

**APLICACIÓN DE BIOSENSORES
AMPEROMÉTRICOS DE
POLISULFONA/NANOTUBOS DE
CARBONO EN EL ANÁLISIS DE
MUESTRAS REALES**

**Memoria presentada por
Sandra Pérez Rafael**

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**Director:
Esteve Fàbregas Martínez**

**DEPARTAMENT DE QUÍMICA
FACULTAT DE CIÈNCIES**

2012

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por Sandra Pérez Rafael

Con el visto bueno del director de la tesis doctoral, Esteve Fàbregas Martínez, profesor titular de la Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 26/09/2012

Grup de Sensors i Biosensors
Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici C, 08193, Bellaterra

El trabajo descrito en esta memoria se llevó a cabo gracias a las siguientes fuentes de financiación:

- Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación:
Desarrollo de (bio)materiales basados en nanoestructuras. Optimización y caracterización para su aplicación en (bio)sensores y energías renovables. CTQ2009-13873(Subprograma BQU)
Investigador Principal: Jordi Bartrolí Molins
- Concesión de una beca PIF (4 años de duración) de la Universitat Autònoma de Barcelona para realizar el doctorado en el Grupo de Sensores y Biosensores.
- Concesión de una beca de la Universitat Autònoma de Barcelona para realizar una estancia de 3 meses en la Universidad Tor Vergata de Roma.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Esteve primero por aceptarme sin ningún problema para ser mi tutor en el máster, y después como director de la tesis que hoy presento. Son ya unos cuantos años conociéndolo y disfrutando de su buen humor. De tan buen carácter que siempre acabas soltando alguna sonrisa. Por otro lado, siempre tiene historias interesantes que contar, así que siempre salgo de su despacho sabiendo algo más. Y sobre todo, te agradezco la confianza que nos das, que sin lugar a dudas es recíproca. Por último, también el sacrificio de los últimos días para tener a punto todo.

También quiero agradecer a Samuel Sánchez, quien me enseñó los principios básicos del mundo de los biosensores y me ayudó en mis primeros meses en el grupo. Lo puedo considerar prácticamente un subdirector, aunque ahora haya prosperado y dirige su propio grupo en Alemania.

Siempre he pensado que con los compañeros del laboratorio, con los que al fin y al cabo, pasas más horas, incluso que con tu familia o pareja, debes establecer una buena relación. Y creo que eso lo hemos conseguido, tanto cuando empecé, que la mayoría ya me dejaron atrás, como con los actuales, con los cuáles organizamos alguna que otra salida de vez en cuando.

A mis compañeros y compañeras del fútbol! Un gran desestresante! Cuatro temporadas jugando la liga, con más pena que gloria, pero ahí seguimos. NOSOTRAS AHÍ, y con un gran entrenador que siempre nos regala los oídos al acabar los partidos, pero mientras los jugamos no hace más que gritar! Jeje, eso sí, para motivarnos a jugar mejor.

Y también, al resto del grupo de sensores y biosensores, y al resto de compañeros de la planta, con los que siempre puedes compartir conversaciones en el comedor!

A mis amigos, que aunque no entiendan casi nada de lo que hago, siempre están ahí para apoyarte en lo que sea, tanto en los buenos ratos como en los malos. Elegir a tus amigos siempre cuesta, pero no tengo duda en que son los mejores!

Y sobre todo, gracias a quien me lo ha dado todo, mis padres y mis hermanas. No podría haber tenido un apoyo igual en todos los aspectos de la vida. Mis padres siempre se han sacrificado para darnos una educación y que no nos faltara de nada, gracias a ellos soy lo que soy, y tengo los valores que tengo. Espero haber aprovechado bien todas las oportunidades que me habéis brindado.

ABREVIATURAS

A	Área del electrodo
AA	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
Ag	Antígeno
AntiRIgG	Anticuerpo anti RIgG
AntiRIgG-HRP	Anticuerpo anti RIgG marcado con enzima peroxidasa
BA	Aminas biógenas
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Concentración
CNM	Centro Nacional de Microelectrónica
CoPc	Ftalocianina de cobalto
CSLM	Microscopía laser confocal
DMF	Dimetilformamida
DOx	Diamino oxidasa
E	Enzima
E	Potencial
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ET	Estado de transición
Fab	Antigen binding fragment
Fc	Crystallizable fragment
Fc	Ferroceno
GOx	Glucosa oxidasa
GSB	Grupo de sensores y biosensores

hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
HK	Enzima hexoquinasa
HQ	Hidroquinona
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante
Ig	Inmunoglobulina
I	Intensidad
IF	Inversión de fase
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
LH	Hormona luteinizante
LOx	Enzima lactato oxidasa
MB	Azul de Meldola
MWCNT	Nanotubos de pared múltiple
n_H	Constante de Hill
NAD^+	Nicotinamida adenín dinucleótido
NMP	N-metil-2- pirrolidina
OPD	<i>o</i> -fenilendiamina
P	Producto
PB	Azul de Prusia
PBS	Tampón fosfato
PC	Policarbonato
PS	Polisulfona
RIgG	Inmunoglobulina de conejo
S	Sustrato
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SWCNT	Nanotubos de pared simple
t	Tiempo
T	Temperatura

TTF	Tetratiofulvaleno
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
V	Velocidad

Índice

Índice

Índice	3
1. Introducción.....	1
1.1. Sensores químicos.....	1
1.2. Clasificación	2
1.3. Transductores amperométricos	3
1.4. Biosensores	5
1.4.1. Inmunosensores	5
1.4.1.1. Inmunoensayo enzimático.....	7
1.4.1.2. Ventajas y desventajas de los inmunosensores	9
1.4.2. Biosensores enzimáticos.....	10
1.4.2.1. Cinética enzimática	11
1.4.2.2. Cooperatividad. Ecuación de Hill	13
1.4.2.3. Ventajas y limitaciones de los biosensores enzimáticos	14
1.5. Estrategias de inmovilización	15
1.6. Membranas de polisulfona.....	18
1.6.1. Inversión de fase.....	18
1.7. Nanotubos de carbono en el mundo de los biosensores.....	19
1.8. Puertas lógicas	21
1.9. Bibliografía	23
2. Objetivos	25
3. Experimental	27
3.1. Construcción de sensores serigrafados	27
3.1.1. Sensores construidos en la Universidad Autónoma de Barcelona	27
3.1.2. Sensores comerciales de Dropsens.....	28
3.1.3. Sensores construidos en la Universidad Tor Vergata de Roma.....	29
3.2. Inversión de fase	30
3.3. Reacciones de entrecruzamiento.....	33
3.4. Caracterización morfológica de la membrana de PS/CNT.....	33
3.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	34

3.4.1.1.	Preparación de las muestras	34
3.4.2.	Microscopía láser confocal (CLSM)	34
3.4.2.1.	Preparación de las muestras	35
3.5.	Evaluación electroquímica.....	35
3.5.1.	Voltamperometría cíclica	35
3.6.	Procedimiento de medida.....	37
3.6.1.	Voltamperometría cíclica	37
3.6.2.	Calibraciones	38
3.7.	Bibliografía	39
4.	Resultados y discusión	41
4.1.	Estudio de la membrana compósita PS/CNT. Construcción de biosensores para la detección de la hormona hCG.....	41
4.1.1.	Caracterización de la membrana PS/CNT	42
4.1.2.	Inmunoensayo.....	45
4.1.3.	Determinación de la hormona hCG.....	48
4.1.4.	Conclusiones.....	49
4.2.	Sistemas para la determinación de ión lactato	50
4.2.1.	Biosensor enzimático basado en la enzima LDH	51
4.2.1.1.	Optimización	51
4.2.1.2.	Evaluación.....	53
4.2.2.	Biosensor enzimático basado en la enzima LOx.....	54
4.2.2.1.	Optimización del biosensor.....	55
4.2.2.2.	Trabajo con gota y evaluación del biosensor	58
4.2.3.	Sensor bienzimático basado LOx/HRP	59
4.2.3.1.	Optimización del biosensor	60
4.2.3.2.	Evaluación del biosensor.....	61
4.2.4.	Determinación de L-lactato en muestras reales.....	62
4.2.4.1.	Estudio de las interferencias.....	63
4.2.4.2.	Determinación de L-lactato en muestras de vino y cerveza.....	64
4.2.4.3.	Conclusiones	66
4.3.	Construcción de biosensores para la determinación de aminas biógenas.....	67
4.3.1.	Preparación del biosensor.....	68
4.3.2.	Optimización del biosensor	69

4.3.3.	Evaluación	70
4.3.4.	Estudio de interferencias en la determinación de aminas biógenas en muestras reales	71
4.3.5.	Determinación de histamina en muestras reales.....	72
4.3.6.	Conclusiones.....	75
4.4.	Desarrollo de puertas lógicas aplicado en el mundo de los biosensores.....	75
4.4.1.	Obtención de respuestas all-or-none.....	75
4.4.2.	Aplicación de la respuesta <i>all-or-none</i> en el desarrollo de puertas lógicas	80
4.4.3.	Conclusiones.....	81
4.5.	Bibliografía	82
5.	Conclusiones generales	83
6.	Artículos publicados	
	Artículo 1: Toward a Fast, Easy, and Versatile Immobilization of Biomolecules into Carbon Nanotube/Polysulfone-Based Biosensors for the Detection of hCG Hormon	
	Artículo 2: Employing the Metabolic “Branch Point Effect” to Generate an All or None, Digital like Response in Enzymatic Outputs and Enzyme-Based Sensors	
	Artículo 3: Enzymatic Strategies to Construct L Lactate Biosensors Based on Polysulfone/Carbon Nanotubes Membranes	
	Artículo 4: Amperometric bienzymatic biosensor for L lactate analysis in wine and beer samples	
7.	Anexos	
	Artículo 5: Amperometric biosensor for the determination of Histamine in fish samples	

1. Introducción

1. Introducción

En una sociedad caracterizada por la enorme evolución tecnológica y con la rapidez con la que viaja la información, se hace cada vez más necesario encontrar sistemas de medida con los que obtener información fiable y de buena calidad sobre los parámetros químicos. Es en este punto donde la química analítica debe dar respuesta, proporcionando para ello instrumentación y metodologías adecuadas. Considerando el elevado consumo de tiempo de muchos de los procedimientos analíticos actuales, debido en general a laboriosos y costosos pretratamientos, el desarrollo de sensores aborda de una manera rápida, barata y eficaz mucho de estos retos.

1.1. Sensores químicos

Los sensores químicos son dispositivos de dimensiones reducidas con claras ventajas; bajo coste, fácil uso y generación de información en tiempo real, por lo que posibilitan el control continuo de parámetros analíticos¹. Además, son capaces muchas veces de realizar medidas *in situ* formando parte de equipos portables, siendo así especialmente útiles en el campo médico y medioambiental.

Estos dispositivos están constituidos por dos elementos fundamentales; un elemento de reconocimiento (receptor) que interacciona con el analito en cuestión y un elemento de transducción, encargado de transformar los cambios producidos por ésta interacción (señal primaria), ya sean eléctricos, ópticos, másicos o térmicos, en una señal secundaria cuantificable que generalmente es de tipo eléctrico. De esta manera, se puede llegar a correlacionar la señal medida con la concentración de analito en la muestra, obteniendo tanto información analítica cualitativa como cuantitativa. En la Figura 1.1 se representa el funcionamiento esquemático de un sensor químico.

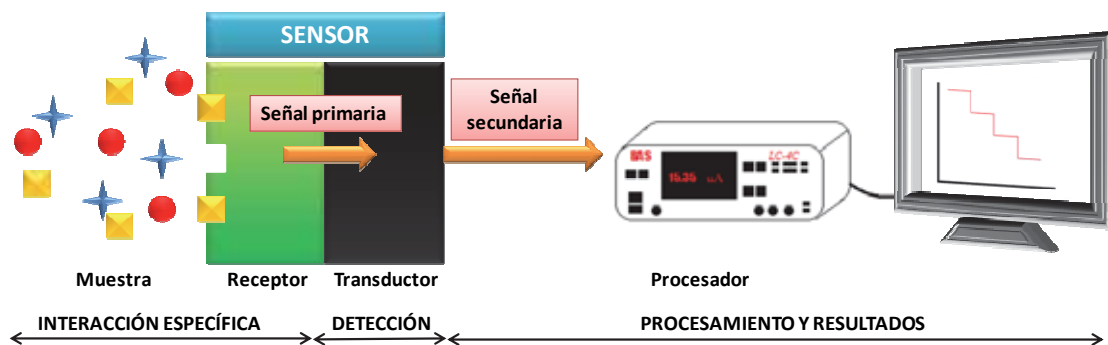


Figura 1.1 Esquema de un sensor químico. El analito es reconocido por el receptor, la interacción de los cuales genera un estímulo que es transformado por el transductor en una señal procesable y proporcional a su concentración en la muestra.

1.2. Clasificación

Los sensores químicos pueden clasificarse según su mecanismo de transducción, a partir de la propiedad física que mide el transductor. Así, principalmente se encuentran divididos en los siguientes grupos:

- *Sensores ópticos*: Se miden cambios de las propiedades ópticas tales como la absorbancia, reflectancia, quimioluminiscencia, fluorescencia, índice de refracción o dispersión de la luz.
- *Sensores electroquímicos*: Miden magnitudes eléctricas basadas en fenómenos de transferencia de carga y de electrones. Pueden clasificarse a su vez en sensores potenciométricos, cuando la propiedad física que miden es el potencial, o en sensores amperométricos cuando lo es la intensidad de corriente.
- *Sensores eléctricos*: Se basan en la medida de cambios de las propiedades eléctricas, sin que tengan lugar procesos electroquímicos, como la conductividad, capacitancia o la permitividad eléctrica.
- *Sensores másicos*: generan una señal debido a un cambio de masa detectado por un material piezoeléctrico de soporte causado por acumulación selectiva de analito sobre éste.
- *Sensores térmicos*: se mide el cambio de temperatura sobre la superficie del sensor debido a intercambios de calor producidos por reacciones donde interviene el analito.

- *Sensores magnéticos*: Se basan en el cambio de las propiedades paramagnéticas de las especies implicadas en la reacción de reconocimiento.

1.3. Transductores amperométricos

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, los sensores amperométricos se basan en la medida de intensidad de corriente producida entre dos electrodos por la aplicación de un potencial constante, debido a reacciones de transferencia de electrones en las que una especie electroactiva en solución se oxida y otra se reduce. La elección del potencial puede ser un factor del cual dependa la selectividad electroquímica del sensor, ya que según éste se producirán o no las reacciones de oxidación o reducción. Por lo tanto, y como se verá más adelante, es usual la modificación química de los electrodos para aumentar la selectividad y la sensibilidad de la detección. Con el mismo objetivo se llevan a cabo modificaciones con material biológico, ya que esto permite la medición de otras especies químicas.

Los sistemas amperométricos están constituidos por celdas electroquímicas formadas por tres electrodos: trabajo, referencia y auxiliar. Es en la superficie del electrodo de trabajo donde se da la reacción electroquímica de interés y se mide el paso de corriente. A su vez, está conectado a un electrodo de referencia, entre los cuáles se aplica una diferencia de potencial fija, y un electrodo auxiliar, encargado de cerrar el circuito eléctrico. El potencióstato mantiene la diferencia de potencial constante, y permite medir las intensidades de corriente obtenidas a partir de las reacciones electroquímicas resultantes. Los electrodos de trabajo y auxiliar suelen construirse a partir de materiales conductores inertes como oro, platino, grafito, nanotubos de carbono y polímeros conductores, mientras que los de referencia suelen ser de Ag/AgCl o de calomelanos.

Tal y como describe la *Ley de Faraday*, la intensidad de corriente (**I**) es directamente proporcional a la velocidad de la reacción electroquímica, es decir, con la oxidación o reducción del analito en cuestión.

Ecuación 1

$$I = nF \left(\frac{dc}{dt} \right)$$

Donde dC/dt representa la velocidad de oxidación o reducción de las especies electroactivas en unidades de mol/s, n es el número de electrones implicados en la reacción, y F la constante de Faraday (96485 C/mol). La velocidad de reacción depende a su vez de la velocidad de transferencia de los electrones a la superficie del electrodo y además de la velocidad de transporte de masa del analito. Este último parámetro varía según la concentración del analito en la disolución, y las condiciones de convección, migración y difusión ².

Cuando se realizan medidas en disoluciones estáticas, la relación entre la intensidad y la concentración de analito (C) viene dada por la ecuación de *Cottrell* ³, en la que se considera factores como el área del electrodo (A) y el coeficiente de difusión de la especie en estudio, y donde la I decrece con el tiempo (t):

Ecuación 2
$$I = nFA \left(\frac{D}{t} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Teniendo en cuenta esta ecuación, se debería obtener un valor de $I = 0$ para periodos de tiempo largos, pero en la realidad se siguen obteniendo valores bajos de I .

Si el fenómeno de la migración se minimiza por la adición de un electrolito soporte a la solución, a la vez que se fuerza la convección constante mediante una agitación controlada, se consigue un transporte de masa a la superficie del electrodo que viene únicamente determinada por la difusión. De esta manera, se genera una capa de grosor (L) dependiendo de la velocidad de convección⁴, en la que la concentración de analito es prácticamente cero ya que toda la masa que llega por difusión reacciona sobre la superficie del electrodo. Es en estas condiciones cuando se cumple que la I es directamente proporcional a la (C) de la especie electroactiva. La relación entre ambos parámetros corresponde a la Ecuación 3.

Ecuación 3
$$I = nFDA \left(\frac{D}{L} \right) C$$

Esta ecuación se puede simplificar a la Ecuación 4:

Ecuación 4
$$I = kC$$

Donde la k incluye así los parámetros anteriores que se mantienen constantes en unas condiciones experimentales determinadas.

1.4. Biosensores

Los biosensores son dispositivos en los cuales se incorpora un receptor de origen biológico. Su naturaleza les confiere algunas ventajas sobre el resto de sensores presentando una mayor especificidad frente al analito en estudio, debido sobre todo a que las capacidades de las sustancias biológicas no se pueden emular fácilmente mediante materiales sintéticos. Sin embargo, en la actualidad se está trabajando, por ejemplo, en el desarrollo de materiales biomiméticos como los polímeros de impronta molecular (MIP)^{5, 6}, con los que se consigue aumentar la especificidad de los sensores y demás técnicas analíticas.

Además de buscar bioreceptores selectivos capaces de discriminar entre el analito en estudio y el resto de compuestos de en una disolución, permitiendo de esta manera minimizar el número de especies interferentes, también se ha de cumplir un factor de proporcionalidad, de manera que haya una respuesta estequiométrica de la concentración o de algún parámetro físico. Por otro lado, también se ha de tener en cuenta la sensibilidad, ya que es crucial encontrar una interacción significativa del analito-bioreceptor para obtener una buena eficacia en su detección.

Los bioreceptores pueden ser muy diversos, desde enzimas, microorganismos, o tejidos (bioreceptores catalíticos donde se catalizan reacciones químicas en las que interviene el analito), a anticuerpos, receptores celulares y ácidos nucleicos (bioreceptores de afinidad en los que el analito se une al transductor produciendo alguna alteración medible).

1.4.1. Inmunosensores

Este tipo de biosensor incorpora anticuerpos (Ab), también llamadas inmunoglobulinas (Ig), como material biológico. Los anticuerpos son glicoproteínas que circulan por la corriente sanguínea y el sistema linfático. Son secretados por los linfocitos B como respuesta a la aparición de sustancias extrañas, los antígenos (Ag), a lo que se denominada respuesta inmunitaria⁷. La estereoespecificidad de los puntos de unión en los anticuerpos confiere una alta selectividad a éste tipo de interacción de afinidad Ag-Ab.

Hay diferentes clases de inmunoglobulinas dependiendo de sus características físico-químicas, su actividad biológica y su estructura molecular. Las principales son

IgD, IgA, IgM, IgE y IgG, siendo éstas últimas las más representativas en la sangre (75 %), y de uso común en inmunoensayo. Las IgG están constituidas por 4 cadenas polipeptídicas y unidas por puentes disulfuro e interacciones no covalentes entre los residuos de aminoácidos⁸. Dos de ellas son cadenas pesadas (55-77 kDa) e iguales entre sí, y dos ligeras (25 kDa) también iguales como se representa en la Figura 1.2. La molécula de inmunoglobulina puede ser cortada por ciertas proteasas (pepsina, papaína, etc) liberando dos fragmentos proteicos diferentes –Fab (*antigen binding fragment*) y Fc (*crystallizable fragment*) –funcional y estructuralmente diferentes. El primero es el encargado de interactuar específicamente con el antígeno y el segundo, mediante la unión a proteínas específicas, se asegura que cada anticuerpo genera una respuesta inmune apropiada para un antígeno determinado, además de unirse a varios receptores celulares y otras moléculas del sistema inmunitario como las proteínas complemento.

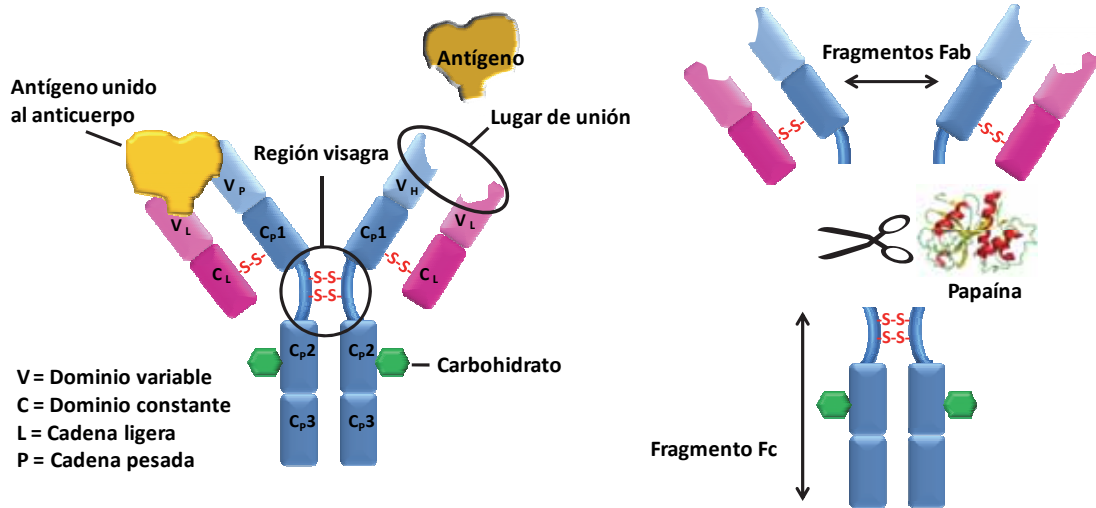


Figura 1.2 Representación esquemática de un anticuerpo. En azul se representa las cadenas polipeptídicas pesadas, y en rosa las ligeras. Cada cadena está formada a su vez por diferentes dominios constantes y dominios variables, dándose en estos últimos la interacción de reconocimiento con el antígeno. Proteasas como la papaína cortan la inmunoglobulina en dos tipos de fragmento Fab y Fc.

La zona de enlace de un anticuerpo, *paratopo*, se une por tanto a una zona en concreto del antígeno, denominada determinante o *epítipo*. La fuerza de interacción Ag-Ab es debida a diversas fuerzas no covalentes entre las que se encuentran puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas, que si bien son todas ellas débiles, presentan carácter cooperativo de manera que se genera finalmente una considerable energía de enlace. El resultado es la formación de un complejo de reconocimiento molecular de elevada estabilidad, donde la

valores de la constante de afinidad (k) se encuentran comprendidos entre 10^4 y 10^{12} , proporcionando a las técnicas de inmunoensayo una elevada sensibilidad⁹.

Ecuación 5

$$k = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]}$$

Según el proceso de obtención de anticuerpos, podemos diferenciar entre anticuerpos policlonales (PAb) y monoclonales (MAb). Al inmunizar un animal, se crean múltiples tipos de anticuerpos para un mismo antígeno, y posteriormente se aíslan de su sangre, su conjunto se considera un anticuerpo policlonal. Los monoclonales surgen de la necesidad de trabajar con anticuerpos más específicos, los cuales interaccionen todos con el mismo epítoto del antígeno. Fusionando linfocitos secretores de anticuerpos de un animal con una línea celular cancerosa se obtienen hibridomas que crecen y se immortalizan. Posteriormente se aíslan estas células de hibridoma y sus clones son capaces de producir todos el mismo anticuerpo. También se puede utilizar fragmentos de anticuerpos y conseguir material inmunológico idéntico mediante la tecnología del ADN recombinante.

Aunque en algunos casos se puede detectar directamente la interacción Ab-Ag, normalmente ésta no produce ninguna propiedad medible por el transductor, por lo que se opta por medición indirecta mediante el marcaje¹⁰ con enzimas, isotopos radioactivos, nanopartículas, grupos fluorescentes... La estrategia más extendida es el marcaje enzimático de alguna de las especies del par inmunológico, que permite también amplificar la señal obtenida mediante el control de la reacción enzimática. En estos casos se habla de inmunoensayo enzimático (EIA, enzyme immunoassay)¹¹.

1.4.1.1. Inmunoensayo enzimático

El inmunoensayo es una técnica analítica basada en el uso de inmunoespecies como reactivos analíticos para la determinación cuantitativa de un analito en disolución. Dada su alta sensibilidad y selectividad, se logra la cuantificación de un gran número de compuestos a concentraciones del orden de ng/ml o incluso pg/ml. La técnica incluye todo los ensayos que utilizan antígenos o anticuerpos marcados, donde este marcaje determina la técnica de detección necesaria para el seguimiento de la interacción inmunológica.

Los métodos de inmunoensayo se pueden clasificar en homogéneos y heterogéneos. En los primeros, el marcador modifica su actividad cuando se unen anticuerpo y

antígeno, por lo que puede seguirse su aumento o disminución sin mayor complicación. En este caso, dado que las inmunoespecies se encuentran en disolución y no se lleva a cabo ninguna separación de la matriz, la sensibilidad es baja debido a la presencia de interferencias. En los métodos heterogéneos, donde se incluye un paso de separación del reactivo excedente, normalmente una etapa de lavado de la superficie sólida, se consigue eliminar gran parte de estas interferencias obteniéndose a su vez mayor sensibilidad y mejores límites de detección.

Uno de los ensayos heterogéneos más importantes es el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Los inmunosensores amperométricos implementan este tipo de ensayo inmovilizando las inmunoespecies sobre el transductor, integrando así la selectividad de los reactivos inmunológicos, la sensibilidad de las reacciones enzimáticas y la simplicidad de la detección amperométrica. Normalmente se trabaja en dos formatos diferentes, ensayo competitivo y ensayo no competitivo (sándwich), como se representa en la Figura 1.3.

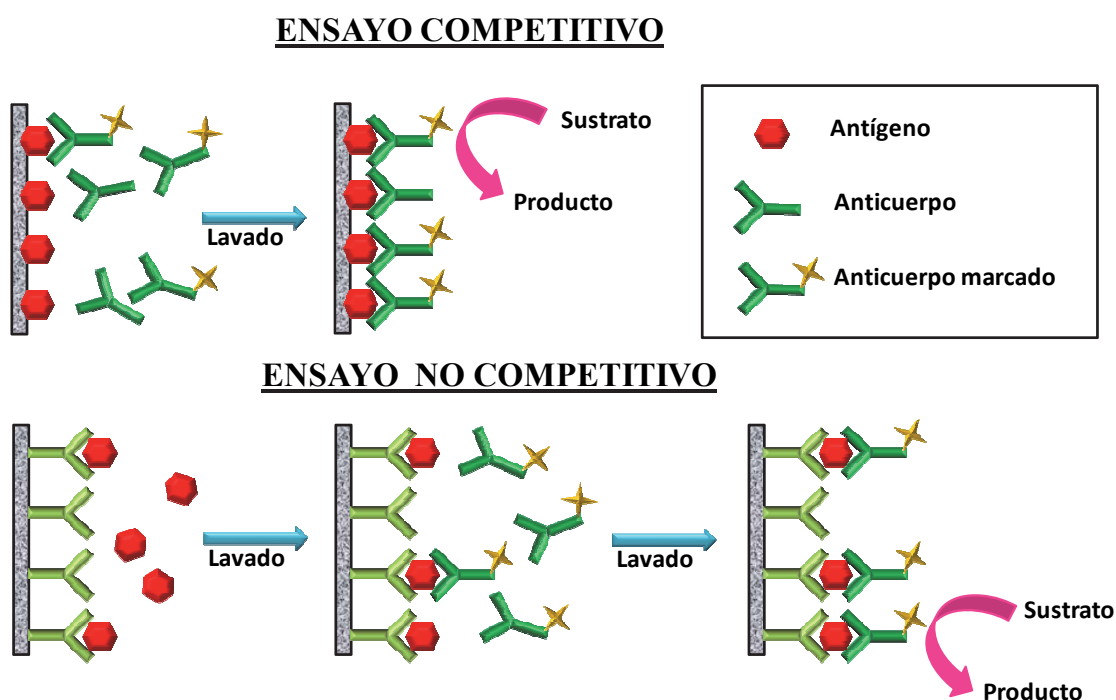


Figura 1.3 Representación esquemática del ensayo enzimático competitivo (superior), y no competitivo o sándwich (inferior).

