ácido tartárico	1 :25	--
Ácido málico	1 :25	--
Ácido succínico	1 :25	--
Ácido láctico	1 :25	-19.0
Ácido fórmico	1 :5	-2.0
Ácido acético	1 :5	-6.4
Ácido ascórbico	1 :0.5	-90.0
Glucosa	1 :25	---
Fructosa	1 :25	---

En las condiciones experimentales empleadas para la determinación de etanol, la respuesta del analito no se vió afectada ni por la glucosa, la fructosa, ni por los ácidos cítrico, tartárico, málico y succínico para relaciones etanol-interferente de 1 :25. Sin embargo, los ácidos fórmico, láctico y succínico si que afectaron la respuesta amperométrica del etanol, produciendo los errores negativos (disminución de la señal analítica) que se muestran en la Tabla, para las relaciones etanol :interferente que se indican. Esta disminución de la respuesta amperométrica en presencia de los ácidos mencionados tiene dos orígenes diferentes. Por un

lado, la señal analítica del etanol disminuye en presencia de ácido ascórbico debido a que este compuesto se oxida sobre un electrodo de grafito-Teflón a potenciales cercanos a 0.00 V. Esta interferencia se puede minimizar trabajando a potenciales más negativos de forma análoga a como se discutió para el estudio de interferencias con el biosensor de hipoxantina (apartado IV.2.5.7.).

Por otro lado, el efecto de los ácidos láctico, fórmico y ascórbico sobre la respuesta del etanol es debida a que estos ácidos pueden actuar como sustratos de la alcohol oxidasa (Nanjo y Guilbault, 1975) y por tanto compiten por los centros activos de la enzima con el etanol, produciendo la disminución de la respuesta al ser menos eficiente la reacción enzimática con los ácidos que con el etanol. Sin embargo, el nivel de concentración al que se encuentra cualquiera de estas especies en las muestras de vinos, cervezas y, sobre todo aguardientes, es mucho menor que el valor al que podrían llegar a interferir en la determinación de etanol (Hart y Fisher, 1991).

La interferencia producida por el metanol era de esperar teniendo en cuenta la alta sensibilidad que presenta la enzima alcohol oxidasa por este alcohol. En cualquier caso, los niveles de concentración a los que se encuentra el metanol con respecto al contenido en etanol en bebidas alcohólicas son muy inferiores a los necesarios para llegar a producir una interferencia significativa en la respuesta del biosensor.

IV.4.5.7. DETERMINACIÓN DE ETANOL EN CERVEZAS

Con objeto de demostrar la aplicabilidad de los electrodos de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno para el análisis de muestras reales, se llevó a cabo la determinación de etanol en cervezas. Como es bien conocido, el contenido de etanol producido en la fermentación de la cebada, tiene gran influencia en el aroma y el tipo de cerveza. Así, se pueden tener cervezas ricas en extracto seco y de fermentación baja con contenidos de etanol del 1.0-1.5 % (w/w), cervezas flojas del 1.5-2.0 % (w/w), cervezas fuertes del 3.5-4.5 % (w/w) y cervezas muy fuertes del 4.8-5.5 % (w/w). (Belitz y Grosch). Se determinó el contenido en etanol tanto en cervezas con un contenido nominal del 4.8 % (v/v), como menor del 1% (v/v), que se denominarán a partir de ahora como cervezas con y sin alcohol, respectivamente. Para ello, se aplicaron tanto el método en discontinuo como en flujo, empleando un calibrado externo y el método de adiciones estándar en ambos casos, siguiendo la metodología expuesta en el apartado IV.4.4.3.6.2.1.

A modo de ejemplo, en las figuras 108 y 109, se muestran algunos de los amperogramas obtenidos en el análisis de las muestras de cerveza con (a) y sin (b) alcohol, empleando el método de adiciones estándar tanto en discontinuo como por inyección en flujo.

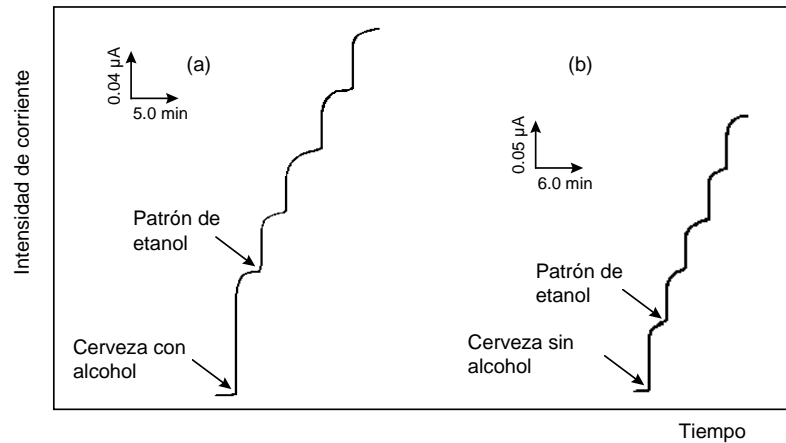


Figura 108. Registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo bienzimático de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno en una disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 en la determinación de etanol en cerveza con (a) y sin (b) alcohol por el método de adiciones estándar. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. Adiciones de 5 µl de una disolución patrón de etanol 0.1 mol l^{-1} .

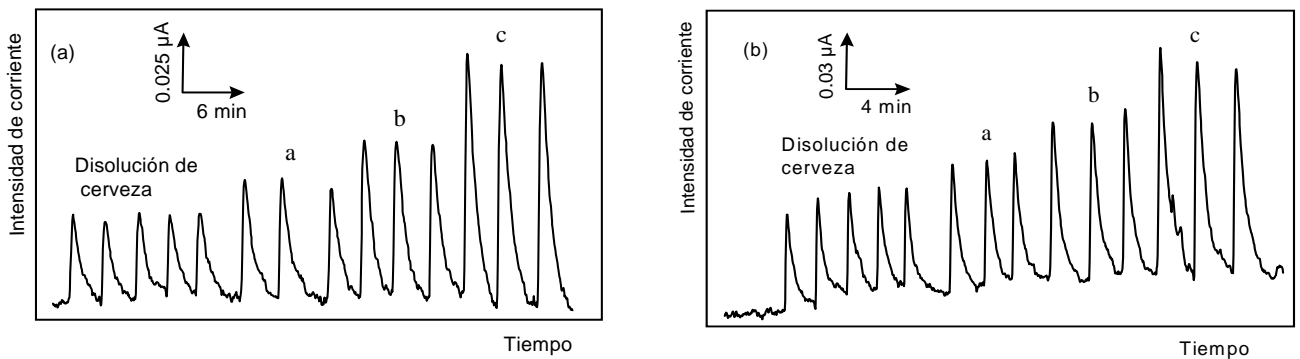


Figura 109. Diagramas obtenidos aplicando el método de adiciones estándar con el electrodo bienzimático de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno. Inyecciones de 50 µl de: (a) disolución de la cerveza con alcohol y (b) disolución de la cerveza sin alcohol; a) muestra + $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, b) muestra + $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, c) muestra + $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. Caudal = 1.0 ml min^{-1} .

Por lo que se refiere al análisis en discontinuo, cuando se compararon estadísticamente los valores de las pendientes de un calibrado externo y del correspondiente a las adiciones estándar, se obtuvieron valores de t_{cal} de 0.973 (con alcohol) y de 0.839 (sin alcohol), menores que el valor tabulado $t_{tab} = 1.895$ para un nivel de significación de 0.05, lo que indica que no hay diferencias significativas entre las pendientes y, por tanto, la ausencia de efecto matriz con estas muestras.

De la misma forma, se realizó la comparación estadística de las pendientes obtenidas a partir del calibrado externo y con el calibrado de adiciones estándar obtenidos mediante inyección en flujo. Para la cerveza con alcohol el valor de t_{cal} fue 0.383, menor que $t_{tab} = 2.920$ para un nivel de significación de 0.05, por lo que se pudo concluir que no existía efecto matriz. Lo mismo ocurrió para la cerveza sin alcohol ($t_{cal} = 0.415$ y $t_{tab} = 2.920$).

Con el fin de validar la exactitud de los métodos desarrollados, los resultados obtenidos se compararon estadísticamente, mediante el método de la t de Student, con los

proporcionados por un kit enzimático comercial que emplea detección colorimétrica de los productos obtenidos en la reacción enzimática (véase el apartado IV.4.4.3.6.2.4.a.). En la Tabla 46 se muestran los resultados obtenidos para cinco determinaciones de etanol en cada caso, junto con los intervalos de confianza calculados para un nivel de significación de 0.05.

Tabla 46. Resultados obtenidos para la determinación de etanol en cervezas con y sin alcohol con el biosensor amperométrico de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno y mediante el método de referencia elegido. $t_{\text{tab}}=1.86$ (N=5)

	Biosensor bienzimático, % EtOH			Método referencia, % EtOH	t_{exp}
Cerveza con alcohol	Amperometría en discontinuo	Calibrado externo	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.4	1.0
		Adiciones estándar	4.9 ± 0.2		0.5
	FIA con detección amperométrica	Calibrado externo	4.86 ± 0.09		0.7
		Adiciones estándar	4.9 ± 0.1		1.4
Cerveza sin alcohol	Amperometría en discontinuo	Calibrado externo	0.80 ± 0.02	0.83 ± 0.01	1.3
		Adiciones estándar	0.82 ± 0.03		0.7
	FIA con detección amperométrica	Calibrado externo	0.8 ± 0.1		0.7
		Adiciones estándar	0.84 ± 0.02		1.0

Como se puede deducir de los resultados recogidos en la Tabla 46, dado que t_{tab} tiene un valor de 1.86, no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el biosensor enzimático y el método de referencia, lo que indica la ausencia de errores determinados a un nivel de probabilidad del 95%. Así pues, se puede concluir que el electrodo compuesto de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno permite la determinación de etanol en cervezas con y sin alcohol, proporcionando valores significativamente iguales a los obtenidos con el método enzimático colorimétrico de referencia y con los contenidos especificados por las casas comerciales correspondientes (4.8 % (v/v) y >1 % (v/v) para la cerveza con y sin alcohol, respectivamente).

IV.4.5.8. HPLC CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA CON EL ELECTRODO DE GRAFITO - TEFLÓN-ALCOHOL OXIDASA-PEROXIDASA-FERROCENO

Son muchas las bebidas alcohólicas en las que se encuentran presentes otros alcoholes además del etanol. Además, son también numerosas las bebidas que contienen una proporción significativa de metanol (vinos, orujos, etc.), cuyo contenido máximo está legislado debido a sus efectos nocivos para la salud (Amelio, 1996). A la vista de los buenos resultados obtenidos con el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno en análisis por inyección en flujo, se evaluó la posibilidad de utilizar el biosensor compuesto bienzimático como detector amperométrico en un sistema de HPLC. Para ello se procedió a la separación de metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol y 1-pentanol.

Los rellenos de columnas más empleados en HPLC para la determinación de alcoholes son de intercambio iónico (Amelio, 1996). Sin embargo, cuando se trabaja con este tipo de columnas se suelen utilizar como fases móviles disoluciones ácidas de H_2SO_4 ó H_3PO_4 , en las que el biosensor no proporcionaría buenos resultados. Así pues, se eligió una columna de fase reversa Hypersil^R acoplada a la misma célula electroquímica que se empleó en el sistema de análisis por inyección en flujo.

Por otro lado, el empleo de modificadores orgánicos es la forma habitual de trabajar en sistemas cromatográficos que emplean columnas de fase reversa. Sin embargo, cada vez más se están empleando fases móviles sin este tipo de modificadores fundamentalmente por tres razones : minimización de desechos químicos, ampliación de las posibilidades de la detección y mayor adaptación del sistema cromatográfico a sistemas analíticos on-line y de detección remota (Quigley, 1999). Por otro lado, la determinación de alcoholes no precisa de modificadores para tener una buena resolución en los cromatogramas cuando se emplean columnas del tipo Hypersil^R (Galensa et al., 1998), por lo que en principio se empleó como fase móvil la disolución reguladora de fosfato de pH 7.4, que se utilizó como medio de trabajo tanto en discontinuo como en flujo. Sin embargo, fue necesario emplear una concentración menor de fosfato (0.01 mol l^{-1}), para evitar los problemas habituales cuando se utilizan estas disoluciones en cromatografía (ruido de fondo, problemas de precipitación de sales en el interior de la columna, etc). Así, el empleo de una menor concentración de fosfato en la fase móvil disminuyó el ruido de la línea base. Se utilizó también el mismo volumen de inyección que en inyección en flujo, es decir, $50 \mu\text{l}$. El tiempo muerto se calculó mediante la inyección de una disolución acuosa sin electrolito fondo, que coincidió con el pico que en algunos cromatogramas aparecía antes del pico del metanol, y que sirvió de referencia para calcular los diferentes parámetros cromatográficos.

En estas condiciones se registró el cromatograma de una disolución que contenía una mezcla de metanol $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, etanol $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, 1-propanol $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, 1-butanol $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y 1-pentanol $8.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (Figura 110). Se observa como los picos con una menor resolución son los correspondientes al metanol y etanol que, obviamente son los alcoholes que se analizan más frecuentemente en bebidas alcohólicas.

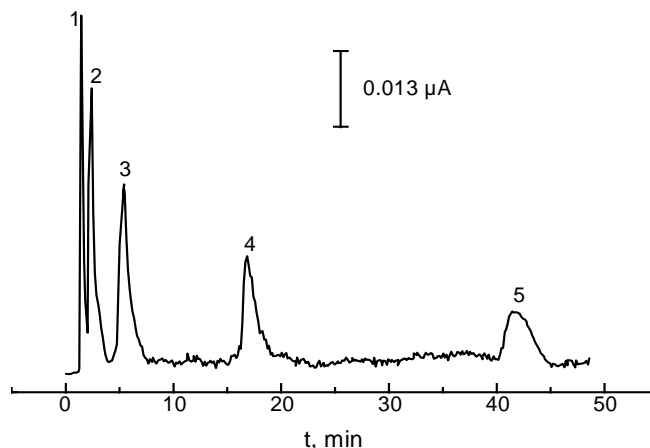


Figura 110. Cromatograma obtenido para una inyección de 50 μL de metanol $0.2 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (1), etanol $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (2), 1-propanol $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (3), 1-butanol $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (4) y 1-pentanol $8.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (5). Fase móvil : disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4), caudal : 1.0 ml min^{-1} , $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Con objeto de mejorar la resolución de estos dos picos se procedió a variar el caudal de la fase móvil. Para ello, se realizaron cromatogramas sucesivos a caudales comprendidos entre 0.2 y 1.0 ml min^{-1} , inyectando disoluciones patrón de metanol y etanol $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ respectivamente (Figura 111). En la Tabla 47 se resumen las características de los picos cromatográficos obtenidos para los diferentes caudales. Como se puede observar, no se obtuvo una separación hasta línea base de los picos cromatográficos para ninguno de los diferentes caudales ensayados. Sin embargo, la resolución a media altura de los picos es mayor de 1.25 en todos los casos.

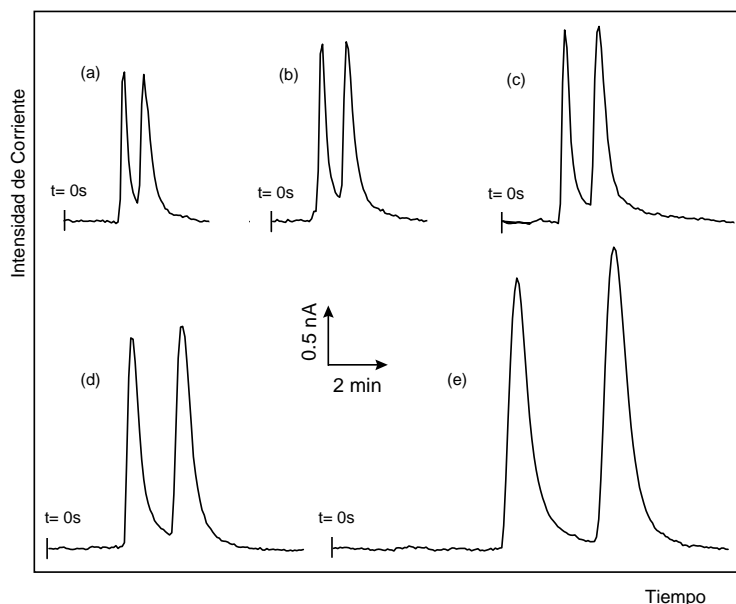


Figura 111 . Cromatograma correspondiente a la inyección de 50 μL de metanol $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y de etanol $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a diferentes caudales : (a) 1.0 ml min^{-1} , (b) 0.8 ml min^{-1} , (c) 0.6 ml min^{-1} , (d) 0.4 ml min^{-1} y (e) 0.2 ml min^{-1} . Fase móvil : disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.
Tabla 47. Tiempo de retención (t_R), anchura de pico a media altura ($W_{1/2}$), área de pico (A_p) y resolución de los picos obtenidos para inyecciones de 50 μL de disoluciones patrón de metanol $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y de etanol $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a diferentes caudales. Fase móvil : disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} , pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$.

Caudal, ml min ⁻¹	t _R , min		W _{1/2} , min		A _p , μA min		R _s
	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	
1.0	1.5	2.3	0.27	0.38	442.5	601.5	1.45
0.8	1.9	2.9	0.30	0.41	560.1	743.4	1.66
0.6	2.4	3.8	0.36	0.48	756.6	1010.1	1.96
0.4	3.7	5.7	0.54	0.64	1268.9	2543.6	1.99
0.2	7.4	11.3	0.86	1.00	2681.7	3237.2	2.50

La altura y el área de los picos del metanol y del etanol aumentaron al disminuir el caudal (Figura 111). Este comportamiento es característico cuando se utiliza un electrodo enzimático como detector, como ya se ha comentado a lo largo de esta Memoria. Por otro lado, se observaron pocas diferencias en lo que se refiere a la anchura y la altura de los picos cromatográficos, a pesar de que la concentración de etanol fuera considerablemente mayor, dado que el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno es mucho más sensible para el metanol. Como se puede apreciar en los cromatogramas, a medida que disminuye el caudal, el pico del etanol se hace mayor que el del metanol. Así, por ejemplo, en la Figura 111 (a) los picos de los dos alcoholes son prácticamente iguales, mientras que en la Figura 111 (e), el pico del etanol es significativamente mayor que el del metanol. Este comportamiento es debido a que la velocidad de la reacción enzimática para el etanol es menor para el metanol. Este factor puede contribuir además a la separación de los picos ya que, además de las diferentes interacciones de cada uno de los sustratos con el relleno de la columna, la diferente velocidad de las reacciones enzimáticas hace que la separación sea más efectiva que si los dos alcoholes tuvieran una misma velocidad enzimática.

A la vista de estos resultados se debería elegir un caudal de 0.2 mL/min. Sin embargo, considerando el tiempo de análisis, y que la sensibilidad no es un factor limitante en el análisis de estos alcoholes en bebidas alcohólicas, se eligió caudal para estudios posteriores de **1.0 mL min⁻¹**.

IV.4.5.8.1. REPETIBILIDAD DE LAS MEDIDAS

La repetibilidad de los tiempos de retención y de las áreas y alturas de pico se evaluó para cinco inyecciones sucesivas de 50 μl de una disolución que contenía metanol $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y etanol $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (Figura 112).

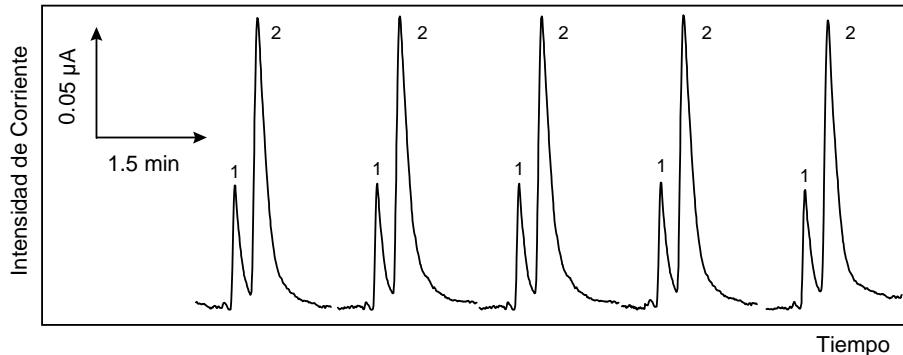


Figura 112 . Inyecciones sucesivas de 50 μl de una disolución de metanol $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (1) y etanol $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (2), en disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} . Caudal= 1.0 ml min^{-1} , $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

En la Tabla 48 se muestran los valores medios obtenidos para los tiempos de retención (t_R), factores de capacidad (k') para un tiempo muerto calculado de 1.2 min, alturas de pico (i_p) y áreas de pico (A_p) con sus correspondientes coeficientes de variación. Los intervalos de confianza se calcularon para un nivel de significación de 0.05.

Tabla 48 . Tiempos de retención (t_R), factores de capacidad (k'), alturas de pico (i_p) y áreas de pico (A_p) para cinco inyecciones sucesivas de 50 μl de una disolución de metanol $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y etanol $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} . Caudal= 1.0 ml min^{-1} , $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

Analito	t_R , min	k'	i_p , μA	RSD (%)	A_p , $\mu\text{A min}$	RSD (%)
Metanol	1.45	0.21	0.136 ± 0.002	0.7	228 ± 1	0.6
Etanol	2.29	0.91	0.30 ± 0.02	2.6	887 ± 19	0.9

Tanto los valores de t_r como de k' se dan sin intervalo de confianza y sin un valor de RSD ya que los cinco cromatogramas proporcionaron los mismos valores. Como se puede apreciar, los cuatro parámetros obtenidos con el electrodo compuesto de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno mostraron una muy buena repetibilidad, lo que confirmó una vez más la buena inmovilización de las enzimas y la estabilidad del biosensor a pesar de las condiciones hidrodinámicas.

IV.4.5.8.2. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

En las condiciones experimentales elegidas se establecieron las curvas de calibrado y las correspondientes características analíticas para la determinación de ambos alcoholes por HPLC con detección amperométrica con el biosensor. A modo de ejemplo, en la Figura 113 se muestran los cromatogramas correspondientes al intervalo de concentraciones $(0.1-1.6) \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y $(0.4-6.4) \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ para metanol (a) y etanol (b), respectivamente. En la Figura 114 se representan las correspondientes curvas de calibrado para metanol (A) y etanol (B).

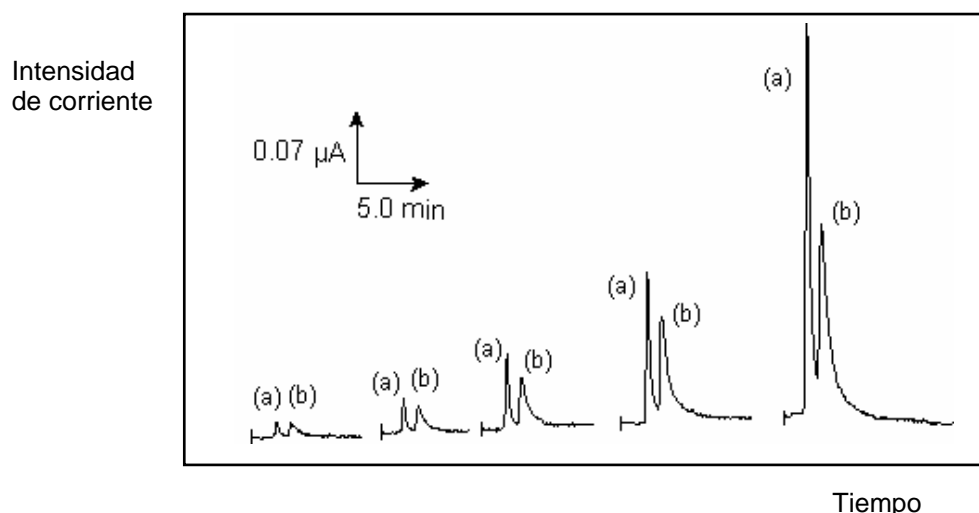


Figura 113. Cromatogramas para metanol (a) y etanol (a) obtenidos con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno acoplado a una columna Hypersil^R y empleando disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4) como fase móvil. Caudal: 1.0 ml min^{-1} , $E_{ap}=0.00 \text{ V}$.

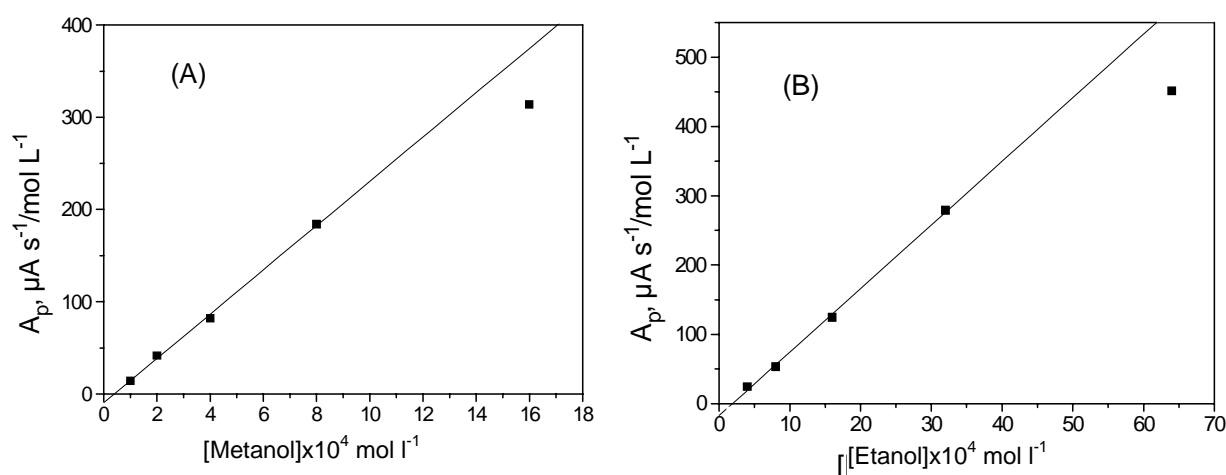


Figura 114. Curvas de calibrado para metanol (A) y etanol (B) obtenidas con el electrodo compuesto de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno mediante HPLC con detección amperométrica. Resto de condiciones experimentales como en la Figura 113.

En la tabla 49 se recogen las características para dichos calibrados. Como es habitual en esta Memoria, los intervalos lineales de las representaciones del área de pico frente a la

concentración del analito se tomaron considerando que no había pérdida de linealidad cuando el coeficiente de correlación era mayor de 0.998.

Tabla 49. Características analíticas de los calibrados para metanol y etanol obtenidos con el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno mediante HPLC con detección amperométrica. Condiciones experimentales como en la figura 113.

Analito	Intervalo lineal, mol l ⁻¹	Ordenada en el origen, μ A	Pendiente, μ A min/mol l ⁻¹	r
Metanol	(1.0-8.0)x10 ⁻⁴	-10 \pm 4	(240 \pm 8) x10 ³	0.9990
Etanol	(4.0-32.0)x10 ⁻⁴	-17 \pm 5	(92 \pm 3) x10 ³	0.9991

Como cabía esperar de nuevo, el intervalo lineal es más amplio para etanol, al tratarse de un sustrato con una constante de Michaelis mayor que para metanol (Liden et al., 1998b). Así mismo, también se obtuvo una menor pendiente demostrando de nuevo que la alcohol oxidasa es menos sensible para este alcohol que para metanol.

Por último, en la Tabla 50 se recogen los límites de detección, de determinación y desviación estándar relativa obtenidos a partir de las medidas correspondientes a diez inyecciones de cada uno de los alcoholes a los niveles de concentración indicados en la Tabla.

Tabla 50. Límites de detección, determinación y valores de RSD obtenidos para la determinación de metanol y etanol con el electrodo compuesto de grafito-teflón-AOD-HRP-ferroceno en el sistema de HPLC. Condiciones experimentales como las de la figura 113.

Analito	Nivel concentración, mol l ⁻¹	Límite determinación, mol l ⁻¹	Límite detección, mol l ⁻¹	RSD, %
Metanol	1.0x10 ⁻⁴	0.5x10 ⁻⁴	2.0x10 ⁻⁵	9.8
Etanol	4.0x10 ⁻⁴	2.6x10 ⁻⁴	8.0x10 ⁻⁵	8.7

Los niveles de concentración detectables son suficientes para la determinación de estos dos alcoholes en muestras reales. Como ya se ha comentado, la proporción de metanol (en caso de que exista) siempre será muchísimo menor que la de etanol en cualquier bebida alcohólica, por lo que no será posible en ningún caso la determinación simultánea de ambos alcoholes en este tipo de muestras mediante HPLC con detección amperométrica sobre el electrodo compuesto bienzimático, dado que no sería factible una dilución de la muestra que hiciera posible que los niveles de concentración respectivos estuvieran incluidos dentro del intervalo lineal del calibrado para cada alcohol. No obstante, se demostró en el apartado IV.4.5.7., que la determinación de etanol puede realizarse sin necesidad de una separación de los alcoholes, mientras que, por el contrario, la determinación de metanol requerirá incluir una separación cromatográfica previa al sistema de detección.

IV.4.5.8.3. DETERMINACIÓN DE METANOL Y ETANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS.

La determinación de etanol en bebidas alcohólicas puede llevarse a cabo mediante numerosos métodos. Como alternativa a los métodos tradicionales, se pueden emplear kits enzimáticos comerciales o biosensores basados en la AOD o en la alcohol deshidrogenasa. Sin embargo, los métodos de análisis más frecuentemente empleados para la determinación de metanol, son más complejos y tediosos que los empleados para determinar etanol, e implican cromatografía de gases, siempre que sea capaz de detectar menos de 20 ppm ($6.25 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), métodos colorimétricos como el basado en la oxidación del metanol con KMnO_4 y posterior derivatización del formaldehído formado con el reactivo de Schiff, y el basado en la derivatización con ácido cromotrópico (que es el que se ha empleado como método de referencia en este trabajo) y refractometría (Amelio, 1996).

Por todo ello, es importante desarrollar métodos de análisis que permitan la determinación de metanol y etanol de una forma sencilla y rápida. A continuación, se propone la determinación de estos dos alcoholes en vinos y aguardientes empleando el biosensor desarrollado. No se determinó metanol en cervezas, ya que no se encuentra en este tipo de bebida (Belitz y Grosch).

IV.4.5.8.3.1. Determinación en vinos

Estudios preliminares empleando las condiciones cromatográficas optimizadas para la determinación de metanol y etanol indican que no es posible la determinación conjunta de estos alcoholes en vinos, debido a que la concentración de etanol es muy superior a la de metanol en este tipo de bebida. Por ello, como ya se ha comentado, la cantidad de muestra que se debe tomar para obtener señales medibles para metanol en el sistema de HPLC, da lugar a señales para etanol que no entran en el intervalo lineal de concentraciones conseguido para este alcohol. Por ello, se procedió en primer lugar a determinar etanol mediante amperometría en discontinuo utilizando el método de adiciones estándar, ya que es el método de determinación más fácil y rápido de los desarrollados para un número de muestras relativamente pequeño. Además, se comprobó que, aunque la medida de control con el biosensor no entrara dentro de los límites establecidos con el gráfico de control, la aplicación del método de adiciones estándar permitía obtener concentraciones de analito prácticamente iguales a las obtenidas con un biosensor nuevo. Por lo tanto, empleando este método no es necesario pulir el electrodo hasta que la señal obtenida se encuentre dentro de dichos límites.

Antes de realizar la determinación del contenido de etanol, se procedió a estudiar la influencia de la presencia de metanol sobre la señal amperométrica del etanol. La relación de concentraciones a partir de la cual la señal del metanol producía una interferencia de un 10%

fue de 1 :10 (MeOH :EtOH). Por consiguiente, para cualquier bebida alcohólica puede descartarse una interferencia significativa por parte del metanol sobre la señal del etanol, ya que la relación de concentraciones entre ambos alcoholes siempre será mucho menor que dicha proporción.

a) *Determinación del contenido de etanol.*

La determinación de etanol se llevó a cabo siguiendo la metodología expuesta en el apartado IV.4.4.3.6.2.2. A modo de ejemplo, en la Figura 115 se muestran algunos de los amperogramas obtenidos para cada uno de los vinos analizados, recogiendo en la Tabla 51 los valores de dichos análisis. El número de muestras analizado en todos los casos fue de 5.

El contenido de etanol en vinos suele darse en grados alcohólicos volumétricos, lo que corresponde al número de litros de etanol en 100 litros de vino, medidos ambos volúmenes a la temperatura de 20 °C. En este trabajo, sin embargo, se dan los contenidos de etanol en g/l, ya que la determinación del alcohol se realizó sin tener en cuenta la temperatura y las correcciones pertinentes. Así, para los vinos analizados, que tienen una graduación de 12°, el contenido en etanol corresponde a un valor de 96 g/l.

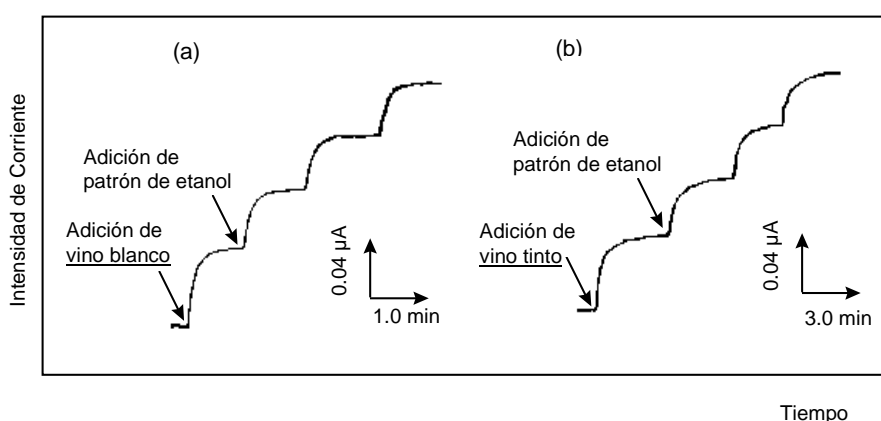


Figura 115. Amperogramas obtenidos con el biosensor de grafito-Teflón-AOD-HRP-Ferroceno para la determinación de etanol en vino blanco (a), vino tinto (b) por el método de las adiciones estándar. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 7.4). $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

Tabla 51. Contenidos de etanol en vino blanco y vino tinto obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-Ferroceno y el método espectrofotométrico de referencia ($n=5$)

	Biosensor bienzimático, g/l EtOH	Método de referencia, g/l EtOH		Valor teórico, g/l EtOH	
		t_{exp}	t_{exp}	t_{exp}	t_{exp}
Vino blanco	95 ± 3	104 ± 8	0.35	96	1.12
Vino tinto	94 ± 4	96 ± 8	0.70	96	2.24

Con el fin de validar los resultados obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno, se compararon con los proporcionados por un método de referencia basado en

la oxidación de etanol con dicromato y posterior valoración por retroceso con sulfato de amonio y hierro (II), cuya metodología se describe en el apartado IV.4.4.3.6.2.4.b.

Los resultados obtenidos con este método de referencia para las mismas 5 muestras de cada uno de los vinos, se recogen en la Tabla 51. La comparación estadística de los resultados obtenidos por ambos métodos, mediante el criterio de la *t* de Student, proporcionó t_{exp} menores en todos los casos que la t_{tab} ($t_{tab}=2.306$), lo que indicó que no existían diferencias significativas entre ambos métodos y que, por lo tanto, no había errores determinados para un nivel de probabilidad del 95 %.

Por otro lado, la comparación de la media de los valores obtenidos con el biosensor bienzimático con el valor etiquetado, aplicando el criterio de la *t* de Student, indicó así mismo que no existían diferencias significativas entre dichos valores para todas las muestras analizadas, siendo la t_{exp} en todos los casos, menor que la t_{tab} ($t_{tab}=2.776$).

A la vista de los resultados obtenidos, se puede decir que el método desarrollado para la determinación de etanol en vinos con el biosensor compósito bienzimático es sencillo, rápido, sensible y selectivo si se compara con otros métodos clásicos u oficiales, y evita muchas etapas del tratamiento de muestra, ya que utilizando el biosensor simplemente se requiere una dilución del vino, añadiéndose directamente la disolución resultante a la célula de trabajo. Esto hace que el tiempo necesario para analizar cada muestra sea solo de aproximadamente 5 minutos.

b). *Determinación de metanol.*

La determinación de metanol en los vinos de mesa empleando un electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno como detector en el sistema de HPLC, se llevó a cabo siguiendo la metodología expuesta en el apartado IV.4.4.3.6.2.3. Es de destacar que solo fue necesaria una dilución del vino en la fase móvil como tratamiento de la muestra antes de su inyección en el sistema de HPLC. A modo de ejemplo, en la Figura 116, se muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra de vino blanco y a una de vino tinto. El primero de los picos corresponde al pico de inyección de la muestra, como ya se comentó anteriormente.

En la Tabla 52 se muestran los valores obtenidos para el contenido de metanol en los vinos, tanto con el biosensor como con un método de referencia, basado en la oxidación del metanol y posterior derivatización con ácido cromotrópico para llevar a cabo una detección colorimétrica (apartado IV.4.4.3.6.2.4.c.). El número de muestras analizadas fue de 10 los dos métodos.

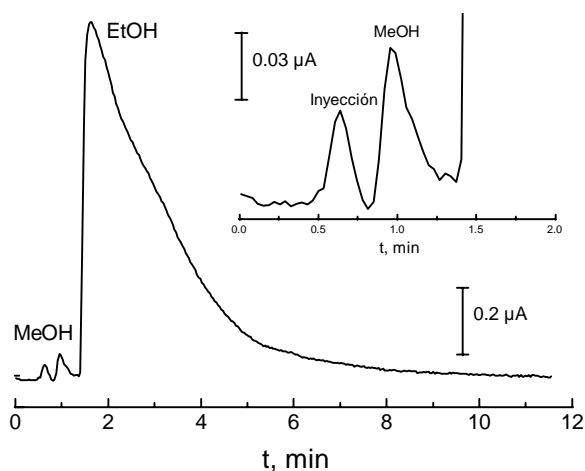


Figura 116. Cromatograma correspondiente a la inyección de 50 μl de disolución preparada diluyendo 0.5 ml de vino blanco en 5 ml de disolución portadora de fosfato 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4). Caudal=1.0 ml min^{-1} , E_{ap} = 0.00 V.

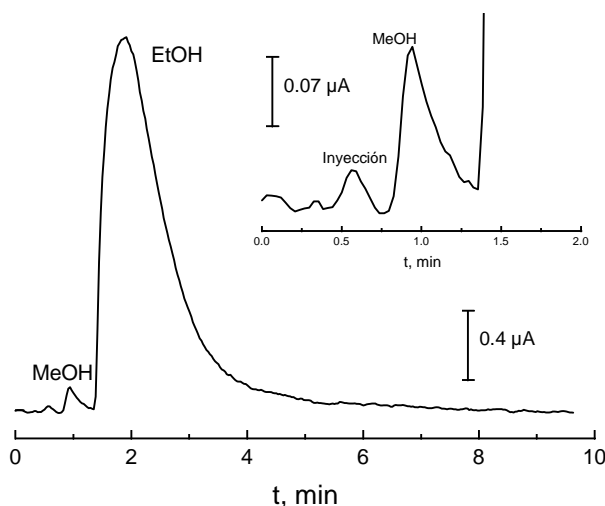


Figura 117. Cromatograma correspondiente a la inyección de 50 μL de disolución preparada por dilución de 0.5 ml de vino tinto en 5 ml de disolución portadora de fosfato 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4). Caudal=1.0 ml min^{-1} , E_{ap} = 0.00 V.

Tabla 53. Contenido de metanol en vino blanco y vino tinto obtenidos con el biosensor compuesto para alcoholes en HPLC y con el método espectrofotométrico de referencia

	Biosensor MeOH, g/L	Método de referencia MeOH, g/L	t exp
Vino blanco	0.079 \pm 0.002	0.07 \pm 0.02	0.897
Vino tinto	0.179 \pm 0.007	0.15 \pm 0.06	1.708

Se compararon estadísticamente los resultados obtenidos por ambos métodos aplicando el criterio de la t de Student. Para ambas muestras, el valor de la t experimental es menor que t tabulada ($t_{tab}=2.101$), lo que indica que no existían diferencias significativas en ninguno de los casos. De nuevo, se puso de manifiesto la validez del electrodo compuesto de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno para ser utilizado como detector amperométrico en HPLC, así como su aplicabilidad a la determinación del contenido de metanol en vinos de forma rápida, con un tiempo de análisis de aproximadamente 15 minutos.

IV.4.5.8.3.2. Determinación en aguardientes

En este caso, tampoco fue posible la determinación cromatográfica conjunta de etanol y metanol, por las mismas razones expuestas en la determinación de estos alcoholes en los vinos. Por lo tanto, de forma análoga, se procedió a determinar el etanol en primer lugar con el biosensor de alcohol oxidasa y peroxidasa mediante amperometría en discontinuo y aplicando el método de las adiciones estándar. Lógicamente, si el metanol no interfería en la determinación de etanol en los vinos, con menor motivo habrá una interferencia significativa en los aguardientes, dado la mayor concentración de etanol presente. La determinación de metanol se realizó, nuevamente, empleando el electrodo compósito bienzimático como detector amperométrico en el sistema de HPLC.

a) Determinación de etanol

Se determinó el contenido de etanol en los aguardientes siguiendo la metodología expuesta en el apartado IV.4.4.3.6.2.3. En la Figura 118 se muestran alguno de los registros intensidad-tiempo obtenidos para el orujo blanco y el orujo de hierbas.

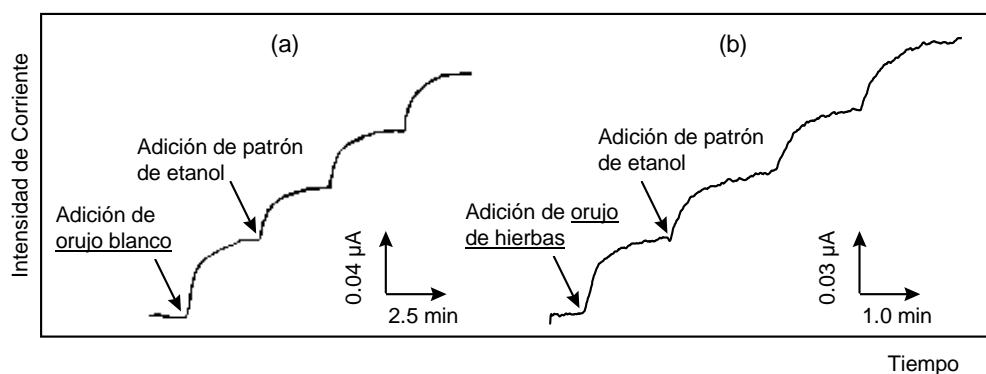


Figura 118. Registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo bienzimático en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, para la determinación de etanol en orujo blanco (a) y orujo de hierbas (b) por el método de adiciones estándar. $E_{app}=0.00 \text{ V}$

En la Tabla 53 se recogen los contenidos de etanol obtenidos con el electrodo bienzimático, así como con el comercial de Boehringer que emplea detección colorimétrica.

Tabla 53. Contenido de etanol en orujo blanco y de hierbas obtenidos con el biosensor bienzimático compósito y el kit enzimático comercial ($n=5$)

	Biosensor, g/l EtOH	Método de referencia	t exp
Orujo blanco	304 ± 8	328 ± 24	1.49
Orujo de hierbas	312 ± 8	320 ± 16	1.14

La comparación estadística de los resultados obtenidos por el criterio de la *t* de Student ($t_{\text{tab}}=2.306$) indicó que no existían diferencias significativas en los valores proporcionados por ambos métodos en las dos muestras analizadas, lo que demuestra que el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno es utilizable para la determinación de etanol en aguardientes.

Como se ha visto en las diversas aplicaciones del electrodo bienzimático a la determinación de etanol en bebidas alcohólicas, el kit enzimático que se ha utilizado como método de referencia proporcionó, en todos los casos, resultados muy similares a los obtenidos con el biosensor. Sin embargo, la comparación de los procedimientos experimentales seguidos con ambos métodos permite concluir que el empleo del kit enzimático comercial implicó un tiempo de análisis elevado debido a la preparación de las diferentes disoluciones. Sin embargo, el análisis de las distintas muestras con el electrodo compuesto bienzimático requiere solo una dilución de la bebida y la posterior adición de una alícuota a la célula de medida, por lo que el tiempo de análisis para cada muestra fue de 5 minutos aproximadamente.

b) Determinación de metanol

La determinación de metanol en aguardientes precisó, como único tratamiento de muestra antes de su inyección en el sistema cromatográfico una simple dilución del aguardiente en la fase móvil. En las Figuras 119 y 120 se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos para la inyección de 50 μL de orujo blanco y orujo de hierbas. En la Tabla 54 se recogen los valores obtenidos con el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno y con el método de referencia elegido.

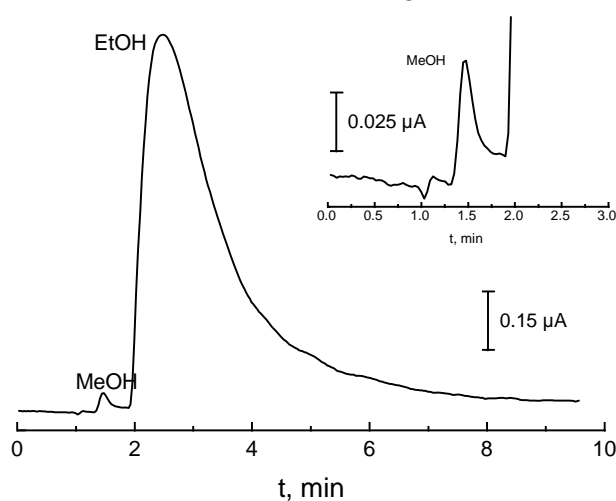


Figura 119. Cromatograma correspondiente a la inyección de 50 μL de una disolución preparada por dilución de 100 μL de orujo blanco en 5.0 ml de disolución portadora de fosfato 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4). Caudal=1.0 ml min^{-1} , $E_{\text{ap}}=0.00$ V.

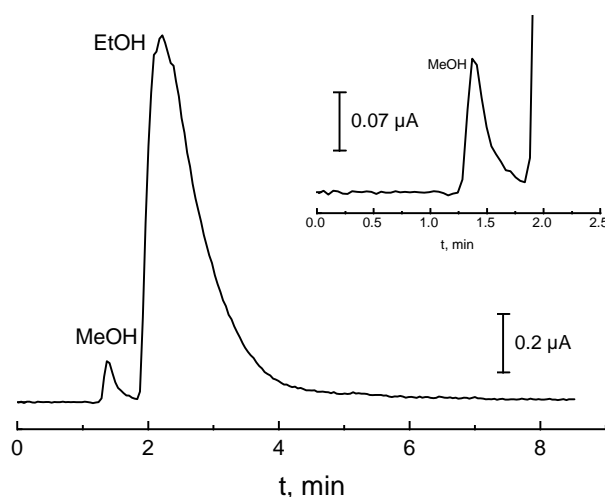


Figura 120. Cromatograma correspondiente a la inyección de 50 μL de una disolución preparada por dilución de 100 μl de orujo de hierbas en 5 ml de disolución portadora de fosfato 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4). Caudal=1.0 ml min^{-1} , E_{ap} = 0.00 V.

Tabla 54. Contenido de metanol en orujo blanco y orujo de hierbas obtenidos con el biosensor compuesto bienzimático y el método de referencia ($n=10$)

	Biosensor, MeOH, g/L	Método de referencia, MeOH, g/L	t exp
Orujo blanco	0.29 \pm 0.02	0.30 \pm 0.05	0.376
Orujo de hierbas	1.06 \pm 0.05	1.1 \pm 0.1	0.945

Los dos tipos de aguardientes analizados mostraron contenidos de metanol menores que los niveles permitidos, si bien se observó una diferencia considerable entre la cantidad de metanol encontrada en el orujo blanco y en el de hierbas. De nuevo se compararon los valores obtenidos por cada uno de los métodos aplicando el criterio de la t de Student. Puesto que el valor de la t de Student tabulada ($t_{\text{tab}}= 2.101$) era mayor que el de la calculada en ambos casos, se dedujo que no existían diferencias significativas entre los valores de metanol obtenidos con el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno y el método espectrofotométrico.

Si en el apartado IV.4.5.7. ya se pusieron de manifiesto algunas de las ventajas de la utilización del biosensor compuesto frente a otros métodos de análisis de etanol, es en el caso de la determinación de metanol donde éstas son mucho más acusadas. En los métodos existentes, los tiempos de análisis son mucho mayores debido a la necesidad de destilar y de mantener un determinado tiempo a temperatura constante las mezclas de reactivos para que se den las reacciones de forma completa. Así pues, el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno supone una muy buena alternativa a los métodos tradicionales de análisis de alcoholes ya que, además de las ventajas ya reseñadas, permite la determinación

de etanol y metanol con el mismo electrodo bienzimático, lo que posibilita la disminución del coste del análisis.

Por otro lado, hay que resaltar que, a pesar de que existen publicados trabajos sobre biosensores de AOD para la determinación de etanol y metanol, las aplicaciones a muestras reales de estos biosensores suelen consistir en la monitorización de etanol, bien en procesos de fermentación (Marko-Varga et al., 1994), en fluidos biológicos (Linden, et al. 1998b; Tagliaro et al. 1991), o incluso en bebidas alcohólicas (Galensa et al., 1998), pero son escasas las aplicaciones a la determinación de metanol.

IV.4.6. ELECTRODO BIENZIMÁTICO DE RVC-RESINA EPOXI-ALCOHOL OXIDASA-PEROXIDASA-FERROCENO

A pesar de las excelentes características del electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno, se propuso también el desarrollo de un electrodo bienzimático con la matriz de RVC-resina epoxi con objeto de verificar su aplicabilidad para la construcción de este tipo de biosensores. Así pues, se fabricó un electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno de acuerdo con el procedimiento experimental que se indica en el apartado IV.4.4.3.2.2. Las enzimas se coinmovilizaron por atrapamiento físico en todo el volumen de la matriz electródica junto con el mediador ferroceno, obteniéndose de este modo un depósito tridimensional de enzima de fácil regeneración superficial. El esquema con la secuencia de reacciones que tienen lugar se ha mostrado ya en la introducción de este capítulo.

En el capítulo III.6.3. ya se optimizaron las condiciones relativas a los electrodos de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno (pretratamiento del RVC, cantidad de HRP inmovilizada en la matriz electródica, curado de la resina, etc.), por lo que éstas fueron las mismas que se emplearon para la construcción del electrodo de alcohol oxidasa. La optimización del resto de variables experimentales se realizó mediante amperometría en disoluciones agitadas, utilizando metanol como sustrato, por ser el que proporciona señales mayores y más rápidas con la alcohol oxidasa.

IV.4.6.1. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES

IV.4.6.1.1. CONTENIDO DE ALCOHOL OXIDASA EN LA MATRIZ ELECTRÓDICA

La cantidad de enzima coinmovilizada en el seno de la matriz de RVC se optimizó estudiando su influencia sobre la intensidad de corriente en estado estacionario proporcionada por una concentración $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de sustrato. Para ello, se construyeron tres electrodos compósitos diferentes conteniendo 25, 50 y 100 unidades de enzima, respectivamente. En la figura 121 se muestran los resultados obtenidos.

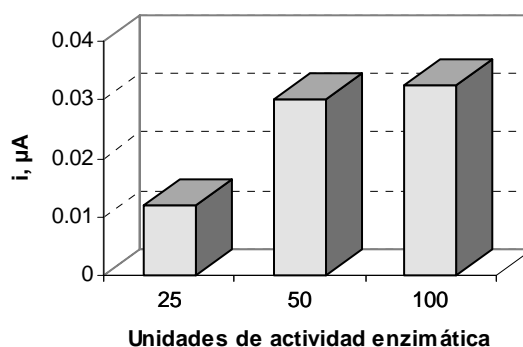


Figura 121. Intensidad de corriente en estado estacionario obtenidas para metanol $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ con electrodos de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno conteniendo diferentes cantidades de AOD. Tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4

Como se puede apreciar, la respuesta del biosensor con 50 unidades de enzima era más del doble que la obtenida con el construido con 25 unidades. Sin embargo, apenas se apreciaron diferencias cuando se inmovilizaron 100 unidades de enzima. Por ello, se eligió una carga de AOD de **50 unidades** para estudios posteriores.

IV.4.6.1.2. INFLUENCIA DEL pH

La influencia del pH de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} sobre la intensidad de corriente en estado estacionario, para una concentración de metanol de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, se muestra en la Figura 122 en el intervalo de pH entre 5.0 y 9.0.

Puede observarse como a partir de pH 6.0, no se apreció una variación significativa en la intensidad de corriente en estado estacionario. Se eligió un **pH de trabajo de 7.4** para estudios posteriores, por ser el más utilizado en los trabajos existentes en la bibliografía, y por ser el pH que se eligió para trabajar con el electrodo de RVC-resina epoxi- HRP-ferroceno.

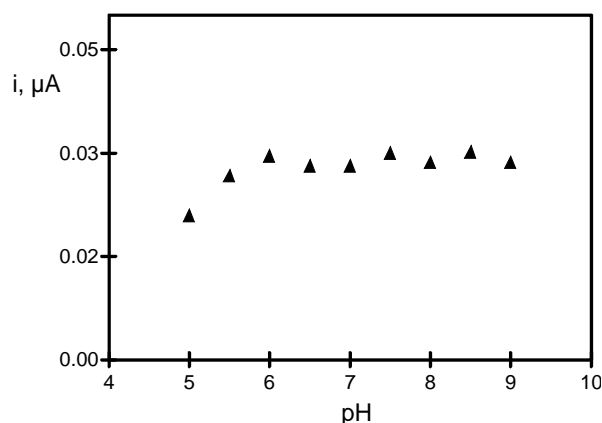


Figura 122. Influencia del pH sobre la intensidad de corriente en estado estacionario obtenida con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno para una concentración de metanol de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. $E_{ap} = 0.0 \text{ V}$.

IV.4.6.1.3. INFLUENCIA DEL POTENCIAL APLICADO SOBRE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE EN EL ESTADO ESTACIONARIO

La influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida para una concentración de metanol $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, se muestra en la Figura 123.

En el intervalo de potencial comprendido entre -0.15 V y 0.15 V , la señal amperométrica resultó ser, disminuyendo para valores superiores o inferiores a los del intervalo mencionado. En este caso, la reducción electródica de H_2O_2 y O_2 comenzó a afectar la respuesta del biosensor a potenciales más negativos que cuando se trabajó con la matriz de grafito-Teflón, lo que demuestra que dichas reducciones electródicas dependen, lógicamente, de la matriz electródica. Se eligió un **potencial de 0.00 V** para estudios posteriores con el propósito de minimizar las posibles interferencias.

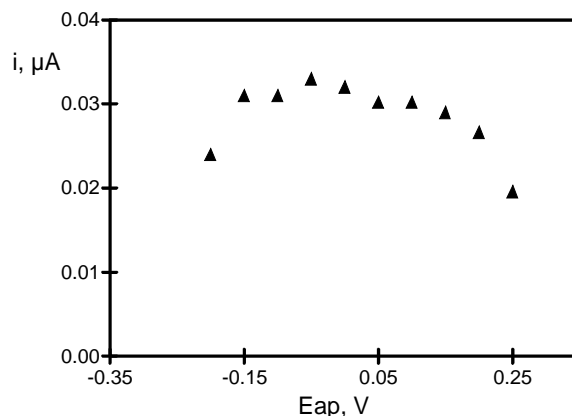


Figura 123. Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente obtenida con el electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-Ferroceno para una concentración de metanol $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

IV.4.6.2. ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR

Al igual que para el resto de los biosensores desarrollados se evaluó la estabilidad del biosensor bienzimático mediante la repetibilidad de las medidas obtenidas sin regeneración de la superficie electródica, la reproducibilidad de las medidas obtenidas regenerando la superficie electródica por pulido, la estimación del tiempo de vida útil de un electrodo y la reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos. Los valores de intensidad de corriente en el estado estacionario para metanol $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 se recogen en la tabla 60. Se incluyen también los valores de las desviaciones estándar relativas correspondientes y los intervalos de confianza calculados para un nivel de significación de 0.05.

La repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica se evaluó para una serie de 10 medidas de disoluciones de metanol diferentes. El valor de la desviación estándar relativa obtenido, 6.4 %, refleja una aceptable repetibilidad de las medidas amperométricas sin necesidad de regenerar la superficie del electrodo.

Para evaluar la reproducibilidad de la superficie electródica por pulido, se llevaron a cabo 10 pulidos y, tras cada uno de ellos, se realizaron tres medidas de la intensidad de corriente en el estado estacionario. Se obtuvo un valor de la desviación estándar relativa del 6.3 % para los 10 valores medios de dicha corriente, indicando que el electrodo compuesto bienzimático proporcionó medidas reproducibles después de su regeneración superficial, y que las enzimas se encuentran distribuidas de forma uniforme en el seno de la matriz de RVC.

Tabla 55. Estabilidad del electrodo compuesto bienzimático de RVC-Resina Epoxi-AOD-HRP-Ferroceno. Concentración de metanol: $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4). $E_{ap} = +0.00 \text{ V}$.

	i, μA		RSD, %
Repetibilidad de las medidas sin regeneración de la superficie electródica	0.030	0.030	6.4
	0.029	0.029	
	0.027	0.028	
	0.030	0.026	
	0.029	0.026	
i media= $0.028 \pm 0.002 \mu\text{A}$			
Reproducibilidad de las medidas tras regeneración de la superficie electródica por pulido	0.030	0.030	6.3
	0.031	0.035	
	0.030	0.032	
	0.029	0.032	
	0.032	0.030	
i media= $0.031 \pm 0.001 \mu\text{A}$			
Tiempo de vida útil del electrodo	20 días		
Reproducibilidad en la fabricación de los electrodos	Electrodo	i, μA	RSD %
	1	0.028	6.0
	2	0.030	
	3	0.029	
	4	0.033	
	5	0.030	
	6	0.032	

A pesar de la posibilidad de recuperar la señal amperométrica mediante regeneración de la superficie del electrodo por un simple pulido, el biosensor posee un tiempo de vida útil durante el cual funciona proporcionando señales reproducibles, pero una vez transcurrido, deja de responder adecuadamente incluso regenerando su superficie. En el apartado III.6.4. se demostró que era necesario pulir diariamente la superficie del electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-ferroceno ya que, en caso contrario, la señal decaía paulatinamente. Este comportamiento se puso de manifiesto también con el biosensor de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno, incluso de forma más acusada, ya que en ocasiones fue necesario realizar más de un pulido para recuperar la señal.

Para evaluar el tiempo de vida útil del electrodo bienzimático, se construyó un gráfico de control con los valores medios de tres medidas realizadas diariamente con distintas disoluciones de metanol $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Para construir el gráfico de control se tomó como período base las medidas de las señales amperométricas obtenidas en el estudio de repetibilidad sin regeneración de la superficie electródica. Así, el valor central del diagrama de

control fue de $0.028 \mu\text{A}$, mientras que el límite de control superior fue $0.034 \mu\text{A}$ y el límite inferior $0.022 \mu\text{A}$. En la figura 124 se representa dicho gráfico para 27 días.

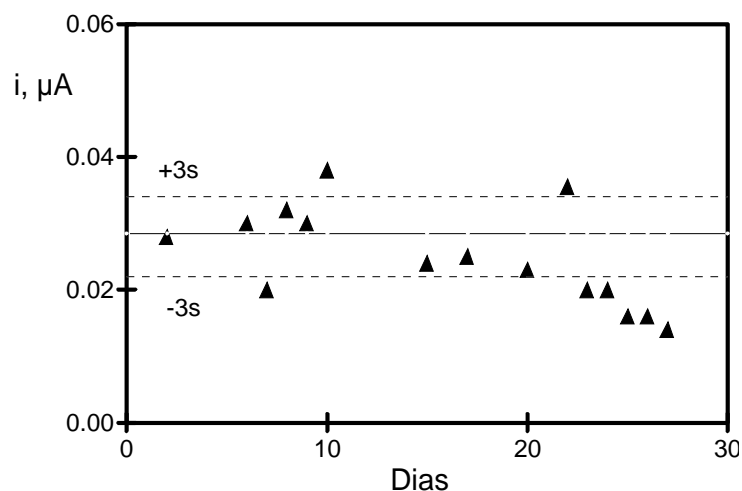


Figura 124. Gráfico de control obtenido con el electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno. Medidas realizadas para una concentración de metanol de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$

Como se puede observar, el electrodo de RVC-Resina Epoxi-AOD-HRP-ferroceno tiene un período de vida útil de aproximadamente **20 días**, periodo similar al del electrodo de RVC-Resina Epoxi-HRP-Ferroceno (apartado III.6.4.). Independientemente del número de enzimas inmovilizadas, el tiempo de vida de estos electrodos es similar, e incluso superior, al de otros electrodos compósitos enzimáticos reportados en la bibliografía (Alegret, 1996).

Debido a que el biosensor presentaba un período de vida útil limitado, se evaluó la reproducibilidad de las respuestas analíticas obtenidas con diferentes electrodos construidos de la misma manera. En la Tabla 55 se recogen los valores de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos con seis electrodos diferentes. La desviación estándar relativa del 6.0%, permitió deducir que el proceso de fabricación de los electrodos era reproducible y fiable, permitiendo conseguir respuestas electroanalíticas reproducibles con diferentes electrodos.

IV.4.6.3. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Se construyeron curvas de calibrado con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno para el metanol, etanol, propanol, butanol y 1-pentanol en la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. En la figura 125 se muestran dichas curvas de calibrado para metanol (a), en el intervalo de concentración 1.0×10^{-6} - $10.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ y para el etanol (b) en el intervalo 1.0×10^{-6} - $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Las curvas de calibrado para propanol (a) y para butanol (b) en los intervalos de concentración comprendidos entre 5.0×10^{-6} a $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ y 5.0×10^{-6} y $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, respectivamente, se muestran en la figura 126. Finalmente, la representación de la variación de la intensidad de corriente en estado estacionario con la concentración de 1-pentanol en el intervalo 1.0×10^{-5} a $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ se muestra en la Figura 127.

El electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno responde a todos los alcoholes ensayados, si bien se observa que a medida que aumenta la cadena alifática del alcohol, se obtuvieron valores de intensidad menores y una velocidad de reacción más lenta, de forma análoga a lo observado con el electrodo de grafito-Teflón-AOD-ferroceno.

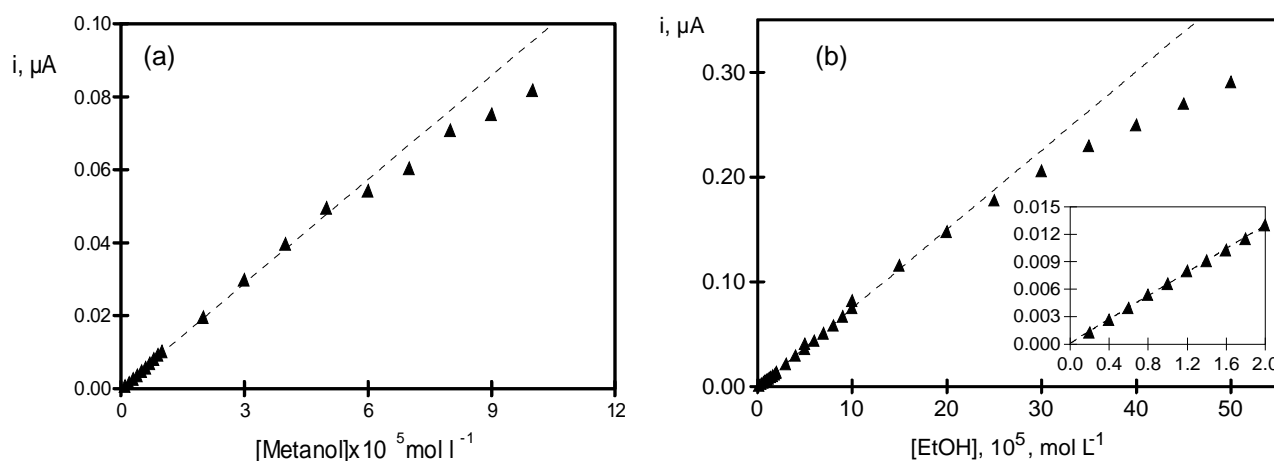


Figura 125. Curvas de calibrado para metanol (a) y para etanol (b) obtenidas con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-Ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$

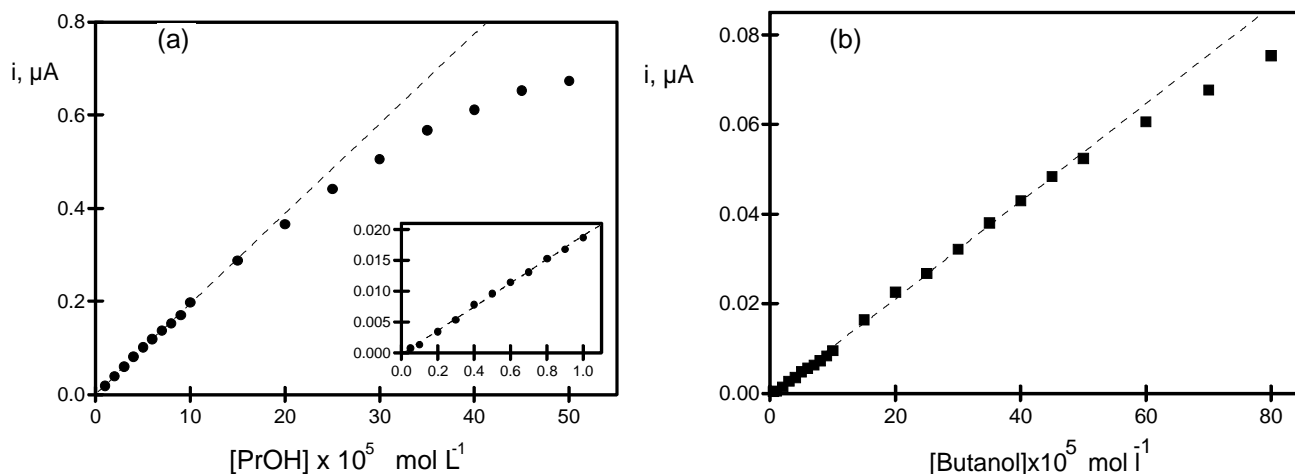


Figura 126. Curvas de calibrado para propanol (a) y butanol (b) obtenidas con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-Ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$

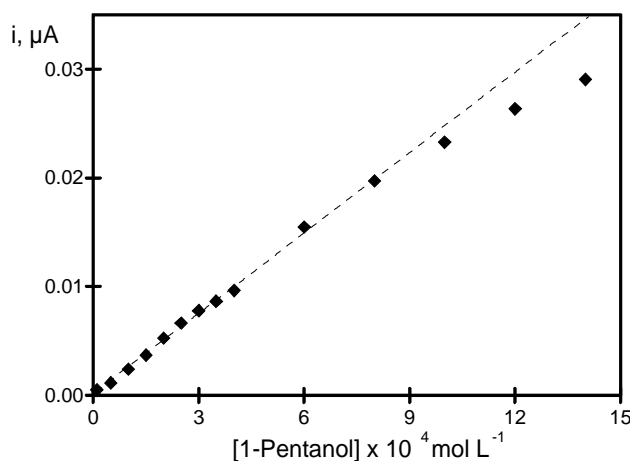


Figura 127. Curva de calibrado para alcohol *n*-amílico obtenida con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$

El intervalo lineal de estos calibrados se estimó, para cada alcohol, mediante regresión por mínimos cuadrados, considerando que no se producía desviación de la linealidad cuando el coeficiente de correlación era mayor de 0.998. En la Tabla 61 se recogen las características de las porciones lineales de dichos calibrados.

De los resultados obtenidos, es posible deducir la posibilidad de emplear el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-Ferroceno para la determinación de alcoholes de cadena corta diferentes del metanol y el etanol, si bien es para estos dos alcoholes para los que se obtiene una mayor sensibilidad. Como se observa en la Tabla, a medida que aumenta el número de carbonos de la cadena alifática del alcohol, aumenta el intervalo de linealidad y disminuye el valor de la pendiente, lo que concuerda con la variación de los parámetros cinéticos enzimáticos existentes en la bibliografía (Liden et al., 1998b) y con los calculados con el biosensor de grafito-Teflón, es decir, al aumentar el número de carbonos aumenta la constante

de Michaelis y, consecuentemente, aumenta el intervalo lineal y disminuye la sensibilidad.

Tabla 56. Características de los calibrados obtenidos para metanol, etanol, propanol, butanol y 1-pentanol con el electrodo bienzimático de RVC-Resina Epoxi-AOD-HRP-Ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

Sustrato	Intervalo de linealidad, mol l^{-1}	Pendiente, $\mu\text{A mol}^{-1} \text{ l}$	Ordenada en el origen, μA	r
Metanol	$(0.1-6.0)\times 10^{-5}$	$(9.49 \pm 0.16)\times 10^2$	$(3 \pm 4)\times 10^{-4}$	0.998
Etanol	$(0.4-25)\times 10^{-5}$	$(6.71 \pm 0.09)\times 10^2$	$(20 \pm 8)\times 10^{-4}$	0.998
1-Propanol	$(0.5-80)\times 10^{-5}$	$(1.76 \pm 0.02)\times 10^2$	$(57 \pm 25)\times 10^{-4}$	0.998
1-Butanol	$(0.5-80)\times 10^{-5}$	$(1.03 \pm 0.02)\times 10^2$	$(0.5 \pm 0.5)\times 10^{-4}$	0.998
1-Pentanol	$(1.0-100.0)\times 10^{-5}$	$(0.24 \pm 0.04)\times 10^2$	$(3 \pm 2)\times 10^{-4}$	0.998

Los límites de determinación y de detección se calcularon a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones distintas de cada uno de los alcoholes a los niveles de concentración indicados en la Tabla 57 aplicando los criterios de $10 \times$ desviación estándar y de $3s_b/m$, respectivamente. En la Tabla 57 se recogen los valores de la desviación estándar relativa y de los límites de detección y determinación para los distintos alcoholes.

Tabla 57. Límites de detección y determinación para metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol y 1-pentanol obtenidos con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4.

Sustrato	Nivel cc. mol l^{-1}	Límite determinación, mol l^{-1}	Límite detección, mol l^{-1}	RSD, %
Metanol	1.0×10^{-6}	4.2×10^{-7}	1.3×10^{-7}	9.0
Etanol	4.0×10^{-6}	1.5×10^{-6}	4.5×10^{-7}	8.0
1-Propanol	5.0×10^{-6}	1.1×10^{-5}	3.4×10^{-6}	12.0
1-Butanol	5.0×10^{-6}	1.9×10^{-5}	5.8×10^{-6}	12.0
1-Pentanol	1.0×10^{-5}	4.2×10^{-5}	1.3×10^{-5}	20.0

De los resultados obtenidos merece la pena destacar los buenos límites de detección y determinación obtenidos para metanol y para etanol. Por otro lado, se obtuvieron valores altos de los coeficientes de variación para el propanol, butanol y pentanol. Puesto que al aumentar la longitud de la cadena alifática, la reacción enzimática con la alcohol oxidasa es más lenta, la repetibilidad de las señales amperométricas empeora, lo que implica la obtención de límites de detección y determinación más altos de lo que cabría esperar a la vista de los intervalos de linealidad y del comportamiento de los alcoholes inferiores (metanol y etanol).

Si se comparan las características analíticas conseguidas con el electrodo de RVC-Resina Epoxi-AOD-HRP-ferroceno con las del electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno, se observa de nuevo que los límites de detección son mejores con la matriz de RVC, gracias a la buena relación señal/ruido que se obtiene sobre todo para metanol y etanol. Sin embargo, en el caso de los alcoholes con mayor número de carbonos, las diferencias de sensibilidad y entre límites de detección se hacen menos acusadas. Este hecho corrobora lo comentado en el apartado III.7. en el que se llegaba a la conclusión de que, a medida que aumenta la hidrofobicidad del sustrato, empeoran las características analíticas del electrodo de RVC-resina epoxi mucho más que con el de grafito-teflón. En este caso, también son más pequeñas las pendientes de los calibrados obtenidos con el biosensor de RVC que con el de grafito-Teflón, pero las diferencias son menos acusadas que con los electrodos de peroxidasa. Este hecho puede estar relacionado con las dimensiones de cada matriz electródica en la que se distribuyen las enzimas. En la matriz de RVC-resina epoxi (vol= 0.075 cm³) hay 3600 U cm⁻³ de HRP y 667 U cm⁻³ de AOD, mientras que en la matriz de grafito-Teflón (vol= 0.53 cm³) hay 5094 U cm⁻³ y 540 U cm⁻³ de HRP y AOD, respectivamente. Esto significa que, en proporción, hay más cantidad de AOD en la matriz de RVC-resina epoxi que en la de grafito-Teflón, mientras que en el caso de la peroxidasa, es en la matriz de grafito-Teflón donde existen más unidades de enzima por unidad de volúmen.

IV.4.6.4. INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

La buena estabilidad del electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-AOX-ferroceno exhibida en discontinuo, así como su rápida respuesta a los cambios en la concentración de sustrato sugirieron la posibilidad de utilizar este electrodo compuesto bienzimático como detector en un sistema de flujo. En todos los experimentos se utilizó una célula de flujo de tipo “wall-jet” de gran volumen (apartado III.4.1.2. de la Parte Experimental), una disolución portadora de regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4, y el mismo potencial que en las medidas en discontinuo, 0.00 V .

IV.4.6.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS

a) Efecto del volumen de inyección

La influencia del volumen de inyección sobre los parámetros característicos del fiagrama obtenido con el electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-HRP-AOX-ferroceno, se estudió inyectando disoluciones patrón de metanol $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ y empleando un caudal de 1.0 ml min^{-1} . Los resultados obtenidos se representan en la figura 128.

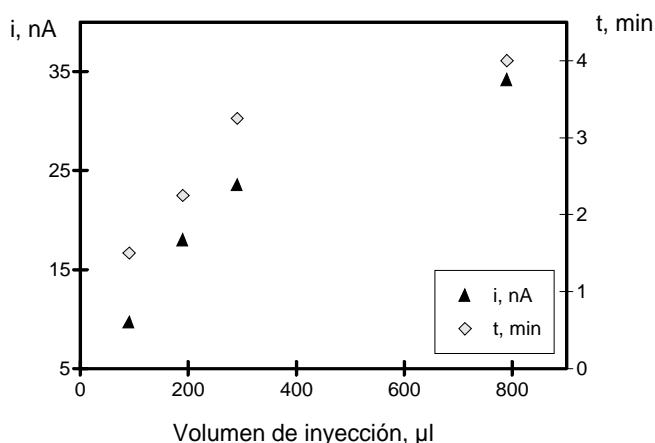


Figura 128. Influencia del volumen de inyección sobre la intensidad de pico (i), y el tiempo que tarda en obtenerse el pico (t).

Como cabía esperar, al aumentar el volumen de inyección, la intensidad del pico es mayor. Igualmente, el tiempo de residencia aumenta a medida que lo hace el volumen de inyección, y por lo tanto el tiempo que se necesita para obtener la señal. La elección del volumen de inyección se llevó a cabo buscando el menor tiempo de residencia y, por tanto, el mayor número de muestras que se pueden analizar por unidad de tiempo. Se prefirió trabajar con tiempos pequeños y un gasto mínimo de muestra ya que, incluso en esas condiciones, la sensibilidad obtenida es suficiente para conseguir los objetivos del trabajo. El volumen de inyección elegido ha sido de **90 μL** .

b) Efecto del caudal

Se evaluó la influencia del caudal de la disolución portadora sobre los parámetros característicos de los fiagramas (intensidad de pico i , tiempo de residencia, t y anchura de pico a la semialtura, a), cuando se realizó la detección amperométrica de metanol a un nivel de concentración de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 129.

La altura de pico del fiagrama disminuyó cuando se aumentó el caudal. Como ya se ha comentado en los capítulos anteriores, este comportamiento es característico de los sistemas FIA que utilizan biosensores enzimáticos como detectores amperométricos.

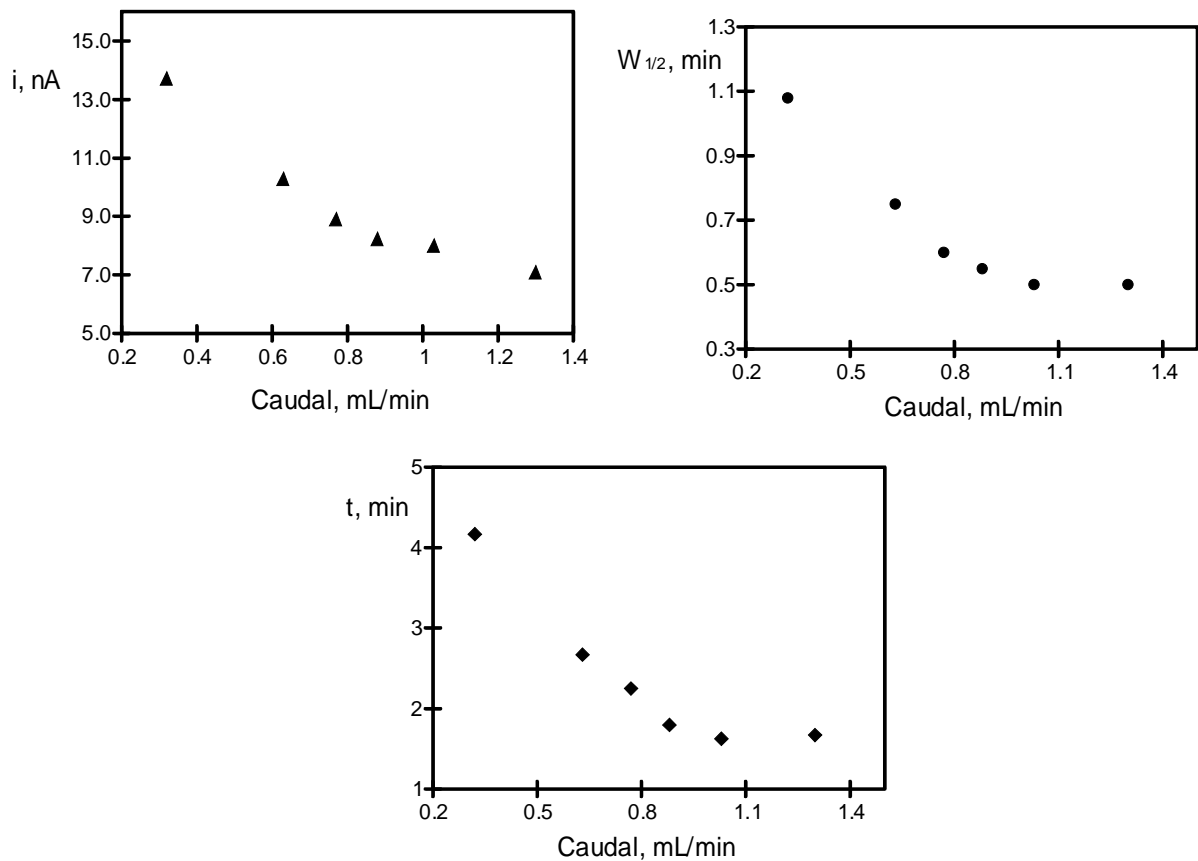


Figura 129. Influencia del caudal sobre i (intensidad de pico), $W_{1/2}$ (anchura de pico a la semialtura) y t (tiempo de residencia)

Por otro lado, como era de esperar, tanto la anchura de pico como el tiempo de residencia disminuían al aumentar la velocidad del portador. Teniendo en cuenta estos factores se eligió un caudal de 1.0 ml min^{-1} , para el que se obtiene una buena intensidad y la anchura de pico no varía demasiado para caudales próximos. Así mismo, el tiempo de residencia es bastante corto con este caudal.

IV.4.6.4.2. REPETIBILIDAD DE LAS SEÑALES AMPEROMÉTRICAS

Empleando las condiciones elegidas, se evaluó la repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas mediante inyección en flujo. Para ello, se realizaron 15 inyecciones sucesivas de 90 μl de disoluciones de los distintos alcoholes a los niveles de concentración que se muestran en la Tabla 56. En la Figura 130 se representan los fiagramas correspondientes a las inyecciones de metanol y etanol.

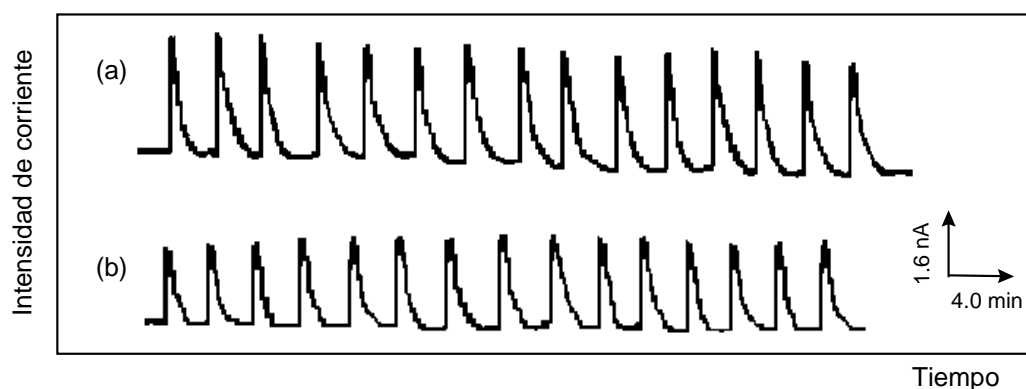


Figura 130. Fiagramas obtenidos con el electrodo compuesto de RVC-resina epoxi-HRP-AOX-ferroceno para 15 inyecciones sucesivas de metanol $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (a) y etanol $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (b). Disolución portadora : regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} . $E_{ap} = 0.00 \text{ V}$. Caudal : 1.0 ml min^{-1} . $V_i = 90 \mu\text{l}$.

A pesar de las condiciones hidrodinámicas existentes, la respuesta fue prácticamente constante para estos dos alcoholes, indicando una buena inmovilización de las enzimas en la matriz electródica. Los valores de la desviación estándar relativa para cada serie de medidas realizada con cada uno de los alcoholes se recogen en la Tabla 56.

Tabla 56. Repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas mediante análisis por inyección en flujo con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno. Número de inyecciones=15

Sustrato	Concentración (mol l^{-1})	RSD (%)	Muestras/hora
Metanol	$5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$	3.8	37
Etanol	$1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$	5.6	26
1-Propanol	$1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$	5.7	21
1-Butanol	$1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$	20.0	20
Alcohol amílico	$5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$	25.0	15

Como se observa en la Tabla, la disminución de la velocidad de muestreo a medida que aumenta el tamaño de la cadena hidrocarbonada, pone de nuevo de manifiesto el aumento del tiempo de respuesta del biosensor con el número de carbonos. Por otro lado, si bien para metanol, etanol y propanol la repetibilidad de las medidas amperométricas es buena, no ocurre lo mismo para butanol y para pentanol. Esto evidencia que el hecho de que no se dio suficiente tiempo para que la enzima reaccionara con el sustrato, lo que hizo que los coeficientes de variación fueran tan elevados que no se puedan considerar las inyecciones como repetibles.

Probablemente, una disminución en el caudal favorecería la reacción enzimática para los alcoholes de cadena más larga, y un caudal más lento haría que la velocidad de muestreo fuera menor, haciendo inviable la determinación de estos alcoholes mediante análisis por inyección en flujo.

IV.4.6.4.3. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

De todos los alcoholes ensayados, solo se construyeron calibrados para metanol y etanol, por ser los alcoholes de más interés analítico y los que mejores respuestas proporcionaron sobre el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-AOX-ferroceno. En la Figura 131 se muestran los calibrados obtenidos y en la Tabla 57 se dan los intervalos de linealidad, pendientes y ordenadas en el origen obtenidas correspondientes.

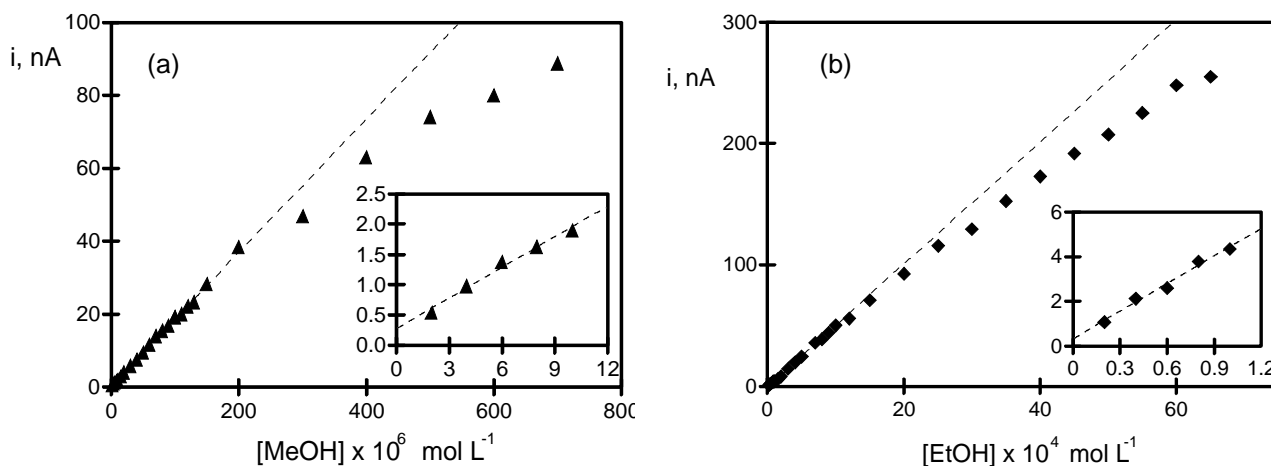


Figura 131. Calibrados para metanol (a) en el intervalo 2.0×10^{-6} - 7.0×10^{-4} mol l⁻¹ y para etanol (b) en el intervalo 2.0×10^{-5} - 6.5×10^{-3} mol l⁻¹, mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica sobre un electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno. Portador: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹, pH 7.4. E_{ap} =0.00 V. Caudal=1.0 ml min⁻¹.

Tabla 57. Intervalos de linealidad, pendientes y ordenadas en el origen de los calibrados para metanol y etanol mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica sobre un electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno. Otras condiciones como en Figura 131.

Sustrato	Intervalo lineal (mol l ⁻¹)	Pendiente (nA/ mol l ⁻¹)	Ordenada en el origen (nA)	r
Metanol	$(0.2-20) \times 10^{-5}$	$(1.97 \pm 0.02) \times 10^5$	0.2 ± 0.1	0.9992
Etanol	$(2.0-250) \times 10^{-5}$	$(0.467 \pm 0.005) \times 10^5$	0.5 ± 0.5	0.9991

Los límites de detección y de determinación se calcularon de acuerdo con los mismos criterios utilizados en discontinuo, recogiendo en la tabla 58.

Tabla 58. Características analíticas para la determinación de metanol y etanol mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica sobre un electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno. Otras condiciones como en Figura 131.

Sustrato	Nivel concentración (mol l ⁻¹)	Límite determinación (mol l ⁻¹)	Límite detección (mol l ⁻¹)	RSD (%)
Metanol	2.0x10 ⁻⁶	8.0x10 ⁻⁷	2.7x10 ⁻⁷	9.4
Etanol	2.0x10 ⁻⁵	3.2x10 ⁻⁵	9.6x10 ⁻⁶	8.6

Como cabía esperar, los intervalos de linealidad resultaron ser algo más amplios en FIA que los que se obtuvieron en discontinuo, debido a que las medidas no se efectúan en el estado estacionario. En cuanto a los límites de detección y determinación, los valores obtenidos mediante inyección en flujo son bastante más altos que los conseguidos en discontinuo, debido al aspecto ya comentado de la velocidad de las reacciones enzimáticas en los sistemas en flujo.

IV.4.6.5. DETERMINACIÓN DE ETANOL EN CERVEZAS

Al igual que con el biosensor de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno, la aplicabilidad del electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-Ferroceno se evaluó mediante la determinación de etanol en cerveza. Para ello se siguió la metodología expuesta en el apartado IV.4.4.3.6. Debido a que el contenido de etanol en cerveza, según se indica en la etiqueta, es de 4.8 %, fue necesario realizar una dilución de ésta para poder tener una concentración de etanol dentro del intervalo lineal del calibrado. No se realizó estudio de interferencias, ya que teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón, se consideró que los posibles interferentes no tenían una influencia apreciable sobre las señales amperométricas del analito a los niveles de concentración a los que se encuentran dichas sustancias interferentes en las cervezas.

En la Figura 132 se muestran algunos de los registros i-t correspondientes a una de las muestras de cerveza analizadas, mediante amperometría en disoluciones agitadas utilizando el método de adiciones estándar. Una vez alcanzada la estabilidad en la línea base, se añadió una alícuota de la disolución de cerveza realizándose posteriormente adiciones de una disolución patrón de etanol.

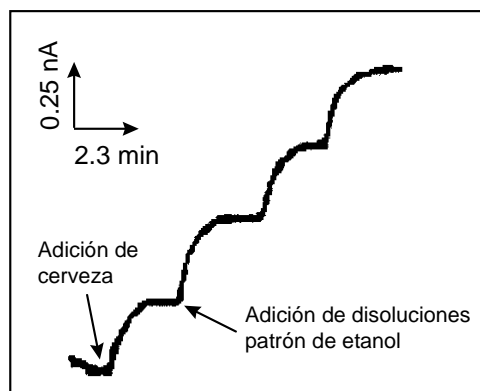


Figura 132. Curva intensidad-tiempo obtenidas con el electrodo de RVC-resina epoxi-HRP-AOX-ferroceno para la determinación de etanol en cerveza mediante el método de adiciones estándar. $E_{ap} = 0.00$ V.

Para comprobar la posible existencia de efecto matriz y la necesidad de emplear el método de adiciones estándar, se compararon los valores de las pendientes obtenidos para el calibrado con este método ($170 \pm 6 \mu\text{A mol}^{-1}$ l), con el de la pendiente del calibrado externo ($671 \pm 9 \mu\text{A mol}^{-1}$ l) realizado con disoluciones patrón de etanol. Como es obvio, existían diferencias significativas entre ambos valores ($t_{cal}=46.3$, $t_{tab}=2.571$), por lo que todas las determinaciones se llevaron a cabo aplicando el método de adiciones estándar. Esto indica que se producía efecto matriz con la matriz electródica utilizada, comportamiento que no se observaba con el biosensor de grafito-Teflón.

La concentración media encontrada para 6 determinaciones de etanol con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno fue de 4.9 ± 0.5 % (v/v). El resultado fue comparado con el obtenido aplicando el kit enzimático ya comentado IV.4.5.7., siendo 5.0 ± 0.3 % (v/v) para 6 determinaciones. Aplicando el criterio de comparación de la t de Student para un nivel de probabilidad del 95%, se obtuvo un valor de t calculado de 0.42, menor que la t tabulada ($t_{tab}=2.262$), lo que indicó la ausencia de diferencias significativas entre ambos métodos, quedando demostrada la aplicabilidad del electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno para su utilización con muestras reales.

Si se comparan los resultados obtenidos con este electrodo con los proporcionados con el biosensor de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno, además de los matices existentes en cuanto a estabilidad, relación señal/ruido y diferencias en las características analíticas que ya se han comentado hay que destacar que la aplicación del electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno a muestras reales, presenta una serie de desventajas con respecto al de grafito-Teflón. Así, la desviación estándar relativa obtenida para la determinación de etanol en cerveza es más del doble (9.2%) que la que se observó con el biosensor de grafito-Teflón en las mismas condiciones (4.1%). Además, con el electrodo de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno fue

necesario utilizar el método de adiciones estándar, dada la existencia de efecto matriz. Este efecto no se observó para la misma muestra cuando se empleó el electrodo de grafito-Teflón. Esto confirma lo que se ha venido observando con este tipo de electrodos a lo largo de toda la Memoria, y es que la matriz de RVC-resina epoxi es mucho más sensible al tipo de medio de trabajo que se está utilizando. Por lo tanto, si bien estos electrodos pueden ser útiles como **sensores de alarma**, no son tan fiables por lo que respecta a la exactitud de las medidas como lo son las matrices de grafito-Teflón, para las que ha quedado sobradamente demostrada su aplicabilidad con diferentes muestras y en diferentes medios de trabajo.

IV.4.7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que tanto los electrodos de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno como los de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno constituyen biosensores amperométricos robustos para la determinación de alcoholes de cadena alifática corta. Estos bioelectrodos compósitos pueden utilizarse tanto en discontinuo como en flujo y son fáciles de fabricar. Además muestran una aceptable capacidad de renovación superficial por pulido y buena estabilidad. El electrodo compósito bienzimático basado en RVC permite la determinación de etanol en muestras de cerveza, pero es el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno el que proporciona más posibilidades de aplicación ya que, además del etanol en muestras de cerveza, vinos y aguardientes, permite determinar en un sistema cromatográfico metanol y etanol de una forma simple, rápida y selectiva con un mínimo tratamiento de la muestra que implica únicamente una dilución.