- **Ensayo competitivo:** el reactivo de captura inmovilizado (antígeno o anticuerpo según el caso) se pone en contacto con una disolución de la muestra que contiene el analito en el que se añade además una cantidad perfectamente conocida del reactivo marcado (idéntico al analito que se

quiere determinar). Su enlace con el reactivo de captura es proporcional a las cantidades en solución. Después de una etapa de lavado en la que se elimina el sobrenadante, se determina la cantidad de reactivo marcado que ha reaccionado mediante la medida de la actividad enzimática superficial.

- **Ensayo no competitivo o sándwich:** El reactivo de captura se inmoviliza en el soporte sólido, y posteriormente se incuba la muestra que contiene el analito (antígeno) de manera que se enlace selectivamente. Después de una etapa de lavado en que se retira el exceso de muestra, se incuba con una disolución que contiene en exceso un segundo anticuerpo marcado, que se enlaza a un epítipo del antígeno diferente al que lo ha hecho el primer anticuerpo. Se separa el sobrenadante y se monitoriza la reacción enzimática proporcionando la información analítica requerida.

1.4.1.2. Ventajas y desventajas de los inmunosensores

Los inmunosensores presentan una serie de ventajas respecto al inmunoensayo clásico. La principal es la proximidad del material biológico y el transductor, que permite detectar de manera más sensible los cambios producidos por la reacción de reconocimiento. A su vez, los inmunosensores se caracterizan por detectar el antígeno en periodos cortos de tiempo y la posibilidad de miniaturizar la instrumentación asociada, lo que conlleva poder realizar ensayos en condiciones diferentes a las de fuera de un laboratorio^{9, 12}. Además el uso de anticuerpos confiere otras ventajas como las que se detallan a continuación:

- Aunque la generación de anticuerpos es complicada en el caso de moléculas de antígeno de pequeñas dimensiones (haptenos) en las que hay que recurrir a su unión con moléculas mayores, en general, se pueden obtener anticuerpos, potencialmente, a partir de cualquier tipo de estructura química.
- Las técnicas inmunoquímicas son de elevada sensibilidad.
- Gracias a la homogeneidad en la estructura química de los anticuerpos, se pueden estandarizar procedimientos comunes para su inmovilización, estabilización, calibración, etc...
- Las moléculas de anticuerpo, en general, son más estables que las enzimas, por lo que cabe esperar mayor tiempo de vida del biosensor.

Sin embargo, el uso de anticuerpos también tiene ciertas limitaciones, sobre todo por el hecho de que la interacción antígeno-anticuerpo es difícilmente detectable por medición directa. Las principales se resumen a continuación:

- Debido a las elevadas constantes de afinidad entre anticuerpo y antígeno y su fuerte interacción, se dificulta la capacidad de regeneración de la superficie sensora.
- La tendencia del material inmunológico a adsorberse inespecíficamente sobre las superficies provoca fenómenos interferentes.
- La determinación directa (electroquímica, óptica,..) posterior al reconocimiento molecular puede ser difícil.
- La mayoría de las veces se necesita un marcaje de las inmunoespecies con enzimas, moléculas fluorescentes, etc...
- La producción y separación de los anticuerpos es cara, además de requerir periodos largos de tiempo.

1.4.2. Biosensores enzimáticos

Las enzimas (E) son proteínas (a excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico) que actúan como catalizadores en los sistemas biológicos aumentando la velocidad de las reacciones químicas sin que haya un consumo de las mismas gracias a su capacidad de regeneración, pudiendo empezar así un nuevo ciclo de reacción. Su alta especificidad permite transformar sustratos (S) o grupos de sustratos en sus respectivos productos (P)¹³.

La función catalítica de la enzima depende de su estructura tridimensional y del plegamiento de las cadenas polipeptídicas, ya que normalmente es dentro de esta estructura proteica donde se encuentra el centro activo encargado de acoger al sustrato. Éste está compuesto por unos 5-10 aminoácidos (AA)¹⁴, formando clústers de grupos funcionales que determinan la afinidad, especificidad y capacidad de transformación química de S a P¹. En muchos casos las enzimas requieren de elementos no proteicos llamados cofactores sin los cuales no puede llevarse a cabo la reacción catalítica¹³. Estos cofactores pueden ser iones metálicos o moléculas orgánicas, denominándose entonces coenzimas, llegando incluso a requerir su presencia conjunta para la reacción de catálisis.

Las diversas interacciones que intervienen en la unión de los dos componentes son fuerzas de Van der Waals, iónicas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, etc. La cavidad en las enzimas proporciona una conformación de estado de transición (ET), por lo que es más fácil conseguir una determinada geometría molecular. Esto conlleva una disminución de la energía de activación, y en consecuencia una aceleración de la reacción como se puede ver en la Figura 1.4 .

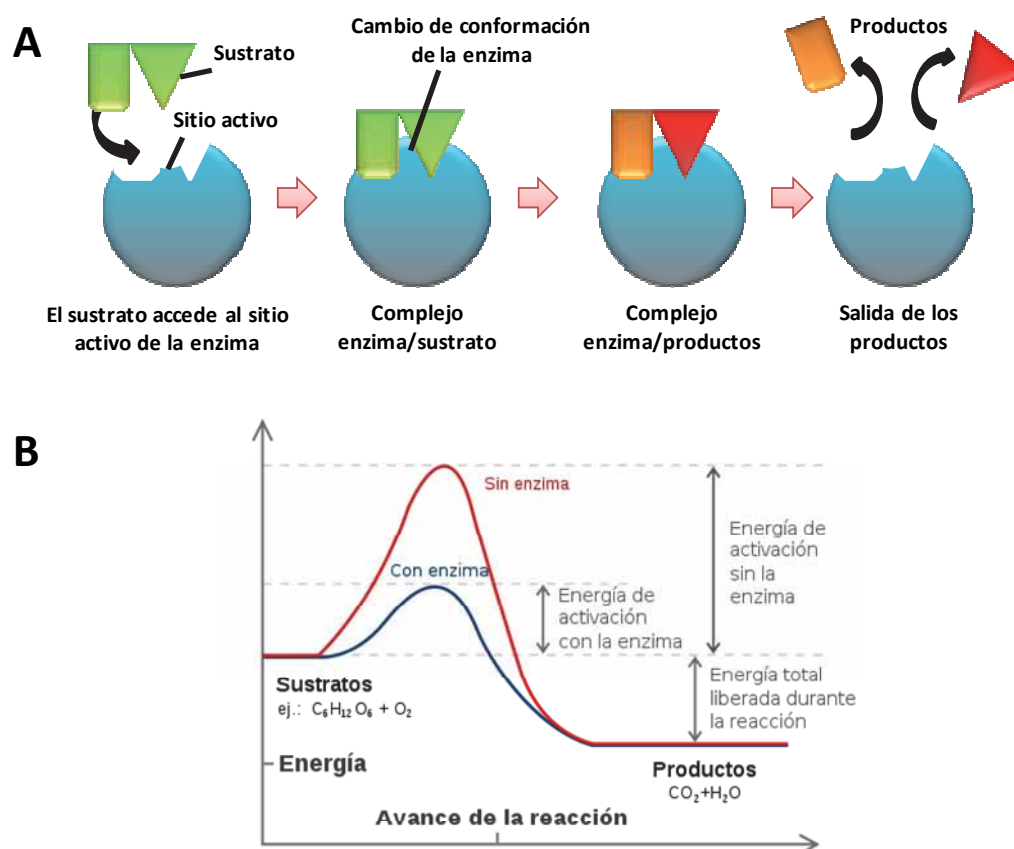


Figura 1.4 A) Esquema de reacción de un sustrato catalizado por una enzima. B) Esquema energético de la reacción de catálisis llevado a cabo por una enzima en comparación con el mismo proceso cuando no hay presencia de ésta.

1.4.2.1. Cinética enzimática

Cuando se emplean enzimas con finalidades analíticas como es el caso de los biosensores enzimáticos, un factor importante a tener en cuenta es la sensibilidad. Ésta se relaciona directamente con la afinidad de la enzima por el sustrato y con la velocidad con la que el complejo ES evoluciona para dar el producto. Mediante el análisis de Michaelis y Menten¹⁵ de la cinética de las reacciones enzimáticas se pueden llegar a cuantificar diferentes factores.

Suponiendo un mecanismo sencillo de catálisis para un único sustrato, observamos que la reacción se desarrolla en dos etapas diferentes como se muestra a continuación:



K_1 i K_{-1} son las constantes de formación del complejo ES y su inversa respectivamente, y la K_2 la de formación del producto. Mediante tratamientos matemáticos aplicando la *hipótesis del estado estacionario*, se obtiene la siguiente ecuación donde encontramos una relación directa entre la velocidad de formación del producto y la concentración de sustrato y enzima en la solución:

Ecuación 6
$$v = \frac{k_2[E][S]}{K_M + [S]}$$

Donde K_M es la constante de Michaelis-Menten y se define como:

Ecuación 7
$$K_M = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

Si se tiene en cuenta que la velocidad máxima (V_{max}) es igual a $K_2[E]$, la Ecuación 6 se puede expresar como:

Ecuación 8
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Utilizando esta ecuación, podemos representar la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato como se muestra en la Figura 1.5

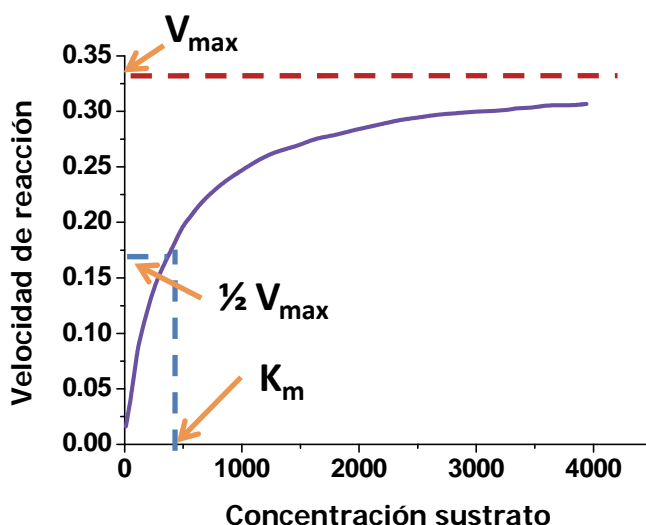


Figura 1.5 Representación gráfica de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato cuando se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten.

Como se representa en el gráfico, la K_M puede calcularse experimentalmente como la concentración del sustrato cuando la velocidad es la mitad de la velocidad máxima. A partir de su valor, podemos tener una estimación de la afinidad de la enzima por el sustrato, valores bajos de K_M corresponden así a enzimas con poca afinidad, ya que se cumple que $K_1 \gg K_{-1} + K_2$.

A partir del gráfico se pueden observar además dos zonas diferenciadas. En la primera de ellas, donde $[S] \ll K_M$, la velocidad de reacción varía linealmente con la concentración, lo que facilita la cuantificación del sustrato. En la segunda en cambio, cuando $K_M \gg [S]$, la velocidad no presenta una relación lineal respecto el sustrato. Cuando las concentraciones de éste son muy elevadas, la velocidad de reacción es constante, y trabajando en esta zona puede determinarse la concentración de enzima.

1.4.2.2. Cooperatividad. Ecuación de Hill

Cuando una enzima o receptor presenta diversos sitios de unión, se puede producir el efecto de cooperatividad. Este efecto también se da en casos de moléculas formadas por largas cadenas como ADN, proteínas y fosfolípidos.

Así, cuando un sustrato se une a una subunidad enzimática, el resto de las subunidades son estimuladas y se activan. La cooperatividad puede ser positiva o negativa. De ser positiva, la unión del sustrato a un sitio activo produce un aumento en la afinidad de la enzima por el sustrato, por el contrario, cuando se trata de cooperatividad negativa, ésta unión produce que la afinidad disminuya.

Para determinar el grado de cooperatividad en el caso de las enzimas alostéricas, se emplea la ecuación de Hill. Considerando un caso de fijación cooperativa donde una enzima contiene n sitios de fijación y están todos ellos ocupados simultáneamente con una constante de disociación K tenemos que:



donde K se define como:

Ecuación 10
$$K = \frac{[E] \cdot [S]^n}{[ES_n]}$$

y el grado de saturación viene dado por:

Ecuación 11
$$Y = \frac{[ES_n]}{[E_0]}$$

Ecuación 12
$$1 - Y = \frac{[E]}{[E_0]}$$

Al combinar las ecuaciones 10 y 12 se obtiene:

Ecuación 13
$$\text{Log } [Y/(1-Y)] = n \log [S] - \log K$$

En la gráfica de Hill se toma ésta última ecuación pero cambiando n por n_H , que corresponde en este caso a la constante de Hill, teniendo así la ecuación 14:

Ecuación 14
$$\text{Log } [Y/(1-Y)] = n_H \log [S] - \log K$$

Esta ecuación describe la fijación de ligandos a proteínas alostéricas en la región del 50 % de saturación (de 10 a 90 %). Fuera de esta región, la curva experimental se desvía de línea recta. La constante de Hill es el valor de n_H y se define como una medida de la cooperatividad. Cuanto más alto es el valor de n_H , mayor es el grado de cooperatividad. Así tenemos que cuanto n_H es 1, no existe cooperatividad, si $n_H < 1$ la cooperatividad es negativa y si $n_H > 1$ es positiva ¹⁶.

1.4.2.3. Ventajas y limitaciones de los biosensores enzimáticos

Cuando se trabaja con enzimas, su actividad enzimática puede controlarse normalmente por el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la presencia de cofactores, de manera que pueden optimizarse estos factores con el fin de mejorar la cinética de las reacciones químicas catalizadas.

Aunque el tiempo de vida para un biosensor enzimático es una de sus mayores limitaciones, ya que su estabilidad suele ser baja, también puede aumentarse utilizando distintas técnicas como la estabilización química o mejorando los métodos de inmovilización.

Existen muchos tipos de enzimas, siendo las oxidoreductasas las más empleadas en el campo de los biosensores, y de las más estables que se pueden encontrar. Éstas catalizan reacciones enzimáticas en las que se dan procesos de oxidación o reducción, pero necesitan de oxígeno u otros cofactores. Por otro lado, también existen las enzimas menos estables o difíciles de purificar, por tanto es difícil su uso aislado. En estos casos, la estrategia que se lleva a cabo es el uso de orgánulos celulares, células completas o tejidos que contengan las enzimas en su medio natural de forma más estable.

Así, podemos resumir las principales ventajas del uso de enzimas en los siguientes puntos:

- Las enzimas presentan una elevada selectividad
- Su respuesta es rápida
- Hay una elevada variedad de enzimas disponibles
- Son autorregenerables
- Su uso facilita la construcción de dispositivos

1.5. Estrategias de inmovilización

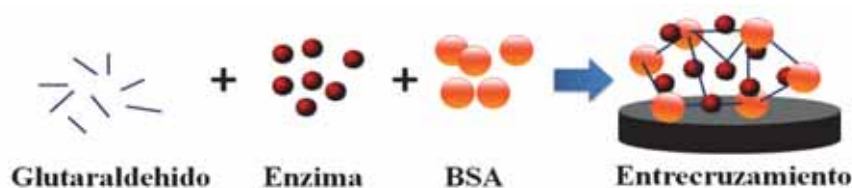
Uno de los pasos cruciales en la construcción de un biosensor es conseguir una buena inmovilización del material biológico de reconocimiento. La fijación de éste material en soportes sólidos es lo más habitual ya que conlleva ventajas como el aumento de la sensibilidad de las medidas. Por ello, cada vez más se desarrollan nuevos protocolos en los que se busca aumentar la estabilidad de la fijación. A continuación se exponen las técnicas generales y más comunes de inmovilización en superficies sensoras:

- *Adsorción física*: Este protocolo se basa en la unión del material biológico mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van de Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc. Presenta ventajas como ser una técnica simple, de bajo coste y en la que la actividad de las biomoléculas se mantiene prácticamente intacta. Sin embargo, es poco reproducible y estable, perdiendo sensibilidad con el uso por pérdida del material inmovilizado, además de su fácil alteración por cambios de pH, temperatura o fuerza iónica.

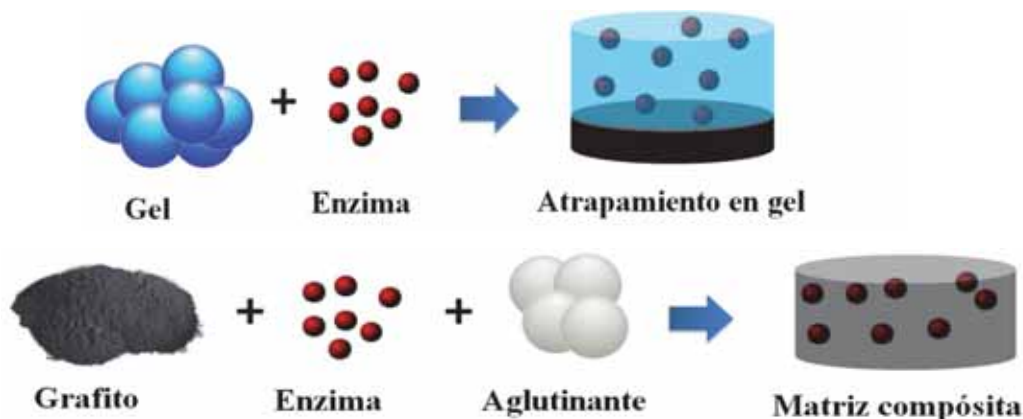


- *Entrecruzamiento (crosslinking)*: Se consigue una mayor estabilidad que en el caso de la adsorción. El entrecruzamiento se basa en un atrapamiento físico del material biológico (generalmente enzimas) mediante la reacción con un agente bifuncional como el glutaraldehído, diisocianato de hexametileno, etc. Los dos grupos carbonilo terminales reaccionan con los grupos amino de las proteínas para dar agregados insolubles de elevada masa molecular, inmovilizando las biomoléculas por atrapamiento dentro de la

matriz reticulada. Debido a que la actividad de las enzimas puede verse alterada en el proceso de entrecruzamiento, dado que el agente bifuncional puede enlazarse con sus centros activos, se reparte su efecto añadiendo proteínas no activas con las que reaccionar como la albúmina de suero bovino (BSA). Aunque se puede controlar el grado de entrecruzamiento variando la cantidad de agente bifuncional, las capas de membrana formadas en general presentan problemas en la difusión de los sustratos. Un inconveniente añadido es la toxicidad de los agentes bifuncionales empleados.



- Atrapamiento:* Este método tiene la ventaja de preservar bien la actividad biológica del material que se retiene mediante atrapamiento físico en matrices de geles como agar, nylon, almidón, poliacrilamida, o en matrices electrónicas compósitas rígidas como el grafito-teflón o el grafito-resina epoxy. En el primer caso, usando matrices de geles, hay que optimizar el procedimiento de inmovilización para que las biomoléculas no se liberen con facilidad y los biosensores pierdan sensibilidad. Con este método se inmovilizan habitualmente microorganismos o enzimas en matrices poliméricas. Cuando se trata de biocompósitos, se prepara un material en el que las biomoléculas (enzimas, anticuerpos) se encuentran en el seno del transductor (grafito en polvo), los posibles mediadores o cofactores, y un material aglutinante que hace el papel de matriz soporte.





- *Retención con membranas:* Este método de inmovilización permite la retención de las biomoléculas utilizando membranas semipermeables al sustrato de porosidad variable. Se consigue así un buen contacto entre el material biológico y el transductor, se preservan sus propiedades, se limita la contaminación y la biodegradación, además de ser estable a los cambios de pH, temperatura, fuerza iónica y composición del medio. Algunos ejemplos son las membranas de acetato de celulosa que retienen las proteínas y retrasan la difusión de algunos iones interferentes, las de nafión excluyen aniones...



- *Unión covalente:* Se basa en la formación de enlaces covalentes entre la superficie del sensor, previamente activada y los grupos funcionales de las proteínas (-NH₂, -COOH, -OH, -SH, -Ph-OH, etc) que no estén directamente implicados en la acción catalítica o en la reacción de afinidad. Los mayores inconvenientes de este tipo de inmovilización es que muchas veces se daña la actividad biológica, que requiere procedimientos complicados y tediosos y son de difícil reproducibilidad. Sin embargo, en términos de estabilidad es una de las técnicas de inmovilización con mejores resultados, obteniendo superficies modificadas biológicamente que forman parte de biosensores con largo tiempo de vida.



1.6. Membranas de polisulfona

Como se verá más adelante, la polisulfona (PS) tiene un papel destacado en el presente trabajo. Es un material de gran estabilidad química¹⁷, térmica y mecánica, y de carácter relativamente hidrofóbico. Puede trabajar por tanto a altas temperaturas (presenta un temperatura de transición vítrea de 195 °C)¹⁸ y en amplio rango de pH (2-13), sin embargo es soluble en solventes orgánicos poco polares¹⁹⁻²¹ como la dimetilformamida (DMF) o el cloroformo.

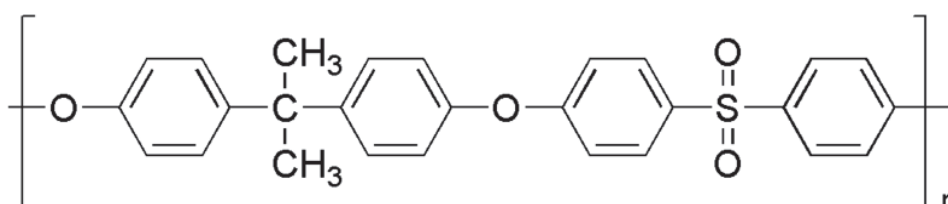


Figura 1.6 Estructura química de la polisulfona.

Gracias a sus extraordinarias propiedades, es un polímero muy empleado como material para la construcción de membranas de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración o de ósmosis inversa. Además, su fácil fabricación, la reproducibilidad de sus propiedades y del tamaño de poro, hace de la polisulfona un material útil para aplicaciones en hemodiálisis, recuperación de aguas residuales, procesamiento de alimentos y bebidas, y separación de gases. Asimismo, gracias a su resistencia térmica, permite realizar procesos de esterilización, y sumado a su biocompatibilidad, permiten su uso también dentro del campo médico.

Dejando de lado todas estas aplicaciones, la polisulfona presenta otra propiedad interesante y muy útil en el campo de los biosensores. Es una matriz que acepta fácilmente en su interior un amplio rango de componentes, desde grafito, nanotubos de carbono, nanopartículas, a mediadores electroquímicos o material biológico como enzimas, hormonas, anticuerpos, etc. Por lo tanto, una membrana de polisulfona que incorpore todos estos componentes puede convertirse en una membrana de reconocimiento y a su vez en un transductor electroquímico, dando lugar a un biosensor compacto.

1.6.1. Inversión de fase

La inversión de fase (IF) es un proceso en el cual un polímero pasa de manera controlada de estado líquido a estado sólido²². El proceso involucra la conversión, por lo

tanto, de soluciones poliméricas líquidas homogéneas en un sistema de dos fases, una de ellas rica en polímero formando la estructura rígida de la membrana, y una fase líquida pobre en polímero formando los poros. La separación de fases en los sistemas poliméricos viene determinada por parámetros cinéticos y termodinámicos²⁰, tales como potenciales químicos, difusividades de los componentes individuales y la energía libre de Gibbs de mezclado del sistema total.

El proceso de inversión puede llevarse a cabo mediante tres procesos diferentes:

- Termocongelación de una mezcla de dos o más componentes
- Por evaporación de un solvente volátil de una mezcla de dos o más componentes
- Por adición de un no solvente a la solución polimérica homogénea.

La mayoría de membranas poliméricas empleadas para procesos de filtración se elaboran a partir de la última técnica mencionada. Consiste en depositar un film de la disolución polimérica y sumergirla posteriormente en un baño que contiene el no solvente; con lo que el solvente es desplazado por el no solvente precipitando el polímero.

Las características morfológicas de la membrana preparada pueden modificarse controlando parámetros como la temperatura, la concentración del polímero o el tipo de disolvente. Además, las membranas resultantes pueden ser simétricas o asimétricas, siendo las primeras de morfología constante y las segundas de variación de ésta a lo largo de su grosor.

En la presente tesis se ha empleado polisulfona como polímero, disuelta en DMF y utilizando agua como agente no solvente que induce su precipitación por inversión de fase, con lo que se consiguen membranas porosas y asimétricas. Su eficacia a la hora de incorporar anticuerpos^{23, 24}, enzimas^{25, 26} o metalotioneínas²⁷ ha sido exitosamente comprobada en nuestro grupo y se ha destinado a la construcción de biosensores tanto amperométricos como potenciométricos²⁷.

1.7. Nanotubos de carbono en el mundo de los biosensores

Los nanotubos de carbono son una forma alotrópica del carbono, al igual de los fullerenos, el grafito o el diamante. Se trata de formas tubulares con diámetros del orden de nanómetros. Desde que fueron descubiertos por Iijima en 1991²⁸, se han

aplicado a diversos campos de investigación gracias a sus excelentes propiedades químicas, mecánicas y electrónicas²⁹⁻³¹.

Se pueden diferenciar dos clases principales de nanotubos, los de pared simple (SWCNT) y los de pared múltiple (MWCNT). La estructura de los SWCNT se basa en una lámina de grafeno enrollada de tal forma que se genera un cilindro, a menudo encapsulado en sus extremos, donde la mayoría de sus propiedades son consecuencia de la estructura simétrica que los caracteriza. Así, según la dirección de enrollado, pueden darse diferentes grados de quiralidad, y obtener nanotubos de carbono metálicos o semiconductores.

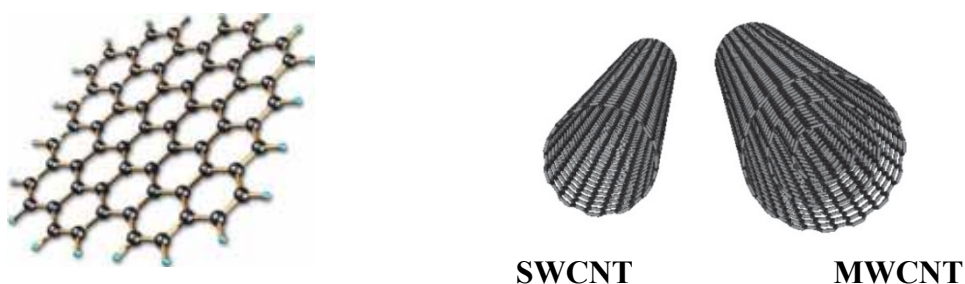


Figura 1.7 Representación de una lámina de grafeno a la izquierda, y de nanotubos de carbono a la derecha.

Los MWCNT se basan también en cilindros enrollados de manera concéntrica, entre los cuáles se halla una separación de 0.3-0.4 nm, llegando a diámetros de tubo entre 2 y 100 nm, en comparación con los 0.4 a 1 nm típicos de los SWCNT.

Ejemplo de sus aplicaciones como elementos metálicos son su uso en circuitos nanométricos, supercapacitores, emisores de campo, sondas electroquímicas nanométricas. Su alta conductividad los hace especialmente interesantes en el campo de los biosensores electroquímicos, como se demuestra en gran cantidad de trabajos llevados a cabo en los últimos años. Por otro lado, los CNT semiconductores se han aplicado a sensores de escala nanométrica, transistores y aparatos fotovoltaicos.

Uno de los problemas de los CNT es que debido a las fuerzas de Van der Waals, tienden a formar agregados, con lo cual, se disminuye la superficie activa de los mismos. Por esta razón, y con el objetivo de aprovechar al máximo sus propiedades, se han estudiado diversas estrategias para disminuir este fenómeno. En disoluciones acuosas, por ejemplo, se trabaja con tensioactivos, en disoluciones orgánicas, aunque se dispersan más fácilmente, el número de solventes que se emplean es limitado, algunos

de ellos son la DMF, dimetil acetamida y la N-metil pirrolidina (NMP). Sin embargo, se están obteniendo muy buenos resultados de dispersión utilizando los líquidos iónicos.