IV.4.8. BIBLIOGRAFÍA. BIOSENSORES DE ALCOHOLES

- Akyilmaz, E., Dinckaya, D. (2000). "A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum". *Talanta*, 53(3) 505-509.
- Alegret, S. (1996). "Rigid carbon polymer biocomposites for electrochemical sensing". *Analyst*, 121, 1751-1758.
- Amelio, M. (1996). "Alcohol in Food and Beverages" *Handbook of food analysis*. Ed. Leo M.L. Nollet (1). 551-599
- Belitz, H.D., Grosch, W. "Química de los Alimentos".. *Editorial Acribia*, S.A. 2ª Edición. Cap. 20, 957.
- Burfeind J., Weigel, B., Kretzmer, G., Schügerl, K., Huwing, A., Giffhorn F. (1996). "Determination of the concentration of higher alcohols with enzyme coupled flow-injection analysis in model systems". *Analytica Chimica Acta* ; 322, 131-139.
- Cai, C., Xue, K., Zhou, Y., Yang, H., (1997). *Talanta*, 44, 339.
- Compagnone D., O'Sullivan, D., Guibault, G.G. (1997). "Amperometric bienzymic sensor for aspartame". *Analyst*. 122 (5), 487-490.
- Du, X., Anzai, J., Onza, T., Motohashi, R. (1996). "Amperometric alcohol sensors based on protein multilayers composed of avidin and biotin-labelled". *Electroanalysis*, 8 (8-9), 813-816.
- Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Korpan, Y.I., El'Skaya, A.V., Soldatkin, A.P., Jaffrezic Renault, N., Martelet, C. (2001). "Conductometric formaldehyde sensitive biosensor with specifically adapted analytical characteristics". *Analytica Chimica Acta* ; 445(1) : 47-55.
- Ennis, J.N., Buxton, P.C. (1998). "The use of Constant Potential Amperometry to determine the Oxidation Rate of [R-(Z)- α -(methoxyimino)-1-azabicyclo[2.2.2]octane-3-acetonitrile by dimethyldioxirane". *Current Separations*, 17 :3, 75-77.
- Galensa, R., Müller, G., Schirmer, A., Hippe, H., Stadler, H. (1998). "Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen durch HPLC-Enzymereaktor Kopplung". *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* 42, 84-85.
- Gnekow, B., Ough, C.S. (1976). "Methanol in wines and musts : source and amounts". *Am. J. Enol. Vitic.* 27. 1-6.
- Gonchar, M.V., Maidan, M.M., Moroz, O.M., Woodward, J.R., Sibirny, A.A. (1998). "Microbial O₂ and H₂O₂ electrode sensors for alcohol analysis based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements". *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 945-952.
- González Raurich, M. (1986). "Volátiles minoritarios de los vinos españoles. Caracterización de los principales vinos procedentes de uvas tintas". Tesis Doctoral, Fac. CC. Químicas, Univ. Complutense de Madrid.
- Guarna, M.M, Lesnicki, G.J., Tam, B.M., Robinson, J., Radziminski C.Z., Hasenwinkle, D., Boraston A., Jervis, E., MacGillivray, R.T.A., Turner, R.F.B., Kilburn, D.G. (1997). "On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia Pastoris*". *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 56, No. 3, 279-286.
- Gulce, A.H., Gulce, A., Kavanoz, M., Coskun, H., Yildiz, A. (2002). "A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination". *Biosensors and Bioelectronics*. 17 (6-7) 517-521.
- Hart, F.L., Fisher, H.J. (1991). "Análisis Moderno de los Alimentos". Ed. Acribia.

- Horie, H., Rechnitz, G.A. (1995). "Hybrid tissue/enzyme biosensor for pectin". *Analytica Chimica Acta*, 306, 123-127.
- Iwuoha E.I., Saenz de Villaverde, D., Peña Garcia, N., Malcolm, M.R., Pingarrón, J.M. (1997). "Reactivities of organic phase biosensors. 2. The amperometric behaviour of horseradish peroxidase immobilised on a platinum electrode modified with an electrosynthetic polyaniline film". *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 12, No. 8, pp 749-761.
- Kakemoto, M., Murakami, M, Ogawa, H. (1996). "Simultaneous determination of ethanol and glucose by HPLC with an immobilized enzyme membrane electrode". *Nippon. Kaguki. Kaishi* (2), 141-145.
- Karyakin, A.A., Karyakina, E.E., Gorton, L. (1996). "Prussian blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis". *Talanta*. 43(9), 1597-1606.
- Korpan, Y.I., Gonchar, M.V., Sibirny, A.A., Martelet, C., El'skaya, A.V., Gibson, T.D., Soldatkin, A.P. (2000). "Development of highly selective and stable potentiometric sensors for formaldehyde determination". *Biosensors and Bioelectronics*. 15(1-2) : 77-83.
- Lidén, H., Buttler, T., Jeppson, H., Marko-Varga, G., Volc, J., Gorton, L. (1998a). "On-line monitoring of monosaccharides and ethanol during a fermentation by microdialysis sampling, liquid chromatography and two amperometric biosensors". *Chromatographia*, 47 (9/10), 501-508.
- Lidén, H., Viyakumar, A.R., Gorton, L., Marko-Varga, G. (1998b). "Rapid alcohol determination in plasma and urine by column liquid chromatography with biosensor detection". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 17, 501-508.
- Madrid, A., Cenzano. I., Vicente, J.M. "Nuevo Manual de Industrias Alimentarias", A.M.V. Ediciones Mundi-Prensa.
- Marko-Varga, G., Johansson, K., Gorton, L. (1994) "Enzyme-based biosensor as a selective detection unit in column liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 660, 153-167.
- Mitsubayashi, K., Yokoyama, K., Takeuchi, T., Karube, I. (1994). "Gas-phase biosensor for ethanol". *Analytical Chemistry*, 66, 3297-3302.
- Mituzani, F., Yabuki, S., Ijima, S. (1997). "Amperometric alcohol sensing electrode based on a polyion complex membrane containing alcohol oxidase". *Anal. Sci.* 13 (1). 83-87.
- Mizgunova, U.M., Shekhovtsova, T.N., Dolmanova, I.F. (1998). *Journal of Analytical Chemistry*, 53 (10), 880.
- Mohns, J., Kuennecke, W. (1996). "Biosensors in automated analysis systems. Part 1. Determination of ethanol in beer and wine by flow-diffusion analysis and amperometric detection". *Dtsh. Lebensm. Rundschau*. 92(1), 1-4.
- Morales, A., Céspedes, F., Martínez Fábregas E., Alegret, S. (1998). "Ethanol amperometric biosensor based on an alcohol oxidase-graphite-polymer biocomposite" *Electrochimica Acta*, 43, 3575-3579.
- Naessens, M., TranMinh,C. (1998). "Whole-cell biosensor for direct determination of solvent vapours". *Biosensor and Bioelectronics*. 13 (3-4) : 341-346.

- Nanjo, M., Guilbault, G.G. (1975). "Amperometric determination of alcohols, aldehydes and carboxylic acids with an immobilized alcohol oxidase enzyme electrode". *Analytical Chimica Acta*, 75, 169-180.
- Narváez, A., Suarez, G., Popescu, I.C., Katakis, I., Domínguez, E. (2000). "Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures". *Biosensors and bioelectronics*. 15 (1-2), 43-52.
- Patel, N.G., Meier, S., Cammann, K., Chemnitz, G.C. (2001). "Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases". *Sensors and actuators B-Chemical*, 75(1-2) :101-110.
- Quigley, W.W.C., Ecker S.T., Vahey, P.G., Synovec, R.E. (1999). "Reversed phase liquid chromatography with UV absorbance and flame ionization detection using a water mobile phase and a cyano propyl stationary phase. Analysis of alcohols and chlorinated hydrocarbons". *Talanta* ; 50, 569-576
- Rank, M., Gram, J., Danielsson, B. (1993). "Industrial on-line monitoring of penicillin V, glucose and ethanol using a split-flow biosensor modified thermal sensor". *Anal. Chim. Acta*. 281 (3), 521-526
- Real Decreto 835/1972, de 23 de marzo. <<B.O.>> Reglamento de la Ley 25/1970. Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes.
- Real Decreto 1416/82 de 29 de mayo (B.O. 28 de junio). Reglamentación técnica sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de aguardientes compuestos, licores y aperitivos sin vino base y otras bebidas derivadas de alcoholes naturales
- Smyth, A.B., Talasila, P.C., Cameron, A.C. (1999). "An ethanol biosensor can detect low-oxygen injury in modified atmosphere packages of fresh-cut produce". *Postharvest Biology and Technology*. 15(2) : 127 :134.
- Tagliaro, F., Dorizzi, R., Ghielmi, S., Marigo, M. (1991). "Direct injection high-performance liquid chromatographic method with electrochemical detection for the determination of ethanol and methanol in plasma using an alcohol oxidase reactor". *Journal of Chromatography*, 566, 333-339.
- Vijayakumar, A.R., Csöregi, E., Heller, A., Gorton, L. (1998). "Alcohol biosensors based on coupled oxidase-peroxidase systems". *Analytica Chimica Acta* 327, 223-234.
- Woodward, J.R. (1990). "Advances in Autotrophic Microbiology and One-Carbon Metabolism" in G.A. Codd et al. (Eds.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, P. 193-225

IV.5. BIBLIOGRAFÍA ELECTRODOS BIENZIMÁTICOS

- Belay, A., Ruzgas, T., Csoregi, E., Moges, G., Tessema, M., Solomon, T., Gorton, L. (1997). "LC biosensor system for the determination of the neurotoxin". *Analytical Chemistry*. 69(17) : 3471-3475.
- Bergmann, W., Rudolph, R., Spohn, U. (1999). *Analytica Chimica Acta*. 394 (2-3) : 233-241.
- Chen, Q., Kobayashi, Y., Takeshita, H., Hoshi, T., Anzai, J. (1998). "Avidin-biotin system based enzyme multilayer membranes for biosensor applications : Optimization of loading of choline esterase and choline oxidase in the bienzyme membrane for acetylcholine biosensors". *Electroanalysis*. 10 (2) :94-97.
- Collins, A., Mikeladze, E., Bengtsson, M., Kokaia, M., Laurell, T., Csoregi, E. (2001). "Interference elimination in glutamate monitoring via chip integrated enzyme microreactores". *Electroanalysis*. 13(6) : 425-431.
- Colon, C.M., Guadalupe, A.R. (1998). "Cobalt polypyridyl complexes as redox mediators for lipamide dehydrogenase" *Electroanalysis*, 10 (9) : 621-627.
- Cosnier, S., Gondran, C., Watelet, J.C. (2001). "A polypyrrole-bienzyme electrode (salicylate hydroxylase-polyphenol oxidase) for the interference-free determination of salicylate". *Electroanalysis*, 13 (11) 906-910.
- Curulli, A., Dragulescu, S., Creminisi, C., Palleschi, G. (2001). "Bienzyme amperometric probes for choline and choline esters assembled with nonconducting electrosynthesized polymers". *Electroanalysis*. 13 (3) : 236-242.
- Dominguez, R., Serra B., Reviejo, A.J., Pingarrón J.M. (2001). "Chiral analysis of amino acids using electrochemical composite bienzyme biosensors". *Analytical Biochemistry*. 298(2) :275-282.
- Espinosa, M., Atanasov, P., Wilkins, E. (1999). "Development of a disposable organophosphate biosensor". *Electroanalysis*. 11 (14) 1055-1062.
- Gajovic, N., Warsinke, A.,; Huang, T., Schulmeister, T., Scheller, F.W. (1999). "Characterization and mathematical modeling of a bienzyme electrode por L-malate cofactor recycling". *Analytical Chemistry*, 71 (20) : 4657-4662.
- Kinoshita, H., Torimura, M., Kano, K., Ikeda,, T. (1997). "Peroxidase based amperometric sensor of hydrogen peroxide generated in oxidase reaction : Application to creatinine and creatine assay". *Electroanalysis*, 9(16) 1234-1238.
- Liden, H., Volc, J., Marko-Varga, G., Gorton, L. (1998). "Pyranose oxidase modified carbon paste electrodes for monosaccharide determination". *Electroanalysis*, 10(4) :223-230.
- Lvovich, V., Scheeline, A. (1997). "Amperometric sensors for simultaneous superoxide and hydrogen peroxide detection". *Analytical Chemistry*. 69, 454-462.
- Mikeladze, E., Collins, A., Sukhacheva, M., Netrusov A., Csoregi, E. (2002). "Characterization of glutamate biosensor based on a novel glutamate oxidase integrated into a redox hydrogel". *Electroanalysis*. 14(15-16) :1052-1059.
- Niulescu, M., Nistor, C., Frebort, I., Pec, P., Mattiasson, B., Csoregi, E. (2000). *Analytical Chemistry*. 72 (7) : 1591-1597.

- Niwa, O., Kurita, R., Hayashi, K., Horiuchi, T., Torimitsu, K., Maeyama, K., Tanizawa, K. (2000). "Continuous measurement of histamine from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3) with an on-line sensor using histamine oxidase". *Sensors and Actuators-B-Chemical*. 67(1-2) : 43-51.
- Núñez de Castro, I. "Enzimología". *Ediciones Pirámide*.
- Ohara, T.J., Vreeke,, M.S., Battaglini F., Heller, A. (1993). "Bienzyme sensors based on "Electrically Wiired" Peroxidase". *Electroanalysis*, 5, 825.
- Pérez, E.F., Neto, G.D., Kubota, L.T. (2001). "Bi-enzymatic amperometric biosensor for oxalate". *Sensors and Actuators B Chemical*. 72(1) 80-85.
- Pingarrón, J.M., Sánchez Batanero,P. (1999) "Química Electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones". *Editorial Síntesis*.
- Piñeiro-Avila, G., Salvador, A., De la Guardia, M. (1998). "Flow injection determination of free and total cholesterol in animal greases using enzymes in non-aqueous media". *Analyst*, Vol. 123 (999-1003).
- Ruzgas, T., Csöregi E., Emnéus, J., Gorton, L., Marko-Varga, G. (1996). "Peroxidase-modified electrodes :Fundamentals and application", *Analytica Chimica Acta*, 330, 123-138.
- Saurina, J., Hernández, C., Alegret, S., Fabregas, E. (1999). "Amperometric determination of lysine using a lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites". *Biosensors and Bioelectronics*. 14(2) : 211 -220.
- Scheller, F., Schubert, F. "Biosensors". *Techniques and Instrumentation in analytical Chemistry*". Vol. 11.
- 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". *Biosensors and Bioelectronics*. 14 (5) : 505-513.
- Szeponik, J., Moller, B., Pfeiffer, D., Lisdat, F., Wollengerger, U., Makower, A., Scheller, F.W. (1997). "Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline" *Biosensors and Bioelectronics*, 12 (9-10) : 947-952.
- Tkac, J., Gemeiner, P., Sturdik, E. (1999). "Rapid and sensitive galactose oxidase-peroxidase biosensor for galactose detection with prolonged stability". *Biotechnology Techniques*. 13(12) : 931-936.
- Tkac, J., Sturdik, E., Gemeiner, P. (2000) "Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised beta-galactosidase". *Analyst*, 125 (7) : 1285-1289.
- Tkac, J., Sturdik, E., Gemeiner, P. (2001). "Monitoring of dehidroxyacetona production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor". *Enzyme and Microbial Technology*. 28 (4-5) : 383-388.
- Tzang, C.H., Yuang, R., Yang, M.S. (2001). "Voltammetric biosensors for the determination of formate and glucose-6-phosphate based on the measurement of dehydrogenase-generated NADH and NADPH". *Biosensors and Bioelectronics*. 16(3) : 211-219 y 5B.
- Yao, T., Nanjyo Y., Nishino, H. (2001). "Micro-flow in vivo analysis of L-glutamate with on-line enzyme amplifier based on substrate recycling" *Analytical Sciences*, 17(6) :703-708.

Tabla XI. Biosensores amperométricos basados en Glucosa Oxidasa (GOD)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestra	Referencia
GOD / Glucosa	Covalente con carbo-diimida o entrecruzamiento con glutaraldehído	Electrodo de disco de oro modificado con monocapas ensambladas	Discontinuo y FIA Medio acuoso	Tetratiofulvaleno, ácido mercaptopropiónico	Tetratiofulvaleno L.D. : $3.5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$	Misma pendiente durante 5 días	---	Campuzano et al., 2002
GOD / Glucosa y cobre (reacción inhibición)	Unión covalente a membranas poliméricas de ciclodextrina a las que se unen complejos de Ru por intercambio iónico	Amperométrica Electrodos de disco de Pt o carbono vitrificado modificados con complejos de polipiridina rutenio	Discontinuo Medio acuoso	Complejos de rutenio (4 diferentes)	I.L. complejos : 2. $1-24 \text{ m mol l}^{-1}$ 3. $1-14 \text{ m mol l}^{-1}$ 4. $1-4 \text{ m mol l}^{-1}$	---	---	Kosela et al., 2002
GOD / Glucosa	Electropolimerización de poli 3,4-etilendioxitiofeno (PEDT)	Amperométrica Electrodo de Pt modificado con PEDT	Discontinuo Tampón fosfato	+650 mv (vs. SCE)	I.L. : $0.2 \text{ a } 8 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ L.D. : $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$	1 mes tras almacenar a 4°C sin usar	Suero sintético	Fabiano et al., 2002
GOD / Glucosa	Entrecruzamiento con glutaraldehído	Amperométrica Electrodo "screen-printed" modificado con azul de Prusia	Discontinuo Tampón fosfato	---	I.L. : $0.2 \text{ a } 4 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ L.D. : $0.2 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	---	---	Pravda et al., 2002
GOD / Glucosa	Atrapamiento por electropolimerización	Amperométrica Electrodo Pt modificado con p-clorofenol	Discontinuo Tampón fosfato	---	I. L. : $2.5 \times 10^{-4} \text{ a } 1.5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$	90 días sin pérdida de señal	---	Xu et al., 2001
GOD / Glucosa	Atrapamiento membrana de polímero de poliuretano acrilato fotocurable	Amperométrica Electrodo grafito-epoxi	Discontinuo Tampón fosfato	---	I.L. : $1.0 \times 10^{-4} \text{ a } 5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	Electrodo : 1 mes Membrana : 3 meses	---	Puig-Lleixa, et al., 2001
GOD / Glucosa	Coatrapamiento en membrana con el complejo de Os	Amperométrica Screen-printed	Flujo Tampón fosfato	Os	I.L. : $0.1- 10 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ L.D. : $0.03 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	100 inyecciones 1 mes almacenado	---	Zhang, Gao y Aizawa, 2001
GOD / Glucosa	Atrapamiento en el complejo de Os	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica Electrodo "thick-film" (capa gruesa) Electrodo trabajo : carbono	Discontinuo Dispositivo de llenado por capilaridad Tampón fosfato 0.1 mol l^{-1} pH 7.4 + NaCl 0.1 mol l^{-1}	Complejo de Os-tris(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) Monit de H ₂ O ₂ +0.55 V vs Ag/AgCl	I.L. : $0.1- 25 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	1 mes almacenado a 4°C	---	Zhang et al., 2001

Tabla XI. Biosensores amperométricos basados en glucosa oxidasa (GOD) (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestra	Referencia
GOD / Glucosa	Atrapamiento durante electropolimerización de polietacridina (polímero no conductor)	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de Pt	Discontinuo Tampón fosfato pH 7.0	Monitorización de H ₂ O ₂ + 0.45 V vs SCE	I.L. : 0.01- 18,0 x 10 ⁻³ mol l ⁻¹	10 días estable. 55% actividad después de un mes	---	Xu y Chen, 2000
GOD / Glucosa	Adsorción Enzima estabilizada con dietilaminoetil dextran	Amperometría Electrodo de carbono poroso	Discontinuo Tampón fosfato 10 mmol l ⁻¹ pH 7.5	Monitorizan la oxidación de H ₂ O ₂ a +800 mV Vs Ag/AgCl	I.L: 50x10 ⁻⁶ a 2.5x10 ⁻³ mol l ⁻¹ L.D. : 10x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	6 meses almacenado en seco en congelador. 50% tras 9 meses	---	Gavalas y Chaniotakis 2000
GOD / Glucosa	Atrapamiento físico	Amperometría Electrodo pasta C	Discontinuo y flujo Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ pH 7.4	Diferentes medios (+0.2 V) Biosensor Kel-F +0.6 V	Con el Kel-F se evita la dependencia de los intervalos lineales de la cantidad de oxígeno	---	---	Wang et al., 2001
GOD / Glucosa	Atrapamiento físico	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodos pasta C (con aceite mineral y aceite de parafina) modificado con azul de Prusia	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 6.0 Estable entre pH 3 y 9	Azul de Prusia (FeCl ₃ + K ₃ [Fe(CN) ₆]) Monitorizan la reducción de H ₂ O ₂ a 0 mV Vs Ag/AgCl	I.L: 2x10 ⁻⁴ a 2.0x10 ⁻² mol l ⁻¹ L.D. : 10 ⁻⁴ mol l ⁻¹	1 mes almacenado a 4 °c	---	Moscone, et al., 2001
GOD / Glucosa	Atrapamiento físico	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de pasta C tipo aguja	Discontinuo y flujo Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ pH 7.4	+0.6 V vs Ag/AgCl	I.L: 2 a 14x10 ⁻³ mol l ⁻¹ L.D. : 0.4x10 ⁻³ mol l ⁻¹	Pierde 8% sensibilidad a los 10 días	---	Wang y Zhang, 2001
GOD / Glucosa	GOD liofilizada y tres tipos de GOD cristalizada entrecruzada (CLEC ^R) Atrapamiento con membranas de Nafion	Amperometría Electrodo carbono vitrificado modificado con azul de Prusia electropolimerizado	Flujo Tampón fosfato 0.05mol l ⁻¹ + KCl 0.1mol l ⁻¹ pH 5.5	Azul de Prusia (FeCl ₃ + K ₃ [Fe(CN) ₆]) Monitorizan la reducción de H ₂ O ₂ a -50 mV vs Ag/AgCl	I.L: 2.5x10 ⁻⁶ a 2.5x10 ⁻³ mol l ⁻¹ L.D. : 2.5x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	3 horas con 100% actividad	---	Luiz de Mattos, 2001

Tabla XI. Biosensores amperométricos basados en glucosa oxidasa (GOD) (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E_{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestra	Referencia
GOD / Glucosa	Adsorción con mediador en membrana de nitrocelulosa y cubierta con película de poliéster	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica Electrodo screen-printed tipo tira	Discontinuo Tampón fosfato	$[Ru(NH_3)_6]^+$ Monitorizan reducción de H_2O_2 a 0.0 mV vs Ag/AgCl	Lineal hasta $27.7 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	---	Sangre y suero	Cui, et al., 2001
GOD / Glucosa	Atrapamiento durante electropolimerización de un derivado de pirrol con dos grupos pirrol unidos por una cadena etoxi	Voltamperometría cíclica Electrodo de Pt	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l^{-1} , pH 7.0	Monitorizan oxidación de H_2O_2 a +0.6 V vs Ag/AgCl	$296 \pm 7 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	Mantiene 75% actividad tras 20 días y disminuye a 20% tras 40 días y 15% tras 60 días	---	Mousty et al., 2001
GOD / Glucosa	Entrecruzamiento con glutaraldehído en membrana de policarbonato	Voltamperometría cíclica Electrodos compósitos de Au y poliácilonitrilo en forma de membrana	Discontinuo Tampón fosfato pH 7.4	Monitorizan oxidación de H_2O_2 a +650 mV vs Ag/AgCl	---	---	Sangre	Bridge y Higson, 2001
GOD / Glucosa	Entrecruzamiento del conjugado avidin-GOD con glutaraldehído	Amperometría Electrodo de Pt modificado con Nafion y con membrana de bicapa lipídica	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l^{-1} , pH 7.2	Monitorizan oxidación de H_2O_2 a +600 mV vs Ag/AgCl	---	---	---	Trojanowicz y Miernik, 2001
GOD / Glucosa	Enlace covalente al grupo carboxílico del poliamino-naftaleno	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica. Electrodo de Pt modificado con poliaminonaftaleno y poliaminonaftoquinona	Discontinuo Tampón fosfato 0.01 mol l^{-1} , pH 6	Grupo quinónico de la membrana $E_{ap} = 0.7 \text{ V}$ vs Ag/AgCl	Lineal hasta $25 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	---	---	Piro et al., 2000
GOD / Glucosa	Atrapamiento físico	Amperometría Electrodos pasta carbono, una con grafito-rodio y aceite mineral, y otra con grafito, aceite y ferrocianuro cúprico	Discontinuo Tampón fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4	Rodio y ferrocianuro cúprico (Comparación) $E_{ap} = -0.1 \text{ V}$ vs Ag/AgCl	Rodio : lineal hasta $2 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ Ferrocianuro cúprico : lineal hasta $1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$	Ambos aguantan 150 min de operación continua (agitando)	---	Wang, et al., 2000

Tabla XI. Biosensores amperométricos basados en la glucosa oxidasa (GOD) (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestra	Referencia
GOD / Glucosa	Enlace por grupo amino sustituyendo grupos N-hidroxisuccinimida y pentafluorofenoxi del polímero	Amperometría Voltamperometría cíclica. Electrodo de Pt modificado con película del polímero polidicarbazol	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0	E _{ap} = 0.6 V vs SCE	---	Pierden 50% actividad a los tres días	---	Cosnier et al., 2000a
GOD / Glucosa	Atrapamiento durante electro-polimerización de o-fenilendiamina	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica Microelectrodo de oro modificado con polímero+GOD	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0	Monitorización de oxidación de H ₂ O ₂ E _{ap} =+0.6 V vs SCE	I.L: 0.5x10 ⁻³ a 10x10 ⁻³ mol l ⁻¹	Estable durante 2 semanas almacenado a 4°C. Caída 14% en tres semanas	---	Ju et al., 1998
GOD / Glucosa	Atrapamiento durante electropolimerización	Amperometría Voltamperometría cíclica. Electrodo de carbono vitrificado modificado con película de polipirrollactobionamida	Discontinuo Acetonitrilo+ perclorato de tetrabutilamonio 0.1 mol l ⁻¹ Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Monitorización de oxidación de H ₂ O ₂ E _{ap} =+0.6 V vs SCE	Tricapa en medio acuoso :40 mA M ⁻¹ cm ⁻²	---	---	Cosnier et al., 1998
GOD / Glucosa	Entrecruzamiento con glutaraldehído	Amperometría Voltamperometría cíclica. Electrodo sandwich : chitosan con base pasta C-ferroceno-GOD	Discontinuo Tampón fosfato 0.02 mol l ⁻¹ , pH 7.0	Ferroceno E _{ap} = +0.4 V vs SCE	I.L: 8x10 ⁻⁴ a 1.7x10 ⁻² mol l ⁻¹	Mantiene el 65% de su actividad tras 1 mes de almacenamiento	---	Miao et al., 2001
GOD / Glucosa	Atrapamiento durante electropolimerización	Amperometría Voltamperometría cíclica. Electrodo pasta C +ferroceno+ polifenol	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0	Ferroceno E _{ap} =+0.4 V vs Ag/AgCl	I.L: 0.2x10 ⁻³ a 29x10 ⁻³ mol l ⁻¹	---	---	Nakabayashi et al., 1998

Abreviaturas :

I.L. = Intervalo lineal
 L.D.= Límite de detección
 L.Q. = Límite de cuantificación
 GOD : Glucosa Oxidasa

BSA : Alúmina de suero bovino
 SCE : Electrodo de calomelanos
 Pasta de C : pasta de carbono
 CLEC^R : Glucosas oxidasas cristalinas y entrecruzadas

HRP : Peroxidasa

Tabla XII. Biosensores amperométricos bienzimáticos basados en glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (HRP)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestra	Referencia
GOD / Glucosa y GOD + HRP / Glucosa	Entrecruzamiento entre los grupos amino de PAA y los residuos de lisina de GOD con PEG-400	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo rotatorio de Au (discontinuo) y carbono vitrificado (FIA) modificados con hidrogel de polialilamina-Os	Discontinuo y FIA Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ , pH 7.0 + KCl 0.1 mol l ⁻¹	Os del hidrogel GOD : E _{ap} =+0.4 V vs SCE GOD+HRP : E _{ap} = 0.05 V vs SCE	GOD+HRP : I.L: Hasta 3x10 ⁻³ mol l ⁻¹	---	---	Danilowicz et al., 1998
GOD + HRP / Glucosa	Atrapamiento durante electropolimerización de pirrol	Amperometría Voltamperom cíclica Electrodo de carbono virificado modificado con polipirrol+enzimas	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0	Monitorización de reducción de H ₂ O ₂ E _{ap} = -0.1 V vs SCE	171 mA M ⁻¹ cm ⁻²	---	---	Popescu et al., 1997
GOD + HRP / Glucosa	HRP : Atrapamiento en la formación de la membrana GOD : Entrecruzamiento con glutaraldehido a la membrana	Amperometría Electrodo carbono vitrificado modificado con membrana de HRP+ferroceno+poli-L-lisina+poli(4-estireno-sulfonato)	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 6.5	Ferroceno E _{ap} = -0.2 V vs Ag/AgCl	I.L: hasta 0.1x10 ⁻³ mol l ⁻¹ L. D. : 1.0x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	Medidas ctes durante 3 semanas. Al día 40 se pierde la membrana	Zumos y refrescos	Yabuki et al., 2001
GOD + HRP / Glucosa	Atrapamiento físico	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de carbono vitrificado+película compósita de grafito y arcilla + 3,4-dihidroxibenzaldehido	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0	Polímero Monitorización de reducción de H ₂ O ₂ E _{ap} = 0.0 V vs SCE	14.95 mA M ⁻¹ cm ⁻²	Sensibilidad cae a 55% del valor inicial tras tres semanas	---	Cosnier et al., 2000b
GOD + HRP / Glucosa	Entrecruzamiento con glutaraldehido +BSA y cubierto con Nafion	Amperometría Voltamperometría cíclica Electrodo carbono vitrificado modificado con azul de Meldola electropolimerizado	Discontinuo y flujo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0 para optimizar. Solución Ringer para simular microdiálisis	Azul de Meldola Monitorizan reducción de H ₂ O ₂ a -0.3 V vs Ag/AgCl	I.L: hasta 500x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	Discontinuo : Constante 7 días (3-4 horas/día) Flujo : sin pérdidas de actividad 24	---	Mao y Yamamoto, 2000

						horas		
--	--	--	--	--	--	-------	--	--

Tabla XII. Biosensores amperométricos bienzimáticos basados en glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (HRP)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestra	Referencia
GOD + HRP / Glucosa	Entrecruzamiento con glutaraldehído y BSA y deposición en el electrodo Pt-Nafion	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de carbono vitrificado modificado con Nafion	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 7.0	Metasulfato de N-metil fenazina Monitorizan mediador a -0.20V vs SCE	I.L: Hasta 5.0 x 10 ⁻³ mol l ⁻¹ L.D. : 2.0x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	88.2%(1 mes) y 82.4 %(2 meses) de actividad respectivamente con el almacenam.	Suero	Liu et al., 1997
GOD + HRP / Glucosa	Atrapamiento físico	Amperometría Electrodo de pasta de carbono (carbono vitrificado+polietilenimina+intercambiador catiónico de poliéster sulfónico	Continuo (célula wall-jet dual) Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ pH 6.5	Monit. reduc biocatalítica de H ₂ O ₂ 0.0V	I.L : 5.6x 10 ⁻⁵ a 5.6x 10 ⁻⁴ mol l ⁻¹	Disminución de un 20% tras 20 horas de operación	Proceso fermentación	Min et al., 1988