Aunque en general, son poco reactivos, se pueden funcionalizar mediante tratamientos químicos agresivos creando por ejemplo hidroxilos o grupos carboxílicos en sus paredes. De esta manera abren una puerta a la inmovilización de diferentes moléculas entre las que se incluyen los enlaces con material biológico, muy útil dentro del desarrollo de biosensores.

1.8. Puertas lógicas

Uno de los objetivos principales de la tecnología actual es el desarrollo de ordenadores de tamaño reducido, y de bajo consumo, con lo que recientemente ha crecido la motivación para la búsqueda de nuevos sistemas de procesamiento alternativos. En pleno proceso de expansión, se está investigando el procesamiento de información basado en el uso de biomoléculas. Por ello, se están haciendo grandes esfuerzos para implementar los sistemas de puertas lógicas moleculares en el campo de la electrónica.

Las puertas lógicas se definen como dispositivos electrónicos, conformados a partir de otros componentes electrónicos discretos, y son la expresión física de los operadores booleanos. El algebra de Boole, llamada así por el matemático inglés George Boole, es la herramienta matemática utilizada para el análisis de circuitos electrónicos digitales.

La electrónica digital se centra en el proceso de señales discretas, que sólo poseen dos estados posibles. En las señales digitales la amplitud varía rápidamente de un límite al otro, sin que existan (teóricamente) estados o fases entre esos dos límites posibles. Estos límites representan estados lógicos altos o bajos y normalmente se los toma como “1” o “0” (sistema binario), con una convención que fija qué valores mínimos y máximos corresponden a cada uno.

Los elementos básicos de cualquier circuito digital son las puertas lógicas, a las que se les puede considerar como cajas negras, donde se ponen valores a su entrada, y un valor de salida. Con el objetivo de representar todas las posibles combinaciones entre las entradas y la salidas se utilizan las denominadas “tablas de verdad”, que no son más que una lista de todas las posibles combinaciones de valores en las entradas, y que valor

de la salida corresponde en cada caso. En la Figura 1.8 se representan las puertas lógicas principales junto con su tabla de verdad, NOT, AND, OR y XOR, pero existen otras como la IF y las negaciones de las anteriores (NAND, NOR, NXOR).

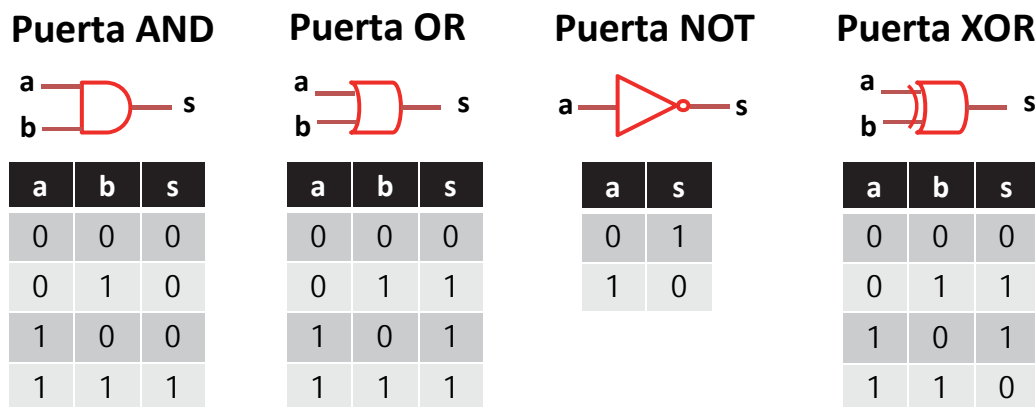


Figura 1.8 Representación de las principales puertas lógicas con sus correspondientes tablas de verdad.

Así, se han descrito una gran variedad de sistemas moleculares y supramoleculares que emplean diferentes tipos de biomoléculas, como ADN o las enzimas, funcionando mediante operaciones lógicas como las explicadas anteriormente³²⁻³⁶.

En el caso concreto de las enzimas, las puertas lógicas se implementan utilizando reacciones químicas del tipo $A+B \rightarrow C$ o $A+B \rightarrow C+D$, donde se interpreta la concentración de los metabolitos (sustratos) A y B como entradas y la del sustrato C como salida (en su caso D no se considera como salida). Las entradas y las salidas se interpretan de forma que si la concentración de dicha sustancia es menor que cierto umbral se representa con un “0” lógico y si supera otro cierto umbral se representa con un “1”. En la Figura 1.9 se muestra un ejemplo de puerta lógica AND basada en enzimas.

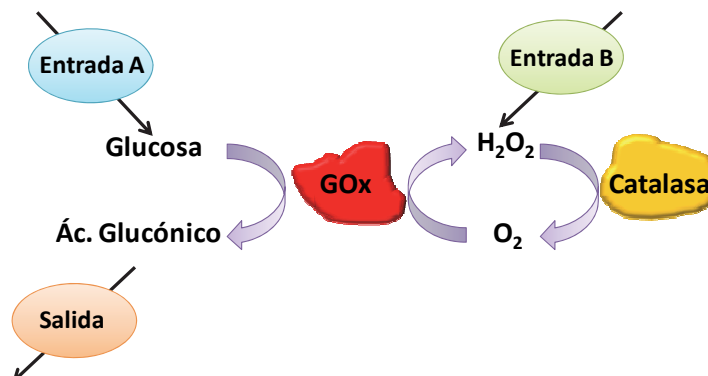


Figura 1.9 Ejemplo de una puerta lógica AND basada en enzimas. En este caso, la glucosa y el H_2O_2 actúan como señales de entrada y la producción de ácido glucónico como salida. Figura adaptada³⁷.

1.9. Bibliografía

1. S. Alegret, M. Valle and A. Merkoçi, *Sensores electroquímicos*, Servei de Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, 2004.
2. M. Alvarezicaza and U. Bilitewski, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, A525-A533.
3. A. W. Bott, *Current Separations*, 1995, **14**, 104-109.
4. W. J. Albery, *Electrode kinetics*, Clarendon Press, Oxford, 1975.
5. F. Horemans, A. Weustenraed, D. Spivak and T. J. Cleij, *Journal of Molecular Recognition*, 2012, **25**, 344-351.
6. K. Haupt, A. V. Linares, M. Bompert and B. T. S. Bui, *Topics in current chemistry*, 2012, **325**, 1-28.
7. E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988.
8. J. R. Regueiro, *Inmunología :biología y patología del sistema inmune*, Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2002.
9. B. Hock, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **347**, 177-186.
10. D. J. Holme and H. Peck, *Analytical biochemistry*, Longman, 1998.
11. J. P. Gosling, *Immunoassays: A Practical Approach*, Oxford University Press, USA, 2000.
12. A. L. Ghindilis, P. Atanasov, M. Wilkins and E. Wilkins, *Biosens. Bioelectron.*, 1998, **13**, 113-131.
13. *Principles of enzymology for technological applications*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1993.
14. M. P. Byfield and R. A. Abuknesha, *Biosens. Bioelectron.*, 1994, **9**, 373-400.
15. R. A. Copeland, *Enzymes :a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, Wiley, New York etc., 2000.
16. A. Fersht, *Estructura y Mecanismo de Los Enzimas*, Reverté, Barcelona, 1980.
17. G. Pozniak, B. Krajewska and W. Trochimczuk, *Biomaterials*, 1995, **16**, 129-134.
18. S. P. Nunes and K. V. Peinemann, *Membrane Technology: in the Chemical Industry*, Wiley, 2006.
19. J. H. Choi, J. Jegal and W. N. Kim, *J. Membr. Sci.*, 2006, **284**, 406-415.
20. C. Torras, F. Ferrando, J. Paltakari and R. Garcia-Valls, *J. Membr. Sci.*, 2006, **282**, 149-161.
21. M. Tian, R. Zhong, S. Sun, C. Zhao, X. Huang and Y. Yue, *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, **103**, 3818-3826.
22. M. Mulder, *Basic principles of membrane technology*, Kluwer Academic, Dordrecht etc., 1996.
23. S. Sánchez, M. Roldan, S. Pérez and E. Fàbregas, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6508-6514.
24. S. Sánchez, M. Pumera and E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **23**, 332-340.
25. S. Sánchez, M. Pumera, E. Cabruja and E. Fàbregas, *Analyst*, 2007, **132**, 142-147.
26. B. Prieto-Simón and E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **22**, 131-137.
27. A. Gonzalez-Bellavista, S. Atrian, M. Munoz, M. Capdevila and E. Fabregas, *Talanta*, 2009, **77**, 1528-1533.
28. S. Iijima, *Nature*, 1991, **354**, 56-58.
29. E. T. Thostenson, Z. F. Ren and T. W. Chou, *Composites Science and Technology*, 2001, **61**, 1899-1912.
30. A. Merkoçi, *Microchim. Acta*, 2006, **152**, 157-174.
31. Y. Yan, M. B. Chan-Park and Q. Zhang, *Small*, 2007, **3**, 24-42.
32. T. Niazov, R. Baron, E. Katz, O. Lioubashevski and I. Willner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**, 17160-17163.

33. M. Pita, J. Zhou, K. M. Manesh, J. Halamek, E. Katz and J. Wang, *Sens. Actuator B-Chem.*, 2009, **139**, 631-636.
34. R. Baron, O. Lioubashevski, E. Katz, T. Niazov and I. Willner, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, **45**, 1572-1576.
35. A. Credi, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, **46**, 5472-5475.
36. E. Katz and V. Privman, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 1835-1857.
37. R. Baron, O. Lioubashevski, E. Katz, T. Niazov and I. Willner, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 8451-8456.

2. Objetivos

2. Objetivos

En el campo de los biosensores siempre se ha buscado obtener dispositivos sencillos, robustos, portables y económicos, además de una gran selectividad y sensibilidad con el objetivo final de poder llevar a cabo la función para la cual se ha diseñado. En la mayoría de casos, como en el presente trabajo, su aplicación en muestras reales. Así los objetivos concretos en nuestro caso han sido los siguientes:

- Desarrollo de biocompuestos basados en nanotubos de carbono y polisulfona mediante la técnica de inversión de fase sobre electrodos serigrafiados de carbono.
- Caracterización química y morfológica del material biocompuesto.
- Evaluación de diferentes estrategias para el desarrollo y optimización de biosensores enzimáticos basados en membranas de polisulfona y nanotubos de carbono para la determinación de L-lactato, y posterior aplicación en muestras de vino.
- Desarrollo de biosensores enzimáticos basados en membranas de polisulfona y nanotubos de carbono para la determinación de histamina en muestras de pescado.
- Construcción de biosensores basados en membranas de Nafión para el desarrollo de puertas lógicas enzimáticas.

3. Experimental

3. Experimental

En este capítulo se presenta la metodología general empleada en la construcción de electrodos serigrafiados, así como la técnica de inversión de fase para la incorporación de material biológico en membranas de polisulfona y nanotubos de carbono. Se describen brevemente, además, las técnicas utilizadas para la caracterización de la misma. También se detalla el procedimiento para llevar a cabo el desarrollo de membranas a partir de reacciones de entrecruzamiento. Se describen también, de manera general, los procedimientos de las medidas electroquímicas realizadas con los biosensores preparados. No se pretende dar una explicación detallada de cada caso en particular ya que el procedimiento específico se puede encontrar en los artículos publicados (ver capítulos 6 y 7).

3.1. Construcción de sensores serigrafiados

Durante el período en que se ha desarrollado la tesis doctoral se han empleado tres tipos diferentes de sensores serigrafiados de carbono. A continuación se dará una breve explicación de cada uno de ellos.

3.1.1. Sensores contruidos en la Universidad Autónoma de Barcelona

El diseño de electrodos de trabajo serigrafiados se llevó a cabo en nuestro grupo de investigación en trabajos anteriores¹. Se trata de la construcción de soportes electródicos a partir de la superposición de diferentes capas de tinta sobre bases de policarbonato (PC), que posteriormente desempeñarán la función de electrodos de trabajo.

Para ello, fue necesaria la fabricación de pantallas a partir de patrones diseñados por Autocad con las características deseadas. Éstas pueden ser de dos tipos, de acero inoxidable que permiten el paso libre de tinta, o de hilo de polímero blando que facilitan un control exhaustivo del grosor de las capas. Su construcción fue llevada a cabo por dos empresas, PANTUR S.L. (Sabadell, Barcelona) encargada de la fabricación de los marcos, y PAYMSER S.L. (Cerdanyola del Vallès) de las máscaras. Las tintas utilizadas, todas ellas proporcionadas por la empresa Acheson colloids Co. (USA), fueron inicialmente de Ag/AgCl (Electrodag 6037 SS) para imprimir la pista conductora, a continuación de carbono (Electrodag 400 B) que

define el área del electrodo de trabajo, y por último, una tinta aislante (Minico M 7000). Esta última encapsula la superficie conductora evitando que la pista conductora de plata entre en contacto con la disolución donde se llevan a cabo las medidas electroquímicas. Todo el proceso de impresión realizó a cabo en el Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) en colaboración con el doctor Enric Cabruja. Para ello se empleó una máquina semi-automática de la marca Dek, modelo Dek 248. En el proceso de impresión, la presión aplicada se estableció en $7 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ a una velocidad de 20 mm/s.

Así, el procedimiento de construcción de los sensores serigrafiados consistió en la deposición consecutiva de las tintas de plata, carbono y aislante, en las que posteriormente a cada etapa de impresión, la tinta se curaba en la estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante una 30 min.

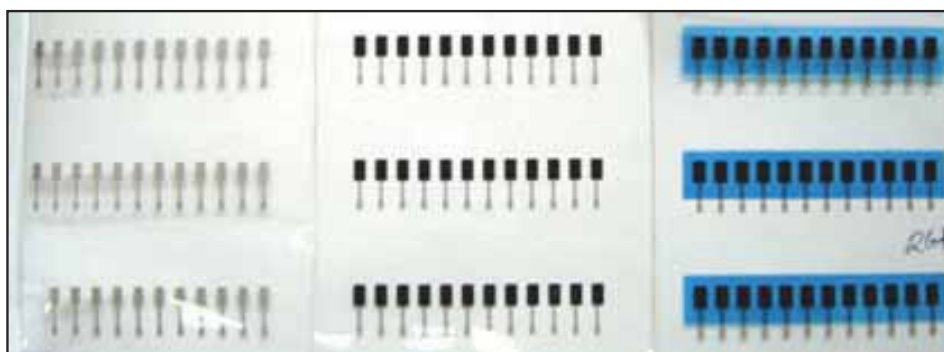


Figura 3.1 Representación de las tres etapas de impresión de tinta de plata, carbono y aislante.

El resultado final es un sensor de trabajo en forma rectangular de dimensiones $5 \times 9 \text{ mm}$, que posteriormente será modificado con las membranas de PS/CNT.

3.1.2. Sensores comerciales de Dropsens

Los sensores comerciales se obtuvieron de la empresa Dropsens S.L. (Llanera, Oviedo). Constan de tres electrodos, trabajo, referencia y auxiliar, necesarios para llevar a cabo medidas amperométricas. Se trata también de electrodos serigrafiados, en este caso sobre soportes cerámicos ($3.4 \times 1.0 \times 0.05 \text{ cm}$), a partir de tintas de carbono (trabajo y auxiliar) y plata (referencia y contactos eléctricos). El electrodo de trabajo es circular y presenta un diámetro de 4 mm. Al contener los tres electrodos serigrafiados en el mismo soporte, estos dispositivos son óptimos para trabajar con volúmenes de pocos microlitros (DRP-110) así como introduciéndolos

en disolución (DRP-C110). En la Figura 3.2 se representa un esquema de estos sensores:

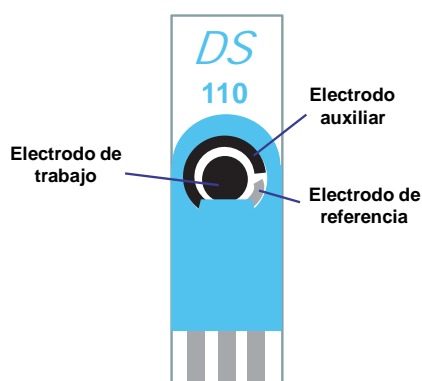


Figura 3.2 Esquema de un sensor comercial de Dropsens que incorpora en el mismo soporte los electrodos de trabajo, referencia y auxiliar.

En algún caso también se ha trabajado con sensores duales de Dropsens formados por dos electrodos de trabajo, un auxiliar y uno de referencia de las mismas características que los anteriores (DRP-C1110).

3.1.3. Sensores construidos en la Universidad Tor Vergata de Roma

Estos sensores, al igual que los comerciales de Dropsens, contienen tres electrodos serigrafados (trabajo, referencia y auxiliar) mediante el uso de tintas y la superposición de diferentes capas. Fueron suministrados por el laboratorio de biosensores de la Universidad de Florencia, y posteriormente fueron modificados y utilizados en la Universidad Tor Vergata de Roma durante una estancia realizada en esta última.

Para ello se emplearon una máquina DEK 245 y las tintas de grafito (Electrodag 421), plata (Electrodag 477 SS RFU) y la aislante (Electrodag 6018 SS) suministradas por Acheson Italiana². Los soportes sobre los que se serigrafaron los electrodos fueron láminas de poliéster flexible (Autostatat HT5). Así, se obtuvieron sensores formados por un electrodo auxiliar y uno de trabajo (diámetro de 3 mm), ambos de grafito, y uno de referencia (a partir de la tinta de plata) como muestra la Figura 3.3. Después de cada deposición de tinta, ésta se dejó secar a 110 °C durante 10 min.

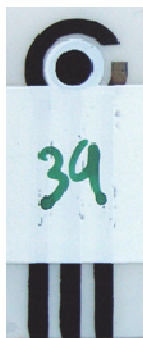


Figura 3.3 Electrodo serigrafiado sobre poliéster constituido por dos electrodos de grafito (auxiliar y trabajo) y por uno de plata (referencia) siguiendo la misma configuración serigráfica que en la figura Figura 3.2.

Para las aplicaciones posteriores que se dieron a estos electrodos, se modificó el electrodo de trabajo mediante la deposición de azul de Prusia (PB) que actúa como mediador electroquímico³. Esta modificación de los sensores consistió en la formación *in situ* del mediador a partir de soluciones precursoras, 0.1 M de ferricianuro potásico y 0.1 M de cloruro de hierro (III), ambas en HCL 10 mM. Primero se depositaron 20 μ l de FeCl_3 cubriendo todo el área del electrodo de trabajo evitando el contacto con el resto de los electrodos, y a continuación se añadieron 20 μ l de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. El paso siguiente fue agitar la lámina de sensores en un agitador orbital durante 10 min y a continuación enjuagar la solución resultante de PB con unos mililitros de HCL 10 mM. Finalmente, se secó durante 1 h a 100 °C para obtener una capa de PB estable y más activa. Estos sensores se han de conservar en seco, a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

3.2. Inversión de fase

Como se ha descrito previamente en el apartado 1.6.1 del capítulo 1, la inversión de fase es un proceso en el cual un polímero disuelto, en presencia de un no solvente, precipita de manera que se forma el polímero sólido. Ésta propiedad, característica de la polisulfona empleada en nuestro trabajo, puede aprovecharse para la incorporación de material biológico durante el proceso de precipitación, de manera que éste queda inmovilizado en la membrana recién formada. Así, en este trabajo el proceso de inversión de fase se ha utilizado para la construcción de biosensores mediante la inmovilización de biomoléculas en membranas de PS/CNT.

Dado que la polisulfona es un polímero no conductor, su uso como matriz para sensores amperométricos es limitado. Es por ello, y por su capacidad para incorporar

una gran diversidad de materiales, que se ha desarrollado una mezcla de PS/CNT que confiera al nuevo material ambas propiedades, la posibilidad de incorporar biomoléculas y obtener un material compósito conductor que actúe como transductor.

La metodología para la preparación de membranas poliméricas por inversión de fase y su uso en sensores se lleva a cabo en varios pasos. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que las proporciones de CNT, polisulfona y mediadores electroquímicos empleados en cada estudio se han modificado en base a diferentes factores. Uno de ellos es la morfología del sensor de trabajo utilizado, ya que su adherencia a la membrana formada varía en cada caso.

El primer paso consiste en la disolución de la polisulfona sólida en DMF, que actúa como solvente en el proceso de inversión de fase. A continuación se añaden los CNTs, y en los casos que convenga, los mediadores electroquímicos. Los CNTs han de ser purificados previamente a su uso debido a que contienen partículas metálicas. Esta purificación se lleva a cabo mediante ebullición en HNO₃ 6 M en agitación durante 2 horas y su posterior secado a 80 °C. Dado que los CNTs tienden a agregarse, la mezcla se dispersa durante 1 h para su homogeneización. Por otro lado, se ha de preparar la disolución de inversión de fase. Se trata de una disolución acuosa en la que pueden añadirse las biomoléculas que actuarán como receptores.

Como se puede observar en la Figura 3.4, según el tipo de electrodos empleados para el desarrollo de los biosensores se utilizan dos metodologías diferentes para la construcción de la membrana de PS/CNT. Para los electrodos planos construidos en nuestro laboratorio, el primer paso es superponer la pantalla serigráfica metálica que permite imprimir sobre el electrodo de trabajo. Colocando una cantidad apropiada de la mezcla de PS/CNT preparada sobre la pantalla y arrastrándola de manera homogénea y controlada, se consigue serigrafiar la nueva capa que dará lugar a la membrana. Después de esto, los electrodos se sumergen en la disolución de inversión de fase durante 5 minutos y se lavan durante 5 minutos más en una disolución agitada de tampón de fosfato (PBS). Todo el proceso debe llevarse a cabo con la máxima celeridad posible ya que la mezcla de PS puede empezar a precipitar antes de estar en contacto con la solución de inversión de fase por el efecto de la humedad ambiental.

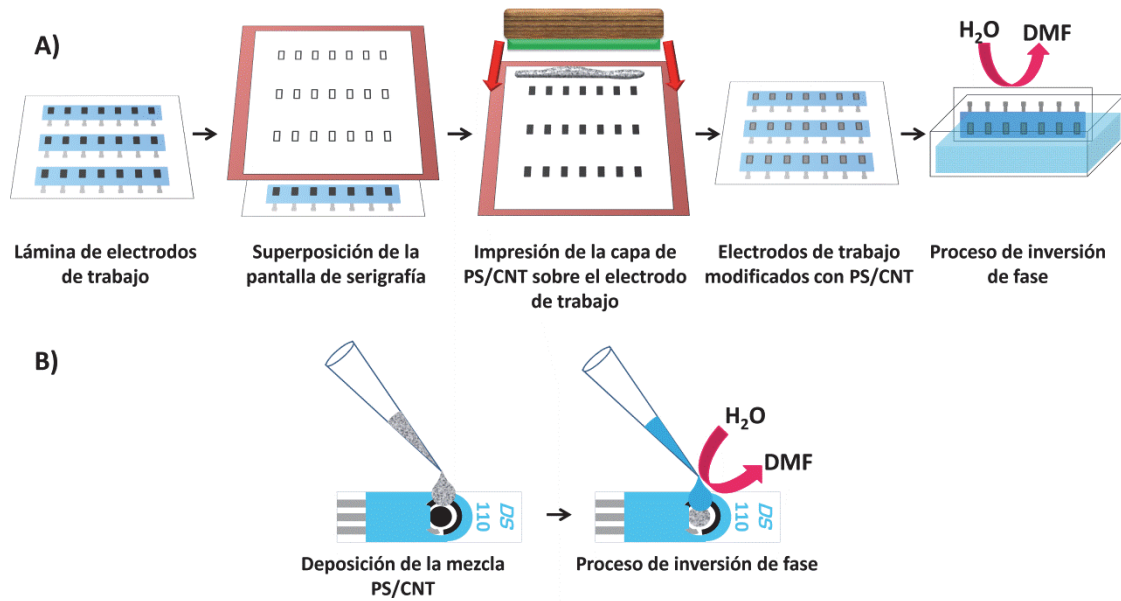


Figura 3.4 Metodología llevada a cabo para la realizar la inversión de fase en los electrodos desarrollados por nuestro grupo (A) y los comerciales de Dropsens (B).

Por otro lado, cuando se utilizan los sensores comerciales de Dropsens se requiere un paso previo de activación a su modificación con la membrana de polisulfona. Con ello se consigue una buena calidad de la señal amperométrica cuando se trabaja con el biosensor reduciendo el ruido eléctrico. Con este objetivo se llevan a cabo medidas de voltamperometría cíclica en una disolución de ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$) 0.05 M preparada en tampón fosfato, entre -0.6 V y + 0.6 V vs. Ag/AgCl como electrodo de referencia, 100 mV/s como velocidad de barrido y 9 mV de saltos de potencial. Con la aplicación de 5 ciclos se obtiene una mejora considerable de la calidad de la señal, como se muestra en la Figura 3.5 .

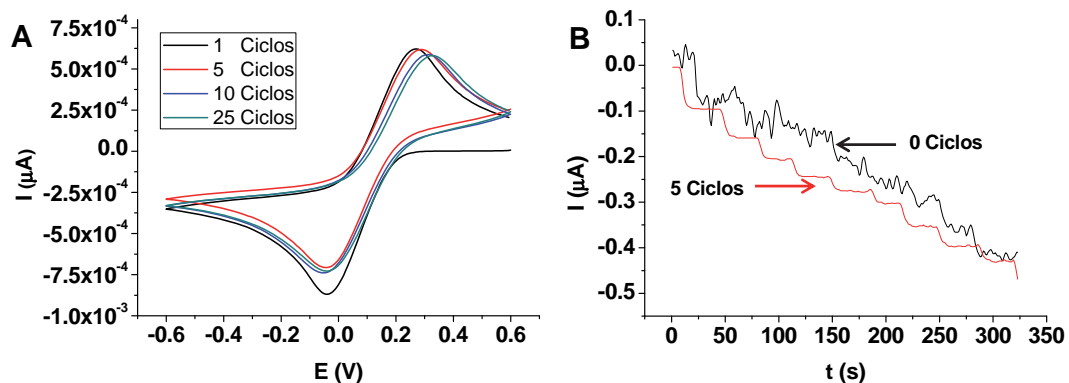


Figura 3.5 En el gráfico A se muestra un proceso de activación mediante 5 voltamperometrías cíclicas realizada con el sensor comercial de Dropsens en una disolución de $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM preparada en tampón fosfato. En el gráfico B se muestran las medidas experimentales obtenidas cuando se realizan calibrados añadiendo diferentes alícuotas de la misma disolución de ferricianuro para un sensor en el que se ha llevado a cabo el paso de activación con 5 ciclos, y en el que no.

Una vez realizado este paso, se procede a la formación de la membrana sobre el sensor. Para ello se deposita una gota de la mezcla PS/CNT cubriendo la totalidad del electrodo de trabajo con cuidado para no alterar los electrodos de referencia y auxiliar. El paso siguiente es la inversión de fase, depositando una gota de la disolución acuosa sobre el electrodo de trabajo que se lava transcurridos 5 minutos. Cuando no están en uso, los biosensores se mantienen a 4 °C sumergidos en una disolución de tampón fosfato.

3.3.Reacciones de entrecruzamiento

Las membranas desarrolladas a partir de reacciones de entrecruzamiento se realizaron en la Universidad Tor Vergata de Roma durante una estancia de 3 meses para la construcción de sensores de glucosa. Para ello se emplearon los sensores serigrafiados descritos en el apartado 3.1.3.

En este caso, el objetivo es inmovilizar la enzima glucosa oxidasa (GOx) en la membrana. Para ello se prepara una mezcla de volumen total 150 μ l a partir de las disoluciones siguientes:

- 100 μ l de disolución enzimática formada por 4 mg de BSA y 1 mg de GOx disueltas en tampón fosfato 0.05 M. 0.1 M KCl a pH 7.4.
- 20 μ l de glutaraldehído (2.5 % en agua)
- 30 μ l de Nafion (5 % en etanol)

La disolución resultante se mezcla para obtener una buena homogeneidad y finalmente se depositan 10 μ l, mediante una micropipeta, sobre el electrodo de trabajo cubriendo toda su superficie y finalmente, se deja secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Todo el proceso se efectúa en vitrina dada la toxicidad del glutaraldehído.

3.4.Caracterización morfológica de la membrana de PS/CNT

Para la caracterización morfológica de la membrana compósita de PS/CNT se han realizado análisis de la misma mediante dos técnicas de microscopía; por un lado, se llevó a cabo un estudio superficial mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), y por el otro, se estudió tanto su superficie como su morfología interna gracias a la microscopía láser confocal (CSLM).