Abreviaturas :

I.L. = Intervalo lineal
L.D.= Límite de detección
L.Q. = Límite de cuantificación
GOD : Glucosa Oxidasa
HRP : Peroxidasa

BSA : Alúmina de suero bovino
SCE : Electrodo de calomelanos
Pasta de C : pasta de carbono
PAA : Polialilamina
PEG-400 : Eter de diglicidil polietilenglicol

Tabla XIII. Biosensores amperométricos basados en la Xantina Oxidasa (XOD)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
XOD, HRP / Hipoxantina, Xantina	En membrana de nylon por entrecruzamiento	Amperometría Electrodo Pt	Continuo Tampón fosfato pH 7.0	Ferrocianuro (en disolución) Medida H ₂ O ₂ a -100 mV	IL = 2 a 100x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	2 meses uso intermitente	---	Moody et al., 1987
XOD, nucleosido fosforilasa / IMP	En membrana con 1,8-diamino4-aminometiloctano	Amperometría Electrodo tipo Clark	Continuo Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ , pH 6.6+0.1mmol ⁻¹ cisteína	---	IL= 1.0 a 5.0x10 ⁻³ mol l ⁻¹	---	Diferentes pescados	Watanabe et al., 1988
XOD / Hipoxantina	Covalente en membrana de nylon preactivada	Amperometría Electrodo polarográfico	Discontinuo Tampón fosfato	Evalúan respuesta de ácido úrico y H ₂ O ₂	IL hasta 107 x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ L.D.=3.6x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	40 análisis	Trucha, bacalao, lenguado	Mulchandani et al., 1989
XOD / Hipoxantina	Entrecruzamiento y electropolimerización	Amperometría Electrodo de Pt modificado con p-diaminobenceno y resorcinol	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.8	Monitorización de H ₂ O ₂ a 500-700 mV	IL= 5 a 300x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ L.D.=5x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	60 días almacenado en tampón a 4°C	Trucha y lenguado	Nguyen, et al., 1991
XOD / Hipoxantina, xantina	Adsorción + membrana semipermeable	Amperometría Electrodo pasta C (grafito espectroscópico + nujol)	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.2	Monitorización de ácido úrico a +0.4 V	H :IL= 5 a 130x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ X :IL=5 a 100x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	I.L. constante 6 días, pero la pendiente cae	---	González et al., 1991
XOD / Hipoxantina	Covalente + membrana diálisis	Amperometría Pasta de carbono modificada con triacetato de celulosa	Discontinuo Tampón fosfato	Hidroximetilferroceno	L.D.= 6x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	30 días almacenado a 5°C	Atún	Okuma et al., 1991
XOD, NP, NT / IMP, Xantina, Hipoxantina	Reactor 1: NP+XOD Reactor 2 : NT+NP+XOD Entrecruzamiento en cuentas	Amperometría Electrodo de oxígeno por cada reactor	Continuo Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ , pH 7.8	Monitorización de oxígeno	L.D. IMP:2x10 ⁻⁵ -1.9x10 ⁻³ mol l ⁻¹ HxR:1x10 ⁻⁵ -1.7x10 ⁻³ mol l ⁻¹ Hx: 1x10 ⁻⁵ -1.8x10 ⁻³ mol l ⁻¹	7 meses almacenado a 4°C	Pescado	Okuma et al., 1992
Putrescina oxidasa, XOD, HRP / Poliaminas,	Entrecruzamiento con glutaraldehído en CPG (reactores) BSA/Gutaraldehído	Amperometría (un pico por cada reactor/sustrato) Electrodo carbono	Continuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.8	Ferrocianuro (en disolución) Monitorización de H ₂ O ₂ a 0.0 V	IL=1x10 ⁻⁶ a 5x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ L.D.=0.5x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	Reactores= 40 días con 90% de actividad	Lomo de cerdo	Yao et al., 1992

xantina	(electrodo HRP)	vitrificado			25 muestras/hora			
---------	-----------------	-------------	--	--	------------------	--	--	--

Tabla XIII. Biosensores amperométricos basados en la Xantina Oxidasa (XOD) (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
XOD / Hipoxantina, xantina	Entrecruzamiento con glutaraldehído + membrana policarbonato	Amperometría Electrodo Pt	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0	Azul de metileno Monitorización de H ₂ O ₂ a +50 mV	---	100% actividad durante 4 semanas	---	Amine et al., 1991
Deflavo XOD / Hipoxantina, xantina	Entrecruzamiento + Membrana diálisis	Voltamperometria Cíclica Carbono vitrificado	Discontinuo Tampón fosfato	1,1'-dimetilferricinio	L.D.= 0.1 μmol l ⁻¹	150 análisis, 75 horas de trabajo 80% sensibilidad después de un mes	---	Zhao y Luong, 1994
XOD / Hipoxantina	Atrapamiento físico	Amperometría Compósito TTF-TCNQ-Aceite silicona	Discontinuo Tampón fosfato pH 6.7	TTD-TCNQ - 100 Mv	L .D. = 10x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹	3 meses a - 30°C	---	Korell y Spichiger, 1994
XOD / Hipoxantina	Covalente en membrana de seda	Amperometría Electrodo disco Pt	Discontinuo Tampón fosfato	Monitorización de H ₂ O ₂	IL : 1x10 ⁻⁷ -1x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹ L.D.=1x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	---	---	Tuzhi et al., 1995
XOD / Hipoxantina, Xantina	Atrapamiento en gel de poliacrilamida y membrana	Amperometría Electrodo Clark	Discontinuo Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 8.3	Agente reductor: ácido ascórbico	Sin agente reductor : 1x10 ⁻⁵ -1.3x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ Con agente reductor : 5x10 ⁻⁷ -3x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹	7 días con 80% y cae a menos de 1/3 tras 10 días	---	Hasebe et al., 1995
XOD, NP, NT / IMP, Xantina, Hipoxantina	XOD en la superficie del electrodo con membrana NP y NT en disolución	Amperometría Electrodo de Pt	Discontinuo Tampón imidazol/ fosfato pH=7.8	Monitorización de H ₂ O ₂ a +650 mv	IL= 1x10 ⁻⁶ a 2x10 ⁻⁵ mol l ⁻¹ L.D.=5x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	---	Pescado	Volpe y Mascini, 1996
XOD / Hipoxantina, Xantina	Electropolimerización	Amperometría Electrodo carbono vitrificado con película de Au	Discontinuo Tampón fosfato 1/15 mol l ⁻¹ , pH 7.3	Polímero poli(mercapto-p-benzoquin.) 0.3 V	Hx : 1 - 80x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ HxR : 1 - 50x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	Señal constante 4 días y caída gradual a 70% en 8 días	---	Arai et al., 1996
XOD-HRP / Hipoxantina	Entrecruzamiento con glutaraldehído	Amperometría Carbono vitrificado modificado con	Discontinuo Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ , pH	Paraquat Monitorización de O ₂ a -0.6 ó -0.7V	IL= 1x10 ⁻⁶ a 2x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ L.D.= 8x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	Señal estable 3 días que disminuye	Pescado	Hu y Liu, 1997a

		Nafion	7.8 Tª ambiente			tras 14 días a un 65%	
--	--	--------	--------------------	--	--	-----------------------	--

Tabla XIII. Biosensores amperométricos basados en la Xantina Oxidasa (XOD) (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
NP, XOD / Hipoxantina, inosina	Solo inmovilizan XOD	Amperometría Electrodo carbono vitrificado modificado con Nafion	Discontinuo Tampón borato	Paraquat Monitorización de O ₂	IL=1x10 ⁻⁶ - 2x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹	---	Pescado	Hu y Liu, 1997b
XOD / Hipoxantina, inosina e IMP	Covalente en reactor de CPG con aminopropilsilano	Amperometría Electrodo screen-printed	Continuo	Monitorización de ácido úrico	Todos I.L. hasta 50x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ L.D.=1x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	---	---	Carsol et al., 1997
XOD (Tejido) / Xantina	Atrapamiento de suero de leche en electrodo	Amperometría Electrodo de pasta de C	Discontinuo Tampón fosfato pH 8.0-9.0	Ftalocianina de Co en electrodo y ferricianuro en disolución	IL : 1x10 ⁻⁶ - 15x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	En 60 días 60% de la señal del primer día	---	Kilinc et al., 1998
XOD / Hipoxantina	Membrana XOD de seda y membrana de acetato celulosa para interferencias	Amperometría Electrodo de alambre cubierto con bicapa	Discontinuo	Monitorización H ₂ O ₂	L.D.= 1x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	6 semanas, 400 ensayos	Pescado	Cheng, et al., 1998
XOD, NP / IMP, inosina e hipoxantina	Reactor XOD y reactor NP de vidrio aminopropil	Amperometría Electrodo screen-printed	Continuo	Monitorización H ₂ O ₂	---	3 meses a 4°C 200-300 análisis (1 mes trabajo)	Pescado	Carsol y Mascini, 1998
XOD, HRP / Hipoxantina	Entrecruzamiento al electrodo con Os-gel-HRP	Voltamperometría cíclica y amperometría Electrodo carbono vitrificado	Continuo Tampón fosfato	Os modificador del electrodo 0.0 V	IL :0.5-80x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ L.D. :0.2x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	---	---	Mao y Yamamoto, 2000
XOD / Hipoxantina, Xantina	---	Amperometría Electrodo carbono vitrificado modificado con CuPtCl ₆	HPLC	Modificadores electrodo	HX: 6x10 ⁻⁷ -2x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ HxR: 5x10 ⁻⁷ -2x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ L.D. : 1x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	---	Mezclas de HrX y HX	Pei y Li, 2000
XOD / Hipoxantina	Electropolimerización de polianilina	Voltamperometría cíclica Electrodo pasta C de metilviologeno y montmorillonita	Discontinuo Tampón fosfato	Metilviologeno	IL :1x10 ⁻⁶ - 4x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ L.D. : 0.8x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	---	Pescado	Hu et al., 2000
XOD / Hipoxantina	Atrapamiento en matriz de grafito-silice	Amperometría Electrodo compuesto de	Discontinuo Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ pH	Monitorización de H ₂ O ₂ sin mediador y monitorización de	1x10 ⁻⁶ - 1x10 ⁻³ mol l ⁻¹ L.D. : 1.3x10 ⁻⁶ ,	---	Carpa	Niu y Lee, 2000

		grafito-cerámica	7.6	O ₂ sin mediador y con benzilviologeno	5.6x10 ⁻⁶ y 3.8x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹ respectivamente.			
--	--	------------------	-----	---	--	--	--	--

Tabla XIII. Biosensores amperométricos basados en la Xantina Oxidasa (XOD) (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
XOD / Hipoxantina	---	Voltamperometria onda cuadrada Electrodo modificado con Nafion/plomo-oxido rutenio	Discontinuo	Metales modifíc	Limite detección = 0.75x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	---	Pescado	Zen, et al., 2000
XOD / Hipoxantina	Atrapamiento en Nafion y fenol por electropolimerización	Amperometría Microelectrodo de fibra de carbono	Discontinuo	Monitorización de H ₂ O ₂ y ác. úrico a +0.60 V	IL : 5x10 ⁻⁶ - 1.8x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ L.D.=1.5x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	---	Cultivo de células miocardial	Mao et al., 2001
XOD, NP / IMP, inosina e hipoxantina	Reactor enzimático de cuentas	Electrodo de oxígeno	Flujo	---	Tiempo respuesta ensayo : 5 min	28 dias	---	Okuma y Watanabe, 2002

Abreviaturas :

XOD : Xantina Oxidasa

HRP : Peroxidasa

NP : Nucleótido Fosforilasa

NT :5'-nucleotidasa

Hx :Hipoxantina

HxR : Inosina

I.L. : Intervalo lineal

L.D. Límite de detección

CPG : Vidrio de poro controlado

BSA : Alúmina de suero bovino

TTF-TCNQ : Tetracianoquinodimetano tetratiafulvaleno

IMP : ácido inosínico fosforilado

Tabla XIV. Determinación de colesterol mediante biosensores enzimáticos amperométricos

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
COD, HRP, CE / Colesterol	Enzimas en disolución Incubación a 37 °C	Amperometría Electrodo tubular de carbono.	Mediador : ferrocianuro 15 mM colato de sodio 0.75% Triton X-100, 3 mM azida de sodio y tampón fosfato. T ^a ambiente	Precisión en el día=2% Recuperación= depende de la concentración. Entre 98.2 y 102.4%	---	Suero	Hahn y Olson, 1979
COD, CE / Palmitato y colesterol	Reactor con gel de agarosa activada con BrCN situado antes del electrodo	Amperometría Electrodo H ₂ O ₂	Flujo Monitorizan H ₂ O ₂ a 0.6 V 5% Triton X-100 pH 8.0 T ^a = 37 °C	n=50 RSD=2% IL= 100-400 mgdL ⁻¹ RSD(n=50) = 2% (300 mg/dL)	300 ensayos 1 mes	Suero	Karube et al., 1982
COD	Entrecruzamiento con glutaraldehído en CPG. Separado del detector	Amperometría	FIA 5% Isopropanol 4% Triton X-100 0.87 g NaCl Calientan y disuelven en agua (>100 ppm turbias)	0-80 mg / dL RSD=1.0-3.0 % 30 muestras/h L.D. = 0.2 µg	3 meses vida	Sangre Mantequilla Cosméticos	Masoom y Townshend, 1985
COD, HRP, CE / Colesterol y palmitato de colesterol	Entrecruzamiento con glutaraldehído en sílice y con alquilaminos. (Reactores de COD y CE).	Amperometría Electrodo de lámina de Au con HRP inmovilizada. Al que llegan los productos formados en los reactores de COX y CE.	FIA E _{ap} =-0.30 V 1.5 mL/min Tampón fosfato 0.1 M, pH=7.5. 2.0% de Triton X-100 y 0.5 mM de hexacianoferrato (II).	10 muestras/hora RSD=2% L.D.: Colesterol libre = 8x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹ Colesterol total = 3x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	Reactores : 2 meses reteniendo el 90% de su actividad inicial	Suero	Yao y Wasa, 1988
COD, CE / Colesterol	Inmovilizan COX en albúmina y lo ponen en el electrodo de O ₂ . CE para pretratar a 37 °C	Amperometría Electrodo O ₂ modificado	Cloroformo/hexano (1 :1)	Al ir aumentando la concentración de colesterol, se inactiva debido al H ₂ O ₂ que se forma.	1 hora para equilibrar	Mantequilla Margarina Manteca Grasa	Hall y Turner, 1991
COD / Colesterol	Atrapamiento entre capas	Electrodo platinizado y con dos capas : polipirrol y poli(o-fenilendia mina)	---	L.D.= 12x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	1 mes	Suero	Tatsuma y Watanabe, 1991
COD / Colesterol	Membrana de nylon	Amperometría	Tampón fosfato 0.1 mol l ⁻¹ , pH 7.0. T ^a = 37 °C	I.L. : 0.5 a 12.5x10 ⁻³ mol l ⁻¹ L.D. : 0.25x10 ⁻³ mol l ⁻¹	--	---	Bala et al., 1997

Tabla XIV. Determinación de colesterol mediante biosensores enzimáticos amperométricos (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
COD,HRP GOD Colesterol	Enzima en disolución	Mediador : ferrocianuro $E_{ap} = -0.1V$ $T^a = 17\text{ }^\circ C$	Solubilizador : Propanol/Agua 75/25 v/v y Triton X-100 1.1% m/v (sol : 0.02 M)	Lineal hasta 0.01 M (Añaden los sustratos, los dejan reaccionar 2 min y entonces aplican el potencial)	---	---	Cassidy et al., 1993
COD, CE / Colesterol y palmitato de colesterol	Adsorción (disolución de enzimas y dejan sumergido el electrodo por la noche).	Amperometría Microsensores compósitos de negro de acetileno teflón y un mediador de Os.	Monitorización de H_2O_2 a 650 mV Tampón cítrico/fosfato pH 7.0 $T^a = 37\text{ }^\circ C$	5 μM - 0.47 mM colesterol 2 μM - 1.00 mM éster de colesterol	Colesterol= 2-3 meses Ester=1mes	Suero	Motonaka y Faulkner, 1993
COD, CE / Colesterol Colesterol oleato	Mezcla enzimas con laponita y deposición en la superficie del electrodo. Secado a vacío. Polimerización.	Amperometría Electrodo enzimático via laponita (disco Pt).	Monitorizan H_2O_2 a 0.53 V Disolución en Triton X- 100 y adición de fosfato pH 7. Trabajan en 0.05% Triton. $T^a = 37\text{ }^\circ C$	Sin arcilla no se ve el éster de colesterol Sensibilidad : Colesterol= 3.4 mA M^{-1} Oleato=0.2 mA M^{-1} (L.D. =0.2 μM)	---	---	Besombes et al., 1995
COD, CE, HRP / Colesterol	En disolución	Cronoamperometría y voltamperometría cíclica. Electrodo pasta C con HRP y ferroceno.	Tampón fosfato pH 7.0 y 0.35% Triton X-100 T^a ambiente	1×10^{-6} - 1.5×10^{-4} M Sensibilidad= 9500 μM^{-1}	1 año y medio Respuesta : 30 s	Suero	Charpentier y Murr, 1995
COD, HRP / colesterol CE para pretra- tamiento de las muestras	Atrapamiento durante electropolimerización	Amperométriía (Bicapa enzima/PPD)	FIA *Mezclas 2-PrOH y Tritón X-100 * Tritón X-100 en tampón fosfato pH 7.4. $T^a = 65\text{ }^\circ C$	I.L. : 0.25 - 0.3 mM s= 43.99 nA L $mmol^{-1}$ L D : Altura=5.7 μM , Anchura=23.9 μM 1-2 determinaciones/min	550 deter- minaciones 7-11 s=f(cc)	Suero Colesterol certificado	Vidal et al., 1999
COD, CE / Colesterol y linoleato de colesterol	Entrecruzamiento con glutaraldehído. 1) monocapa de 2- aminoetanotiolato y 2) disolución con la/s enzima y glutaraldehído	Amperometría Electrodo Au	Med: Tionina (0.0 V vs SCE) $T^a = 30\text{ }^\circ C$ Solubilizador: i-propanol Medio medida : tampón fosfato pH 7.0 con 1 mM tionina y 30% de isopropanol	Colesterol lineal hasta 2 mM Linoleato colesterol lineal hasta 4 mM (Para mejorar la estabilidad, tienen que liofilizar a $-22\text{ }^\circ C$)	Alcanza el estado esta- cionario en 60 seg En 40 horas caída de 15.8% en la señal	Suero	Nakamina- mi et al., 1999

Tabla XIV. Determinación de colesterol mediante biosensores enzimáticos amperométricos (Continuación)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
COD / Colesterol	Atrapamiento en una capa de polipirrol	Amperometría. Electrodo de Pt en el que se deposita una capa de polipirrol y un polímero bicapa de poli(o-fenilendiamina)	---	L.D.= $12 \mu\text{mol l}^{-1}$	1 mes	Suero sintético	Vidal et al., 2001
COD / Colesterol	Atrapamiento en una membrana de p(HEMA)-polipirrol	Amperometría Electrodo de Pt modificado primero con el hidrogel y luego con el polipirrol	---	I.L. : 1.5×10^{-4} a $1.5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ L.D. : $120 \mu\text{M}$ 60 muestras/hora	80% actividad tras 12 meses almacenado en seco	Suero de pacientes	Brahim et al., 2001
COD, Microperoxidasa / Colesterol	COD atrapada con poliestirenosulfonato en monocapa de microperoxidasa inmovilizada covalentemente en el electrodo	Amperometría Electrodo de oro-aminoetanotiol	---	I.L. : 0.2 a 3.0 mol l^{-1}	---	---	Gobi y Mizutani, 2001
COD / Colesterol	Atrapamiento entre la capa de P(1,5-DAN) y de polipirrol	Amperometría Electrodo modificado con la heterobicapa polimérica	Flujo	Sensibilidad : $44.99 \text{ nA mmol}^{-1} \text{ l}$ L.D. : $9.7 \mu\text{M}$	---	Suero sintético	Vidal et al., 2002a
COD / Colesterol	Electropolimerización de polipirrol. Se incluye a la vez el mediador	Amperometría Electrodo de Pt modificado con capa de polipirrol-COD-ácido monocarboxílico ferroceno	Flujo	Sensibilidad : $88.51 \text{ nA mmol}^{-1} \text{ l}$ L.D. : $12.4 \mu\text{M}$	Mejora con la deposición de la capa de polímero	---	Vidal et al., 2002b

Abreviaturas :

COD = Colesterol oxidasa

CE = Colesterol esterasa

HRP = Peroxidasa

GOD = Glucosa oxidasa

p.HEMA : Poli(2-hidroxietilmetacrilato)

P(1,5-DAN) : Poli(1,5-diaminopolinaftaleno)

Tabla XV. Biosensores amperométricos basados en Alcohol Oxidasa (AOD)

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
AOD/ EtOH	Entrecruzamiento en vidrio de poro controlado	Detección amperométrica de H ₂ O ₂ Electrodo de Pt	Sistema de difusión en flujo (reactor)	0.7 V	I.L: hasta 15 % v/v	---	Cerveza y vino	Mohns y Kuennecke, 1996
AOD/EtOH	En membrana	Amperométrica	HPLC Fase móvil: tampón fosfato 0.05 mol L ⁻¹ , pH 7	Monitorización de H ₂ O ₂ 0.8 V vs. Ag/AgCl	L. D. = 30 ng	---	Bebidas alcohólicas	Kakemoto, 1996
AOD/ Etanol	Modificación del electrodo con avidina y deposición de la enzima en ella	Amperométrica Electrodo de disco de Pt	Tampón fosfato 0.1 mol L ⁻¹ , pH 7.8	+0.6 V vs Ag/AgCl	I.L: 0.1-100 mg/L	4 semanas	Sake	Cu et al., 1996
AOD/ MeOH y EtOH	AOD inmovilizada en películas de Nafion	Amperométrica	---	Azul de Prusia 0 mV	I.L: MeOH: 5 µM-1mM EtOH: 0.1-1 mM L.D.: MeOH 1 µM EtOH 50 µM	---	---	Karyakin, et al., 1996
AOD/ Etanol	Atrapamiento con el modificador de la superficie electródica	Amperométrica Electrodo de carbono vitrificado Modificado con sulfonato de poli (4-estireno)	---	1.0 V vs Ag/AgCl	I.L: Hasta 0.4 mM L.D.: 0.5 µM t. Respuesta: ~ 5 s	~ 2 semanas	Bebidas alcohólicas y salsas de soja	Mituzani, 1997
AOD/ aspartamo	Inmovilización covalente en una membrana de policarbonatos con glutaraldehído	Amperométrica	Tampón fosfato 0.1 mol L ⁻¹ , pH 7.5 Discontinuo y FIA	Electrodo de Pt polarizado a +650mV vs. Ag/AgCl	I.L: Discontinuo:1-750 µM FIA: hasta 1 mM L.D.: 0.2-1 µM RSD: 1.8- 4 % (n=10)	---	Alimentos (Comidas)	Compagnone et al., 1997
AOD, GOD / MeOH, EtOH, cloroetanol, propanol	Reactores con una sola y con las dos enzimas	Amperométrica Pt	Tampón fosfato Fase reversa Hypersil C18	+ 500 mV (Monitor H ₂ O ₂)	---	1 mes (reactor)	Zumo, vino Cerveza sin alcohol Sangre	Galensa, et al., 1998
AOD / EtOH, MeOH y n-propanol	Inmovilización en cartuchos (Adsorción)	Amperométrica Grafito 19% +resina epoxi 78% curado a 40°C1 semana	Tampón fosfato 0.1 M, KCl 0.1 mM pH 7.0 Discontinuo	Monitorización de H ₂ O ₂ a 1100 mV	EtOH : I.L.= 0.5-29 mg/mL (0.01-0.6 M) s= 22 nA mL/mg ⁻¹	Más de 15 días sin pulir y 100 puliendo	Bebidas alcohol	Morales, et al., 1998

Tabla XV. Biosensores amperométricos basados en Alcohol Oxidasa (AOD) Continuación

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
1. Piranosa oxidasa, HRP 2. AOD,137U HRP,385 U Sustratos : patron ferment (glucosa,xilosa galactosa)	1. Covalente, adirivos : polietilendiimina y lactitol 2. Adsorción, aditivo : lactitol	Amperométrica Pasta de carbono formada con parafina	Tampón fosfato Cromatograf. líquida Columna intercambio	- 50 mV vs Ag/AgCl	I.L. : Glucosa : 0.3-2.5 g/L Xilosa : 0.5-6.7 g/L Galactosa : 0.5-6.7 g/L EtOH : 1.6 - 11.7 g/L L.D.: Glucosa : 0.1 g/L Xilosa : 0.2 g/L Galactosa : 0.4 g/L EtOH : 0.2 g/L	Alcohol : ↓1.5% por hora Carbohidr: ↑ durante 7 horas y cae 1% por hora hasta fin ferment	Productos de fermentación : Etanol y monosacaridos Interferencias : HAc, ribitol	Liden, et al., 1998a
AOD (137 U), HRP (395 U) / EtOH, MeOH	Covalente (carbodiim + glutaraldehido)	Amperométrica Pasta de carbono En algunos casos membranas OPDA+membrana iónica Eastman AQ	Tampón fosfato Cromatograf Líquida (columna : Relleno de compuesto polimérico : PLRP-S)	Usan algunos aditivos - 50 mV vs Ag/AgCl	I.L. : H ₂ O ₂ : 2 μm-0.2 Mm EtOH : 30 μM-2mM MeOH : 8 μM-0.5 mM 30 muestras/hora Sistema cromatográfico :13 inyecciones/h EtOH : 20 μM-2mM MeOH : 5-600 μM	52 horas (viene dado por la AOX)	Plasma, orina Estudios recuperación : Plasma : 97-109% Orina : 60-100 %	Liden et al., 1998b
AOD MeOH, EtOH, formaldehido	Inmov. en gel de alginato de calcio y lo colocan en la superficie del electrodo	Amperométrica	Aditivos : azucares y polialcoholes para ↑estabilidad	---	Biosensor O ₂ : EtOH : 0.2-1.2 mM, MeOH : 0.03-0.35 mM Biosensor H ₂ O ₂ : EtOH : 0.4 - 4.0 mM, MeOH : 0.05 - 1.2 mM Selectividad : MeOH 100%, EtOH 21% y formaldehído 12%	1 dia 100% y caída lenta hasta dia 8 un 30% y 10% dia 9		Gonchar et al., 1998
AOD y HRP/ MeOH,	Adsorción por deposición en electrodo modificado con multicapas	Amperométrica Au. Multicapas: MPS y polímero redox de Os	Tampón fosfato 0.1 mol L ⁻¹	---	Sensibilidad= 10.6 mA/Mcm	---	---	Narváez, et al., 2000
Tejido de champiñón / Etanol	Entrecruzamiento con glutaraldehido en gelatina y deposición en la	Amperométrica Electrodo de oxígeno (membrana de teflón sensible	Discontinuo Tampón fosfato 0.05 mol l ⁻¹ , pH 7.5	---	I.L.: 0.2 a 2.0x10 ⁻³ mol l ⁻¹	Pérdida 18% en 10 horas	Suero	Akyilmaz, et al., 2000

	membrana de O ₂	O ₂)	T ^a = 35 °C					
--	----------------------------	------------------	------------------------	--	--	--	--	--

Tabla XV. Biosensores amperométricos basados en Alcohol Oxidasa (AOD) Continuación

Enzima / Sustrato	Inmovilización	Detección / Tipo electrodo	Medio y modo de medida	Mediador, E _{ap}	Características analíticas	Tiempo vida	Muestras	Referencia
AOD distintas fuentes / Diferentes alcoholes	Atrapamiento en hidrogel	Amperométrica Electrodo screen-printed modificado con mezcla de hidrogel PCS y la enzima	Discontinuo	---	---	---	Vino	Patel., 2001
AOD/ MeOH, EtOH, ButOH, bencilalcohol	Atrapamiento en matriz de polivinil-ferrocenica	Amperométrica Electrodo de Pt modificado con la matriz polivinil-ferrocenica	Acuoso pH=8.0	+0.70 V vs. SCE	I.L. : MeOH : hasta 3.7 mM EtOH : hasta 3.0 mM ButOH : hasta 6.2 mM Bencilalcohol : hasta 5.2 mM	---	---	Gulce eet al., 2002

Abreviaturas :

AOD : Alcohol oxidasa

HRP : Peroxidasa

MeOH : Metanol

EtOH : Etanol

I.L. : Intervalo Lineal

L.D. : Límite de detección

PLRP-S : Poliestireno divinilbenceno

MPS : 3-mercapto-1-propano sulfonato de sodio

PCS : Policarbamoilsulfonato

V. ELECTRODOS MULTIENZIMÁTICOS. BIOMULTIDETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

V.1. OBJETIVO

Diseño, desarrollo, optimización y evaluación de las características operacionales y analíticas de biosensores compósitos multienzimáticos de grafito-Teflón como detectores amperométricos en HPLC. Evaluación de la utilización de electrodos bienzimáticos en paralelo.

V.2. INTRODUCCIÓN

En ocasiones, la determinación de un analito individual en una muestra no sirve para resolver un problema analítico de forma completa. Para intentar resolver esta situación, se pueden incorporar en el sistema de detección varios sensores o elementos de reconocimiento, con los que se puede monitorizar un grupo de parámetros que permita obtener mucha más información analítica para la muestra en cuestión. Esta estrategia es particularmente útil en el análisis de alimentos, ya que la mayoría de las muestras contienen una mezcla compleja de analitos para los que la multidetección resulta sumamente apropiada.

Tradicionalmente, la cromatografía ha resuelto multitud de problemas que implican la necesidad de resolver con un solo análisis la determinación de varios analitos de interés. Una de las desventajas que se pueden plantear trabajando de esta forma es la limitación que existe en cuanto a la detección, ya que solo se puede llevar a cabo con compuestos de la misma familia o que presenten características similares en lo referente al principio de detección. Por otro lado, no siempre se pueden resolver cromatográficamente los analitos de determinadas muestras, debido a que puede que no existan columnas o derivatizadores adecuados. Los biosensores enzimáticos suponen una alternativa a la hora de llevar a cabo multidetección, ya que mediante la incorporación de diferentes enzimas o el acoplamiento de varias reacciones enzimáticas se pueden analizar muestras que contengan analitos que no se podrían detectar simultáneamente con un detector convencional, siempre que cada elemento de reconocimiento biológico responda de forma individual (O'connell y Guilbault, 2001) .

Como una alternativa a la cromatografía, pueden agruparse varios biosensores en serie ("arrays"). Los sensores en serie de primer orden consisten en un conjunto de sensores parcialmente selectivos que operan a la vez para analizar una muestra. La señal producida por la muestra da lugar a $1 \times n$ series de respuestas según el número de sensores (n) que exista. El mejor sensor que existe para poder ser utilizado de esta forma es aquél que es específico/selectivo hacia un analito, por lo que un sensor enzimático es una buena opción para desarrollar este tipo de sistemas, ya que cuanto mayor sea el poder discriminatorio del "array", mejor exactitud y precisión se conseguirá en el análisis y más analitos podrán ser resueltos a partir de una sola muestra. Existen también arrays de sensores de segundo orden, con los que hay recurrir a la quimiometría para resolver las respuestas. (Carey, 1994).