3.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite conseguir imágenes de alta resolución mediante el uso de un haz de electrones que incide sobre las muestras. Los electrones son acelerados gracias a la aplicación de un campo eléctrico, que al salir del cañón, son enfocados por las lentes condensadora y objetiva para lograr una mayor precisión. El uso de las bobinas deflectoras permite efectuar un barrido sobre la muestra, consiguiendo así crear la imagen correspondiente a la topografía de la muestra.

La incidencia del haz de electrones con los átomos de la muestra produce diversas interacciones, entre ellas los electrones retrodispersados, radiación X, electrones Auger o los secundarios. Esta gran variedad de señales obtenidas confieren una amplia versatilidad al microscopio, proporcionando información morfológica y topográfica de la superficie de los sólidos.

Una de las condiciones que deben cumplir las muestras para poder obtener imágenes de SEM es que éstas han de ser conductoras, en el caso que no lo sean, pueden ser recubiertas con capas finas de oro, carbono, etc.

3.4.1.1. Preparación de las muestras

Para el estudio de la membrana compósita por SEM se procedió a su deposición sobre el electrodo de trabajo serigrafiado en policarbonato (PC) como soporte. Después de su inmersión en N₂ líquido, se efectuó un corte transversal para estudiar su perfil. Además, se cubrió la muestra con una fina capa de oro para hacerla más conductora y asegurar así la obtención de una imagen de calidad. Para ello, se empleó un microscopio electrónico Hitachi Ltd. (Tokio, Japón) del servicio de microscopía de la UAB.

3.4.2. Microscopía láser confocal (CLSM)

La microscopía láser confocal se engloba dentro de la microscopía óptica, en concreto en la microscopía de fluorescencia. En ella, la luz interacciona con la muestra a diferentes profundidades por lo que se pueden obtener imágenes de diferentes secciones (x-y-z) y reconstruir una imagen tridimensional. La ventaja que proporciona el uso de este tipo de microscopio es la combinación de medidas por reflexión y por fluorescencia, permitiendo además la superposición de las dos

imágenes. En el caso de las medidas de fluorescencia es muy frecuente el uso de fluorocromos, por lo que la longitud de onda de la fuente de luz (láser) se ha de corresponder con la de excitación de éstos^{4,5}.

El modo de reflexión (excitación a 488 nm y emisión de 480 a 500 nm) nos sirvió para caracterizar la estructura y topografía de la muestra. En cambio, el modo de fluorescencia permitió visualizar la inmovilización de los anticuerpos en la membrana. Para ello, se utilizó como fluorocromo el anticuerpo AntiRIgG-Alexa568 (marcado con grupos fluorescentes), que visualizamos en el canal rojo (580 a 730 nm de emisión) usando la línea de 561 nm de un diodo láser.

3.4.2.1. Preparación de las muestras

Las diferentes muestras de membrana compósita a analizar fueron preparadas por inversión de fase sobre los electrodos de grafito según la metodología habitual. Posteriormente, el área del electrodo a estudiar fue recortada del resto y se colocó en un portaobjetos con una cavidad, para minimizar la pérdida de enfoque debido al grosor del material. Se cubrió con un cubreobjetos y se selló con cera. Las imágenes se obtuvieron finalmente con el microscopio Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany).

3.5. Evaluación electroquímica

En el campo de los biosensores electroquímicos, es de vital importancia estudiar y caracterizar el sistema mediante diferentes técnicas con el fin de determinar las condiciones en las que tendrán lugar los análisis. En la presente tesis la más utilizada ha sido la voltamperometría cíclica.

3.5.1. Voltamperometría cíclica

Esta técnica electroanalítica es de gran importancia en el campo de la electroquímica, especialmente en el estudio de procesos redox, mecanismos de reacción, propiedades electrocatalíticas, etc. Permite, por tanto, obtener información previa del comportamiento del transductor y de las especies electroactivas en un amplio intervalo de potenciales.

La voltamperometría cíclica consiste en la medida de intensidad de corriente cuando se aplica un barrido de potencial al electrodo de trabajo (en disolución

estática) de manera triangular, como puede verse en la Figura 3.6A, donde éste varía linealmente con el tiempo. El resultado de representar la intensidad (I) obtenida en función del potencial (E) da lugar al voltamperograma.

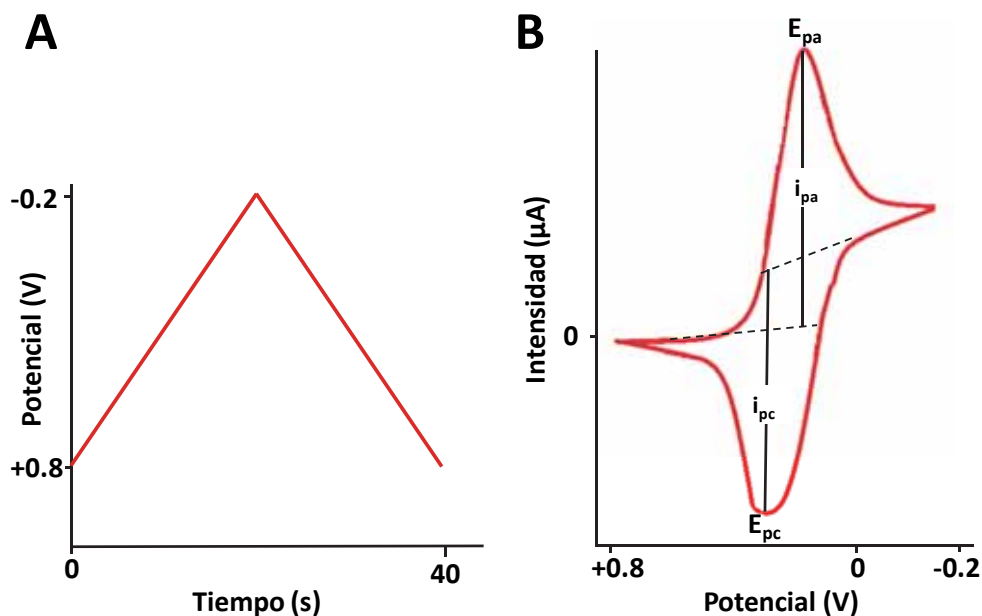


Figura 3.6 El gráfico A muestra la variación del potencial aplicado a un sensor vs el electrodo de referencia en función del tiempo para realizar voltamperometría cíclica. En B se representa un ejemplo de voltamperograma asociado al barrido de potencial anterior.

En el barrido hacia potenciales positivos (barrido directo), el electrodo aumenta su capacidad oxidante, de manera que si la especie electroactiva estaba inicialmente en su forma reducida, se favorece ahora su oxidación sobre la superficie del electrodo con el consiguiente aumento de la intensidad anódica. En el caso contrario, hacia potenciales negativos tenemos el llamado barrido inverso, donde aumenta la intensidad catódica correspondiente a la reacción de reducción. En la Figura 3.6 se muestran los parámetros más importantes del voltamperograma cíclico, el potencial de pico catódico (E_{pc}), el de pico anódico (E_{pa}), la corriente de pico catódica (i_{pc}) y la de corriente anódica (i_{pa}).

En procesos reversibles donde la transferencia de electrones es más rápida que el resto de procesos, la separación entre los picos E_{pa} y E_{pc} debe cumplir la siguiente relación:

Ecuación 15
$$\Delta E = |E_{pa} - E_{pc}| = 2.303 \frac{RT}{nF}$$

Con lo que se concluye que a mayor separación de los picos, el sistema es más irreversible.

3.6.Procedimiento de medida

El estudio electroquímico de los biosensores ha consistido básicamente en dos tipos de medidas amperométricas, la voltamperometría cíclica y las calibraciones, que como se explica a continuación, varían ligeramente según el tipo de sensor o el equipo con el que se hayan efectuado.

3.6.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica se ha llevado a cabo utilizando dos equipos. Para los electrodos de trabajo serigrafiados en nuestro grupo, los cuáles necesitan electrodos auxiliar y de referencia externos, se empleó un analizador electroquímico AUTOLAB PGSTAT10 (Eco Chemie BV, Holanda). Para los electrodos comerciales y los construidos en la universidad Tor Vergata se ha utilizado el bipotenciostato μ Stat 200 de Dropsens (Oviedo, España).

En el primer caso, se utiliza como electrodo de referencia Ag/AgCl (900200, Orion Thermo, West Palm Beach, Florida) con disolución externa KCl 0.1 M y como auxiliar un electrodo de platino. Junto a ellos se coloca el electrodo de trabajo serigrafiado, tal como muestra la Figura 3.7, lo más cercano posible al resto, de manera que la caída de potencial por la separación entre ellos sea mínima. Para realizar el análisis por voltamperometría cíclica, los electrodos se sumergen en un vaso de precipitados con la disolución de medida sin agitación. Por otro lado, cuando trabajamos con los sensores serigrafiados que contienen los tres electrodos en el mismo soporte (a los que denominaremos sensores completos), la medida puede efectuarse simplemente con la deposición de unos pocos microlitros de disolución cubriendo los 3 electrodos (ver Figura 3.7).

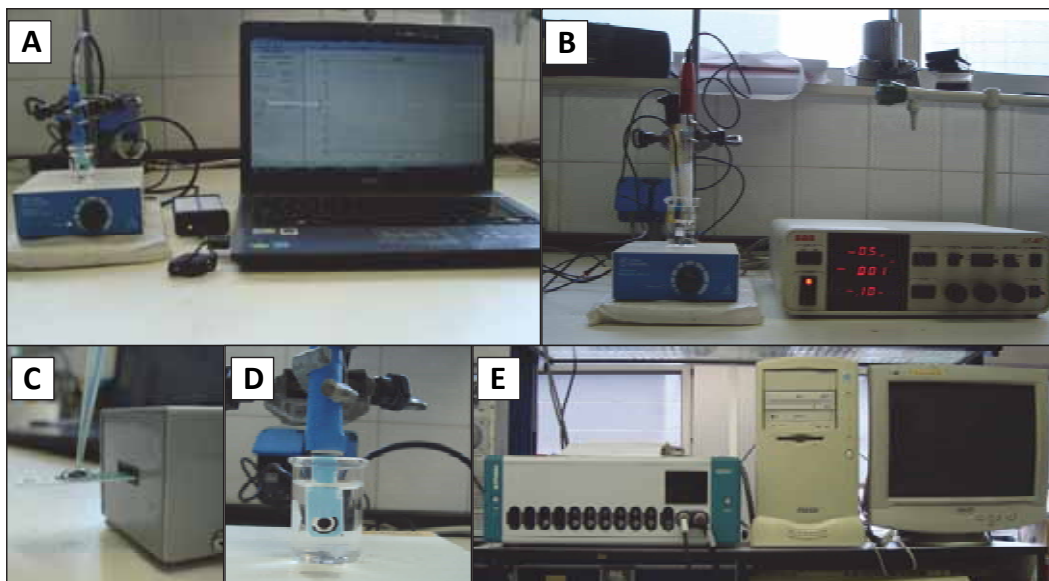


Figura 3.7 A) Medidas amperométricas llevadas a cabo por el bipotenciostato μ Stat 200 de Dropsens B) Medidas amperométricas realizadas con el potenciostato Bioanalytical System BAS LC-4C C) Deposición de una gota de solución sobre el sensor de Dropsens D) Realización de medidas hidrodinámicas con el electrodo de Dropsens sumergido en solución E) Equipo AUTOLAB PGSTAT 10.

3.6.2. Calibraciones

Para el estudio de los biosensores construidos, tanto si se trata de optimizaciones del sistema como de análisis de muestras reales, se han realizado calibrados amperométricos en los que se ha trabajado a un potencial constante y se ha evaluado la intensidad de corriente resultante. A continuación se describe la metodología utilizada en las diferentes calibraciones realizadas según el tipo de sensor, de equipo, etc.

Calibraciones directas:

Para las calibraciones directas, los electrodos se sumergen en la disolución de medida, generalmente tampón fosfato 0.1 M y KCl 0.1 M como electrólito soporte. Las determinaciones se llevan a cabo mediante agitación magnética constante, por lo que se trata de medidas amperométricas hidrodinámicas.

Una vez conectado el sistema electroquímico de medida y la consiguiente aplicación de un potencial constante, se ha de esperar a la estabilización del sistema antes de empezar las mediciones. Éstas se efectúan tras distintas adiciones del sustrato, variando el tiempo de estabilización según el tipo de biosensor. Las medidas y el registro se han efectuado con dos equipos: el potenciostato

Bioanalytical System BAS LC-4C y el de Dropsens bipotenciostato μ Stat 200. A partir de los resultados obtenidos, se pueden construir las curvas de calibración.

El uso de sensores completos, combinado con el potenciostato de Dropsens, permite construir curvas de calibrado a partir de la deposición de microvolumenes de disolución sobre el conjunto de los electrodos. En este caso, también se requiere un tiempo de estabilización del sensor y realizar el cambio de disoluciones en un corto plazo de tiempo.

Adiciones estándar:

Se han llevado a cabo medidas por adición estándar para el análisis de muestras reales en disolución agitada. Después de la estabilización del sensor en tampón fosfato, se añade la disolución estándar y posteriormente se adicionan las alícuotas del analito.

En algún estudio, para este tipo de análisis se han utilizado electrodos duales de Dropsens para efectuar medidas diferenciales. En estos casos, cada uno de los electrodos de trabajo se ha modificado con una membrana de PS/CNT con y sin elemento de reconocimiento. Del registro de las medidas se pueden obtener por separado las señales de intensidad medida por cada uno de los electrodos. En este caso, las medidas sólo pueden realizarse con el bipotenciostato de Dropsens. Éste tipo de medidas permite obtener una señal resultante que elimina interferencias eléctricas y electroquímicas.

3.7. Bibliografía

1. S. Sánchez Ordoñez, Universitat Autònoma de Barcelona, 2008.
2. A. Cagnini, I. Palchetti, I. Lioni, M. Mascini and A. P. F. Turner, *Sens. Actuator B-Chem.*, 1995, **24**, 85-89.
3. F. Ricci, A. Amine, G. Palleschi and D. Moscone, *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**, 165-174.
4. C. Charcosset, A. Cherfi and J. C. Bernengo, *Chemical Engineering Science*, 2000, **55**, 5351-5358.
5. M. Ferrando, A. Rozek, M. Zator, F. Lopez and C. Guell, *J. Membr. Sci.*, 2005, **250**, 283-293.

4. Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

En este capítulo se presentarán los resultados obtenidos en el estudio de los biosensores desarrollados en el seno del grupo de sensores y biosensores (GSB) de la Universidad Autónoma de Barcelona, donde se ha llevado a cabo gran parte del trabajo realizado, además de una breve discusión de ellos. También se presenta el trabajo realizado durante una estancia de en la Universidad Tor Vergata de Roma.

A continuación se presenta la lista de publicaciones a las que ha dado lugar esta tesis doctoral, que pueden consultarse en el capítulo “Artículos publicados” y en “Anexos” (los pendientes de publicación).

- ✓ S. Sánchez, M. Roldan, **S. Pérez**, and E. Fàbregas, 'Toward a Fast, Easy, and Versatile Immobilization of Biomolecules into Carbon Nanotube/Polysulfone-Based Biosensors for the Detection of Hcg Hormone', *Analytical Chemistry*, 80 (2008), 6508-14.
- ✓ **Sandra Pérez**, Samuel Sanchez, and Esteve Fabregas, 'Enzymatic Strategies to Construct L-Lactate Biosensors Based on Polysulfone/Carbon Nanotubes Membranes', *Electroanalysis*, 24 (2012), 967-74.
- ✓ **Sandra Pérez Rafael**, Alexis Vallee-Belisle, Esteve Fabregas, Kevin Plaxco, Giuseppe Palleschi, and Francesco Ricci, 'Employing the Metabolic "Branch Point Effect" to Generate an All-or-None, Digital-Like Response in Enzymatic Outputs and Enzyme-Based Sensors', *Analytical Chemistry*, 84 (2012), 1076-82.
- ✓ **Sandra Pérez Rafael**, Esteve Fàbregas Martínez, “Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples”, *Analyst*, 137 (2012), 3854-3861.
- ✓ **Sandra Pérez Rafael**, Jordi Bartrolí, Esteve Fàbregas Martínez, “Amperometric biosensor for the determination of Histamine in fish samples” (Enviado).

4.1. Estudio de la membrana compósita PS/CNT. Construcción de biosensores para la detección de la hormona hCG.

En este apartado se describe el estudio de la membrana de PS/CNT, preparada por inversión de fase (IF) sobre electrodos serigrafiados de carbono. Uno de los principales objetivos de este estudio fue determinar la morfología de la membrana a partir de la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía láser confocal (CSLM), además de permitir esta última observar la distribución del material biológico en ella. Así mismo, se han desarrollado inmunosensores para la determinación de la hormona

gonadotropina coriónica humana (hCG), por lo que también se ha caracterizado electroquímicamente el sensor y se han optimizado diferentes parámetros para llevar a cabo el análisis.

4.1.1. Caracterización de la membrana PS/CNT

Para el estudio de la membrana de PS/CNT se han obtenido imágenes por SEM y por CSLM.

A partir de las imágenes de SEM de la membrana de polisulfona (ver Figura 4.1), se observa que se trata de una membrana porosa. Por otro lado, cuando se incorporan los nanotubos de carbono, se consigue además un aumento en su rugosidad, incrementando así su superficie activa. Ambas propiedades dan como resultado la posibilidad de una mayor interacción y difusión de las especies involucradas en el sistema electroquímico dado. La imagen del perfil permite estimar el grosor de la membrana, siendo éste alrededor de unos 150 μm .

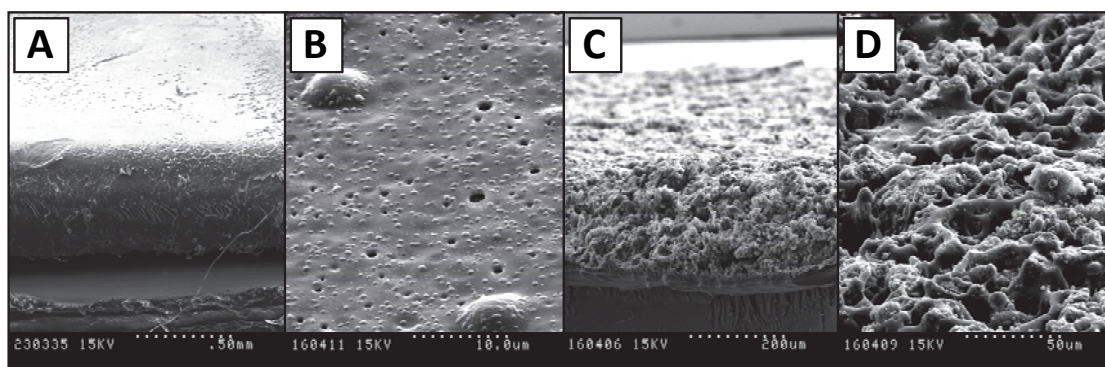


Figura 4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de 2 membranas preparadas por IF (empleando H_2O bidestilada como solución de IF) y depositadas sobre PC. (A) Perfil de la membrana de PS (B) Superficie ampliada de la membrana de PS (C) Perfil de la membrana de PS/CNT (D) Superficie ampliada de la membrana de CNT/PS.

Para el estudio por CSLM se prepararon 4 membranas de PS/CNT diferentes, se utilizaron anticuerpos RIgG (inmunoglobulina de conejo) y antiRIgG-Alexa568 (especie marcada con fluorocromo) para determinar la distribución de las biomoléculas por IF, la adsorción inespecífica sobre la membrana y la difusión de los anticuerpos para enlazarse a las especies complementarias inmovilizadas. El procedimiento para obtener cada una de las muestras que se evaluaron se muestran en la Tabla 1 y la Figura 4.2.

Tabla 1 Etapas y reactivos utilizados en cada tratamiento de preparación de las membranas estudiadas.

	Inversión de fase	Lavado (5 min)	Bloqueo (15 min)	Incubación (30 min)	Lavado (5 min)
a	H ₂ O bidestilada	Tampón TRIS	-	-	-
b	H ₂ O bidestilada	Tampón TRIS	BSA 2%	AntiRlgG-Alexa568 50 µg/ml	Tampón TRIS
c	AntiRlgG-Alexa568 20 µg/ml	Tampón TRIS	-	-	-
d	RlgG 20 µg/ml	Tampón TRIS	BSA 2%	AntiRlgG-Alexa568 50 µg/ml	Tampón TRIS

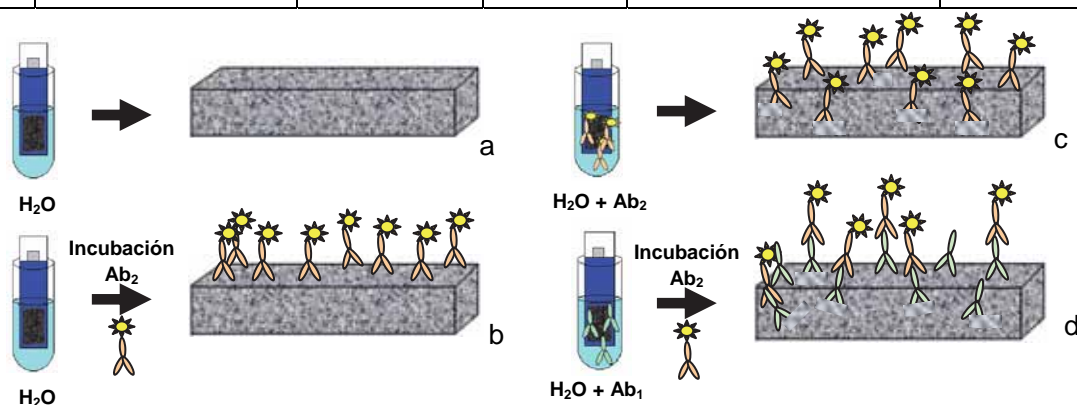


Figura 4.2 a) Compósito PS/CNT, b) Compósito PS/CNT después de una incubación con 50 µg/ml AntiRlgG-Alexa568 (adsorción inespecífica), c) Compósito PS/CNT con AntiRlgG-Alexa568 introducido por IF (20 µg/ml), d) Compósito PS/CNT con RlgG introducido por IF (20 µg/ml) e incubado posteriormente con AntiRlgG-Alexa568 (50 µg/ml).

La proyección de la imagen x-y de las 4 membranas, así como de la sección ortogonal (planos x-z y y-z) de cada una de ellas en modo reflexión, nos muestra una vez más la rugosidad de la membrana. De la comparación se deduce que no hay diferencias apreciables en la morfología de cada una de ellas, por lo que podemos afirmar que la introducción de anticuerpos por IF no altera las características superficiales.

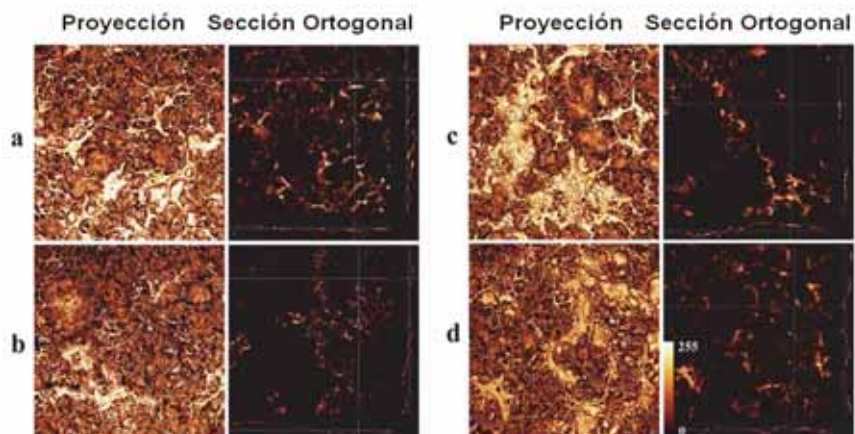


Figura 4.3 Imágenes de la proyección de las muestras y de la sección ortogonal a 10x, modo reflexión, hasta 70 μm de profundidad y con una distancia entre secciones de 9 μm . La nomenclatura a, b, c y d se corresponden a las muestras preparadas anteriormente.

Tabla 2 Grosor medio de las membrana determinado por CSLM en modo reflexión, y penetración del anticuerpo AntiRIgG-Alexa568 determinado en modo fluorescencia.

Membrana	Grosor (μm)	Desviación estándar	Penetración del anticuerpo AntiRIgG-Alexa568	Desviación estándar
a	121	10	-	-
b	150	7	16	3
c	105	7	22	2
d	135	7	24	3

Se determinó también para cada muestra el grosor de la membrana, ligeramente variable entre ellas (

Tabla 2). Esto puede ser debido a que el proceso de serigrafía de la capa de PS/CNT es manual a diferencia de la construcción del soporte eléctrico. También se ha estudiado la penetración de los anticuerpos marcados con Alexa568. Los resultados indican que la adsorción inespecífica es un fenómeno superficial, dado que la penetración es baja. Sin embargo, por IF y por difusión del anticuerpo AntiRIgG-Alexa568 para enlazarse con RIgG, los valores son similares y más altos que en el caso anterior, concluyendo así que el anticuerpo penetra lo suficiente para enlazarse al RIgG de las capas internas. Esta conclusión se corrobora cuando se cuantifica la fluorescencia de los primeros 15 μm , donde la intensidad de fluorescencia en las muestras c y d es más homogénea y alta. Al examinar la intensidad total, como era previsible, la mayor intensidad de fluorescencia se encuentra cuando el anticuerpo marcado se inmoviliza

por IF, por encima de cuando éste se inmoviliza por enlace al RIgG atrapado en la membrana, y al menos un orden de magnitud superior a cuando lo hace por adsorción.

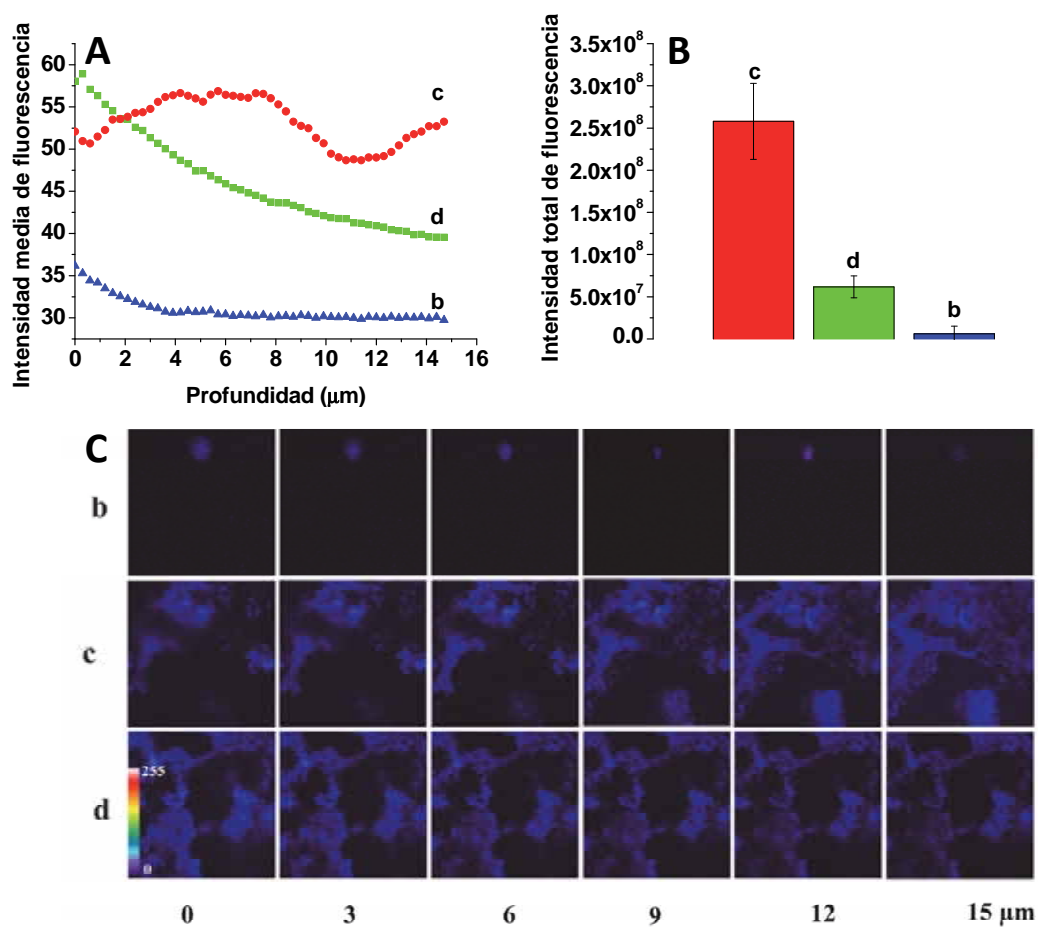


Figura 4.4 A) Representación de la intensidad media de fluorescencia en función de la profundidad en la membrana B) Representación de la intensidad de fluorescencia total en los primeros 15 μm C) Imagen del plano x-y en modo fluorescencia variando z cada 0.3 μm de la membrana en los primeros 15 μm.

4.1.2. Inmunoensayo

Como estudio previo al desarrollo del inmunosensor para la determinación de hCG, se comprobó la viabilidad de los biosensores con matriz de PS/CNT a partir de especies inmunológicas modelo RIgG, AntiRIgG y AntiRIgG-HRP. Se procedió a un inmunoensayo tipo sándwich donde el marcador enzimático HRP (peroxidasa de rábano picante) cataliza la reducción del H₂O₂ añadido en la disolución, lo que permite un seguimiento electroquímico. Para rebajar el potencial de trabajo a aplicar, ya que la reducción del H₂O₂ requiere potenciales altos, se incorporó hidroquinona en solución (HQ) como mediador electroquímico.

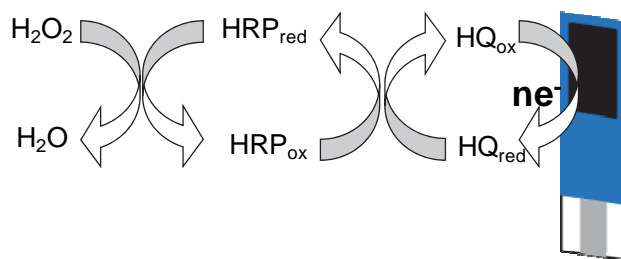


Figura 4.5 Representación esquemática de las reacciones electroquímicas en el biosensor.

El primer paso fue caracterizar electroquímicamente el biosensor y determinar el potencial de trabajo para la determinación de H_2O_2 . Para ello se llevó a cabo un estudio por voltamperometría diferencial de impulsos a distintas concentraciones de HQ (Figura 4.6 A) en la que se observó que el pico de potencial máximo se encontraba a -0.225 V. Además, se comprobó también que la señal amperométrica obtenida es directamente proporcional a la concentración del mediador. Por otro lado se realizaron voltamperometrías cíclicas de la membrana PS/CNT en tampón fosfato y en tampón fosfato más la HQ en el medio. Cuando se añade la HQ, la voltamperometría cíclica resultante aumenta su intensidad y presenta dos picos diferenciados; $E_{\text{pa}}=0.327$ y $E_{\text{pc}}=-0.122$ V (Figura 4.6 B).

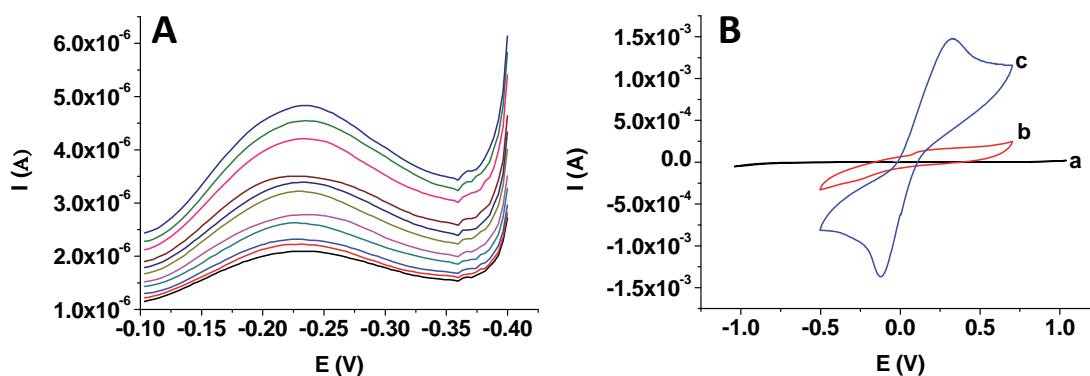


Figura 4.6 A) Voltamperometría diferencial de impulsos del sensor PS/CNT al añadir diferentes concentraciones de HQ de 5 a 30 mM aplicando un barrido de potencial desde -0.1 a -0.4 V. B) Voltamperometría cíclica de a) sensor de carbono no modificado en tampón fosfato (pH 7), b) sensor PS/CNT en tampón fosfato y c) tampón fosfato después de la adición de HQ (1.6 mM).

Una vez seleccionado -0.225 V como potencial de trabajo, se llevó a cabo la optimización de algunos parámetros del inmunoensayo y de análisis como la temperatura de incubación, el tiempo de contacto con el bloqueante BSA 2%, o el pH de la disolución tampón de fosfato para efectuar las medidas amperométricas. Para ello se prepararon biosensores donde se inmovilizó RIGG por IF y se incubaron con el

anticuerpo marcado con peroxidasa (AntiRIgG-HRP). La única excepción es cuando se estudia el tiempo de bloqueo, donde no se inmoviliza RIgG y la medida viene dada por la adsorción inespecífica del AntiRIgG-HRP sobre la membrana de PS/CNT. Finalmente, y dados los resultados obtenidos, los valores escogidos como óptimos fueron 37 °C, 15 min de bloqueo y pH 7.0 como se puede observar en la Figura 4.7. El paso siguiente fue llevar a cabo un inmunoensayo sándwich con las concentraciones de ambos anticuerpos constantes y variando la concentración del analito (RIgG) de 0.1 a 10 µg/ml en la etapa de incubación. De los resultados se deduce el intervalo lineal del ensayo, en este caso 0.1-3.0 µg/ml. El resto de parámetros del inmunoensayo se habían estudiado con anterioridad ¹.

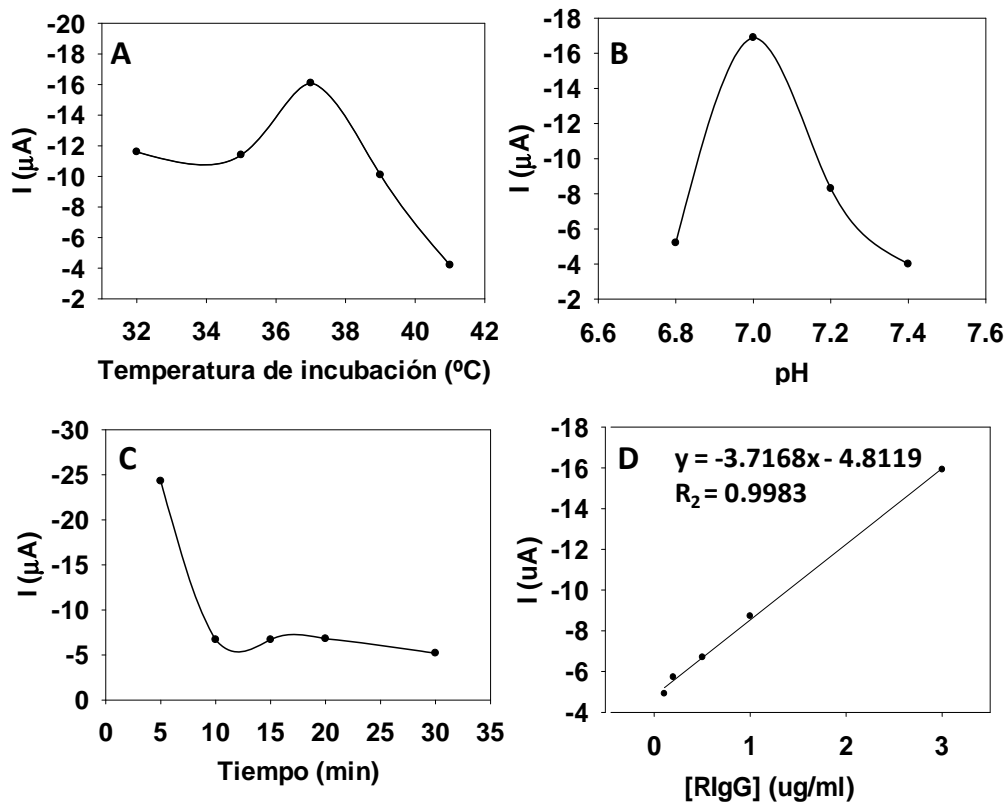


Figura 4.7 Preparación de la membrana mediante IF con RIgG 5.6 µg/ml e incubación posterior con AntiRIgG-HRP 1.37 µg/ml. Disolución bloqueante BSA 2%. Las medidas se realizan tras adiciones de H₂O₂ sobre disoluciones de 20 ml de PBS con HQ 1.8 mM A) Estudio del efecto de la temperatura en la etapa de incubación (tiempo de incubación 15 min, y tiempo de bloqueo 5 min) B) Estudio del pH de la disolución (tiempo de incubación 30 min, tiempo de bloqueo 15 min) C) Estudio del tiempo de bloqueo con BSA. D) Inmunoensayo sándwich realizado con concentraciones constantes de 5 y 2 µg/ml AntiRIgG y AntiRIgG-HRP respectivamente. Las medidas se realizan en 20 ml de tampón PBS, pH 7.0, HQ 1.8 M, y una concentración de H₂O₂ 2.84 mM (concentración a la que empieza la saturación de la enzima).

4.1.3. Determinación de la hormona hCG

La hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) es una glicoproteína que se segrega generalmente debido a un embarazo, por lo que se emplea como indicador de este estado. Sin embargo, también tiene otras aplicaciones diagnósticas como marcador tumoral en diferentes padecimientos neoplásicos, tanto en hombres como en mujeres.

La hCG aparece pocos días después de la concepción, y se presenta en cantidades elevadas y crecientes en sangre y orina durante el primer trimestre de un embarazo normal. Sin embargo, en algunos casos se dan anomalías como el llamado embarazo ectópico, en el que los niveles de esta hormona no crecen al mismo ritmo, de manera que se detectan niveles menores de hCG. Aunque los valores de hCG son menores en el caso de embarazos ectópicos (con desarrollo del embrión fuera de la cavidad uterina), es difícil limitar los valores para su detección, por lo que se opta por hacer un seguimiento de la evolución de la hormona durante un tiempo en lugar de realizar un ensayo puntual. Este tipo de embarazo es de gran riesgo para la madre ya que el embrión se desarrolla fuera del útero, generalmente en las trompas de Falopio, y puede llegar a producir incluso la muerte de la paciente. Por esta razón, se requiere de un diagnóstico lo más rápido posible y hace especialmente interesante el desarrollo de inmunosensores para su detección.

La hormona consta de dos subunidades, α y β , siendo esta última la que le confiere una mayor especificidad frente a la α , común en otras glicoproteínas de la misma familia como la hormona luteinizante (LH). Por este motivo, los inmunoensayos se llevan a cabo con la fracción β -hCG.

Dada la capacidad de la polisulfona para incorporar una amplia variedad de biomoléculas, se llevó a cabo un estudio previo al inmunoensayo competitivo en el que se incorporó β -hCG (4.9 $\mu\text{g/ml}$) por IF en la membrana PS/CNT, y se incubó con Anti β -hCG-HRP (2.5 $\mu\text{g/ml}$). La experiencia se desarrolló teniendo en cuenta las optimizaciones realizadas en el estudio anterior de inmunoensayo RIgG-AntiRIgG. Las medidas de intensidad se obtuvieron añadiendo diferentes alícuotas de H_2O_2 en una disolución tampón de fosfato. Además, se demostró una adsorción inespecífica muy baja cuando se incubó un sensor sin hormona con el mismo anticuerpo marcado.

Dados los buenos resultados, el paso siguiente fue desarrollar un inmunoensayo competitivo en el cuál, por un lado se inmovilizó la hormona por IF, y por el otro se

hizo una incubación previa (1 h a 37 °C) de la misma β -hCG con el anticuerpo marcado Anti β -hCG-HRP a concentraciones variables de β -hCG (entre 0 y 1000 mUI/ml), y de Anti β -hCG 0.25 μ g/ml. Se tomó este intervalo de concentraciones ya que es el habitual en los ensayos ELISA para el análisis de este analito. Posteriormente se incubó durante una hora el sensor con la disolución que contenía la hormona y el anticuerpo marcado, efectuándose así un proceso en el que el anticuerpo marcado puede reaccionar ahora también con la hormona inmovilizada para enlazar con el anticuerpo. Finalmente, tras un proceso de lavado para eliminar las inmunoespecies que restaban en disolución, se realizaron los calibrados con H_2O_2 para cada uno de los biosensores preparados, dando lugar a los resultados que se muestran en la Figura 4.8.

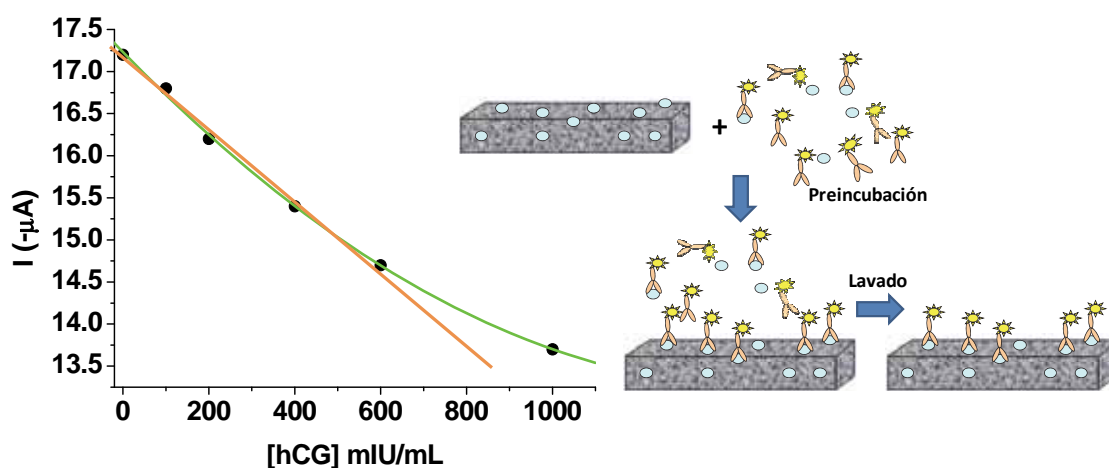


Figura 4.8 Inmunoensayo competitivo para la β -hCG en el cuál se emplea una disolución de 100 mIU/ml de β -hCG como disolución de IF. En la incubación, la hormona varía en un rango de 0 a 1000 mIU/ml y se utiliza una concentración constante de Anti β -hCG-HRP de 0.25 μ g/ml.

El inmunoensayo muestra un intervalo lineal hasta un valor de 600 mIU/ml a partir del cual empieza a perderse la linealidad, con un límite de detección de 14.6 mIU/ml calculado como 2 veces la desviación estándar del blanco (β -hCG = 0), interpolado en la ecuación de regresión $I = 17.28 - 0.046[\beta\text{-hCG}]$. Aunque el límite de detección es más alto que en otros inmunoensayos publicados²⁻⁴, se ha de tener en cuenta que los valores de β -hCG con los que se trabaja para la detección de anomalías en el embarazo, tumores testiculares, etc, son concentraciones altas de la hormona.

4.1.4. Conclusiones

De estudio realizado se puede obtener diversas conclusiones, tanto de la caracterización de la membrana como del desarrollo de inmunosensores.

- La combinación de CNT y PS nos lleva a la formación de una membrana por IF porosa y rugosa, por lo que logramos aumentar la superficie activa de la misma. Ésta es una característica deseable en la construcción de biosensores ya que incrementa la capacidad de respuesta por favorecer que las reacciones no sólo tengan lugar en la superficie del biosensor sino también en su interior, aumentando así la respuesta.
- La CSLM nos muestra el nivel de penetración de las biomoléculas (alrededor de 20 μm) en el proceso de IF, así como la penetración de las especies por difusión para interactuar con los receptores. Se observa además una adsorción inespecífica baja.
- La IF es una forma eficiente y rápida de incorporar tanto inmunoespecies como hormonas en la membrana.
- La implementación de la membrana en electrodos serigrafiados de carbono se muestra como una estrategia viable para el desarrollo de inmunosensores.

4.2.Sistemas para la determinación de ión lactato

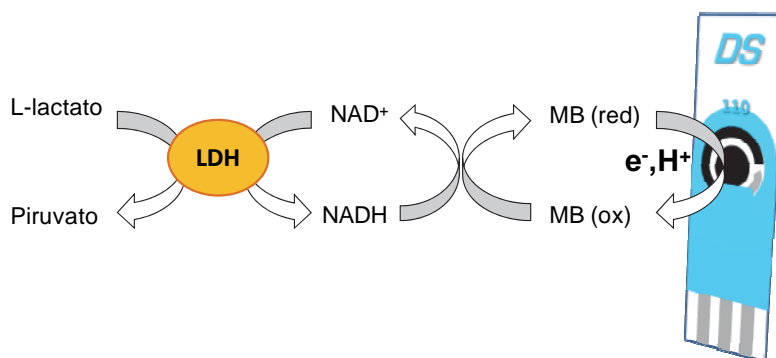
Dentro de este capítulo se dará una breve explicación y discusión de los resultados obtenidos en el desarrollo de biosensores enzimáticos para la determinación del ión L-lactato para lo que se elaboraron diversas estrategias. Inicialmente se optó por la construcción de biosensores monoenzimáticos basados en la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) o lactato oxidasa (LOx) (artículo 3), y la consiguiente comparativa entre ellos. Se planteó, además, el desarrollo de un biosensor bienzimático (artículo 4) empleando la LOx y la enzima HRP. Por último, se llevó a cabo el análisis de L-lactato en muestras reales.

La determinación de ácido láctico es un parámetro importante en diversas áreas como el diagnóstico clínico, la medicina deportiva o el análisis de alimentos. Por ejemplo, elevados niveles en sangre pueden indicar fallos en órganos, muerte de un paciente por un shock séptico o desórdenes como la hipoxia⁵⁻⁸. En el deporte, se determina para establecer el estado físico o de entrenamiento de los deportistas⁹. Por otro lado, se encuentra también en una gran variedad de alimentos y bebidas como los productos de fermentación de la leche, yogurt, queso...En el vino, el ácido láctico se produce a partir de la descomposición del ácido L-málico durante la fermentación

maloláctica¹⁰. Así, en la industria vinícola, se controla ésta fermentación determinando la disminución del ácido L-málico y el incremento del nivel de ácido L-láctico.

4.2.1. Biosensor enzimático basado en la enzima LDH

Los biosensores basados en la enzima LDH son capaces de reaccionar con las moléculas de L-lactato y catalizar la formación de ión piruvato. Para ello es necesaria la incorporación de un cofactor, en éste caso el NAD^+ (nicotinamida adenín dinucleótido), que es reducido a su forma hidrogenada NADH. Así, el seguimiento electroquímico de ésta última especie permite la cuantificación de L-lactato. Sin embargo, esta estrategia de medida presenta un inconveniente, y es que se trata de una especie que requiere para su detección la aplicación de potenciales de oxidación elevados. Como consecuencia, puede darse la oxidación de otras sustancias interferentes presentes en las muestras, lo que conlleva buscar alternativas para rebajar éstos potenciales de trabajo. Es aquí donde juega un papel importante la incorporación al sistema de los llamados mediadores redox^{11, 12}. En este estudio se trabajó con el azul de Meldola (MB), que da lugar al siguiente mecanismo de reacción:



Esquema 1 Diagrama esquemático de las reacciones involucradas en la determinación de L-lactato catalizadas por la enzima LDH y utilizando MB como mediador redox.

4.2.1.1. Optimización

Una vez escogido el mediador redox, se procedió a caracterizar el sistema electroquímico y determinar el potencial de trabajo adecuado para las mediciones de lactato mediante voltamperometría cíclica y un barrido de potencial en el que se evaluó la intensidad obtenida. Como muestra la Figura 4.9, se seleccionó 50 mV como el valor óptimo en el que trabajar, ya que se encuentra dentro del intervalo de E en el cual la intensidad de corriente (zona en la que $I = k \cdot C$) se mantiene constante. La voltamperometría cíclica muestra claramente dos picos de intensidad, consecuencia de

la incorporación del MB, a potenciales -0.13 y -0.28 V, siendo E_{pa} y E_{pc} respectivamente.

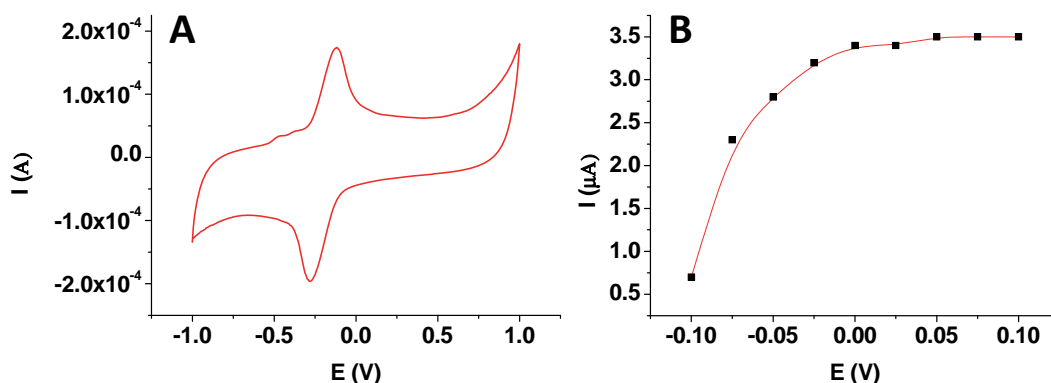


Figura 4.9 A) Voltamperometría cíclica entre -1 y 1 V B) Barrido de potencial entre -0.1 y $+0.1$ V. Experiencia realizada con sensores que incorporan LDH (500 U/ml) por inversión de fase, y membrana de PS/CNT/MB(2mg/ml), donde las medidas se realizan en una disolución tamponada de fosfato a pH 7 y 3 mM de NAD^+ .

El azul de Meldola es un compuesto soluble tanto en disolventes orgánicos como acuosos, lo que permite su uso tanto en disolución como en la mezcla que dará lugar a la membrana. Como el objetivo es obtener un biosensor compacto, se optó por incorporarlo dentro de la membrana de polisulfona. Así, se estudió su proporción en la mezcla hasta una concentración de 12 mg/ml. Los resultados mostraban un incremento de la intensidad al realizar calibrados de L-lactato hasta concentraciones de 2 a 12 mg/ml, donde este incremento se estabilizó. Se optó, sin embargo, por escoger un valor intermedio, 6 mg/ml, debido a que es soluble en disoluciones acuosas y una parte puede perderse en la disolución de medida, asegurando que quede inmovilizado en suficiente cantidad.

Se evaluó también la disolución tampón y el pH adecuado para llevar a cabo las medidas. Para ello se estudiaron 4 disoluciones diferentes; TRIS (tris(hidroximetil)aminometano), amonio, imidazol y fosfato. Los mejores resultados en cuanto a respuesta electroquímica y estabilidad de la misma se obtuvieron con las disoluciones de imidazol y fosfato a pH 8, de manera que se procedió finalmente a seguir trabajando con tampón fosfato como hasta el momento.

Por otro lado, se ha de tener en cuenta que la optimización, tanto la cantidad de LDH incorporada por IF como la de su cofactor NAD^+ en disolución son factores importantes. Aunque se intentó inmovilizar NAD^+ en la membrana por IF o

incorporándola mediante la unión covalente avidina-streptavidina a nanopartículas de oro, no se obtuvo un buen funcionamiento del biosensor, por lo que se utilizó en disolución. Para la optimización de la cantidad de LDH, se procedió a trabajar con una concentración de NAD^+ constante 3 mM y variar la de enzima en un intervalo de 1500 a 100 U/ml (Figura 4.10 A). Para la optimización de NAD^+ se trabajó a una concentración de LDH constante de 500 y 1500 U/ml, y se realizaron calibrados para esta molécula manteniendo la concentración de L-lactato constante (Figura 4.10 B). Aunque el valor de 1 mM de NAD^+ es suficiente, se optó por una cantidad mayor, 3 mM, para que la reacción no quedara limitada por la falta de cofactor. Se escogió 500 U/ml como valor óptimo de LDH ya que presenta un comportamiento muy similar a cantidades mayores de la misma.

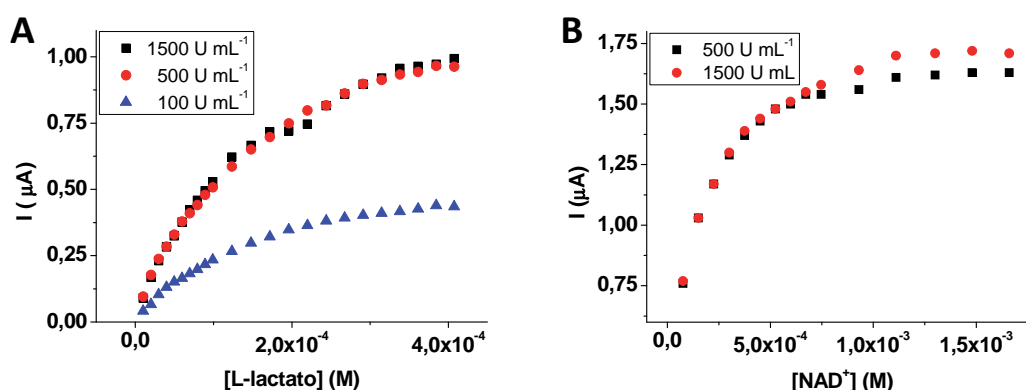


Figura 4.10 A) Optimización de la [LDH] en la disolución de IF a una $[\text{NAD}^+] = 3 \text{ mM}$. B) Calibrados de $[\text{NAD}^+]$ con dos biosensores de [LDH] variable a una concentración constante $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ en tampón fosfato a pH 7.

4.2.1.2. Evaluación

Para evaluar el biosensor, se ha estudiado su repetitividad, intervalo lineal, límite de detección y su tiempo de vida.

Respecto a la repetitividad, se ha de tener en cuenta que el primer calibrado con el sensor recién preparado se descarta, debido a que la sensibilidad baja notablemente en comparación con el segundo (alrededor de un 30% de la señal inicial). Después, ésta se mantiene constante, hecho que puede explicarse ya que como se ha dicho con anterioridad, el azul de Meldola es soluble en disoluciones acuosas y en la primera medida se pierde parte en la disolución de medida. Así, la RSD calculada para estos biosensores es 4.3 %. Presenta además un intervalo lineal no muy amplio, de $1 \cdot 10^{-6}$ a $2 \cdot 10^{-5}$, con un bajo límite de detección $3.7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ y una alta sensibilidad.

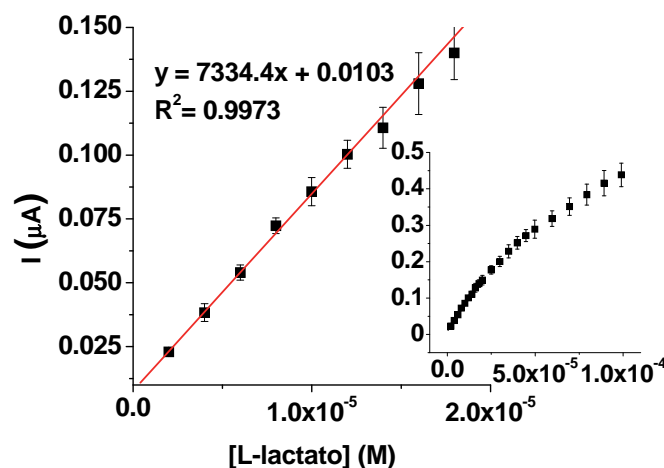


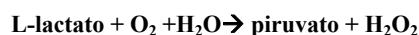
Figura 4.11 Calibrado de L-lactato con el biosensor basado en LDH, a pH 8 en disolución tampón de fosfato y 3 mM de NAD^+ .

La principal limitación del biosensor construido es su tiempo de vida. Se estudiaron dos estrategias de almacenamiento para su conservación cuando no está en uso. Algunos biosensores que mantuvieron en sequedad a 4 °C, y otros se guardaron en disolución de tampón fosfato también a 4°C. Se observó que si la membrana se mantiene en disolución, después de 1 día retiene el 30 % de su señal inicial, en cambio cuando se seca pierde totalmente su funcionalidad. Por tanto, todos los biosensores preparados con esta enzima se mantuvieron en disolución cuando no estaban en uso. Ésta pérdida de respuesta puede ser debida a una mala retención de la enzima, o a una baja estabilidad de la misma y reducción de su actividad enzimática. Aunque se probaron otros disolventes de la PS que dieran propiedades diferentes a la membrana, como la NMP (N-metil-2-pirrolidona) que la hace más densa, o nuevas proporciones de PS/DMF, ninguna de estas estrategias mejoró su retención.

4.2.2. Biosensor enzimático basado en la enzima LOx

Los biosensores basados en LOx reaccionan con el lactato y el O_2 presente en la disolución para dar piruvato y H_2O_2 , siendo la concentración de este último la que se sigue electroquímicamente.