En capítulos anteriores, se ha demostrado la compatibilidad de los electrodos de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno con sistemas cromatográficos de HPLC. Además, también se ha demostrado sobradamente la posibilidad de coinmovilizar varias enzimas por simple atrapamiento físico en la matriz electródica de grafito-Teflón. Por ello, se pensó en la posibilidad de construir un biosensor compósito “multienzimático” capaz de ser utilizado como “monoanalito”, cuando sea necesario hacer medidas individuales de los sustratos correspondientes a cada una de las enzimas, o como sensor “multianalito” empleándolo como detector en un sistema de HPLC. Así, se construyó un biosensor trienzimático de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno susceptible de ser aplicado a la determinación simultánea de glucosa y alcoholes en vinos, tras su separación mediante HPLC. Por otro lado, se diseñó una célula de medida “multielectrodo” con objeto de poder disponer varios electrodos de trabajo conectados a diferentes potencióstatos, de forma que sea posible detectar simultáneamente varios analitos sin tener que recurrir a una separación cromatográfica. Los principios de medida son, obviamente, los indicados para cada biosensor individual.

V.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Probablemente los dispositivos multidetectores de más actualidad son los denominados como narices y lenguas electrónicas (Ulmer et al., 2000). La mayoría de estos sistemas están basados en sensores químicos, tales como sensores de óxidos metálicos (Kohl et al., 2000), polímeros conductores (Stella et al., 2000), puentes micromecánicos cubiertos (Maute et al., 1999) o superficies de microbalanzas de cristal de cuarzo modificadas (Nakamoto et al., 1993). No obstante, estos sistemas son solo semi-selectivos y presentan una relación señal/ruido baja producida por el ruido y la deriva de los sensores.

Se han publicado también arrays de inmunosensores en los que la técnica de construcción más común es separar el material de afinidad en puntos concretos de la superficie del sensor. La reacción bioquímica puede detectarse a través de un marcador de fluorescencia y una cámara CCD (Wadkins, et al., 1998) o de haces de fibra óptica (Bronk y Walt, 1994). Un método alternativo es utilizar múltiples marcadores para distinguir entre varios analitos (Choi et al., 1991).

Con sensores enzimáticos es relativamente más fácil producir sistemas multianalito que puedan detectar un determinado número de ellos simultáneamente, siempre que, como ya se ha indicado, se cumpla el requisito imprescindible de poder llevar a cabo las transducciones de forma individual. En la tabla XVI se recogen algunas referencias de trabajos basados en la multidetección de analitos con biosensores enzimáticos.

Dada la sencillez de la instrumentación, la mayoría de los trabajos publicados pertenecen al campo de los biosensores enzimáticos amperométricos, si bien también se ha incluido alguno que utiliza detección UV-Visible (Becker y Schmidt, 2000) y que combina

detección amperométrica y colorimétrica (Rhee y Schügerl, 1997), aunque siempre resultan ser sistemas mucho más complicados en cuanto a instrumentación y operatividad.

Como se muestra la tabla, son bastantes los electrodos multidetectores acoplados a sistemas cromatográficos (Guerrieri y Palmisano, 2001 ; Chen y Matsumoto, 1995 ; Park et al., 2000), e incluso hay trabajos en los que se incluyen en sistemas de varios canales, columnas cromatográficas específicas para la separación de los analitos de la matriz (Chen y Matsumoto, 1995 ; Buttler et al., 1993). Como alternativa a la cromatografía, la combinación de diferentes reactores enzimáticos (Matsumoto et al., 1988 ; Becker y Schmidt, 2000 ; Matsumoto y Waki, 1999 ; Chen y Matsumoto, 1995 ; Park et al., 2000) permite analizar muestras en las que los analitos no podrían llegar a separarse cromatográficamente, pero de nuevo estas formas de multidetección resultan bastante complicadas en cuanto a montajes, inmovilización de las enzimas, instrumentación necesaria, etc. Por todo ello, parece que la forma más sencilla de resolver una detección simultánea de analitos es utilizando células duales o multidetectoras (Katrlik, et al., 1999 ; Mannino et al., 1999).

En cuanto a los sistemas enzimáticos utilizados, las aplicaciones más extendidas son las que incluyen analitos de interés en fermentaciones, entre los que aparecen mayoritariamente la glucosa, el ácido láctico y el etanol. También es bastante común la detección de sacáridos, aprovechando la combinación de enzimas que liberan glucosa o galactosa de estructuras de polisacáridos. Otros sistemas en los que suelen emplearse enzimas para llevar a cabo multidetección, son los diseñados para la determinación de acetilcolina y colina en tejidos nerviosos o, como ya se vió en el capítulo IV.2., para la determinación simultánea de degradación del ATP con objeto de evaluar la frescura de carnes y pescados.

Tabla XVI. Biosensores enzimáticos desarrollados para detección simultánea de analitos

Enzimas/	Método inmovilización	Detección	Modo de trabajo	Muestra	Referencia
----------	-----------------------	-----------	-----------------	---------	------------

Analito					
GOD, galactosa oxidasa y β -galactosidasa / Glucosa, galactosa y lactosa	---	Amperométrica Sensor de microdialisis acoplado a FIA	Flujo	Leche	Rajendran y Irudayaraj, 2002
Maltosa fosforilasa, mutarrotasa y GOD / Fosfato y glucosa	Atrapamiento físico en arcilla (laponita)	Amperométrica	Discontinuo	---	Mousty et al., 2001
Acetilcolinesterasa Colina oxidasa / Acetilcolina y colina	Entrecruzamiento con glutaraldehido	Amperométrica (Electrodo de Pt)	Cromatografía líquida (célula thin-layer)	Tejido de cerebro de rata	Guerrieri y Palmisano 2001
XOD, NP, 5'-NT / Hipoxantina, inosina y 5'-monofosfato de inosina	Entrecruzamiento con glutaraldehido en reactores (uno por enzima)	Amperométrica Electrodo de oxígeno (uno por reactor)	Flujo	Carne	Park et al., 2000
Glucosa oxidasa y lactato oxidasa / Glucosa, L-lactato	---	Amperométrica	FIA	Fermentación ácido láctico	Kumar et al., 2001
Glucosa oxidasa / Glucosa e insulina	Atrapamiento físico	Amperométrica (Electrodos pasta de carbono. Modificado con óxido de rutenio)	Flujo (microsensor con dos electrodos integrados)	---	Wang y Zhang, 2001
Glucosa oxidasa y lactato oxidasa / Glucosa, L-lactato	Entrecruzamiento con glutaraldehido	Amperométrica (Electrodos de Pt modificados con polipirrol)	Flujo (célula dual)	Zumo de tomate	Palmisano et al., 2000
Glucosa oxidasa y lactato oxidasa / Glucosa, L-lactato	Inmovilización en dos reactores de CPG paralelos	Amperométrica (Electrodo de Pt modificado con membrana de fenilendiamina)	Flujo	Orina, plasma sanguíneo y productos lácteos	Marzouk et al., 2000
Glucosa oxidasa y lactato oxidasa / Glucosa, L-lactato	Atrapamiento físico	Amperométrica (Electrodos de pasta de carbono)	Flujo (célula dual)	Fermentación de lactococcus lactis	Min et al., 1998
Galactosa oxidasa y glucosa oxidasa / Galactosa y glucosa	Atrapamiento físico	Amperométrica (Electrodos de pasta de carbono-rodio)	FIA (Electrodos en paralelo)	---	Mannino, 1999
L-malato y L-lactato deshidrogenasas / Acidos málico y láctico	Atrapamiento físico	Amperométrica (Electrodos compósitos de grafito-NAD ⁺ -2-hexadecanona)	Multisensor para detec simultánea	Vino	Katrlík et al., 1999
INV, MUT, GOD, FDH / Glucosa, fructosa y sucrosa	Entrecruzamiento con glutaraldehido en diferentes reactores de vidrio poroso fino	Amperométrica (Electrodos de Pt)	Flujo (célula multicanal)	Frutas	Matsumoto et al., 1988
FDH, GDH, diaforasa / Fructosa y glucosa	Coinmovilización por enlace covalente en membrana	Amperométrica (Electrodos de Pt cubiertos con las membranas. Mediador : ferricianuro en disolución)	Discontinuo	Miel	Antiochia y Palleschi 1997
AChE, BChE, GOD, ureasa/ Acetilcolina, butirilcolina, glucosa, urea	Covalente en membranas de nitrocelulosa o directamente en la superficie del detector	Capacitancia (Sensor enzimático de seis canales)	Discontinuo	Metales pesados y pesticidas organofosfor en patatas	Starodub et al., 1999
AOD, HRP / Etanol, hidratos de carbono	Covalente con carbodiimida y glutaraldehido (polietilimina para estabilizar)	Amperométrica para etanol (electrodo pasta C) y fotométrica para hidratos carbono	Separación de flujo en dos canales con dos columnas cromatográficas : una para etanol y otra para hidratos C	Fermentación	Buttler et al., 1993

Tabla XVI. Biosensores enzimáticos desarrollados para detección simultánea de analitos (continuación)

Enzimas/ Analito	Método inmovilización	Detección	Modo de trabajo	Muestra	Referencia
PyOD, AOD, HRP / Etanol y monosacáridos	Atrapamiento físico	Amperometría (electrodos de pasta de C : POX-HRP y AOD-HRP)	Columna cromatográfica, posterior sepa- ración de caudal y detección separadas	Fermentación	Lidén, et al., 1998
AOD, GOD-HRP / Etanol, glucosa	GOD: Covalente en reactor de CPG AOD: Covalente en bioreactor rotatorio con CPG	Amperometría etanol y quimioluminiscente glucosa	Sistema en flujo con reactores en línea (1º AOD, 2º GOD) y adición de HRP+luminol	Bebidas japonesas	Matsumo- to y Waki, 1999
GOD, AOD, GluOD/ Glucosa, etanol, glutamato	Reactores para cada enzima con aminopropil-CPG	Amperométrica (detección de H ₂ O ₂)	Sistema en flujo. Columna crom para el glutamato	Fermentación	Chen y Matsumo- to, 1995
GOD, PyOD, AOD, AAOD, LMO / Glucosa, etanol, metionina, lactato	Cartuchos especiales (un cartucho por cada enzima)	EVA	FIA	Fermentaciones diferentes para cada sustrato	Jürges et al., 1995
GOD, AOD, LOD / Glucosa, alcohol, lactato	Membranas fotosensitivas	Amperométrica Configuración de tres electrodos (Pt, Au, titanio,...)	Discontinuo	---	Muñoz, et al., 1999
AOD-HRP / Metanol y etanol	Adsorción	Amperométrica (electrodo pasta de carbono)	Cromatografía líquida (columna PLRP-S)	Orina (muestras preparadas)	Park et al., 2000
AOD, GOD, LDH, LMO, SOD / Etanol, glucosa, piruvato, L-lactato y acetato	Cartuchos VA-Epoxy- Biosynth E3-Carrier	Glucosa, etanol y lactato : electrodo de oxígeno. Sarcosina : Monit de H ₂ O ₂ espectrof. Piruvato : Monit. NADH espectrofot	Flujo	-- (Son metabo- litos cultivos de E. coli, pero no lo han aplicado)	Rhee y Schügerl, 1997
ADH, FoDH, PK, GDH, LDH, MDH, GIS / Etanol, piruvato / glucosa, acetato / glucosa, urea	Covalente en CPG y empaquetamiento en columnas dif	UV-Visible	Flujo	Zumo Refresco cola Miel Siropes	Becker y Schmidt, 2000

CPG : Vidrio de poro controlado
 INV : Invertasa
 MUT : mutarrotasa
 GOD : Glucosa oxidasa
 FDH : Fructosa deshidrogenasa
 ADH : Alcohol deshidrogenasa
 FoDH : Formaldehido deshidrogenasa
 PK : Piruvato kinasa
 GDH : glucosa deshidrogenasa
 LDH : Lactato deshidrogenasa
 MDH : manita deshidrogenasa
 GIS : glucosa isomerasa

AChE : Acetilcolinesterasa
 BChE : Butirilcolinesterasa
 HRP : Peroxidasa
 GluOD : Glutamato oxidasa
 PYOD : Piranosa oxidasa
 AAOD : Amino ácido oxidasa
 LMO : lactato monooxigenasa
 XOD : Xantina oxidasa
 NP : nucleósido fosforilasa
 5'-NT : 5'-nucleotidasa
 AOD : Alcohol oxidasa
 SOD : Sarcosina oxidasa

V.4. PARTE EXPERIMENTAL

V.4.1. INSTRUMENTACIÓN

V.4.1.1. APARATOS

Para las medidas realizadas mediante cromatografía líquida, se utilizó un detector electroquímico EG&G Princeton Applied Research Modelo 400. Para las medidas realizadas con electrodos en serie, se empleó un detector BAS EPSILON.

Los experimentos FIA se llevaron a cabo utilizando un sistema de inyección en flujo constituido por una bomba peristáltica WIZ y una válvula de inyección de volúmenes variables. Para cromatografía líquida se empleó una bomba JASCO PU-980 y una válvula de inyección Rheodyne. La columna utilizada fue Hypersil^R ODS de 5 μ m de 125x4 mm d.i.

Otros aparatos utilizados fueron: agitador magnético Ikamag Ret, pH-metro de precisión Metrohm E-510 calibrado de forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.00 y 7.02 a 25.0 ± 0.5 °C, baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, prensa de infrarrojos Carver y estufa P-Selecta.

V.4.1.2. ELECTRODOS Y CÉLULAS DE TRABAJO

- Electrodos de trabajo: Electrodo trienzimático de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno y electrodos bienenzimáticos de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno, grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno y grafito-Teflón-LOD-HRP-ferroceno preparados según se describe en el apartado IV.4.3.2.1.
- Electrodo de referencia: Electrodo de Ag/AgCl/KCl (3 M) BAS RE-1 tanto en discontinuo como para las medidas en FIA y en cromatografía líquida.
- Electrodo auxiliar: Electrodo de punta de platino, tanto en discontinuo como para las medidas en FIA y cromatografía líquida.

Como células electroquímicas de trabajo se utilizaron:

- Célula de tipo “wall-jet” de gran volumen (Figura 1 del apartado III.4.1.2.) para las medidas de cromatografía líquida.
- Medidas con electrodos en paralelo: Las células utilizadas son tipo “wall-jet” de gran volumen y fueron especialmente diseñadas para utilizar varios electrodos de trabajo. En la figura 133 se muestran las células construidas tanto para medidas en discontinuo (a) como en flujo (b).

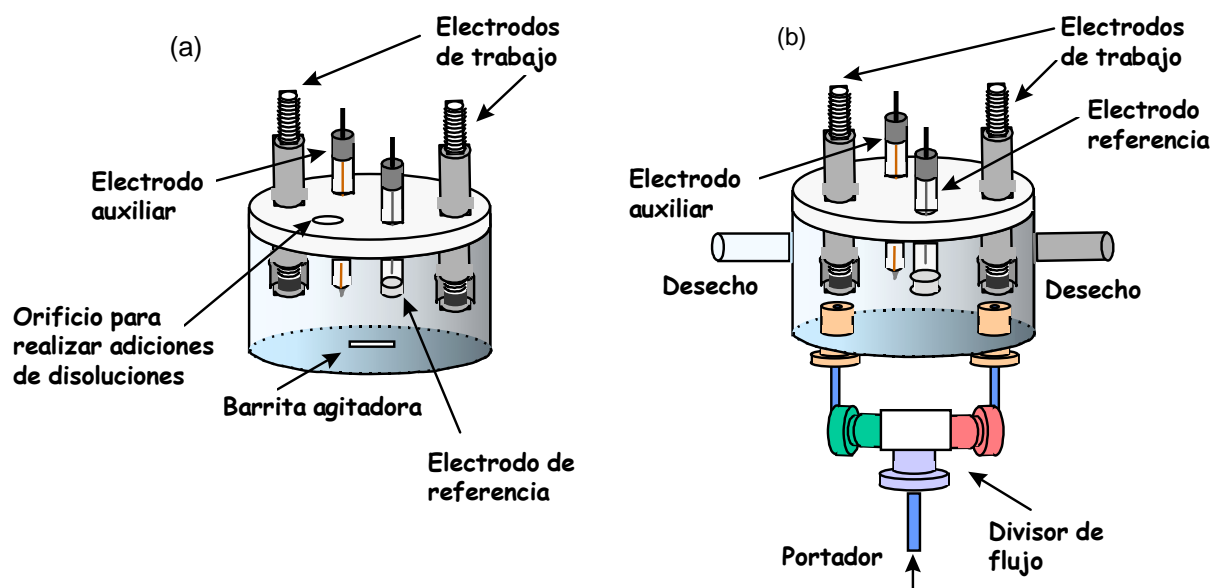


Figura 133

V.4.2. REACTIVOS

Para la preparación de los electrodos compósitos enzimáticos se utilizó:

- Grafito Ultra “F” purity (Carbone of America), como fase conductora.
- Teflón (politetrafluoroetileno), como fase aislante.
- Ferroceno (Merck) , como mediador.
- Peroxidasa (HRP) EC 1.11.1.7 (Type II-from Horseradish) de actividad 180 unidades por miligramo de sólido (Sigma).
- Glucosa oxidasa (GOD) EC 1.1.3.4 (Type X-S-from Aspergillus niger) de 181.600 unidades de actividad por gramo de sólido (Sigma).
- Alcohol oxidasa (AOD) EC 1.1.3.13 (de Pichia Pastoris) de actividad 1430 unidades por ml (55 mg de proteína/ml y 26 U/mg proteína).
- Lactato oxidasa (LOD) EC 1.1.3.2. de actividad 35 unidades de actividad por miligramo de sólido (Sigma).

Como sustratos se emplearon:

- D(+) Glucosa (Panreac)
- Metanol y etanol para HPLC (Scharlau).
- Ácido L-Láctico (Sigma).

Otros reactivos fueron :

- Fosfato disódico anhidro (Panreac) y fosfato monosódico dihidratado (Merck) para preparar las disoluciones reguladoras que se utilizan como medio de trabajo.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad para el análisis.

El agua empleada en todos los casos se obtuvo mediante purificación en un sistema Millipore Milli-Ro.

Las muestras analizadas fueron:

- Vino blanco y vino tinto de mesa "El Sotillo" (12% Vol.)
- Jerez dulce "Valdespino" (15% Vol.).

V.4.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

V.4.3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 :

Se prepara disolviendo las cantidades apropiadas de las sales disódica y monosódica, ajustando posteriormente el pH con NaOH 2 mol l^{-1} . Esta disolución se empleó también como portadora en análisis por inyección en flujo.

- Fase móvil en el sistema de HPLC : Disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} de pH 7.4, preparada tal y como se ha indicado anteriormente. Esta disolución fue filtrada a vacío inmediatamente antes de ser usada en el sistema cromatográfico.

- Disolución patrón de glucosa:

Se preparó una disolución 0.10 mol l^{-1} de glucosa, disolviendo la cantidad apropiada en la disolución reguladora de fosfato. Disoluciones más diluidas se prepararon por dilución con dicha disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} , pH 7.4.

- Disoluciones patrón de metanol y etanol:

Se prepararon disolviendo el volumen apropiado de cada alcohol en la disolución reguladora de fosfato para obtener una disolución 0.10 mol l^{-1} . Disoluciones más diluidas se prepararon por dilución con la misma disolución reguladora.

- Disolución patrón de ácido láctico:

Se obtuvo disolviendo la cantidad necesaria, pesada exactamente para obtener una concentración 0.10 mol l^{-1} de ácido láctico, en la disolución reguladora de fosfato. Disoluciones más diluidas se prepararon por dilución con dicha disolución reguladora.

V.4.3.2.- PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS COMPÓSITOS ENZIMÁTICOS

V.4.3.2.1. Electrodo bienzimático de grafito - Teflón - lactato oxidasa- peroxidasa - ferroceno

Se mezclaron 0.28 g de grafito, 0.014 g (2700 U) de peroxidasa y 0.0029 g (101.5 U) de lactato oxidasa, pesados exactamente, mediante agitación mecánica, durante 2 horas, en una suspensión de 0.4 mL de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 a una temperatura de 4 °C. Tras la agitación, se evaporó el agua por paso de una corriente de Argon. añadiéndose seguidamente 0.016 g de ferroceno, pesados exactamente, y agitándose mecánicamente en una suspensión de 0.4 ml de acetato de etilo durante aproximadamente 15

minutos. A continuación se evaporó el acetato de etilo por paso de una corriente de Argon. Posteriormente se mezcló manualmente el grafito modificado con las enzimas y el ferroceno (lo que supone una cantidad de 0.3 g) con 0.7 g de teflón (todas estas cantidades pesadas exactamente). Se procedió, seguidamente, a la compresión mecánica de la mezcla en forma de pastillas utilizando una prensa de IR, aplicando una presión de 10.000 Kg/cm² durante 10 minutos. La pastilla así obtenida (pastilla madre) tiene 1.3 cm de diámetro y 0.4 cm de grosor. Se preparan a continuación pastillas más pequeñas, de 3 mm de diámetro, con ayuda de un troquel y se colocan en la punta de un tubo de Teflón, procediéndose a montar el electrodo que se esquematizaba en el apartado III.5.2.

El resto de electrodos bienzimáticos utilizados se prepararon de forma análoga a lo indicado en los capítulos correspondientes a cada uno de ellos : apartado IV.1.4.3.2. para el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno y apartado IV.4.4.3.2.1. para el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno.

V.4.3.2.2. Electrodo trienzimático de grafito - Teflón - glucosa oxidasa-alcohol oxidasa - peroxidasa - ferroceno

La única diferencia de este electrodo con los anteriores, es el mayor número de enzimas coinmovilizadas que se incluyen en la matriz electródica. Esto no supuso ninguna diferencia en el procedimiento de construcción de los electrodos descrito a lo largo de la Memoria, salvo que, en este caso la suspensión de grafito en 0.4 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4 contiene : 2700 U de HRP, 2724 U de glucosa oxidasa y 286 U de alcohol oxidasa. El resto del procedimiento es idéntico al del apartado anterior.

V.4.3.3. OBTENCIÓN DE LOS AMPEROGRAMAS EN DISCONTINUO

Tras mantener el biosensor almacenado a 4 °C es necesario, antes de realizar las medidas, alcanzar la temperatura ambiente, para lo que se esperó el tiempo necesario.

Como con el resto de electrodos desarrollados, los amperogramas en discontinuo se obtuvieron sumergiendo el biosensor en la célula de medida que contenía 5.0 ml de la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ de pH 7.4 y agitando mecánicamente de forma constante. Tras aplicar el potencial deseado, se permitió la estabilización de la corriente de fondo. Las medidas con electrodos en serie, se realizaron de forma análoga a lo expuesto en otras ocasiones, con la única diferencia de que los tiempos de estabilización y tiempos necesarios para alcanzar el estado estacionario estarán referidos a los dos electrodos de trabajo utilizados, y el electrodo más lento en las dos etapas será el limitante. A continuación, se añadió con una micropipeta el volumen apropiado de la disolución del analito en cuestión, registrándose la corriente hasta alcanzar el estado estacionario. Entre las diferentes señales no fue necesario hacer ningún tratamiento, ni físico ni químico al electrodo.

V.4.3.4. MEDIDAS POR INYECCIÓN EN FLUJO

Los electrodos enzimáticos se colocaron en la célula de flujo tipo “wall-jet” de gran volumen por donde circula la disolución portadora. A través de la válvula se inyectó la disolución de trabajo del analito en la corriente del portador y se registraron las señales amperométricas al valor del potencial deseado previamente impuesto. Una vez más, tanto el tiempo de estabilización, como el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario, son función de los dos electrodos utilizados, y dependerán del electrodo más lento en las dos etapas.

V.4.3.5. OBTENCIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS EN HPLC

Se hizo circular la fase móvil por el sistema cromatográfico, aumentando la velocidad de flujo de forma progresiva hasta obtener el valor de caudal previamente escogido. Se aplicó al electrodo de trabajo un potencial de 0.00 V, esperando el tiempo necesario hasta obtener una corriente fondo estable. Se inyectó entonces un volumen de 50 µl de la disolución de trabajo, registrándose el cromatograma correspondiente.

V.4.3.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

V.4.3.6.1. Preparación de las muestras

- Determinación de etanol y glucosa en vino de jerez mediante HPLC con detección amperométrica:

Al igual que para todas las bebidas alcohólicas que se han analizado con los biosensores amperométricos desarrollados en esta Memoria, bastó una dilución de 5 µl de la muestra en 5 ml de fase móvil para poder determinar simultáneamente etanol y glucosa con el electrodo compuesto trienzimático de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno.

- Determinación de etanol y glucosa en vino de jerez con electrodos bienzimáticos en paralelo :

Al igual que para la determinación cromatográfica, se realizó simplemente una dilución de 100 µl del jerez en 5 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ (pH 7.4) para la determinación en discontinuo, y de 5 µl en 5 ml de disolución portadora para el análisis por inyección en flujo.

- Determinación de ácido láctico y glucosa en vino tinto con electrodos bienzimáticos en paralelo :

Para el análisis simultáneo de ácido láctico y glucosa con los electrodos bienzimáticos de grafito - Teflón - LOD - HRP - ferroceno y grafito - Teflón - GOD - HRP-ferroceno trabajando en paralelo, se hicieron adiciones directas de la muestra sobre la célula de trabajo para la determinación en discontinuo. Para el análisis por inyección en flujo, se diluyeron 50 µl de vino tinto en 5 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l⁻¹ (pH 7.4), que era la disolución portadora.

V.4.3.6.2. Obtención de las señales amperométricas

V.4.3.6.2.1. Determinación de etanol y glucosa en vino de jerez

Como ya se ha comentado, la determinación de etanol y glucosa en el vino de jerez se realizó por un lado, mediante una separación cromatográfica empleando como detector un electrodo compósito de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno, y por otro utilizando una célula para electrodos en paralelo en la que se emplearon los electrodos bienzimáticos correspondientes a cada analito.

Para la determinación mediante HPLC, se inyectaron 50 μl de la disolución preparada según se indica el apartado V.4.3.6.1. Tras registrar el cromatograma, se calculó la concentración de etanol y glucosa por interpolación de las áreas de los picos en los calibrados correspondientes.

Empleando electrodos en paralelo, la determinación se realizó mediante adiciones estándar, por lo que, tras obtener la señal correspondiente a la adición de una alícuota de 50 μl de la disolución de la muestra (apartado V.4.3.6.1) con cada uno de los electrodos empleados para la determinación, se realizaron adiciones de alícuotas de 25 μl de etanol 0.1 mol l^{-1} y de glucosa 0.01 mol l^{-1} hasta obtener todas las señales deseadas. La determinación mediante análisis por inyección en flujo, se realizó empleando un calibrado externo, en el que se interpoló la señal obtenida tras la inyección de la muestra diluida tal y como se indicó en el apartado V.4.3.4.). La elección del modo realización de las determinaciones por adiciones estándar o por calibrado externo, se hizo buscando la mayor rapidez y comodidad en los análisis.

V.4.3.6.2.2. Determinación de ácido láctico y glucosa en vino tinto

La determinación de estos analitos también se realizó empleando varios electrodos en paralelo, esta vez de grafito-Teflón-LOD-HRP-ferroceno para determinar el ácido láctico y grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno para determinar glucosa. El análisis en discontinuo se llevó a cabo aplicando el método de adiciones estándar, para lo que se hizo inicialmente una adición de 25 μl de la muestra sin diluir a la célula de trabajo. Tras obtener las señales correspondientes a cada uno de los analitos en sus respectivos registros, se adicionaron alícuotas de 25 μl de los patrones de ácido láctico 0.01 mol l^{-1} y glucosa 0.01 mol l^{-1} hasta obtener las señales deseadas. En FIA, la determinación se realizó por adiciones estándar, para lo cual, tras la inyección de 50 μl de la muestra diluida como se indica en el apartado V.4.3.6.1. se inyectaron disoluciones con la misma concentración de muestra más concentraciones crecientes de ácido láctico (0.5×10^{-4} , 1.0×10^{-4} y 1.5×10^{-4} mol l^{-1}) y de glucosa (1.0×10^{-5} , 2.0×10^{-5} y 3.0×10^{-5} mol l^{-1}). En este caso se realizó la determinación mediante adiciones estándar en lugar de con un calibrado externo, debido a que se utilizó un electrodo desarrollado previamente en el grupo de investigación (Serra et al., 1999) y no se conocía el posible efecto matriz.

V.4.3.6.3. **Determinación de los analitos en las muestras mediante métodos de referencia.**

Ya que ya se ha demostrado a lo largo de toda esta Memoria que los electrodos bienzimáticos desarrollados proporcionaban medidas significativamente iguales a las obtenidas

con los métodos de referencia para todas las aplicaciones realizadas, en este capítulo se tomaron como referencia las medidas obtenidas los biosensores individuales para cada uno de los analitos, es decir : con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno para las medidas de glucosa, con el de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno para las medidas de alcoholes y con el de grafito-Teflón-LOD-HRP-ferroceno para las medidas de ácido láctico.

V.5. ELECTRODO TRIENZIMÁTICO DE GRAFITO-TEFLÓN-GLUCOSA OXIDASA-ALCOHOL OXIDASA-PEROXIDASA-FERROCENO

En capítulos precedentes de esta Memoria se construyeron y caracterizaron electrodos compósitos bienzimáticos en los que se coinmovilizaron las enzimas que se consideran en este electrodo trienzimático. En los estudios de interferencias respectivos, se demostró que el metanol y el etanol no afectaban a la respuesta del electrodo de grafito-Teflón-GOD-HRP-

ferroceno para glucosa, y que tampoco se producían interferencias por adiciones de glucosa sobre las señales obtenidas con el biosensor de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno. Así pues, se puede asegurar que la respuesta del biosensor compósito trienzimático para glucosa o para los alcoholes, corresponderá al peróxido de hidrógeno generado en la reacción de cada uno de esos analitos con la enzima correspondiente. Por ello, parece lógico concluir que la presencia de enzimas no involucradas en la cadena de reacciones que se produce tras la adición de un sustrato, no debe afectar a la estabilidad ni a las características analíticas de las otras reacciones enzimáticas implicadas, debiendo obtenerse comportamientos similares a los observados con cada uno de los electrodos bienzimáticos correspondientes. No obstante, con el fin de caracterizar este electrodo, se realizaron algunos estudios concretos referidos tanto a la estabilidad del electrodo como a sus características analíticas.

V.5.1. ESTABILIDAD DEL ELECTRODO TRIENZIMÁTICO

Cuando se estudiaron los biosensores para glucosa y alcoholes, quedó demostrada la buena repetibilidad de las señales amperométricas obtenidas a lo largo de una serie de medidas realizadas con la misma superficie electródica, así como la buena reproducibilidad de las medidas cuando la superficie del biosensor era regenerada mediante pulido. Por ello, se ha considerado innecesario realizar ahora este tipo de estudios con el electrodo trienzimático. Sin embargo, si se ha procedido a evaluar el tiempo operacional de este electrodo compósito, ya que no es el mismo para el biosensor de glucosa y de alcoholes.