Esquema 2



Al igual que el NADH, para la detección del H_2O_2 se requiere la aplicación de altos potenciales de trabajo, por lo que se planteó también el uso de mediadores redox.

4.2.2.1. Optimización del biosensor

Se incorporó la enzima LOx a las membranas de PS/CNT de los biosensores por IF y éstas se depositaron sobre el electrodo de trabajo de los sensores Dropsens de carbono. El primer estudio se llevó a cabo sin la incorporación de ningún mediador electroquímico en el sistema, por lo que se determinaron los potenciales de trabajo que necesitaba el sistema para llevar a cabo la reacción de L-lactato a piruvato. Estos potenciales se estudiaron a partir de medidas de voltamperometría cíclica y de barrido lineal (ver Figura 4.12).

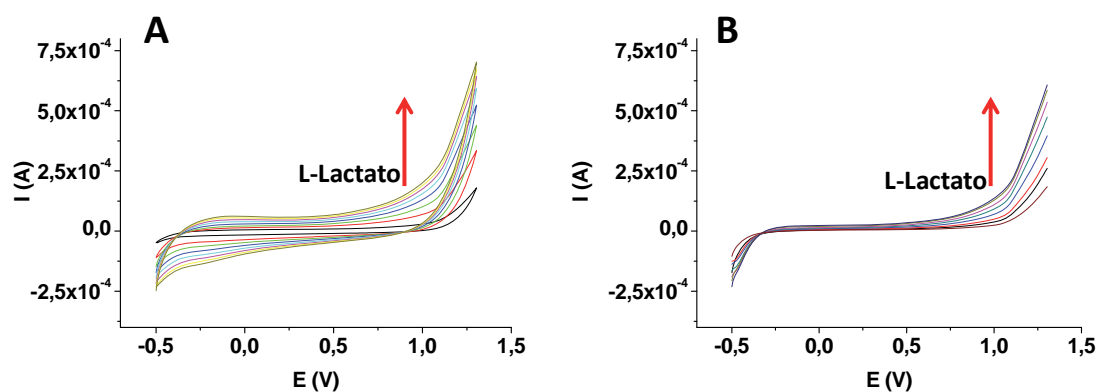


Figura 4.12 Voltamperometría cíclica (A) y de barrido lineal (B) obtenidas por el biosensor PS/CNT/LOx (5 mg/ml) en una disolución de tampón fosfato a pH 7 para concentraciones de L-lactato en el intervalo de 0 a 0.01 M.

Como se observa en la Figura 4.12, la determinación del H_2O_2 producido en la reacción se da a partir 0.5 o 0.6 V, por lo que si trabajáramos con muestras reales a este potencial, encontraríamos sustancias interferentes y como consecuencia, una mala determinación de L-lactato. Así, se procedió al estudio de la incorporación de mediadores en la membrana como el azul de Meldola (MB), el ferroceno (Fc), el tetratiofulvaleno (TTF) y ftalocianina de cobalto (CoPc). Con el azul de Meldola tuvimos el mismo problema que en el caso del biosensor basado en LDH, pérdida de sensibilidad después de varios calibrados consecutivos, por lo que se descartó. La ventaja del resto de mediadores estudiados es que son solubles únicamente en solventes orgánicos, por lo que se evita su pérdida por redisolución en la fase acuosa. Se trabajó con ellos incorporándolos en la mezcla de CNT/PS/DMF antes del proceso de IF. Para cada uno de ellos se estableció una proporción en la mezcla de manera que la membrana

se adhiriera correctamente al electrodo de trabajo. La CoPc fue el mediador con el que se obtuvo una mayor reproducibilidad, por lo que se seleccionó para llevar a cabo las medidas de L-lactato. La concentración en la mezcla de PS/CNT/DMF se estableció en 150 mg/ml, ya que a concentraciones menores del mediador, la sensibilidad decrecía considerablemente a medida que se realizaban calibrados. Con este mediador, se consiguió reducir el potencial de trabajo a aplicar a 0.35 V. El esquema de las reacciones involucradas en el sistema se muestra en la Figura 4.13.

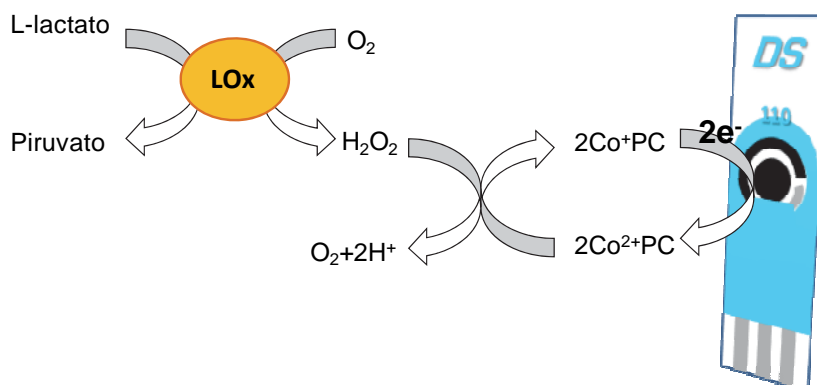


Figura 4.13 Diagrama esquemático de las reacciones involucradas en la determinación de L-lactato empleando la enzima LOx y CoPc como mediador electroquímico.

La concentración de LOx en la membrana por IF también se optimizó construyendo biosensores de 5, 10 y 20 mg/ml. Éstos se evaluaron en la primera parte del estudio, a un potencial de 0.6 V, y de los calibrados de lactato obtenidos se examinó su sensibilidad y el intervalo lineal para cada una de las [LOx]. Los resultados muestran una sensibilidad creciente a medida que se incrementa la concentración de enzima, y los intervalos de concentración donde la respuesta es lineal son en orden de [LOx] creciente de $1 \cdot 10^{-6}$ a $2 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$ y $3.0 \cdot 10^{-4}$ M. Sin embargo, dada la disponibilidad de la misma, se optó por trabajar a 5 mg/ml para llevar a cabo el estudio de optimización. Finalmente, se aumentó hasta 10 mg/ml para su evaluación en términos de intervalo lineal, estabilidad con el tiempo, reproducibilidad y límite de detección.

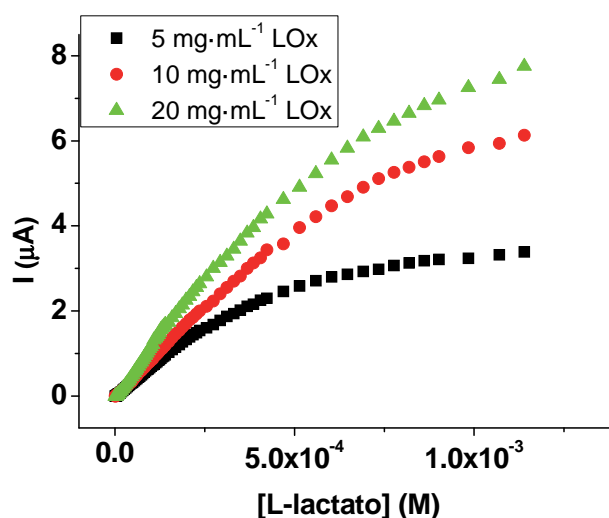


Figura 4.14 Curvas de calibración para L-lactato a 0.6 V usando tres biosensores preparados con diferentes concentraciones de [LOx] en la disolución de IF.

El pH de la disolución de tampón fosfato también se estudió en un intervalo entre 6.5 y 8.5, en el que se optó por llevar a cabo los experimentos a 7.5, ya que se obtenía una mayor señal con una buena reproducibilidad (ver Figura 4.15 A). Por otro lado, respecto a su estabilidad a lo largo del tiempo, se observó que la respuesta amperométrica a lactato $1 \cdot 10^{-4}$ M (dos replicados) caía un 45 % el segundo día, pero se mantenía constante durante 2 días más. Sin embargo, después de 20 días, ésta era tan solo de un 30 % de la medida inicial. A pesar de eso, son valores mayores en comparación con el biosensor basado en LDH, es un parámetro mejorable, pero dada su naturaleza de sensores de un solo uso no es un serio problema. Los biosensores se conservaban en disolución de tampón fosfato y a 4 °C cuando no estaban en uso.

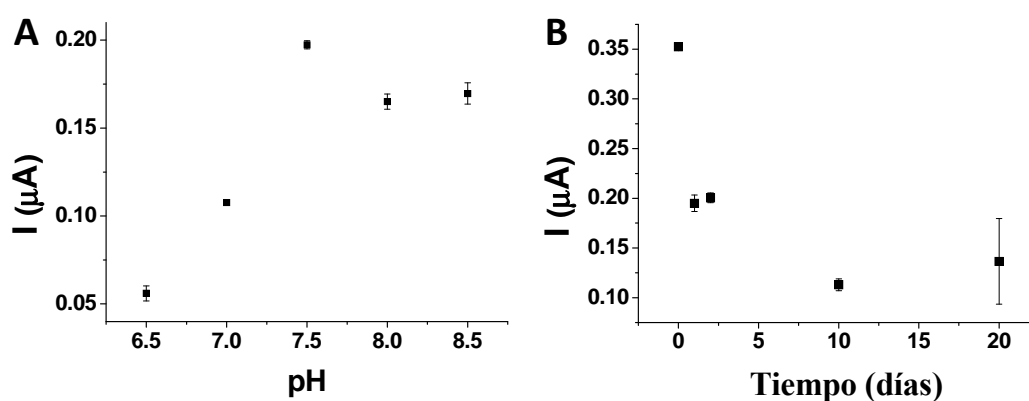


Figura 4.15 A) Estudio del pH de la solución tampón. B) Evaluación de la estabilidad del biosensor en función del tiempo. Las medidas se realizaron para ambos estudios a una concentración de $1 \cdot 10^{-4}$ M en el tampón fosfato y por duplicado.

4.2.2.2. Trabajo con gota y evaluación del biosensor

La particularidad de trabajar con sensores serigrafados que contienen los tres electrodos en el mismo soporte es que permiten trabajar con unos pocos microlitros de solución depositando una gota de muestra sobre ellos. Dado que los biosensores basados en LOx son compactos y no requieren de la adición de cofactores ni mediadores en la disolución, se optó por probar su viabilidad para llevar a cabo el análisis de lactato siguiendo la metodología descrita a continuación.

Así, se trabajó depositando gotas de 50 μl de disoluciones de tampón fosfato de concentraciones crecientes de L-lactato para efectuar los calibrados. Antes de la deposición de la siguiente gota, se retiraba la anterior y se ambientaba con la nueva disolución. Para obtener el valor de intensidad correspondiente a cada concentración de L-lactato, fueron necesarios únicamente 40 s para lograr la estabilización de la señal. En la Figura 4.16 se muestra una curva de calibrado de L-lactato obtenido a partir de 5 replicados consecutivos.

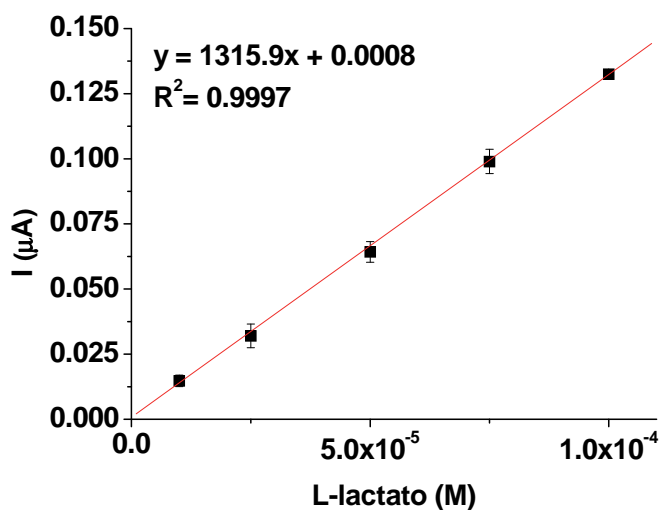


Figura 4.16 Calibrado de L-lactato obtenido depositando una gota de disolución para cada concentración. La señal de intensidad se tomó después de 40 s de la estabilización de la misma. Las medidas se llevaron a cabo en tampón fosfato a pH 7.5.

El intervalo lineal se estudió entre $5 \cdot 10^{-6}$ y $1 \cdot 10^{-2}$, y tras la evaluación de la curva de calibración resultante, se estableció éste entre $5 \cdot 10^{-6}$ y $5 \cdot 10^{-4}$ (ver Figura 4.17). Por otro lado, el límite de detección se calculó igual que en el caso del biosensor basado en LDH, 3 veces el valor de la desviación estándar del blanco, $3.4 \cdot 10^{-6}$ M. Para evaluar la repetitividad de las medidas llevadas a cabo por el biosensor, se efectuó la determinación

de disoluciones de concentración $5 \cdot 10^{-5}$ M de L-lactato por triplicado, obteniendo finalmente una RSD del 5.3 %.

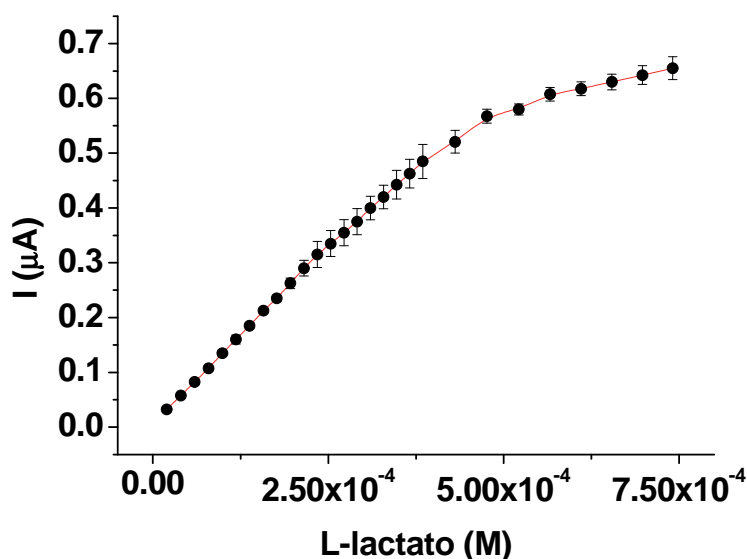


Figura 4.17 Curva de calibración para L-lactato en solución tampón a pH 7.5.

La sensibilidad del biosensor que incorpora la enzima LOx es menor que en el caso de la LDH. Sin embargo se ha de tener en cuenta que la metodología de trabajo también ha sido diferente. Aquí las moléculas de L-lactato llegan a la enzima por difusión, proceso más lento que cuando la solución está agitada, por lo que también se obtiene como consecuencia intensidades de corriente más bajas. No obstante, los valores obtenidos son lo suficientemente buenos como para convertirse en una alternativa real al método de medición en solución agitada, permitiendo además la determinación de sustratos en volúmenes pequeños de muestra.

4.2.3. Sensor bienzimático basado LOx/HRP

La última estrategia que se llevó a cabo para la construcción de biosensores de L-lactato fue la combinación de la enzima LOx con la HRP, ya que al igual que con el uso de mediadores, emplear un biosensor bienzimático permite rebajar los potenciales de trabajo. Además de las dos enzimas, también se ha incorporado a la membrana un mediador electroquímico, el ferroceno, de manera que la respuesta electroquímica se genera a partir del esquema de reacciones siguiente:

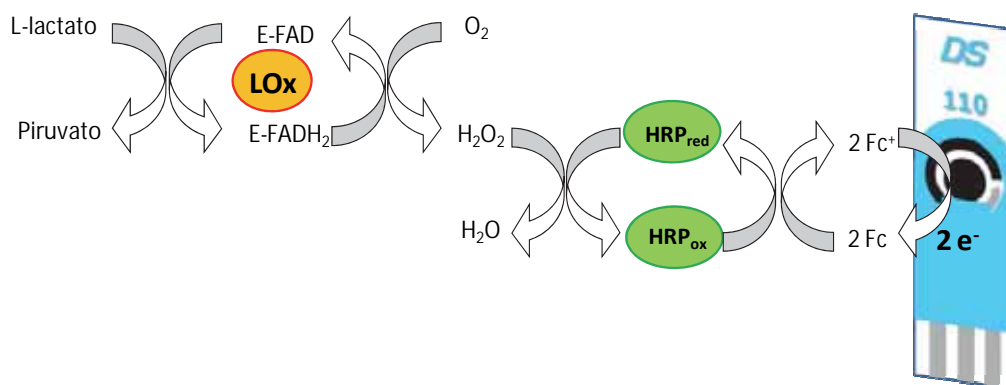


Figura 4.18 Diagrama esquemático de las reacciones involucradas en la determinación de L-lactato en un biosensor bienzimático empleando ferroceno como mediador electroquímico.

La principal ventaja de estos biosensores es que el potencial aplicado es de reducción y cercano a 0 V, de manera que las posibles interferencias en las muestras habituales son relativamente pocas.

Ambas enzimas se incorporan por IF en la membrana, y el mediador se prepara junto con la PS y los CNT en DMF.

4.2.3.1. Optimización del biosensor

Dado que la cantidad de LOx inmovilizada ya había sido estudiada en el apartado 4.2.2.1, se trabajó con la misma de ésta (10 mg/ml), y un exceso de HRP (10 mg/ml). De esta manera se asegura la suficiente HRP para determinar correctamente la concentración de L-lactato, ya que el sistema está controlado únicamente por la primera reacción. Además, se examinó el efecto de introducir un nuevo elemento en la membrana, BSA, que como se había visto en la bibliografía¹³, permite generar un entorno más “confortable” y en nuestro caso concreto, una mayor retención de las enzimas con la consiguiente mejora de la reproducibilidad de las medidas. Cabe decir también, que como se ha visto en el apartado 4.1.1, se emplea como bloqueante para disminuir la adsorción inespecífica en la membrana.

Para determinar el potencial de trabajo a aplicar, se realizó un estudio por voltamperometría cíclica donde se comparó la respuesta del biosensor cuando éste incorpora o no Fc (ver Figura 4.1). Cuando se trabaja con HRP, ésta cataliza la reducción del H₂O₂ a H₂O, por lo que para la determinación electroquímica de L-lactato se aplicaron potenciales de reducción. Se observó que en el caso del biosensor con Fc,

se obtienen picos más altos y definidos. Así, el E_{pc} para el sensor sin mediador es -0.1 V y 0.1 V para el que si lo contiene.

Después de la evaluación de los sensores empleando ambas estrategias, se observó que los que contenían Fc en la membrana eran más reproducibles y las curvas de valoración tenían mayor sensibilidad, por lo que se optó por trabajar con este mediador redox. Una vez escogido el sistema de medida, fue necesario determinar el potencial de trabajo. Mediante un barrido de potencial en función de la intensidad obtenida en una disolución de concentración 0.5 mg/l de L-lactato, se observó un máximo de señal de reducción entre 0 y -0.1 V, seleccionando este último valor para llevar a cabo el estudio del biosensor.

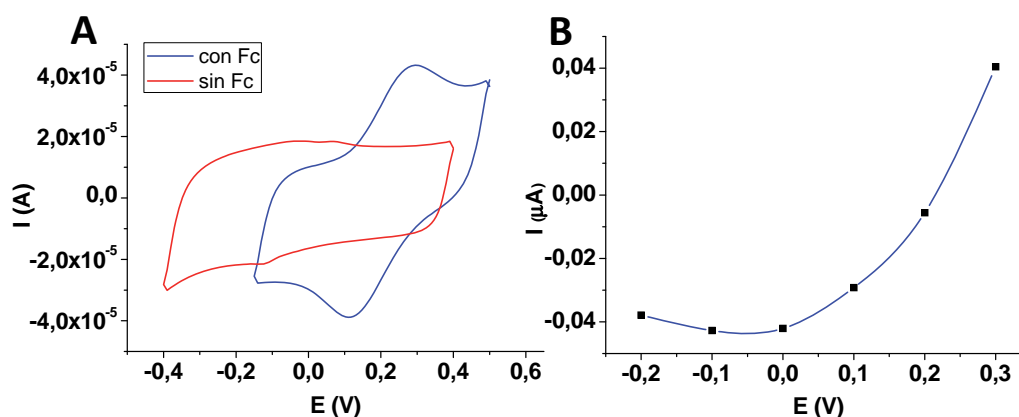


Figura 4.19 A) Medidas de voltamperometría cíclica realizadas con biosensores que contienen o no ferroceno como mediador electroquímico. B) Barrido de potencial llevada a cabo por un biosensor que contiene ferroceno. Todas las medidas se han realizado en disolución de tampón fosfato, pH 7.5 y con una concentración de L-lactato 0.5 mg/l.

Por último, se optimizó el pH de la disolución tampón de fosfato, teniendo en cuenta que de este parámetro depende la actividad de ambas enzimas. En un intervalo de estudio entre 6.5 y 8.5 (medidas por duplicado), el valor de pH que presentó una mayor intensidad de respuesta en una solución de L-lactato 1 mg/ml fue 7.5 .

4.2.3.2. Evaluación del biosensor

Se evaluó la estabilidad del biosensor a lo largo del tiempo. Como en estudios anteriores, se estudiaron dos estrategias de almacenamiento, en seco y sumergido en una disolución a 4 °C. En este caso, los resultados fueron similares, perdiendo un 90 % de su intensidad inicial después de 1 día en el caso de ser guardado en seco. En cambio,

cuando se guardaba en disolución, los dos primeros días mantenía alrededor del 80 % de la respuesta, y después de dos semanas, un 40 %.

Para determinar el intervalo lineal del biosensor, se estudió su comportamiento entre 0.1 y 25 mg/ml de L-lactato, observándose la pérdida de linealidad a partir de 5 mg/ml (Figura 4.20 A). Así, se estableció un intervalo lineal entre 0.1 y 3.5 mg/l, dentro del cual se realizaron el resto de experiencias.

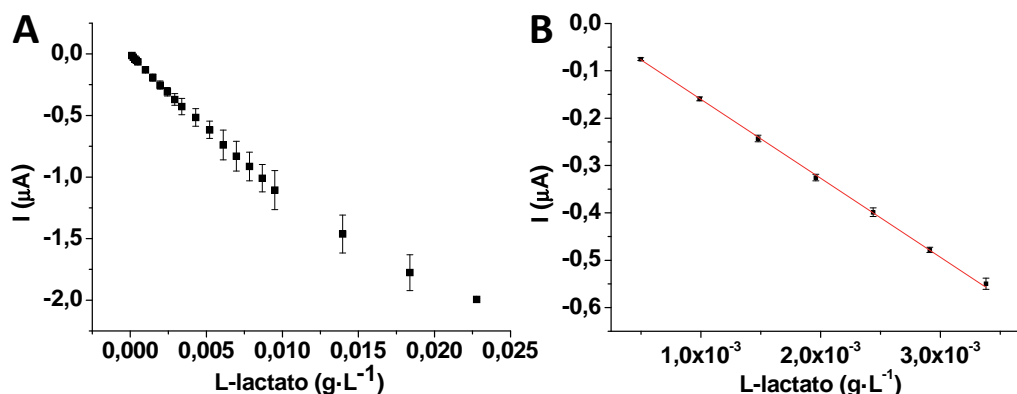


Figura 4.20 A) Evaluación del intervalo lineal del biosensor. B) Calibrado de L-lactato a partir de 5 replicados de cada concentración.

Para evaluar la reproducibilidad de los sensores, se realizaron por un lado 5 replicados con el mismo biosensor y se evaluó la intensidad medida para una concentración de L-lactato 1 mg/l, obteniéndose una RSD de 2.7 %. En cambio, cuando se evaluó la variabilidad en su sensibilidad para tres calibrados consecutivos entre 0.5 y 3.5 mg/l (ver Figura 4.20 B) dieron una RSD de 1.4 %. Por otro lado, el límite de detección calculado a partir de la recta de regresión fue de 0.053 mg/L.

Si se compara el biosensor preparado en este capítulo con otros trabajos publicados también basados en LOx/HRP, se observa que el intervalo lineal en todos ellos es similar, alrededor de 1.5-2 órdenes de magnitud. Sin embargo, nuestro biosensor destaca en términos de sensibilidad y límite de detección, con el único inconveniente de presentar de nuevo, bajos tiempos de estabilidad.

4.2.4. Determinación de L-lactato en muestras reales

El principal objetivo del estudio de los diferentes biosensores preparados era encontrar el que mostrara mejores características para el análisis de L-lactato en muestras reales, en nuestro caso, vino y cerveza. Así, en términos de sensibilidad,

reproducibilidad y potencial de trabajo, destaca el sensor bienzimático. Por otro lado, los intervalos lineales eran similares, y el tiempo de vida mejorable en todos los casos, por lo que se decidió finalmente realizar la determinación de L-lactato con el biosensor bienzimático.

4.2.4.1. Estudio de las interferencias

Cuando se analizan muestras reales es crucial tener en cuenta que éstas pueden contener especies interferentes que afecten a la correcta determinación del sustrato en cuestión. Por ello, es importante hacer un estudio previo de las sustancias que podrían actuar como potenciales interferencias y examinar si afectan o no a las medidas. De esta manera, para el caso concreto del vino y cerveza se analizaron los ácidos málico, gálico, tartárico, succínico, cítrico, acético y ascórbico, además de glucosa y etanol. En la Figura 4.1 A se muestra la respuesta electroquímica de cada uno de ellos a una concentración de 2 mg/ml y la de L-lactato obtenida por un mismo sensor.

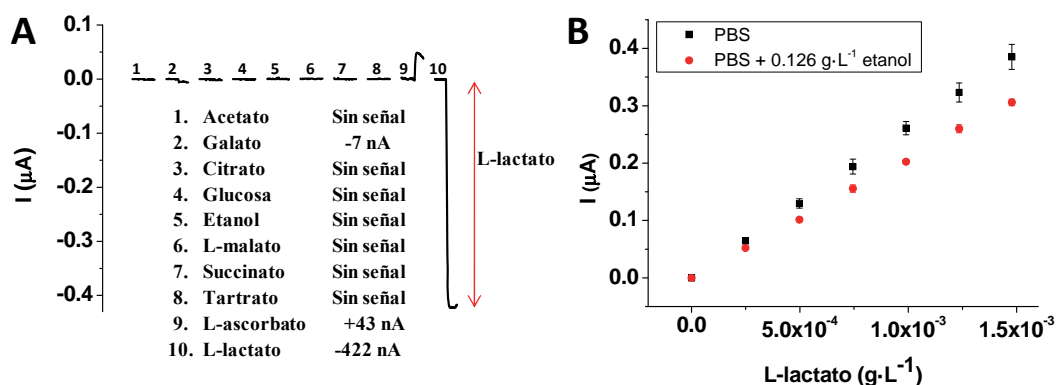


Figura 4.21 A) Estudio de las interferencias donde se representa la respuesta amperométrica de cada sustancia para una concentración de 2 mg/l en tampón fosfato, pH 7.5. B) Influencia de la presencia de etanol (correspondiente al 12 % v/v, aplicando un factor de dilución 1:1000) en la disolución de medida para la determinación de L-lactato.

Dados los resultados, se concluye que sólo el ácido gálico y el ascórbico tienen respuesta electroquímica en estas condiciones y que representan un 1,7 y 10,2 % de la señal del L-lactato. No obstante, se han de tener en cuenta los niveles normales estas sustancias en las muestras. La concentración de ácido gálico estudiada en esta experiencia es similar a la total de polifenoles en el vino tinto (2.16 mg/l) y mayor que su contenido en cervezas (0.52 g/l) aplicando el factor 1:1000 de dilución. En el caso del ácido ascórbico, éste varía en el vino entre 5 y 25 mg/l, que al aplicar el mismo factor de dilución queda muy por debajo de los 2 mg/l estudiados. Así, se puede decir

que aunque estos compuestos tienen una respuesta electroquímica, a los niveles en que se presentan en las muestras estudiadas no representan una interferencia apreciable.

Sin embargo, es importante tener presente que puede haber interferencias que provoquen un efecto matriz, como es el caso del etanol (uno de los componentes mayoritarios en este tipo de muestras). En la Figura 4.21 B se observa que sí hay efecto matriz causado por la presencia de etanol en las muestras. Si se compara la sensibilidad de los calibrados de L-lactato en presencia o no de un 12 % v/v de etanol (valor habitual en vinos) aplicando un factor de dilución igual al que habrá en las muestras reales (1:1000), se determina una caída de un 20 % aproximadamente de la sensibilidad.

4.2.4.2. Determinación de L-lactato en muestras de vino y cerveza

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad del biosensor desarrollado en el análisis de bebidas producidas mediante fermentación, se analizaron diferentes muestras, en concreto 8 vinos (tinto, blanco y rosado) y 7 cervezas. Como método de referencia para validar los resultados, se empleó un kit espectrofotométrico comercial para la determinación de lactato.

Las medidas se llevaron a cabo en las condiciones optimizadas del sensor, y aplicando un potencial de reducción de -0.1 V. A potenciales más negativos, el número de interferencias oxidables se reduce, como es el caso de los polifenoles, presente sobretudo en vinos. Además, dado que se ha demostrado el efecto matriz de las muestras, la determinación de L-lactato se llevó a cabo mediante adición estándar. Se aplicó un factor de dilución entre 1:1000 y 1:2000 en las muestras de vino, y 1:200 en el caso de las cervezas para entrar dentro del intervalo lineal del biosensor. Todas las muestras se midieron por triplicado. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3 Concentraciones de L-lactato en las muestras de vino y cervezas determinadas por el biosensor de L-lactato y el método espectrofotométrico.

	Muestras	Concentración sensor (g·L ⁻¹)	Intervalo de confianza ^a (g·L ⁻¹)	RSD (%)	Concentración kit (g·L ⁻¹)	Diferencia (%)
Vino tinto	<i>Serrasegué</i>	1.06	0.08	2.8	1.03	-2.9
	<i>Valls</i>	0.53	0.03	1.9	0.55	3.6
	<i>Terres negres 1</i>	0.76	0.03	1.3	0.79	3.8
	<i>Terres negres 2</i>	0.79	0.03	1.3	0.81	2.5
	<i>Terres negres 3</i>	0.76	0.07	1.3	0.77	1.3
	<i>Campo viejo</i>	1.11	0.03	2.7	1.14	2.6
Vino blanco	<i>Gandesa</i>	0.93	0.02	0.9	0.94	1.1
Vino rosado	<i>Gourmet</i>	0.88	0.04	2.3	0.88	0.0
Cerveza	<i>Voll Damm</i>	0.067	0.004	3	0.071	5.6
	<i>Carrefour</i>	0.16	0.01	2.5	0.17	5.9
	<i>Moritz</i>	0.277	0.004	0.6	0.28	1.1
	<i>San Miguel</i>	0.030	0.001	1.7	0.029	-3.4
	<i>Adlerbrau</i>	0.047	0.002	2.1	0.048	2.1
	<i>San Miguel (sin alcohol)</i>	0.043	0.003	3	0.044	2.3
	<i>Xibeca (Damm)</i>	0.053	0.003	2.4	0.055	3.6

^a Intervalos de confianza calculado con un nivel de confianza del 95% n=3 y $t_{\text{tab}}=4.303$

Como se puede observar, el biosensor muestra una buena concordancia con los valores del kit comercial, con lo que se concluye que es un método eficaz para la determinación de L-lactato, tanto en vinos como en cervezas, donde la concentración es mucho menor. Las muestras de vino tinto son mayoritarias dado que los blancos no están normalmente sujetos a la fermentación maloláctica¹⁰, y presentan concentraciones muy bajas de L-lactato.

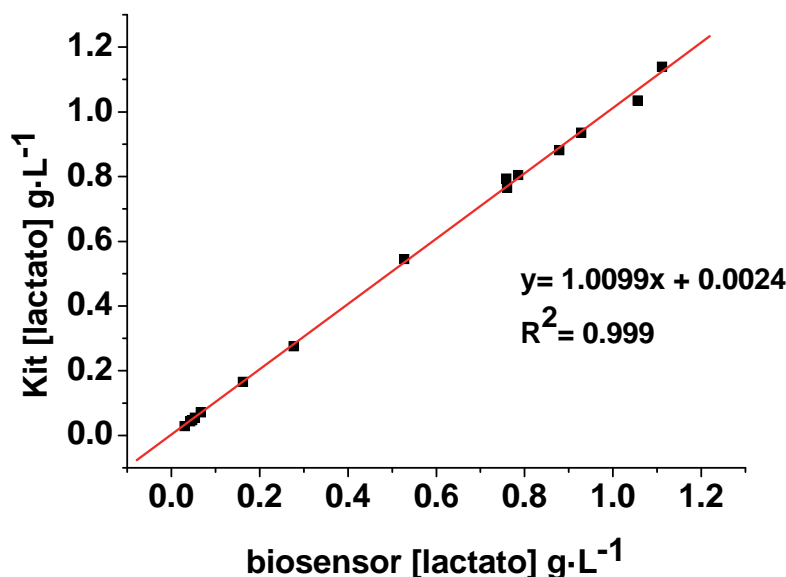


Figura 4.22 Comparación de los resultados obtenidos con el biosensor (eje x) con los obtenidos con el kit espectrofotométrico (eje y) para la determinación de L-lactato.

En la Figura 4.22 se encuentran representados los resultados obtenidos por ambos métodos de análisis. De la regresión se extrae que la correlación es buena ($R^2=0.999$) con una pendiente alrededor de 1 (1.01 ± 0.02) y una intercepción próxima a 0 (0.00 ± 0.01). De estos resultados se deduce que no hay diferencias significantes entre ellos, ni se detectan interferencias destacables.

4.2.4.3. Conclusiones

De las tres estrategias llevadas a cabo para la determinación de L-lactato, la que muestra unas mejores cualidades es la construcción de biosensores bienzimáticos, presentando mayor reproducibilidad y sensibilidad, permitiendo realizar medidas a potenciales de trabajo reducidos. El mayor inconveniente de todos los sensores de L-lactato preparados ha sido su reducido tiempo de vida, pero se ha de tener en cuenta que se trata de sensores de un solo uso, por lo que se minimiza su importancia.

Se ha demostrado la viabilidad de los sensores bienzimáticos para su aplicación en el análisis de L-lactato en muestras de vino y cerveza, comparando los resultados con los de un kit comercial. Además se ha estudiado el efecto de las potenciales interferencias, y se ha concluido que a las concentraciones en que se encuentran normalmente en este tipo de muestras los resultados no se ven afectados.

4.3. Construcción de biosensores para la determinación de aminas biógenas

El principal objetivo de esta tesis ha sido demostrar la capacidad de los biosensores basados en membranas de CNT/PS para el análisis de diferentes sustratos en muestras reales. Siguiendo esta línea, y después de comprobar su eficacia para la determinación de L-lactato, se procedió a estudiar su comportamiento con otro tipo de muestras, en este caso pescado. Así, se ha investigado el análisis de aminas biógenas (BA), en concreto la histamina, mediante biosensores enzimáticos diseñados y construidos en nuestro laboratorio.

Las BA (histamina, putrescina, cadaverina, etc) se producen en ciertos alimentos como el pescado azul (escómbridos), y productos fermentados como quesos, vino o cerveza, principalmente por la descarboxilación de los aminoácidos precursores del presentes en el alimento.. En general, la formación de ciertas BA está causada por un defecto en el proceso de fermentación o por deficiencias en su conservación.

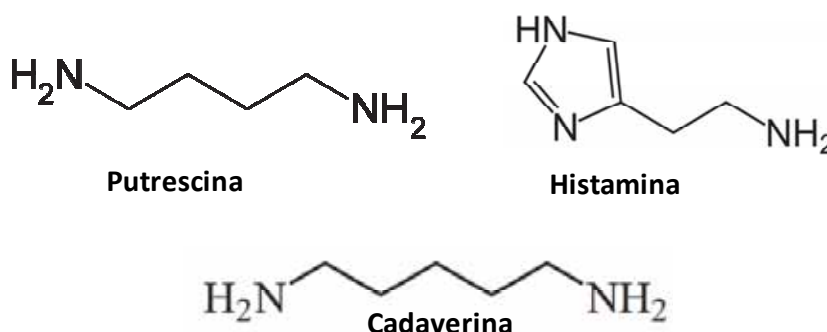


Figura 4.23 Estructura química de algunas aminas biógenas

Las intoxicaciones por aminas biógenas, especialmente debidas a la histamina en pescados y derivados, constituyen la segunda causa registrada de intoxicaciones de origen alimentario. El consumo de alimentos donde hay una proliferación de estos compuestos produce síntomas como sarpullidos, edemas, dolores de cabeza, hipotensión, vómitos, palpitaciones, diarrea y trastornos del corazón. La putrescina y cadaverina, aunque no tienen efectos tóxicos por sí mismas, puedan aumentar la toxicidad de la histamina, tiramina y feniletilamina, ya que interfieren en las reacciones de detoxificación.

Actualmente, algunos criterios de buenas prácticas indican que son tolerables niveles de 50-100 ppm de histamina, 100-200 ppm de tiramina y 30 ppm de

feniletilamina, o un total de aminas biógenas de 100-200 ppm. Hay que considerar, sin embargo, que no son criterios fijos debido a que su interacción con otros compuestos de las muestras o con otras aminas pueden aumentar o disminuir su actividad.

4.3.1. Preparación del biosensor

Para la determinación de histamina y otras BA se estudió la incorporación de la enzima diamino oxidasa (DOx) en el sensor, que cataliza la oxidación de las aminas a los correspondientes aldehídos, NH_3 y H_2O_2 . La reacción se puede seguir electroquímicamente por la disminución de O_2 o la producción de H_2O_2 . Como se ha visto anteriormente, la determinación de H_2O_2 requiere la aplicación de potenciales elevados por lo que se procedió a construir un sensor bienzimático con la enzima peroxidasa similar al del apartado 4.2.3. A pesar de conocer de antemano el buen resultado del ferroceno, también se quiso estudiar el comportamiento de otro mediador muy empleado en estos casos: el azul de Prusia. Para ello se siguieron dos procedimientos: el primero ya descrito en el apartado 3.1.3, consiste en la deposición de las soluciones de FeCl_3 y $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ sobre el electrodo de trabajo. El problema es que este proceso es difícil utilizando los sensores de Dropsens ya que las disoluciones se esparcen fácilmente sobre los demás electrodos, no sólo sobre el de trabajo. Debido a esto, se propuso una segunda estrategia: sintetizar el mediador, secarlo y posteriormente incorporarlo en la mezcla de CNT/PS/DMF. El resultado fue que se obtuvo una membrana quebradiza y de baja adhesión sobre el electrodo de trabajo, por lo que se decidió utilizar el ferroceno como mediador.

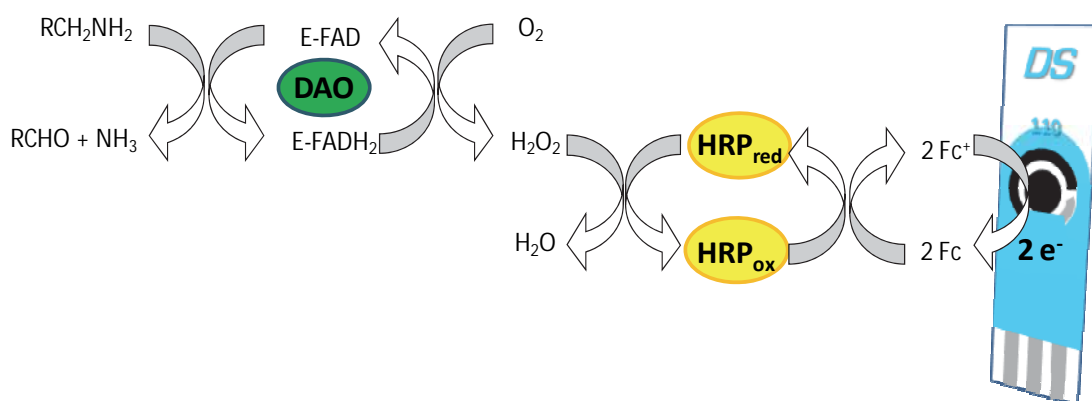


Figura 4.24 Diagrama esquemático de las reacciones involucradas en el análisis de aminas biógenas empleando un biosensor bienzimático basado en DOx y HRP.

4.3.2. Optimización del biosensor

Para el estudio del potencial de trabajo, aún siendo un sistema similar al del sensor bienzimático de L-lactato, se llevaron a cabo medidas con un biosensor que contenía ambas enzimas y el ferroceno. Posteriormente se comparó la señal electroquímica del biosensor a diferentes potenciales para una disolución de tampón fosfato, y para una concentración de histamina 0.2 mM, observándose un aumento de la intensidad de reducción hacia potenciales más negativos, encontrando una diferencia máxima de sus señales entre 0 y -0.15 V (ver Figura 4.25). Al realizar calibrados de histamina en éste intervalo de potenciales, se encontró que la respuesta electroquímica era inestable a potenciales más negativos (mayores a -0.1 V), por lo que se decidió trabajar a -0.05 V.

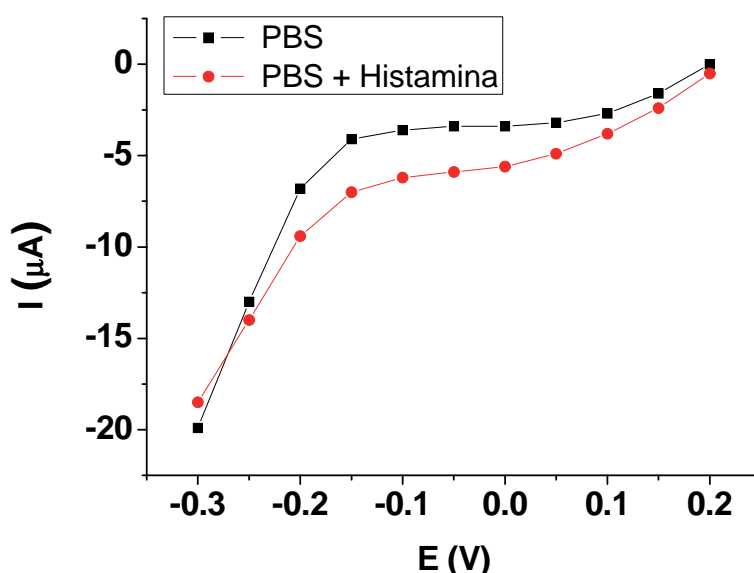


Figura 4.25 Estudio del potencial de trabajo. Las medidas se llevan a cabo en una disolución a pH 7.5 en el tampón fosfato (0.1 M $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$), y en la misma disolución pero con una concentración de 0.2 mM de histamina, variando el potencial de trabajo aplicado.

Dada la importancia e influencia del pH en la actividad de las enzimas, se estudió la variación de la intensidad de corriente obtenida para una concentración 5 μM de histamina en un intervalo de 6.5 a 8.5. De los resultados obtenidos se deduce que el valor óptimo de pH para trabajar con el biosensor es 8, por lo que a partir de ese momento, se trabajó a este valor.

El paso siguiente fue evaluar las concentraciones de ambas enzimas en la disolución de IF para obtener la mayor eficacia del biosensor. Para ello, primero se mantuvo constante la concentración de DOx, variando la proporción de HRP, y a continuación, se

llevó el proceso contrario: a un valor constante de HRP se varió la DOx. Comparando la sensibilidad y la reproducibilidad de los calibrados en cada caso, se escogieron las concentraciones óptimas para cada una de ellas. Así, teniendo en cuenta estos aspectos (Tabla 4), se seleccionaron 4700 U/ml para HRP y 250 U/ml para DOx.

Tabla 4 Optimización de las concentraciones en la solución de IF de HRP y DOx para la preparación de los biosensores.

HRP (U·mL ⁻¹) ^a	0	470	940	4700	9400
Sensibilidad (nA/M)	1.65·10 ⁷	2.05·10 ⁷	1.78·10 ⁷	1.96·10⁷	1.80·10 ⁷
Desviación estándar (nA·M⁻¹)	1.7·10 ⁶	2.4·10 ⁶	1.0·10 ⁵	1.7·10⁵	1.2·10 ⁶
RSD %	10.4	11.8	0.6	0.9	6.8
DOx (U·mL ⁻¹) ^b	5.26	27.8	105	250	375
Sensibilidad (nA·M⁻¹)	1.88·10 ⁶	7.35·10 ⁶	1.31·10 ⁷	1.87·10⁷	1.94·10 ⁷
Desviación estándar (nA·M⁻¹)	5.7·10 ⁴	3.2·10 ⁵	2.8·10 ⁵	1.0·10⁵	6.4·10 ⁵
RSD %	3.0	4.4	2.1	0.5	3.3

a: (DOx = 250 U/mL), b: (HRP = 4700 U·mL⁻¹)

4.3.3. Evaluación

Una vez encontradas las condiciones óptimas de medida, se llevó a cabo la evaluación del biosensor en función del intervalo lineal de trabajo, la reproducibilidad y la estabilidad operacional a lo largo del tiempo.

Para estudiar el intervalo lineal, se construyó una curva de calibrado para histamina hasta alcanzar concentraciones de alrededor a $9 \cdot 10^{-4}$ M. De la observación de ésta, se concluye que la respuesta del biosensor es lineal en un intervalo de concentraciones de $3 \cdot 10^{-7}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M, prácticamente dos órdenes de magnitud (ver Figura 4.26 A).

Para estudiar la estabilidad del biosensor, se procedió a hacerlo de dos maneras diferentes; se construyeron dos sensores idénticos (el mismo día y en las mismas condiciones) y se determinó la sensibilidad de los calibrados de histamina (por triplicado) en cada caso. Uno de los sensores se guardó en una disolución a 4°C durante un mes y se procedió a la misma experiencia comparando los resultados obtenidos en ambos casos. El otro biosensor se evaluó el primer y segundo día, y a partir de ahí, cada semana hasta pasado también un mes (ver Figura 4.26 B). Se observó que para ambos sensores, la sensibilidad al cabo de un mes era prácticamente la misma entre ellos, y ligeramente inferior, alrededor de un 10 % menos, si se comparaba con la inicial. Con esta experiencia se confirma que el uso de estos biosensores durante los días posteriores

a su preparación no influye prácticamente en su comportamiento a lo largo del tiempo y que su tiempo de vida útil es claramente superior a un mes. Además, se estudió la estabilidad operacional (la estabilidad posterior a calibrados consecutivos), comparando la respuesta de un biosensor el mismo día después de haber llevado a cabo con él 35 calibrados. La diferencia entre el primer calibrado y el último fue una reducción en un 19 % en su sensibilidad.

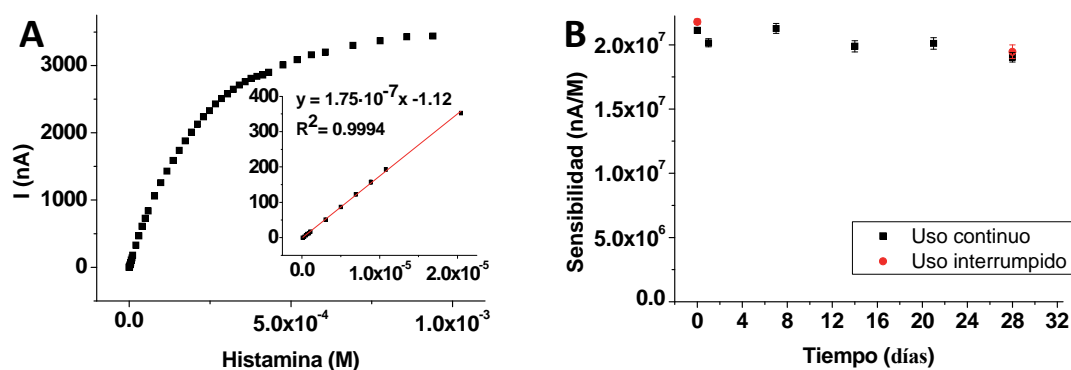


Figura 4.26 A) Estudio del intervalo lineal de respuesta para histamina. Las medidas se hacen por duplicado en las condiciones óptimas estudiadas previamente. B) Evolución de la sensibilidad de los calibrados de histamina de los biosensores a lo largo de un mes. Cuando no están en uso se conservan sumergidos en una disolución tampón de fosfato a 4°C.

En lo referente a la reproducibilidad se llevaron a cabo dos estudios. Por un lado se estudió la reproducibilidad de la construcción, es decir, la similitud que presentan entre sí las distintas unidades construidas, y por otro la repetitividad de las mediciones en un intervalo de tiempo reducido. Par ello se construyeron 5 biosensores iguales y se examinó la reproducibilidad de los calibrados de histamina (entre $2.5 \cdot 10^{-6}$ y $1.5 \cdot 10^{-5}$) llevados a cabo con cada uno de ellos. También se evaluó la repetitividad de 5 calibrados consecutivos para un solo biosensor en el mismo intervalo de concentración. Los resultados fueron respectivamente RSD de 6.5 y 5.6 %, por lo que se concluye que la reproducibilidad de construcción y repetitividad son aceptables.

4.3.4. Estudio de interferencias en la determinación de aminas biógenas en muestras reales

Antes de abordar el análisis de muestras reales es muy importante determinar si los principales compuestos interferentes que pueden encontrarse en las muestras en estudio pueden influir en la determinación de las BA. Como se ha dicho anteriormente, las aminas biógenas se producen a partir de la descarboxilación de sus precursores, siendo éstos mismos los potenciales interferentes. Así, se han estudiado algunos de estos

compuestos; histidina, tirosina, triptófano y lisina. Para ello se ha medido su respuesta por cronoamperometría para dos concentraciones diferentes ($2.5 \cdot 10^{-6}$ y $5.0 \cdot 10^{-6}$ M) y se ha comparado con la de la histamina (Figura 4.27).

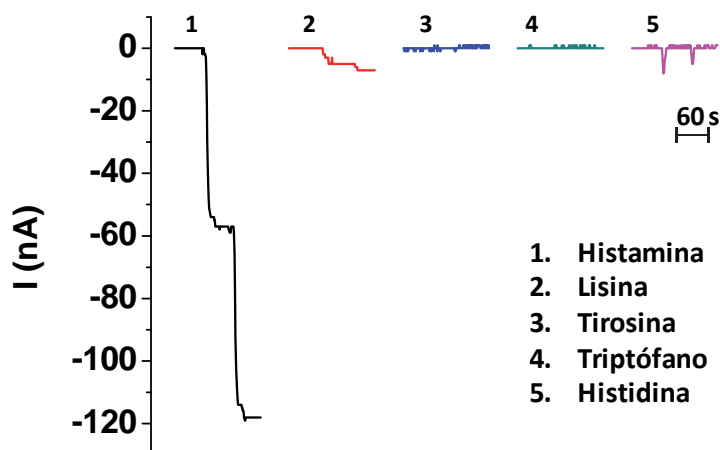


Figura 4.27 Medidas cronoamperométricas de la respuesta del biosensor a la histamina, lisina, tirosina, triptófano y histidina tras la adición de dos alícuotas de cada compuesto cada 60 segundos, hasta alcanzar concentraciones de $2.5 \cdot 10^{-6}$ y $5.0 \cdot 10^{-6}$ M.

De los resultados obtenidos se concluyó que sólo la lisina se mostraba como interferencia a este nivel de concentraciones, representando un 5.9 % de la respuesta para histamina. Cabe destacar sin embargo, que dado que las cantidades de aminoácidos no están bien establecidas y varían para cada tipo de pescado, no se puede afirmar con absoluta seguridad que éstos compuestos afecten más o menos en cada muestra, por lo que para una aplicación definitiva serían convenientes estudios más concretos.

4.3.5. Determinación de histamina en muestras reales

Para evaluar la viabilidad del biosensor preparado, se llevaron a cabo determinaciones de histamina en diferentes tipos de muestras de pescado. Las medidas se realizaron con dos biosensores diferentes, diferencial y no diferencial (sencillo). El sencillo únicamente consiste en un electrodo de trabajo donde se ha inmovilizado las enzimas, y es con el que se había trabajado hasta el momento en todo el proceso de optimización y evaluación. En el diferencial hay dos electrodos de trabajo, uno en el que se inmovilizan las enzimas y otro en el que no, éste último sólo da respuesta electroquímica a compuestos de la muestra que se reducen u oxidan sin intervención de

las enzimas. Restando las señales suministrada por ambos se puede corregir la respuesta obtenida por el electrodo de trabajo enzimático y mostrar únicamente la debida a la reacción enzimática de reconocimiento de BA (lo que el sensor que no contiene enzimas mide, y por lo tanto permite eliminar las señales debidas a las interferencias electroquímicas). Además, para cada tipo de biosensor se han realizado las cuantificaciones mediante interpolación directa en las curvas de valoración de histamina y por adición estándar. Las medidas se realizaron en las condiciones optimizadas por triplicado y se aplicaron factores de dilución entre 1:25 a 1:400 de las muestras extraídas del pescado. Todos los resultados de las diferentes experiencias se recogen en la Tabla 5, donde también se incluyen las determinaciones de histamina llevadas a cabo por el kit ELISA como método de referencia.

Tabla 5 Comparación de las concentraciones de histamina de diferentes muestras de pescado determinadas mediante los biosensores bienzimáticos preparados, diferencial y sencillo, y por el método de referencia, el kit ELISA. Las muestras de pescado que se estudian a lo largo del tiempo se guardan en la nevera a 4 °C. Los resultados obtenidos se expresan con el intervalo de confianza (n=3, nivel de confianza del 95 %).

Muestra	(µg Histamina/g muestra)				ELISA
	Medidas diferenciales		Medidas no diferenciales		
	Interpolación	Adición estándar	Interpolación	Adición estándar	
Sardina (fresco)	94 ± 15	98 ± 11	100 ± 16	87 ± 3	83
Sardina (24 horas)	97 ± 20	97 ± 15	94 ± 7	93 ± 5	87
Sardina (30 horas)	108 ± 31	110 ± 23	109 ± 8	107 ± 6	102
Sardina (96 horas)	151 ± 16	134 ± 25	184 ± 8	176 ± 16	134
Sardina (168 horas)	190 ± 38	190 ± 28	208 ± 19	186 ± 16	152
Jurel (fresco)	44 ± 3	41 ± 3	41 ± 3	34 ± 7	38
Pez araña (fresco)	23 ± 2	23 ± 1	27 ± 4	23 ± 2	23
Boquerón (fresco)	26 ± 3	25 ± 2	26 ± 1	23.1 ± 0.9	20
Boquerón (24 horas)	43 ± 2	42.5 ± 0.5	42 ± 1	41 ± 3	28
Gambas descongeladas	89 ± 8	87 ± 3	86 ± 9	96 ± 19	201
Atún (fresco)	26 ± 8	24 ± 8	-	-	125

Se ha de tener en cuenta que la enzima DOx reacciona con las BA, no específicamente con la histamina, por lo que la cuantificación del biosensor será la suma de todas ellas. Sin embargo, la histamina es una de las mayoritarias en muestras de pescado, y además, es la primera en aparecer tras la captura y muerte del pescado. Así, las medidas únicamente de histamina son más fiables en las primeras horas. Por otro lado cabe decir que el Kit ELISA sí es específico para histamina, y es empleado generalmente para hacer una cuantificación rápida del nivel de esta BA en pescados.

El objetivo de estas experiencias fue en primer lugar, determinar con qué tipo de muestras funciona mejor el biosensor, y segundo, evaluar si hay efecto matriz o no mediante la comparación de los resultados obtenidos por adición estándar, interpolación directa, y biosensores diferenciales y sencillos.

Al examinar los resultados de cuantificación entre la adición estándar y la interpolación directa en tiempos de conservación no muy elevados se observa que no hay grandes diferencias, con lo que se concluye que el efecto matriz, si lo hay, es mínimo. Por otro lado, los datos obtenidos por biosensores diferenciales o sencillos son muy similares, excluyendo al atún. En este último caso, las muestras exhiben un alto grado de respuesta electroquímica causado por la oxidación de algún compuesto/s presente en este pescado, lo que hace imposible la determinación de histamina con un sensor sencillo. En este caso, empleando el biosensor diferencial, corregimos la señal ya que este proceso de oxidación se produce de igual manera en ambos electrodos de trabajo. Por último, se concluye que las muestras en las que el análisis de histamina concuerda con el obtenido mediante el método de referencia es en pescados como la sardina, el pez araña y jurel.

También se evaluó la evolución del contenido de histamina a lo largo del tiempo en algunas de las muestras, concretamente, la sardina, el jurel y los boquerones (ver Figura 4.28). En el caso de las sardinas, los resultados del biosensor y del kit ELISA durante las primeras horas concuerdan, pero empiezan a diferir a partir de las 30 horas. Esto puede ser debido a la proliferación de otras BA que también afectan a la respuesta del biosensor (son catalizadas por la DOx). De estos resultados también se deduce que la concentración de BA aumenta con el paso del tiempo, observándose un perfil similar de crecimiento en las tres muestras, siendo la cantidad de BA claramente superior cuando se trata de sardinas.