Los electrodos de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno proporcionaron, para los mismos niveles de concentración, valores de intensidad de corriente similares a los que a los que se obtuvieron con cada uno de los electrodos bienzimáticos correspondientes, manteniéndose dichos valores constantes a lo largo de toda la jornada de trabajo. Por lo que se refiere a la estabilidad del electrodo trienzimático durante diferentes días, se evaluó mediante la medida de cada uno de los sustratos de forma individual. Se comprobó que el comportamiento era totalmente similar al observado para los biosensores bienzimáticos de glucosa y de alcohol por separado. Por lo tanto, el tiempo de vida útil del electrodo trienzimático estuvo condicionado por la estabilidad de la enzima alcohol oxidasa, de forma que el biosensor fue operativo durante aproximadamente 15 días. Así mismo, fue necesario pulir la superficie del electrodo diariamente antes de su utilización durante una jornada de trabajo si se desea utilizar para la determinación de alcoholes.

V.5.2. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

En las mismas condiciones operacionales elegidas para los electrodos bienzimáticos, se construyeron curvas de calibrado con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno, para glucosa y etanol (Figura 134) en el intervalo de concentración 3.0×10^{-5} - 5.0×10^{-3} mol l⁻¹ y 2.0×10^{-5} - 5.0×10^{-3} mol l⁻¹, respectivamente.

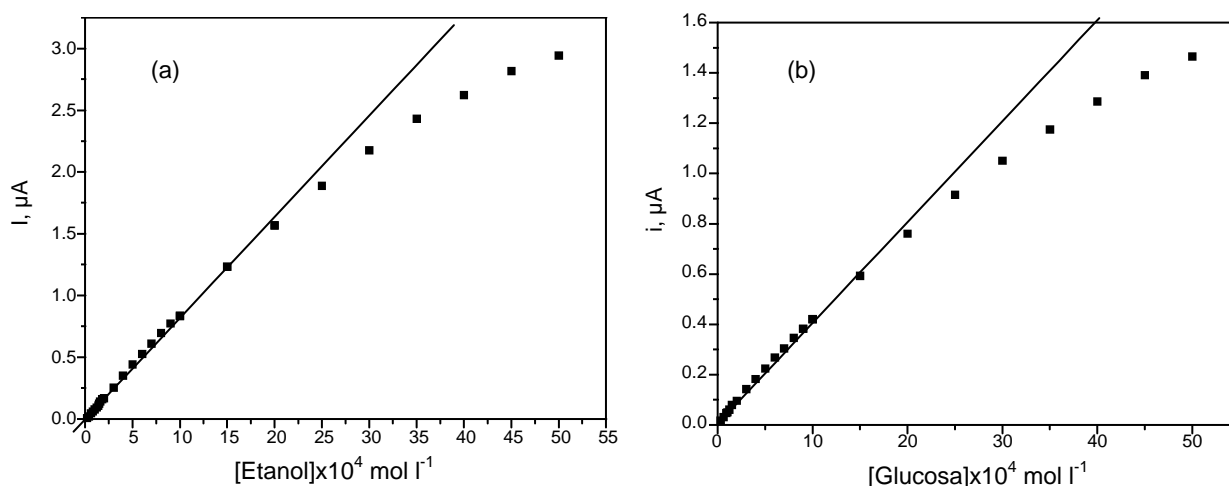


Figura 134. Curvas de calibrado para etanol (a) y glucosa (b) obtenidas con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno en disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

La estimación del intervalo lineal de estos calibrados se realizó mediante regresión por mínimos cuadrados, considerando que no existía desviación de la linealidad cuando el coeficiente de correlación obtenido era mayor o igual a 0.998.

En la Tabla 59 se recogen las características analíticas de dichos calibrados para cada uno de los sustratos, comparándose con los valores obtenidos con cada uno de los electrodos bienzimáticos correspondientes.

Como se puede observar, las características de los calibrados obtenidos con el biosensor trienzimático son muy similares a las que se obtuvieron con los biosensores bienzimáticos correspondientes por separado, lo que permite inferir que las características analíticas para la determinación de ambos sustratos serán también similares.

Tabla 59. Características de los calibrados para glucosa y etanol obtenidos con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno (trienzimático) y con los electrodos bienzimáticos de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno (GOD-HRP) y de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno (AOD-HRP).

Sustrato	Electrodo	Intervalo de linealidad, mol l^{-1}	Pendiente, $\mu\text{A} / \text{mol l}^{-1}$	Ordenada en el origen, μA	r
Glucosa	Trienzimático	$(0.1-9)\times 10^{-4}$	$(6.01 \pm 0.05)\times 10^2$	$(1 \pm 4)\times 10^{-3}$	0.9986
	GOD-HRP	$(0.1-8)\times 10^{-4}$	$(6.10 \pm 0.02)\times 10^2$	$(0.3 \pm 0.9)\times 10^{-3}$	0.9990
Etanol	Trienzimático	$(0.2-20)\times 10^{-4}$	$(6.1 \pm 0.1)\times 10^2$	$(11 \pm 7)\times 10^{-3}$	0.9984
	AOD-HRP	$(0.2-20)\times 10^{-4}$	$(5.51 \pm 0.03)\times 10^2$	$(9 \pm 1)\times 10^{-3}$	0.9997

V.5.3. DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA EN HPLC

Una vez caracterizado el biosensor trienzimático como sensor “monoanalito” en discontinuo, se procedió a evaluar su comportamiento como detector amperométrico en un sistema de HPLC, con vistas a su aplicación en muestras reales en las que estén presentes glucosa, etanol y metanol. La metodología seguida se expuso en el apartado V.4.3.5., empleándose una columna de fase reversa Hypersil^R (5 μm , 125x4 mm), una disolución reguladora de fosfato 0.01 mol L⁻¹ a pH 7.4 como fase móvil, un volumen de inyección de 50 μL y un potencial de detección de 0.00 V.

V.5.3.1. EFECTO DEL CAUDAL

Para la optimización de este parámetro, se registraron los cromatogramas para inyecciones de 50 μL de una disolución que contenía 1.0x10⁻³ mol l⁻¹ de glucosa, 5.0x10⁻⁴ mol l⁻¹ de metanol y 5.0x10⁻³ mol l⁻¹ de etanol a diferentes caudales. En la Tabla 60 se recogen los parámetros cromatográficos obtenidos en cada caso. Entre ellos, se ha incluido la relación entre la altura del valle (h_v) y la altura del pico más pequeño (h_2), ya que a partir de esta relación es posible evaluar el error cometido en la medida del área del pico menor (ϵ_r %) (Sewell y Clarke).

Como se deduce de los resultados obtenidos, los picos de metanol y etanol estaban resueltos a un caudal de 1.0 ml min⁻¹ (como ya se demostró en el apartado V.4.5.8.). Sin embargo, para glucosa y metanol, no se obtuvieron valores de R_s superiores a 1.5 (es decir, solo se resolvieron en un 98 %) para ninguno de los caudales estudiados. Así pues, el criterio que se tomó para elegir el caudal de trabajo fue el error cometido en la medida del área del pico menor (ϵ_r %). Para un caudal de 0.5 ml min⁻¹ se obtuvo una relación $h_v/h_2=0.40$, lo que corresponde a un $\epsilon_r \%= -2$. Este valor puede considerarse como aceptable para la posterior aplicación del biosensor trienzimático como detector de HPLC, ya que aunque $\epsilon_r \%= -1$ con un caudal de 0.2 ml min⁻¹, este valor alargaría el tiempo de análisis mucho más de lo deseable, por lo que se eligió un caudal de **0.5 ml min⁻¹** para estudios posteriores.

Tabla 67. Tiempo de retención (t_R), anchura de pico a media altura ($W_{1/2}$), resolución de los picos a media altura (R_s , 1 vs 2 = glucosa y metanol ; y 2 vs 3= metanol y etanol) y relación entre la altura del valle y la del pico más pequeño (h_v/h_2) para un volumen de inyección de 50 μL de glucosa 1.0x10⁻³ mol l⁻¹, metanol 0.5x10⁻³ mol l⁻¹ y etanol 5.0x10⁻³ mol l⁻¹ a diferentes caudales. Fase móvil : disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l⁻¹, pH 7.4. $E_{ap}= 0.00$ V.

Caudal, ml min ⁻¹	t_R , min			$W_{1/2}$, min			R_s		h_v/h_2
	Glucosa	MeOH	EtOH	Glucosa	MeOH	EtOH	1 vs 2	2 vs 3	

1.0	1.2	1.5	2.3	0.14	0.18	0.46	0.87	1.54	0.75
0.9	1.3	1.6	2.6	0.18	0.21	0.46	0.83	1.59	0.68
0.8	1.5	1.9	2.9	0.21	0.21	0.49	1.11	1.58	0.65
0.7	1.7	2.1	3.3	0.21	0.21	0.49	1.03	1.95	0.60
0.6	2.0	2.4	3.8	0.24	0.28	0.56	0.96	1.86	0.50
0.5	2.3	2.8	4.5	0.28	0.28	0.56	1.02	2.22	0.40
0.4	3.0	3.6	5.6	0.35	0.35	0.70	1.03	2.18	0.35
0.3	3.9	4.8	7.4	0.42	0.49	0.84	1.11	2.26	0.28
0.2	5.8	7.2	11.0	0.56	0.70	1.26	1.24	2.25	0.24
0.1	9.0	11.9	19.5	1.40	1.68	2.03	1.06	2.33	0.21

V.5.3.2. REPETIBILIDAD DE LAS MEDIDAS

Una vez elegidas las condiciones de medida para la detección de glucosa, metanol y etanol se procedió a evaluar la repetibilidad de los tiempos de retención y de las áreas y alturas de pico realizando inyecciones sucesivas de 50 μL de una disolución de glucosa $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ y etanol $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. En la Figura 135 se muestran los cromatogramas obtenidos.

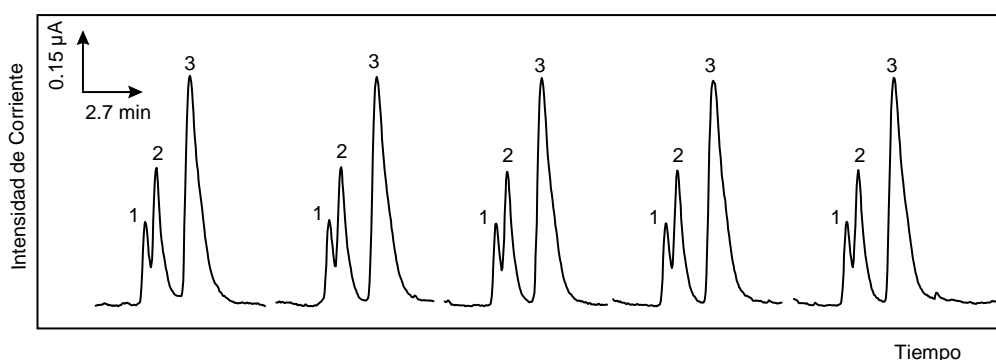


Figura 135 . Cromatogramas obtenidos para 5 inyecciones sucesivas de 50 μl de una disolución de glucosa $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (1), metanol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (2) y etanol $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (3), en disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} de pH 7.4. Caudal= 0.5 ml min^{-1} , $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

En la Tabla 61 se recogen los valores medios de los tiempos de retención (t_R), alturas de pico (i_p) y áreas de pico (A_p) para las 5 inyecciones realizadas con sus correspondientes intervalos de confianza para un nivel de probabilidad del 95%, así como los valores de la desviación estándar relativa obtenidos.

Tabla 61 . Tiempos de retención (t_r), factores de capacidad (k'), alturas de pico (i_p) y áreas de pico (A_p) obtenidos para 5 inyecciones sucesivas de 50 μl de una disolución de glucosa $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ de metanol $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y etanol $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} . Caudal= 0.5 ml min^{-1} , $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

Compuesto	t_R , min	k'	i_p , μA	RSD (%)	A_p , $\mu A s^{-1}$	RSD (%)
Glucosa	2.38 ± 0.05	0.0	0.143 ± 0.001	1.0	214 ± 3	1.1
Metanol	2.9	0.22	0.237 ± 0.03	1.3	501 ± 16	2.6
Etanol	4.5	0.89	0.496 ± 0.005	0.8	1903 ± 88	3.8

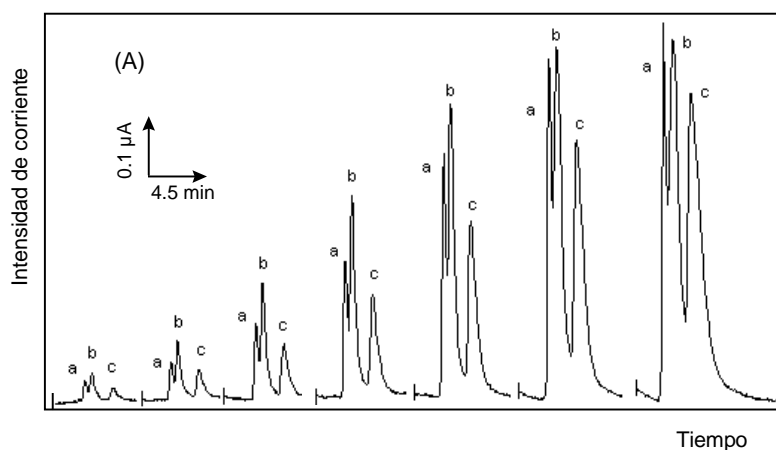
Como se puede observar, se obtuvieron valores repetibles de los tres parámetros con el electrodo compuesto de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno para inyecciones sucesivas, lo que confirmó de nuevo la buena inmovilización de las enzimas y la estabilidad del biosensor en condiciones hidrodinámicas.

V.5.3.3. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

En la figura 136 (A) se muestran los cromatogramas obtenidos para diferentes concentraciones de los tres sustratos, y en la 136 (B) las correspondientes curvas de calibrado. En la Tabla 62 se recogen las características de dichos calibrados para glucosa, metanol y etanol, estando los intervalos de confianza calculados para un nivel de significación de 0.05. Como viene siendo habitual, los intervalos lineales de las representaciones del área de pico frente a la concentración del analito se tomaron cuando el coeficiente de correlación era mayor o igual a 0.998.

Si se comparan estas características para metanol y etanol (0.5 ml min^{-1}), con las que se obtuvieron con el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno (1.0 ml min^{-1}) (apartado IV.4.5.8.2., se observa como los intervalos de linealidad son muy similares. Sin embargo las pendientes son ahora mayores debido a la utilización de caudales menores.

Este comportamiento, disminución de la altura y área de pico a medida que aumenta el caudal, es el habitual cuando se emplean biosensores como sistemas de detección en flujo, como ya se ha comentado a lo largo de esta Memoria.



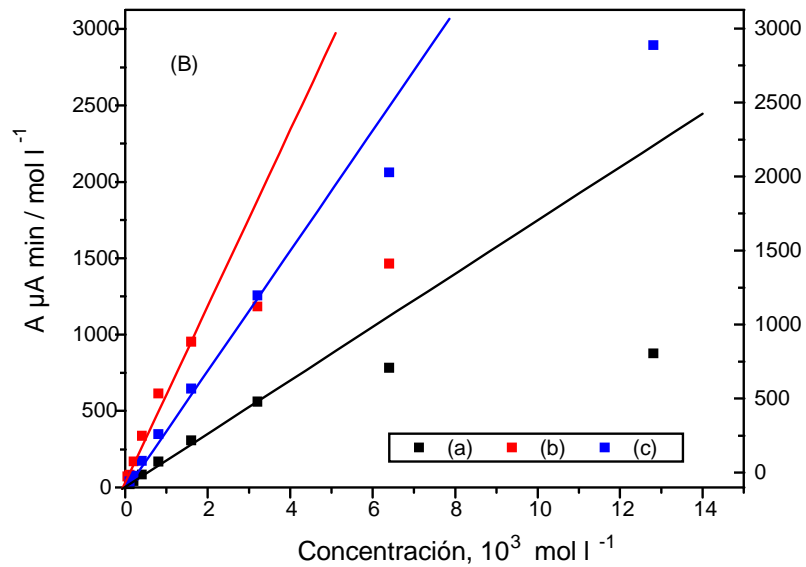


Figura 136. Cromatogramas (A) y curvas de calibrado (B) para glucosa (a) metanol (b) y etanol (c) obtenidos con el electrodo compósito de grafito-teflón-GOD-AOD-HRP-Ferroceno acoplado a una columna de fase reversa y empleando disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4) como fase móvil. Caudal : 0.5 ml min^{-1} , $E_{ap}=0.00 \text{ V}$. En el cromatograma las flechas indican el tiempo de inyección.

Tabla 62. Características de los calibrados para glucosa, metanol y etanol obtenidos con el biosensor amperométrico de grafito-teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno en HPLC con detección amperométrica. Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la figura 136.

Analito	Intervalo lineal, mol l^{-1}	Ordenada en el origen, μA	Pendiente, $\mu\text{A min/mol l}^{-1}$	r
Glucosa	$(1.0-32) \times 10^{-4}$	16 ± 7	$(174 \pm 5) \times 10^3$	0.9984
Metanol	$(0.5-8.0) \times 10^{-4}$	25 ± 10	$(746 \pm 25) \times 10^3$	0.9984
Etanol	$(1.0-32) \times 10^{-4}$	12 ± 10	$(392 \pm 6) \times 10^3$	0.9995

En la Tabla 63 se recogen los límites de detección, determinación y valores de la desviación estándar relativa calculados a partir de las medidas correspondientes a diez inyecciones de cada uno de los analitos a los niveles de concentración que se indican en la tabla. Los criterios para establecer los límites de detección y de determinación son los mismos empleados en apartados anteriores.

Tabla 63. Límites de detección, determinación y valores de RSD obtenidos para la determinación de glucosa, metanol y etanol con el electrodo compósito de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno mediante HPLC con detección amperométrica. Condiciones experimentales similares a las de la figura 136.

Analito	Nivel concentración, mol l ⁻¹	Límite determinación, mol l ⁻¹	Límite detección, mol l ⁻¹	RSD, %
Glucosa	1.0 x10 ⁻⁴	1.4 x10 ⁻⁴	4.0 x10 ⁻⁵	8.2
Metanol	0.5 x10 ⁻⁴	1.4 x10 ⁻⁴	4.0 x10 ⁻⁵	7.3
Etanol	1.0 x10 ⁻⁴	1.6 x10 ⁻⁴	5.0 x10 ⁻⁵	9.1

Los niveles de concentración detectables son suficientes para la determinación de estos compuestos en muestras reales. Si se comparan los límites de detección y determinación obtenidos con un caudal de 0.5 ml min⁻¹ con el biosensor trienzimático, con los que se obtuvieron con el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno para un caudal de 1.0 ml min⁻¹, se observa que son similares para metanol. Aunque el aumento de sensibilidad con caudales menores podría hacer pensar que se obtendría un límite de detección menor, éste es incluso más alto, debido al ligero solapamiento con el pico de la glucosa. Por el contrario, en el caso del etanol, el límite de detección obtenido resultó ser más bajo para un caudal de 0.5 ml min⁻¹ que a 1.0 ml min⁻¹, como cabía esperar dada la buena resolución de los picos. Estos resultados demuestran que el biosensor trienzimático es adecuado para la determinación multianalito cuando se utiliza como detector amperométrico en un sistema de HPLC.

V.5.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Uno de los principales problemas que tiene la utilización de biosensores multianalito en el análisis de muestras reales, es que los niveles de concentración de los analitos no coinciden para que la determinación pueda realizarse a partir de una única alícuota de disolución de la muestra. Para demostrar la aplicabilidad del electrodo compuesto trienzimático como detector multianalito en HPLC, se analizaron muestras de vino blanco, vino tinto y vino blanco semidulce.

V.5.4.1. DETERMINACIÓN DE METANOL Y GLUCOSA EN VINOS

Dado que la concentración de etanol en vinos es obviamente mucho mayor que la de glucosa y metanol, no es posible encontrar la dilución adecuada de la muestra para conseguir que las concentraciones en la disolución analítica se encontraran dentro del intervalo de linealidad correspondiente para cada uno de los tres analitos. Por ello, se optó por llevar a cabo la determinación simultánea de glucosa y metanol en vinos tinto y blanco. Puesto que los contenidos en glucosa y metanol son diferentes para cada muestra, se realizaron las diluciones necesarias para que tanto la glucosa como el metanol estuvieran dentro del intervalo lineal de sus calibrados correspondientes. Así, se diluyeron 1.25 ml de vino blanco y 0.75 ml de vino tinto hasta 5.0 ml con fase móvil. En la figura 137 se muestran los cromatogramas que se obtuvieron para una de las muestras de vino blanco (a) y de vino tinto (b) siguiendo la metodología descrita en el apartado V.4.3.6.

Como era previsible, se obtuvieron picos muy grandes para etanol, que no pudieron ser cuantificados debido a que su área estaba fuera del intervalo lineal del calibrado. Para la muestra de vino blanco, dicho pico apareció cortado debido a que la intensidad de corriente obtenida era demasiado alta para la sensibilidad a la que se estaba trabajando, la cual por otra parte era la necesaria para poder medir bien los picos de glucosa y metanol.

En la Tabla 64 se recogen los resultados obtenidos empleando el electrodo compuesto trienzimático como detector en HPLC para la determinación de glucosa y metanol en las cuatro muestras analizadas. Además, con fines de comparación se recogen también los resultados que se obtuvieron con el electrodo bienzimático de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno en discontinuo para glucosa, y con el método de referencia basado en el ácido cromotrópico para metanol.

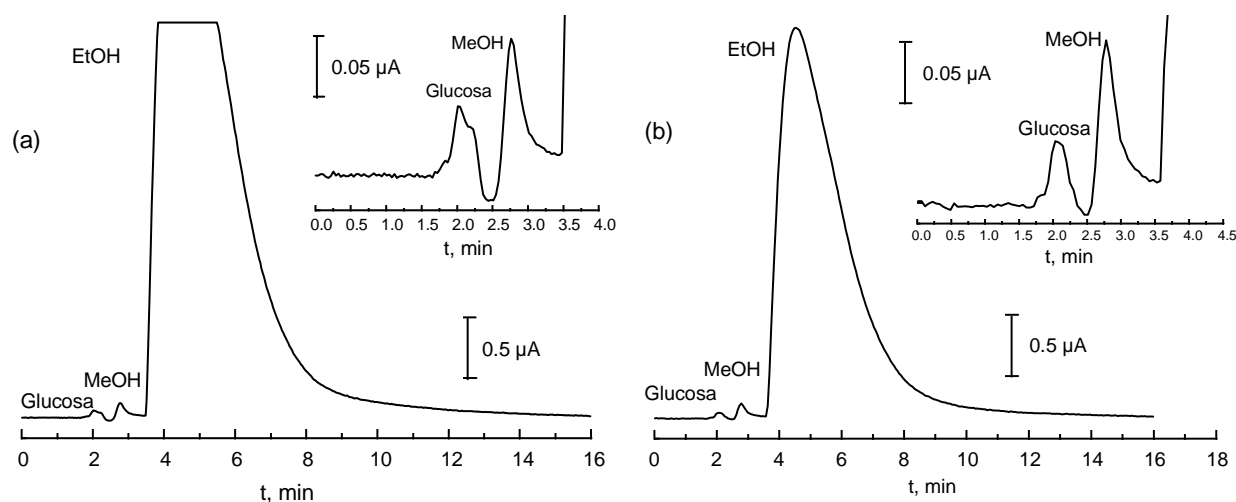


Figura 137. Cromatogramas correspondientes a la inyección de 50 μl de disolución de vino blanco (a) y vino tinto (b) empleando como detector el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno mediante HPLC con detección amperométrica. Fase móvil: Disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} (pH 7.4); Caudal=0.5 ml min^{-1} ; E_{ap} =0.00 V.

Tabla 64. Contenidos de glucosa y metanol en vinos, obtenidos empleando el electrodo compuesto de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno como detector en HPLC.

Muestra	Analito	Método propuesto	Método de referencia
Vino blanco	Glucosa, g/l	0.46 \pm 0.08	0.08 \pm 0.02
	MeOH, g/l	0.07 \pm 0.03	0.07 \pm 0.02
Vino tinto	Glucosa, g/l	0.54 \pm 0.08	0.14 \pm 0.03
	MeOH, g/l	0.16 \pm 0.04	0.15 \pm 0.06

Los resultados obtenidos para metanol en los dos tipos de vino por ambos métodos se compararon empleando el criterio estadístico de la t de Student. Los valores de t_{exp} (0.0 para el vino blanco y 0.02 para el vino tinto) fueron menores que la t tabulada (2.13), lo que indicaba que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los dos métodos, pudiéndose asegurar, por tanto, la ausencia de errores determinados a un nivel de probabilidad del 95%.

Sin embargo, las concentraciones encontradas de glucosa son mucho mayores que las obtenidas con el electrodo compuesto de glucosa oxidasa. Estos resultados anómalos son debidos a que la glucosa se eluye prácticamente con el frente de fase móvil ($k'=0$), es decir, no se retiene y aparece junto con el pico de inyección, que es relativamente grande debido a la pequeña dilución de la muestra realizada para poder detectar la baja concentración de glucosa. Esto provoca que se obtuvieran concentraciones de glucosa bastante por encima de la

concentración real. Estos resultados indican que no es posible la determinación simultánea de glucosa y metanol en los vinos utilizando el biosensor trienzimático. Este problema pudo solventarse, empleando un “array” o batería de biosensores como se verá en el apartado V.6.

V.5.4.2. DETERMINACIÓN DE ETANOL Y GLUCOSA EN VINO DE JEREZ.

Con el fin de demostrar la validez del electrodo compuesto multienzimático como detector en HPLC para la determinación simultánea de etanol y glucosa, se eligió como muestra vino de jerez, que se caracteriza por su elevado contenido alcohólico y por su alta proporción en azúcar (Belitz y Grosch, 1992). Esto hace posible que, con una adecuada dilución, tanto la concentración de etanol como la de glucosa quedasen dentro de los intervalos de linealidad de sus calibrados respectivos. No fue posible llevar a cabo la determinación de metanol en esta muestra, dado que el contenido de este alcohol queda por debajo del límite de detección del método. Debido a esto, y con objeto de disminuir el tiempo de análisis, se decidió emplear un caudal de 1.0 ml min^{-1} , al cual los picos de glucosa y etanol están bien resueltos. Por lo tanto, en primer lugar se establecieron las características analíticas de dichas determinaciones con un caudal de 1.0 ml min^{-1} .

Las curvas de calibrado para glucosa en el intervalo de concentraciones 1.0×10^{-4} - $25.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, y para etanol, en el intervalo 2.0×10^{-4} - $25 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ se muestran en la figura 138, recogiéndose sus características en la Tabla 65.

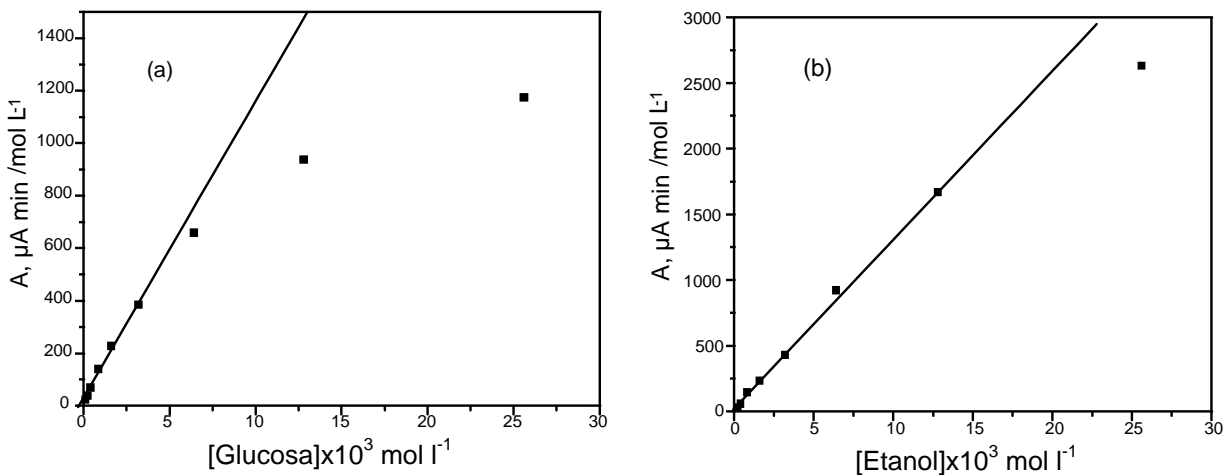


Figura 138. Curvas de calibrado para glucosa (a) y etanol (b) mediante HPLC con detección amperométrica sobre un electrodo de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno utilizando como fase móvil disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l^{-1} , pH 7.4 ; caudal= 1.0 ml min^{-1} . $E_{ap}=0.0 \text{ V}$

Tabla 65. Características de los calibrados para glucosa, y etanol obtenidos con el biosensor amperométrico de grafito-teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno mediante HPLC con detección amperoétrica. El resto de condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la figura 138.

Analito	Intervalo lineal, mol l ⁻¹	Ordenada en el origen, µA	Pendiente, µA min/mol l ⁻¹	r
Glucosa	(1.0-32) x10 ⁻⁴	24± 9	(117 ± 6)x10 ³	0.9985
Etanol	(2.0-128) x10 ⁻⁴	25 ± 17	(131 ± 3)x10 ³	0.9987

Si se comparan las características del calibrado para etanol con las que se obtuvieron con el biosensor bienzimático a 1.0 ml min⁻¹ (I.L.= (4.0-32)x10⁻⁴ mol l⁻¹, pte.= (92 ± 3)x10³ µA min/mol l⁻¹ se observa que, si bien la pendiente no difiere demasiado, el intervalo lineal se amplía bastante. Esto es debido a que el calibrado con el biosensor de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno se construyó inyectando disoluciones que contenían metanol y etanol de forma que, al ir aumentando las concentraciones, empeoraba la resolución de los picos. En este caso, los picos cromatográficos para glucosa y etanol están perfectamente resueltos, por lo que se pueden alcanzar intervalos de linealidad más amplios. Por otro lado, si se comparan las características de los calibrados para glucosa y etanol con las que se obtuvieron con el mismo electrodo con un caudal de 0.5 ml min⁻¹ (apartado V.5.3.3.), se observa una vez más que las pendientes eran mayores para el caudal más bajo.

En la Tabla 66 se recogen los valores de los límites de detección, determinación y desviación estándar relativa calculados a partir de las medidas correspondientes a diez inyecciones de cada uno de los analitos a los niveles de concentración indicados en la Tabla. Como criterio para establecer el límite de detección se ha utilizado el mismo que en los apartados anteriores.

Tabla 66. Límites de detección, determinación y valores de RSD obtenidos para la determinación de glucosa y etanol con el electrodo compuesto de grafito-teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno mediante HPLC con detección amperométrica. Resto de condiciones experimentales similares a las de la figura 138.

Alcohol	Nivel concentración, mol l ⁻¹	Límite determinación, mol l ⁻¹	Límite detección, mol l ⁻¹	RSD, %
Glucosa	1.0 x10 ⁻⁴	2.4 x10 ⁻⁴	0.7 x10 ⁻⁴	9.8
Etanol	2.0 x10 ⁻⁴	2.3 x10 ⁻⁴	0.7 x10 ⁻⁴	8.9

Si se comparan los límites de detección y determinación con los que se obtuvieron para un caudal de 0.5 ml min⁻¹, se observa de nuevo que, son algo mayores para 1 ml min⁻¹, como se podía predecir a partir de la disminución de las pendientes al aumentar al caudal. En cuanto al etanol, los límites de detección y determinación son muy similares a los que se obtuvieron con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno para el mismo caudal.

Una vez establecidas las características analíticas en las condiciones experimentales, se procedió a determinar el contenido en glucosa y etanol en vino de jerez dulce (15°). Para ello se inyectaron 50 µl de una disolución preparada a partir de la dilución de 5 µl de jerez en 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l⁻¹ de pH 7.4. En la figura 139 se muestra el cromatograma correspondiente dándose los valores de glucosa y etanol obtenidos en la Tabla 67. Hay que comentar que en estudios preliminares de inyección de la muestra con esa misma dilución, no se observó pico de inyección medible cuando se emplea el electrodo de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno, por lo tanto, el área de la medida del pico correspondiente a la glucosa obtenido con el electrodo de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-Ferroceno corresponde solo al contenido de glucosa en la muestra.

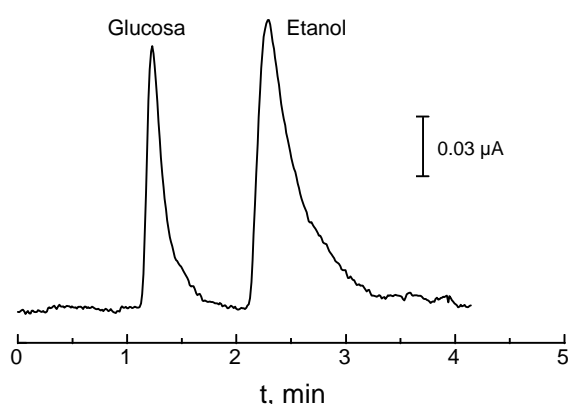


Figura 139. Cromatograma correspondiente a la inyección de 50 µl de la disolución de vino de jerez dulce empleando como detector el biosensor amperométrico de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno. Fase móvil: Disolución reguladora de fosfato 0.01 mol l⁻¹ de pH 7.4; Caudal=1.0 ml min⁻¹; E_{ap}=0.00 V.

Los métodos de referencia empleados para evaluar la exactitud de los resultados obtenidos fueron los desarrollados en esta Memoria para la determinación individual de glucosa y etanol, es decir, los basados en el empleo del biosensor de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno para la determinación de glucosa y del biosensor de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno para la de etanol. En ambos casos se realizaron las medidas en discontinuo y se calculó la concentración del analito aplicando el método de adiciones estándar. Los resultados obtenidos por estos métodos se incluyen también en la Tabla 67.

Tabla 67. Contenidos de glucosa y etanol en vino de jerez dulce obtenidos mediante HPLC con detección amperométrica con un electrodo de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno.

	Método propuesto	Método de referencia	Valor real
Glucosa, g/l	85 ± 3	88 ± 5	Desconocido
EtOH, g/l	120 ± 8	120 ± 8	120

Como siempre, se empleó el criterio de la *t* de Student para evaluar la existencia o no de diferencias significativas entre los resultados proporcionados por ambos métodos. El valor de *t* experimental para glucosa fue de 0.54, y para etanol 1.23. Puesto que la *t* de Student tabulada es de 2.57 para ambos casos, se pudo concluir que no existían diferencias significativas entre ambos métodos. Estos resultados demuestran la aplicabilidad del biosensor de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno como detector en un sistema de HPLC. Sin embargo, el análisis simultáneo de varios analitos en una misma muestra implica que, con la adecuada dilución, los niveles de concentración de dichos analitos puedan estar dentro de los intervalos de linealidad de sus correspondientes calibrados.

V.6. DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ANALITOS MEDIANTE EL EMPLEO DE ELECTRODOS COMPÓSITOS BIENZIMÁTICOS EN PARALELO

Como ya se ha comentado en la Introducción a este capítulo, el empleo de arrays o baterías de sensores para el análisis multicomponente en diferentes tipos de muestras es un área en expansión dentro de la Química Analítica moderna. En este contexto, se utilizaron diferentes biosensores electroquímicos compósitos en paralelo sumergidos en la misma célula de trabajo, empleando un único electrodo de referencia y un único electrodo auxiliar, tanto en discontinuo como en flujo. Para ello, se diseñaron las correspondientes células electroquímicas, descritas en el apartado V.4.1.2., para su utilización con dos o tres biosensores electroquímicos. Puede decirse que las células diseñadas constituyen un array de sensores de primer orden. Las muestras que se analizaron fueron vino de jerez y vino tinto, y los analitos que se determinaron fueron glucosa y etanol para la primera muestra y glucosa y ácido láctico para la segunda.

V.6.1. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y ETANOL EN VINO DE JEREZ

Tanto la muestra como los analitos se eligieron para demostrar la validez de este tipo de arrays de electrodos como una alternativa al empleo de columnas cromatográficas. La determinación de glucosa y etanol se realizó empleando como detectores amperométricos los electrodos de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno y de grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno tanto en discontinuo como en flujo siguiendo la metodología descrita en el apartado V.4.3.6.1.

Para las medidas mediante amperometría en discontinuo los biosensores de glucosa y de etanol se introdujeron en la célula electroquímica conteniendo una disolución de regulador fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 con agitación constante. La determinación de los analitos se realizó aplicando el método de adiciones estándar. Así, una vez efectuada la adición de la alícuota de la disolución de la muestra (apartado IV.4.3.6.2.1.) se hicieron 3 adiciones de $25 \mu\text{l}$ de disolución patrón de glucosa 0.1 mol l^{-1} y de disolución de etanol 0.1 mol l^{-1} (Figura 140).

Por lo que respecta a la determinación de los analitos mediante inyección en flujo, se llevó a cabo empleando el método del calibrado externo, siendo necesario realizar una división del flujo para que la muestra alcanzara los dos electrodos. En la figura 141 se muestran algunos de los diagramas obtenidos para tres adiciones sucesivas de disoluciones patrón de etanol y glucosa y, a continuación, tres inyecciones sucesivas de la disolución de vino de jerez.

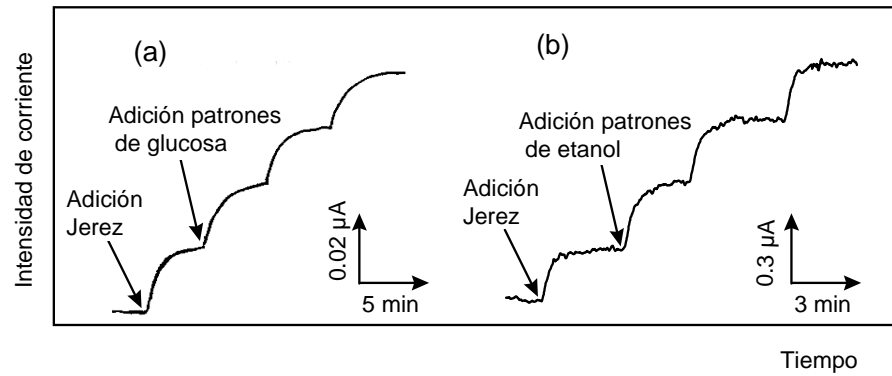


Figura 140. Determinación simultánea de glucosa (a) y etanol (b) en vino de jerez dulce con los biosensores de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno y grafito-Teflón-AOD-HRP-ferroceno. Disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} de pH 7.4 empleando la célula array. $E_{ap}=0.00 \text{ V}$

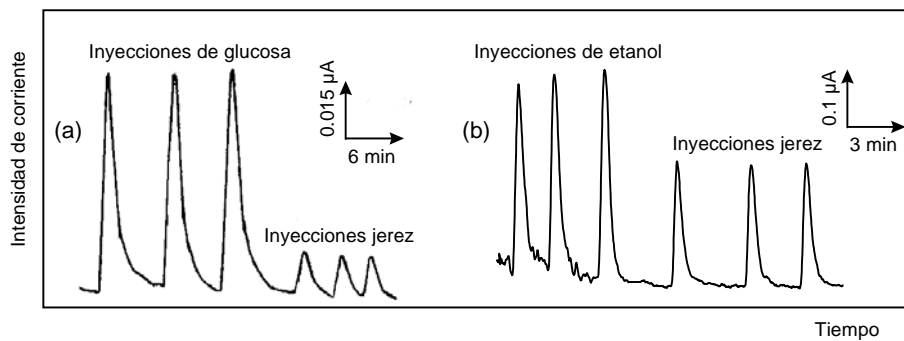


Figura 141. Diagramas correspondientes a la determinación simultánea con el biosensor de glucosa (a) y con el biosensor de etanol (b), tras las inyecciones de $100 \mu\text{L}$ de una disolución patrón de glucosa $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, de una disolución patrón de etanol $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, y de una disolución de vino de jerez dulce preparada diluyendo $5 \mu\text{l}$ del vino en 5.0 ml de disolución reguladora de fosfato 0.05 mol L^{-1} (pH 7.4). $E_{ap}=0.00 \text{ V}$. Caudal= 1.0 mL/min .

En la Tabla 68 se recogen los resultados obtenidos tanto en discontinuo como mediante inyección en flujo. Así mismo, con fines comparativos se muestran los valores para ambos analitos que se obtuvieron mediante HPLC empleando el biosensor trienzimático como detector. Aplicando el criterio de la *t* de Student, se observó que los valores experimentales de *t* fueron en todos los casos menores que la *t* tabulada (2.306), lo que indicó que no había diferencias significativas entre los tres métodos. Por lo tanto, se puede concluir que los métodos desarrollados son válidos para la determinación simultánea de glucosa y etanol en vinos de Jerez.

Tabla 68. Contenidos de glucosa y de etanol en vino de jerez dulce obtenidos de forma simultánea mediante el empleo de electrodos compósitos bienzimáticos en paralelo y mediante HPLC con detección amperométrica sobre un electrodo trienzimático.

	Discontinuo	t_{exp}	FIA	t_{exp}	HPLC
Glucosa, g/l	88 ± 5	1.15	87 ± 5	0.77	85 ± 3
EtOH, g/l	120 ± 8	0.0	121 ± 9	0.1	120 ± 8

V.6.2. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y GLUCOSA EN VINOS.

Ya que la matriz de grafito-Teflón presenta excelentes características para la fabricación de biosensores multienzimáticos, se pensó en la posibilidad de incorporar una cuarta enzima al biosensor de grafito-Teflón-GOD-AOD-HRP-ferroceno, la lactato oxidasa (LOD), para su aplicación al análisis de vinos. Para ello se construyó un electrodo compuesto de grafito-Teflón-LOD-GOD-AOD-HRP-Ferroceno, con el que comprobó de nuevo la posibilidad de utilizar este biosensor como electrodo "monoanalito", presentando características similares a las de los electrodos bienzimáticos construidos con cada una de las oxidasas que componen el biosensor multienzimático. Sin embargo, cuando se utilizó como detector en el sistema cromatográfico empleado en los apartados IV.4.5.8. y V.5.3., se comprobó que era imposible separar los picos obtenidos para glucosa y ácido láctico con la columna Hypersil^R 5 μm , 125x4 mm.

Además de las aplicaciones de la célula array que se han descrito en el apartado anterior, este diseño de célula es muy útil para este tipo de casos en los que resulta imposible la separación de los analitos en una determinada columna cromatográfica. Así pues, se procedió a la detección simultánea de glucosa y ácido láctico en vinos empleando la célula de multidetección. Para ello, se empleó el biosensor de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno para la determinación de glucosa, y un electrodo compuesto de grafito-Teflón-LOD-HRP-ferroceno que ya se había desarrollado con anterioridad en nuestro grupo de investigación (Serra et al., 1999), para la determinación de ácido láctico.

En las figuras 142 y 143 se muestran los amperogramas en disolución agitada y los diagramas obtenidos para glucosa (a) y para ácido láctico (b). En ambos casos se utilizó el método de adiciones estándar y el potencial aplicado fue de 0.00 V. El caudal empleado para las medidas en continuo fue de 1.0 ml min⁻¹. En la metodología en discontinuo, la muestra de vino tinto se añadió sin diluir, mientras que en FIA se inyectó una disolución de 50 μl de vino tinto diluida en la disolución portadora. Los valores de glucosa y ácido láctico obtenidos en vino tinto se muestran en la Tabla 69, comparándose con los obtenidos con los biosensores bienzimáticos de grafito-Teflón específicos de cada sustrato, es decir, glucosa oxidasa para la glucosa, y lactato oxidasa para el ácido láctico.

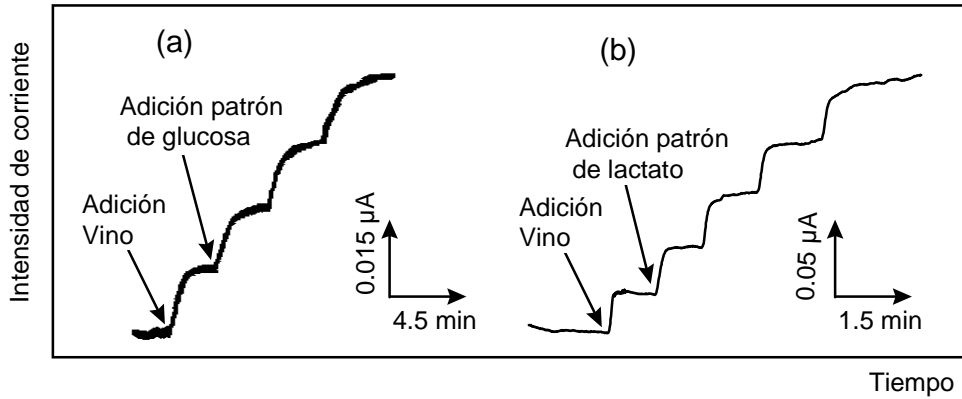


Figura 142. Determinación simultánea de glucosa (a) y ácido láctico (b) tras la adición de 25 μl de vino tinto y posteriores adiciones de los patrones correspondientes a la disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4) empleando la célula array. $E_{ap}= 0.00 \text{ V}$.

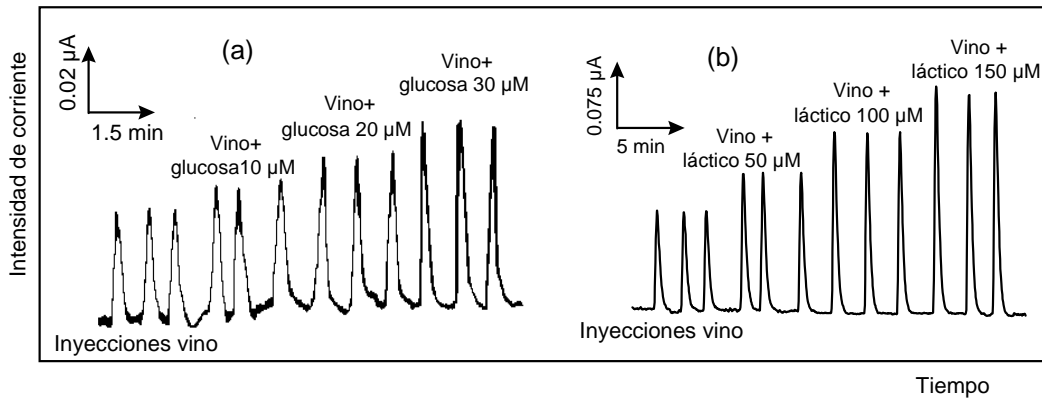


Figura 143. Diagramas correspondientes a la determinación simultánea de glucosa (a) y ácido láctico (b) tras las inyecciones de 50 μl de una disolución de vino tinto y posteriores adiciones estándar de los patrones correspondientes empleando la célula array. Disolución portadora: disolución reguladora de fosfato 0.05 mol l^{-1} (pH 7.4). $E_{ap}= 0.00 \text{ V}$. Caudal= 1.0 ml min^{-1} .

Tabla 69. Contenidos de glucosa y de ácido láctico en vino tinto obtenidos utilizando una célula array y el método de referencia ($n=3$)

	Discontinuo	t_{exp}	FIA	t_{exp}	Referencia
Glucosa, g/l	0.13 ± 0.06	0.26	0.12 ± 0.05	0.59	0.14 ± 0.03
Ácido láctico, g/l	0.9 ± 0.8	0.0	1.1 ± 0.4	0.27	0.9 ± 0.7

Una vez más, los resultados obtenidos empleando los biosensores en paralelo, concuerdan perfectamente con los obtenidos con los electrodos de grafito-Teflón-GOD-HRP-ferroceno y de grafito-Teflón-LOD-HRP-ferroceno utilizados por separado, dado que en todos los casos se obtienen valores de t_{exp} menores que el valor de la t tabulada ($t_{tab}= 2.776$) Así pues, queda demostrada la posibilidad de llegar a determinar simultáneamente los contenidos de glucosa y de ácido láctico con la célula array, algo que no resultaba posible empleando un electrodo multienzimático (al menos con el tipo de columna cromatográfica utilizada). Como se

ha podido observar a lo largo de todos los trabajos presentados en esta Memoria, las posibilidades de las matrices biocompósitas de grafito-Teflón son múltiples, presentando una alternativa ventajosa a muchos métodos de análisis que requieren una instrumentación mucho más compleja y costosa.

En conclusión, se ha podido comprobar como las células array diseñadas, permiten la detección simultánea de varios analitos tanto en discontinuo como mediante inyección en flujo, simplificando la metodología empleada en el sistema de HPLC usando como detector el electrodo trienzimático.

Los resultados obtenidos demuestran que los sensores basados en grafito y Teflón son unas matrices perfectas para poder incluir diversos compuestos de reconocimiento en su seno. Así, a partir de un solo electrodo, se dispone a la vez de un sensor para un solo analito, de un detector amperométrico en sistemas cromatográficos y de un constituyente de un sistema array de medida. Además, ha quedado demostrado que estos biosensores compósitos enzimáticos son aplicables a muestras reales.

- Antiochia, R., Palleschi, G. (1997). "A tri-enzyme probe for the sequential determination of fructose and glucose in the same sample". *Analytical Letters*, 30(4), 683-697.
- Becker, T.M., Schmidt, H.L. (2000). "New ways of enzymatic two-substrate determinations in flow injection systems". *Analytica Chimica Acta* ; 421, 7-18.
- Bronk, K.S., Walt, D.R. (1994). "Fabrication of patterned sensor arrays with aryl azides on a polymer-coated imaging optical-fiber bundle". *Anal. Chemistry*. 66, 3519-3520.
- Buttler, T.A., Johansson, K.A.J., Gorton, L., Marko-Varga, G.A. (1993). "On-line fermentation process monitoring of carbohydrates and ethanol using tangential flow filtration and column liquid chromatography". *Analytical Chemistry*, 65, 2628-2636.
- Carey, W.P. (1994). "Multivariate sensor arrays as industrial and environmental monitoring systems". *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 13, no. 5.
- Chen, R.L.C., Matsumoto, K. (1995). "Sequential enzymatic monitoring of glucose, ethanol and glutamate in bioreactor fermentation broth containing a high salt concentration by a multi-channel flow-injection analysis method". *Analytica Chimica Acta* 308 ; 145-151.
- Choi, M.J., Choe, I.S., Kang, H.K., Lee, J.S., Chung, T.W. (1991). "Simple enzyme-immunoassay for the simultaneous measurement of whole choriogonadotropin molecules and free beta-subunits in sera of women with abnormal pregnancies of tumors of the reproductive-system". *Clin. Chem.*, 37, 673-677.
- Guerrieri, M.A., Palmisano F. (2001). "An acetylcholinesterase/choline oxidase-based amperometric biosensor as a liquid chromatography detector for acetylcholine and choline determination in brain tissue homogenates". *Analytical Chemistry*, 73 (13) :2875-2882.
- Jürgens, H., Brandes, L., Joppien, R., Siebold, M., Schubert, J., Wu, X., Kretzmer, G., Schügerl, K. (1995). "Development of enzyme cartridge flow-injection analysis for industrial process monitoring. Part II. Application for monitoring of microorganism cultivations". *Analytica Chimica Acta* 302 (1995) 289-296.
- Katrlík, J., Pizzariello, A., Mastihuba, V., Svorc, J., Stred-ansky, M., Miertus, S. (1999). "Biosensors for L-malate and L-lactate on solid binding matrix". *Analytica Chimica Acta*. 379 (1-2) : 193-200.
- Kohl, D., Heinert, L., Bock, J., Hoffmann, T., Schieberle, P. (2000). "Systematic studies on responses of metal-oxide sensor surfaces to straight chain alkanes, alcohols, aldehydes, ketones, acids and esters using the SOMMSA approach". *Sensor Actuat. B-Chem.*, 70, 43-50.
- Kumar, M.A., Thakur, M.S., Senthuran, A., Senthuran, V., Karanth, N.G., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B. (2001). "An automated flow injection analysis system for on-line monitoring of glucose and L-lactate during lactic acid fermentation in a recycle bioreactor". *World Journal of Microbiology ad Biotechnology*. 17(1) : 23-29.
- Lidén, H., Buttler, T., Jeppsson, H., Marko-Varga, G., Volc, J., Gorton, L. (1998). "On-line monitoring of monosaccharides and ethanol during a fermentation by microdialysis sampling, liquid chromatography and two amperometric biosensors". *Chromatographia* Vol. 47, No. 9/10.

- Mannino, S., Cosio, M.S., Buratti, S. (1999). "Simultaneous determination of glucose and galactose in dairy products by two parallel amperometric biosensors". *Italian Journal of Food Science*. 11(1) :57-65.
- Marzouk, S.A.M., Sayour, H.E.M., Ragab, A.M., Cascio, W.E., Hassan, S.S.M. (2000). "A simple FIA-system for simultaneous measurements of glucose and lactate with amperometric detection". *Electroanalysis* ; 12(16) : 1304-1311.
- Matsumoto, K., Kamikado, H., Matsubara, H., Osajima, Y. (1988). "Simultaneous determination of glucose, fructose and sucrose in mixtures by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme reactors". *Analytical Chemistry*, 60, 147-151.
- Matsumoto, K., Waki, K. (1999). "Simultaneous biosensing of ethanol and glucose with combined use of a rotating bioreactor and a stationary column reactor". *Analytica Chimica Acta* ; 380 ; 1-6.
- Maute, M., Raible, S., Prins, F.E., Kern, D.P., Ulmer, H., Weimar, U., Göpel, W. (1999). "Detection of volatile organic compounds (VOCs) with polymer-coated cantilevers. *Sensor Actuat. B-Chem.* 58, 505-511.
- Min, R.W., Rajendran, V., Larsson, N., Gorton, L., Planas, J., Hahnagerdal, B. (1998). "Simultaneous monitoring of glucose and L-lactic acid during a fermentation process in an aqueous two-phase systems by on-line FIA with microdialysis sampling and dual biosensor detection". *Analytica Chimica Acta* ; 366(1-3) : 127-135.
- Mousty, C., Cosnier, S., Shan, D., Mu, S.L. (2001). "Trienzymatic biosensor for the determination of inorganic phosphate". *Analytica Chimica Acta*, 443(1) : 1-8.
- Muñoz, J., Mas, R., Galan-Vidal, C.A., Dominguez, C., Garcia Raurich, J., Alegret, S. (1999). "Thin-film microelectrodes for biosensing". *Química Analítica*, 18 Suppl.1 : 155-157.
- Nakamoto, T., Fukuda, A., Moriizumi, T.,(1993). "Perfume and flavor identification by odour-sensing system using quartz resonator array and neural network pattern recognition", *Sensor Actuat B-Chem.*, 10, 85-90.
- O'Connell, P.J., Guilbault, G.G. (2001). "Future trends in biosensor research". *Analytical Letters*, 34(7), 1063-1078.
- Palmisano, F., Rizzi, R., Centonze, D., Zambonin, P.G. (2000). "Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films". *Biosensors and Bioelectronics*, 15(9-10) : 531-539.
- Park, I.S., Cho, Y.J., Kim, N. (2000). "Characterization and meat freshness application of a serial three-enzyme reactor system measuring ATP-degradative compounds". *Analytica Chimica Acta* 404, 75-81.
- Rajendran, V., Irudayaraj, J. (2002). "Detection of glucose, galactose, and lactose in milk with a microdialysis coupled flow injection amperometric sensor". *Journal of Dairy Science*. 85(6) :1357-1361.
- Rhee, J.I., Schügerl, K. (1997). "The influence of metabolites on enzyme based flow injection analysis". *Analytica Chimica Acta* 355, 55-62.

- 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". *Biosensors and Bioelectronics*. 14 ; 505-513.
- Sewell, P.A., Clarke, B. "Chromatographic Separations". *Analytical Chemistry by Open Learning*. Ed. D. Kealy. Published by John Wiley & Sons.
- Starodub, N.F., Kanjuk, N.I., Kukla, A.L., Shirshov, Y.M. (1999). "Multi-enzymatic electrochemical sensor :field measurements and their optimisation". *Analytica Chimica Acta*, 385, 461-466.
- Stella, R., Giorgio-Serra, J.N.B., Wallace, G.G., De Rossi, D. (2000). "Characterization of olive oil by an electronic nose based on conducting polymer sensors". *Sensor Actuat. B -Chem.*, 63, 1-9.
- Ulmer, H., Miltrovics, J., Weimar, U., Göpel, W. (2000). "Sensor arrays with only one or several transducer principles ?. The advantage of hybrid modular systems". *Sensor Actuat. B Chem.*, 65, 79-81.
- Wadkins, R.M., Golden, J.P., Pritsiolas, L.M., Ligler, F.S. (1998). "Detection of multiple toxic agents using a planar array inmunosensor. *Biosens. and Bioelectronics*, 13, 407-415.
- Wang, J., Zhang, X.J. (2001). "Needle-type dual microsensor for the simultaneous monitoring of glucose and insulin". *Analytical Chemistry*. 73(4) : 844-847.

En los diferentes capítulos descritos en la Memoria, se han establecido y comentado conclusiones específicas para cada caso particular. A pesar de las diferencias entre los distintos sensores desarrollados, todos ellos quedan englobados dentro del objetivo general del trabajo, con lo cual es necesario profundizar un poco más en las características comunes de todos ellos. Por ello, a continuación se enumeran las conclusiones generales más importantes a las que se ha llegado a partir de los resultados obtenidos.

1. Todos los electrodos compósitos enzimáticos desarrollados son adecuados para la detección y determinación de los sustratos propuestos en cada caso.
2. El empleo de mediadores permite obtener una mayor sensibilidad y selectividad.
3. La solubilidad de los sustratos en el medio de trabajo influye en la velocidad de respuesta de los biosensores. A pesar de ello, todos los electrodos estudiados muestran una respuesta razonablemente rápida a los cambios de concentración del sustrato, dada la ausencia de enlaces covalentes para inmovilizar las enzimas y de membranas en la superficie del electrodo.
4. Las matrices compósitas de grafito-Teflón y RVC-resina epoxi son adecuadas para la construcción de biosensores electroquímicos reutilizables, como se deduce de los diferentes estudios de estabilidad realizados, tanto en discontinuo como en sistemas en flujo, los cuales ilustran claramente la buena estabilidad y robustez de los biosensores compósitos desarrollados.
5. En el caso de los biosensores bienzimáticos desarrollados, las enzimas oxidasas son las que determinan el tiempo de vida útil del electrodo enzimático, así como el tiempo de almacenamiento de la pastilla madre (en el caso de las matrices de grafito-Teflón). Excepto para glucosa oxidasa, el resto de enzimas utilizadas para fabricar electrodos bienzimáticos han resultado ser menos estables que la peroxidasa. En el caso del biosensor de RVC-resina epoxi-AOD-HRP-ferroceno, si bien el tiempo de vida útil del electrodo resultó ser similar al de RVC-resina epoxi-HPR-ferroceno, la influencia de la alcohol oxidasa sobre la estabilidad del biosensor se puso de manifiesto en la necesidad de efectuar un mayor número de pulidos.
6. El material compósito de grafito-Teflón es más compatible con los medios predominantemente orgánicos que el de RVC-resina epoxi, lo que permite afirmar que la matriz fabricada con grafito y Teflón posee una aplicabilidad más amplia.

7. La variación de la intensidad de corriente en estado estacionario en función de la concentración de sustrato proporciona en todos los casos curvas típicas de los sistemas enzimáticos, con un primer tramo lineal útil analíticamente y una curvatura posterior debida a la saturación de la enzima.
8. En todos los casos estudiados la cinética de la reacción enzimática se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten, independientemente del medio de trabajo utilizado.
9. Las características analíticas obtenidas con todos los biosensores desarrollados, tanto en discontinuo como en flujo, son mejores o cuanto menos similares a las reportadas en bibliografía para otros biosensores.
10. Los límites de detección y cuantificación de los sustratos estudiados son en todos los casos adecuados para su análisis a los niveles de concentración a los que se encuentran en las muestras reales.
11. El comportamiento de cada oxidasa en los biosensores multienzimáticos es similar al observado con los electrodos bienzimáticos particulares.
12. El hecho de que cada sustrato reaccione con la enzima a una velocidad diferente, mejora la resolución de los picos cromatográficos cuando se utiliza un biosensor enzimático como detector en HPLC, en relación con detectores no enzimáticos.
13. La matriz de grafito-Teflón es adecuada para ser utilizada como detector en HPLC, inmovilizando una enzima que responda a varios analitos de interés a la vez (como es el caso de la alcohol oxidasa, con la que se pueden detectar varios alcoholes), o un sistema multienzimático capaz de detectar sustratos con tiempos de retención diferentes.
14. En el caso en el que el empleo de un biosensor multienzimático no sea capaz de resolver los picos de distintos analitos mediante HPLC, es posible aplicar detección dual con dos biosensores diferentes.
15. Cuando se trabaja con electrodos multienzimáticos, el factor limitante para su aplicabilidad con muestras reales es que la concentración de cada analito se encuentre dentro del intervalo lineal del calibrado para cada sustrato.
16. En el análisis de muestras reales, la utilización del método de adiciones estándar, aún cuando no exista efecto matriz, permite cuantificar el analito de interés incluso cuando la señal del biosensor no esté dentro de los límites del gráfico de control correspondiente.

17. Para todos los biosensores desarrollados, la selectividad proporcionada por la enzima al electrodo simplifica el pretratamiento de la muestra si se compara con el que se precisa con los métodos de análisis convencionales o de referencia.
18. El hecho de que la matriz de grafito-Teflón se pueda utilizar prácticamente en cualquier medio de trabajo, hace mucho más sencillo el tratamiento de las muestras, tal y como ha quedado demostrado con el biosensor de colesterol.
19. La simplicidad en el tratamiento de las muestras hace que se minimicen los tiempos de análisis y que disminuyan los costes.
20. Ninguno de los métodos desarrollados para el análisis de las muestras presenta diferencias significativas con respecto a los métodos de referencia seleccionados en cada caso.

Finalmente decir que ha quedado ampliamente demostrado que los biosensores compósitos enzimáticos basados en las matrices de grafito y Teflón constituyen una alternativa válida a métodos clásicos de análisis. Estos biosensores permiten un análisis simple, selectivo, sensible y robusto, por lo que puede considerarse cumplido el objetivo de este trabajo, que como se dijo en un principio, era el diseño de biosensores útiles para resolver problemas analíticos reales.