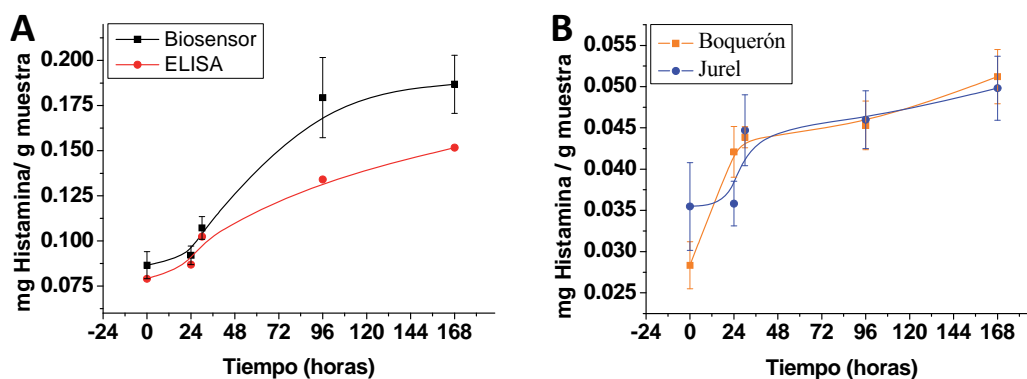


Figura 4.28 A) Evolución del contenido total de BA en sardinas(A) y boquerones y jurel (B). El pescado se mantiene a 4 °C en la nevera. Los datos representados corresponden a valores obtenidos por el biosensor no diferencial e interpolación directa en calibrados de histamina. En el caso de las sardinas, las determinaciones con contrastadas con los valores de histamina obtenidos por el método de referencia (ELISA).

4.3.6. Conclusiones

La inmovilización por IF de las enzimas DOx y HRP en la membrana de PS/CNT/Fc permite la construcción de un biosensor bienzimático que presenta un bajo límite de detección, alta sensibilidad, buenas características de estabilidad, reproducibilidad y repetividad con valores de RSD aceptables.

El biosensor es adecuado para analizar correctamente valores de histamina en pescados como la sardina, jurel y pez araña. Sin embargo, su uso presenta dificultades con el atún, boquerones y gambas. Se concluye así, que el biosensor es una alternativa viable a los métodos ELISA en este tipo de muestras, ofreciendo tiempos de análisis reducidos y costes más económicos.

4.4.Desarrollo de puertas lógicas aplicado en el mundo de los biosensores

El capítulo que se aborda a continuación describe el trabajo que se llevó a cabo en la Universidad Tor Vergata de Roma. Trata del desarrollo de sistemas de puertas lógicas generando respuestas *all-or-none* (todo o nada) a partir de biosensores enzimáticos.

4.4.1. Obtención de respuestas all-or-none

La cinética asociada a la mayoría de los sistemas enzimáticos sigue la ecuación de Michaelis-Menten, produciendo un incremento hiperbólico de la velocidad de reacción a medida que se incrementa la concentración de sustrato. La respuesta puede convertirse en una respuesta tipo *all-or-none* gracias a la adaptación del llamado “branch point

effect” (efecto del punto de ramificación), una situación que ocurre en algunas redes metabólicas en las cuales se da una competición entre dos o más enzimas por el mismo sustrato. Este proceso de competición puede dar lugar a la llamada “ultrasensibilidad”, equivalente a la que se obtiene cuando se trata de enzimas alostéricas, con coeficientes de Hill mayores a 8. La ecuación de Hill se emplea en estos casos para determinar el grado de cooperatividad de las enzimas mediante la constante de Hill.

Para cumplir con el objetivo marcado de conseguir respuestas *all-or-none* y su posterior aplicación al mundo de las puertas lógicas, se elaboró una estrategia basada en la construcción de sensores para la determinación de glucosa. Éstos se construyeron como se describe en el apartado 3.3, mediante la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx) por entrecruzamiento sobre un sensor de carbono modificado con azul de Prusia (PB) (ver apartado 3.3). La enzima GOx cataliza la reacción entre el O₂ y la glucosa produciendo ácido glucónico y H₂O₂, reduciéndose este último a un potencial de -0.05 V gracias al uso del mediador PB. Como suponíamos, la curva de respuesta asociada sigue la cinética de Michaelis-Menten con una K_m asociada de 0.8 mM (ver Figura 4.29). Para producir un efecto “branch point” se procedió a la incorporación en el sistema de la enzima hexoquinasa (HK) que reacciona también con la glucosa, compitiendo así con la GOx. Dado que la afinidad de la HK por la glucosa es mayor, la HK secuestra la glucosa disponible en disolución produciendo glucosa-6-fosfato en presencia de ATP. Cabe decir que esta reacción también está favorecida respecto la catalizada por la GOx debido a que la HK, a diferencia de la primera, se encuentra en disolución, incrementando así su capacidad catalítica.

Así, si en el sistema añadimos una cierta concentración de ATP, a concentraciones de glucosa menor o igual a éste valor, se transforma toda en glucosa-6-fosfato en un tiempo muy reducido. Como este producto no es electroquímicamente activo, no se obtiene respuesta alguna. Por el contrario, cuando la glucosa total sobrepasa este umbral, la reacción con HK se satura y la GOx puede catalizar la oxidación de la glucosa restante produciendo H₂O₂ y generando por tanto, una respuesta del biosensor. De esta manera, se consigue obtener una respuesta pseudo-cooperativa como puede observarse en la Figura 4.29 B. Para demostrar este hecho, se han ajustado las respuestas para obtener los pseudo-coeficientes de Hill, de uso común para describir los sistemas enzimáticos cooperativos. Los resultados mostraron n_H para GOx 1.7, cercano al que debería ser su valor teórico (la unidad). La diferencia es debida a que en este caso

la cantidad de O_2 en disolución está limitada. Al añadir una cantidad de ATP con concentración final en disolución de 0.125 mM, el valor de n_H aumenta hasta 7.8.

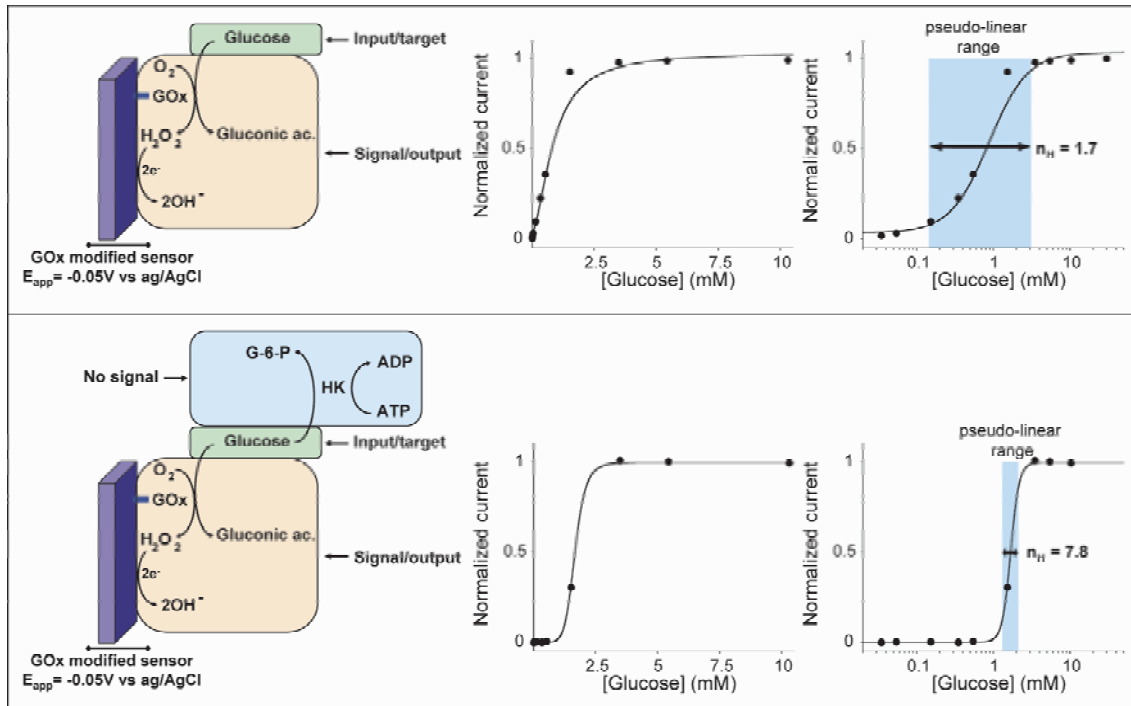


Figura 4.29 A) Diagrama esquemático de las reacciones involucradas en la determinación de glucosa por parte del biosensor cuando se inmoviliza la enzima GOx en la membrana. A la derecha se representa la respuesta de éste a medida que se añaden diferentes de alícuotas de glucosa en una escala lineal o logarítmica B) Introducción de la enzima HK al sistema enzimático, en presencia de ATP (en este caso 1.25 mM). Se obtiene una curva de respuesta pseudo-cooperativa.

Se puede conseguir una respuesta más o menos pronunciada variando las concentraciones de ATP en disolución. La sensibilidad es más alta cuanto más se acerca el nivel de ATP al límite de saturación de la enzima GOx ($[ATP]/K_m > 1$). Si por el contrario, la concentración de ATP se encuentra en el intervalo donde la enzima aún responde linealmente a la glucosa, la sensibilidad de su respuesta es tan sólo un poco más alta de lo que sería en ausencia del ATP y de la HK. En la Figura 4.30 puede observarse este efecto, donde la concentración de ATP se ha variado de 0 a 3 mM, obteniéndose mayor o menor grado de ultrasensibilidad. Los pseudo-coeficientes de Hill también aumentan a la vez que lo hace la concentración de ATP o el cociente $[ATP]/K_m$.

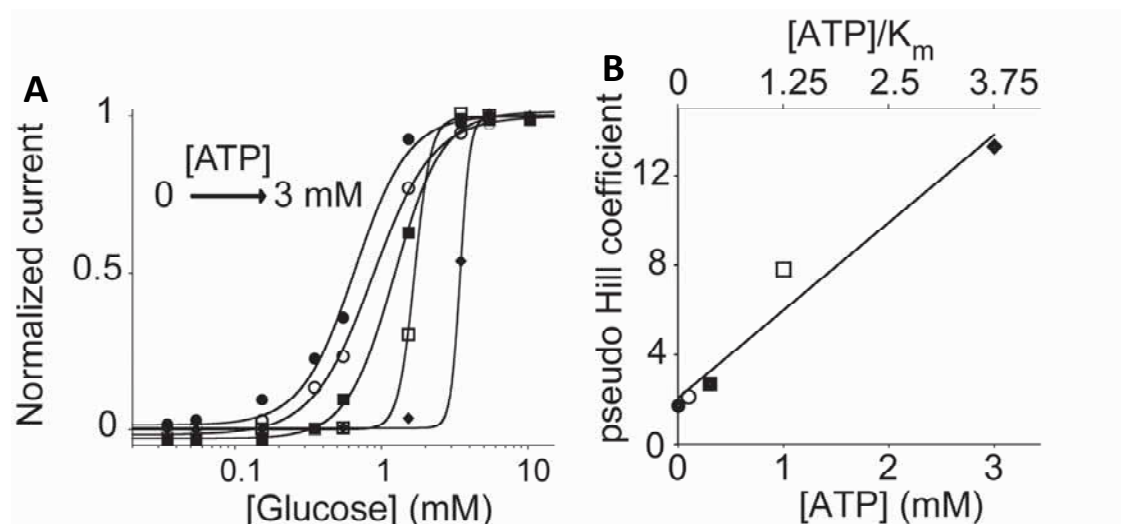


Figura 4.30 A) Uso de la HK como “secuestrador” de glucosa, donde se varía la concentración de ATP (0, 0.1, 0.3, 1.25, 3 mM ATP). A través del ajuste matemático de la respuesta electroquímica se obtienen los n_H correspondientes a cada concentración de ATP. B) Los n_H calculados en A se representan vs [ATP] y el cociente $[ATP]/K_m$.

Para demostrar la aplicabilidad del concepto en estudio, se optó por trabajar con los niveles de glucosa que se indican para la diferenciación de diversos estados como la hipoglucemia o la hiperglucemia.

Tabla 6 Niveles de glucosa en sangre normal o en estado de hipoglucemia e hiperglucemia.

	[Glucosa] (mg/dl)	[Glucosa] (mM)
Hipoglucemia	25	1.25
	45	2.5
Normal	90	5
Hiperglucemia	135	7.5
	180	10
	225	12.5

Así, se prepararon los sensores basados en GOx y se llevaron a cabo diferentes calibraciones, en los que se varió en cada caso la [ATP], equivalente a algunos de los valores límite de glucosa que aparecen en la Tabla 6.

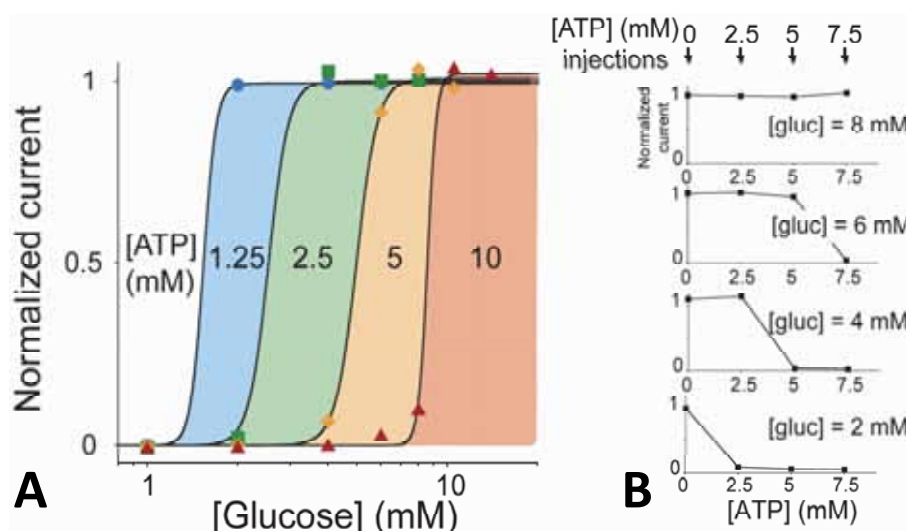


Figura 4.31 Empleo de los sensores basados en GOx para el estudio de la respuesta *all-or-none* de alguno de los niveles clínicamente relevantes de glucosa. A) Calibrados de glucosa en presencia de HK. Las cantidades de ATP se han variado para ser equivalentes a los niveles de glucosa de interés. B) Evolución de la señal para 4 sensores diferentes en los que se depositó una gota de disolución de concentración constante de glucosa y HK, a la que se añaden alícuotas de ATP hasta conseguir concentraciones de 2.5, 5 y 7.5 mM.

Siguiendo el mismo concepto, se cambió el método de análisis. Se prepararon 4 sensores en los que se depositó una gota de disolución cubriendo los 3 electrodos. Para cada sensor la gota contenía una concentración de glucosa diferente, de 2 a 8 mM y una concentración constante de HK. Tras la estabilización de la señal, se efectuó la adición de diferentes concentraciones de ATP. Los resultados, como se observa en la Figura 4.31 B, dan una señal nuevamente tipo *all-or-none*. Al sobrepasar la concentración de ATP a la inicial de glucosa en la disolución, la respuesta amperométrica disminuye drásticamente. Con esto se concluye además que éste tipo de medida puede llevarse a cabo simplemente con la adición de una gota sobre el electrodo, teniendo en cuenta que la velocidad de reacción es más lenta ya que no hay agitación de la disolución y las moléculas se desplazan por difusión.

Como ejemplo visual, en la Figura 4.32 se muestra la cronoamperometría obtenida para glucosa cuando en el sistema se incorporan HK y ATP (2.5 mM en este caso). Tras la adición de glucosa, para valores de concentración de ésta mayores a la de ATP, la intensidad de corriente crece rápidamente y se mantiene a niveles altos. La posterior adición de más glucosa ya no hace variar prácticamente la intensidad total medida. Se observa sin embargo, que a concentraciones de glucosa cercanas al nivel de ATP, la cantidad de glucosa es tal que una parte puede llegar a reaccionar con la GOx generando una señal de reducción. Esperando unos segundos, la HK pasa a ser la enzima

dominante y desaparece la respuesta electroquímica debida el H_2O_2 formado previamente.

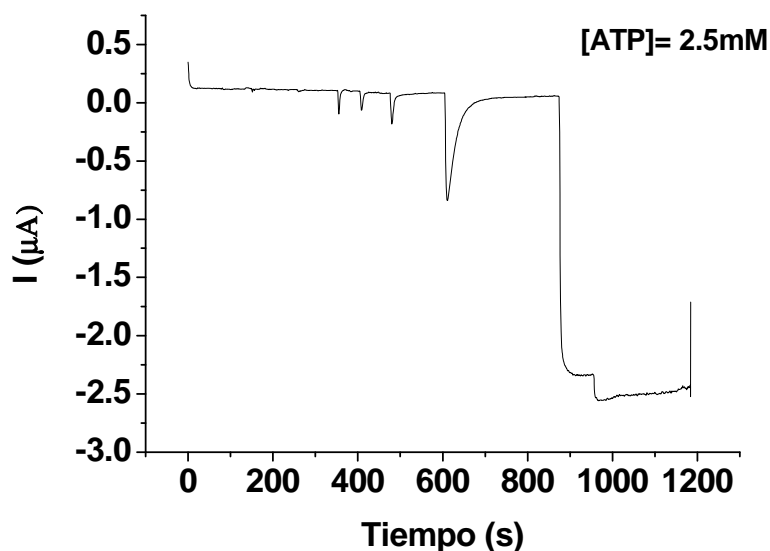


Figura 4.32 Cronoamperometría realizada con el biosensor de GOx, en presencia de HK y una $[\text{ATP}]=2.5 \text{ mM}$, adicionando diferentes alicuotas de glucosa.

4.4.2. Aplicación de la respuesta *all-or-none* en el desarrollo de puertas lógicas

Dado que es posible ajustar arbitrariamente la respuesta, puede emplearse esta estrategia para la aplicación de los biosensores al desarrollo de puertas lógicas en las que se necesite un tipo de respuesta "sí o no". Para llevar a cabo un estudio de puertas lógicas en sistemas biológicos se asigna valor 0 al nivel normal del biomarcador, y 1 a los niveles patológicos. Sin embargo es complicado asociar los valores límite cuando la respuesta sigue una cinética de Michaelis-Menten. Así, se procedió a desarrollar una puerta lógica tipo AND recientemente descrita en otros trabajos^{14, 15}.

En principio, esta puerta lógica da una señal de salida en presencia de dos entradas específicas, por un lado la enzima GOx (entrada A) y la glucosa (entrada B) (ambas en solución). Para implementar el efecto "branch point" se introduce en el sistema enzimático un filtro compuesto por HRP y OPD (*o*-fenilendiamina) (ver Figura 4.33 A). La HRP reacciona con el H_2O_2 mientras la OPD pueda regenerar la enzima, de manera que no se produce ninguna respuesta electroquímica. Aquí es, al igual que el ATP con la HK, la OPD quien determina a partir de que concentración de glucosa se obtendría la señal de salida al que se asignará el valor 1. Así, cuando la concentración total de H_2O_2

equivale o es menor a la de OPD, la señal neta será 0. En este sentido, se ha de tener en cuenta la proporción estequiométrica 3:2 ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{OPD}$). La transición digital entre 0 y 1 se puede controlar variando la concentración del filtro, permitiendo así un importante paso en el diseño de puertas lógicas.

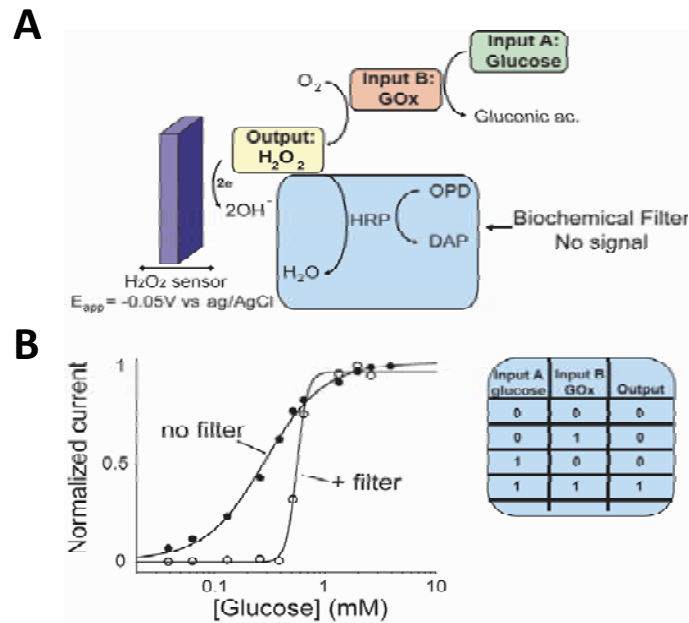


Figura 4.33 A) Diagrama esquemático del sistema enzimático en el que se incorpora un filtro de HRP/OPD para “secuestrar” el H_2O_2 producido por la reacción catalizada por la glucosa. El esquema describe una puerta lógica AND, donde la glucosa y la GOx representan la entrada A y B respectivamente. B) Con el uso del filtro HRP/OPD, se consigue obtener respuesta de ultrasensibilidad. Se efectuaron calibrados de glucosa en una disolución que contiene [HRP] con y sin OPD.

4.4.3. Conclusiones

Se ha establecido una nueva estrategia para convertir la típica respuesta gradual de las enzimas que siguen la cinética de Michaelis-Menten en una respuesta tipo *all-or-none*, implementando un efecto “branch point” en el que las enzimas compiten por el mismo sustrato. Una de ellas, la que tiene mayor afinidad por el sustrato, actúa inhibiendo a la otra, de manera que podemos modificar la respuesta variando ciertos parámetros. Seleccionando como modelo la reacción de glucosa y la enzima GOx con la consiguiente producción de H_2O_2 , al añadir ATP y HK, ésta última enzima “secuestra” la glucosa. Cuando se sobrepasa el umbral de ATP se observa un comportamiento pseudocooperativo, aumentando la sensibilidad de la respuesta amperométrica y aumentando el índice de Hill.

De igual manera, si en lugar de HK, añadimos HRP y OPD en la disolución, el H₂O₂ es catalizado por la enzima peroxidasa y no se detecta en el sensor. Al sobrepasar el valor de OPD añadido, se observa el mismo comportamiento de ultrasensibilidad. Implementando este comportamiento a las puertas lógicas, se obtienen señales 0 y 1 más nítidas.

4.5. Bibliografía

1. S. Sanchez, M. Pumera and E. Fabregas, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **23**, 332-340.
2. R. Baron, O. Lioubashevski, E. Katz, T. Niazov and I. Willner, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 8451-8456.
3. M. Santandreu, S. Alegret and E. Fabregas, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **396**, 181-188.
4. A. F. Chetcuti, D. K. Y. Wong and M. C. Stuart, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4088-4094.
5. J. Bakker, P. Gris, M. Coffernils, R. J. Kahn and J. L. Vincent, *American Journal of Surgery*, 1996, **171**, 221-226.
6. G. J. Kost, T. H. Nguyen and Z. P. Tang, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2000, **124**, 1128-1134.
7. J. D. Artiss, R. E. Karcher, K. T. Cavanagh, S. L. Collins, V. J. Peterson, S. Varma and B. Zak, *American Journal of Clinical Pathology*, 2000, **114**, 139-143.
8. J. Huang, Z. Song, J. Li, Y. Yang, H. Shi, B. Wu, J.-i. Anzai, T. Osa and Q. Chen, *Mater. Sci. Eng. C-Biomimetic Supramol. Syst.*, 2007, **27**, 29-34.
9. A. Poscia, D. Messeri, D. Moscone, F. Ricci and F. Valgimigli, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 2244-2250.
10. P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud, *Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*, Wiley-Blackwell, London, 2000.
11. N. Nikolaus and B. Strehlitz, *Microchim. Acta*, 2008, **160**, 15-55.
12. B. Prieto-Simón, E. Fàbregas and A. Hart, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 2663-2668.
13. X. H. Chen, Y. B. Hu and G. S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**, 1005-1013.
14. J. Wang and E. Katz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 1591-1603.
15. E. Katz and V. Privman, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 1835-1857.

5. Conclusiones generales

5. Conclusiones generales

A partir de los resultados obtenidos a lo largo del estudio realizado y detallado en esta tesis doctoral, se extraen las conclusiones generales que se exponen a continuación.

En primer lugar, referente a los biosensores basado en membranas de PS/CNT:

- Las membranas formadas por CNT/PS resultan ser porosas y rugosas, y por lo tanto, de gran superficie activa. Los CNT permiten obtener una membrana conductora y con excelentes propiedades electrocatalíticas.
- Además se su rapidez metodológica para la preparación de membranas de polisulfona, la técnica de inversión de fase permite la fácil incorporación de biomoléculas por atrapamiento. Ejemplo de ello han sido anticuerpos RIgG, Anti-RIgG, las enzimas LOx, LDH y HRP y la hormona hCG.
- El uso de CSLM en membranas de 100 μm de grosor medio demostró una penetración de las biomoléculas estudiadas de 20 μm
- La implementación de las membranas de polisulfona en electrodos serigrafiados de carbono se muestra como una estrategia viable para el desarrollo de inmunosensores, y biosensores enzimáticos.
- En el caso de sensores donde los tres electrodos están serigrafiados, la preparación de biosensores da lugar a estrategias de medida en las cuales se hace el sistema más portable y permite reducir el volumen de muestra a unos pocos microlitros.
- Para la determinación de L-lactato, a partir de las tres estrategias desarrolladas, se concluye que la más viable es la preparación de biosensores bienzimáticos basados en LOx/HRP y empleando ferroceno como mediador electroquímico. El biosensor muestra un bajo límite de detección, y un alta sensibilidad, además de valores de reproducibilidad aceptables. Sin embargo presenta una estabilidad baja. El análisis de lactato en muestras de vino y cerveza certifican sus buenos resultados comparándolo con un kit de referencia comercial basado en medidas espectrofotométricas. Además se observa un bajo grado de afectación en la cuantificación debido a interferencias potenciales de las muestras.

- La determinación de aminas biógenas fue posible gracias al desarrollo de un biosensor bienzimático basado en DOx/HRP y ferroceno, que presenta un bajo límite de detección, alta sensibilidad y estabilidad, además de una buena reproducibilidad y repetitividad. Del estudio de muestras reales se puede afirmar que el biosensor puede aplicarse con una fiabilidad razonable para la determinación de histamina en muestras de distintos peces, excepto el atún.

Respecto a la aplicación de biosensores en el diseño de puertas lógicas se concluye que:

- La respuesta típica de Michaelis-Menten puede modificarse mediante el efecto “branch-point” para dar lugar a respuestas ultrasensibles tipo *all-or-none*. Para ello se combina el efecto de la enzima HK y el ATP con el sistema enzimático basado en la inmovilización de GOx. Mediante la variación de ATP, puede lograrse un mayor o menor grado de pseudo-cooperatividad, lográndose máximos cuando la concentración de ATP es cercana al valor de saturación de la enzima GOx.
- Introduciendo en el mismo sistema de GOx y glucosa, HRP y OPD se crea un filtro de manera que se secuestra el H₂O₂ producido por la primera enzima. La cantidad de OPD añadida en disolución permite, como en el caso del ATP, variar el grado de respuesta *all-or-none*. Aplicando este sistema a una típica puerta lógica AND, se consigue limitar claramente las señales a una respuesta 0 y 1.

6. Artículos publicados

6. Artículos publicados

- I. **Toward a Fast, Easy, and Versatile Immobilization of Biomolecules into Carbon Nanotube/Polysulfone-Based Biosensors for the Detection of hCG Hormon**
S. Sánchez, M. Roldán, S. Pérez and E. Fàbregas
Analytical Chemistry, **80**(17): 6508-6514
- II. **Employing the Metabolic “Branch Point Effect” to Generate an All-or-None, Digital-like Response in Enzymatic Outputs and Enzyme-Based Sensors**
S. Pérez, A. Vallée-Bélisle, E. Fàbregas, K. Plaxco, G. Palleschi and F. Ricci
Analytical Chemistry, **84**(2): 1076-1082
- III. **Enzymatic Strategies to Construct L-Lactate Biosensors Based on Polysulfone/Carbon Nanotubes Membranes**
S. Pérez, S. Sánchez and E. Fàbregas
Electroanalysis, **24**(4): 967-974
- IV. **Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples**
S. Pérez and E. Fàbregas
Analyst, **137**(16): 3854-3861

Artículo 1

Toward a Fast, Easy, and Versatile Immobilization of Biomolecules into Carbon Nanotube/Polysulfone-Based Biosensors for the Detection of hCG Hormon

S. Sánchez, M. Roldán, S. Pérez and E. Fàbregas

Analytical Chemistry, **80**(17): 6508-6514

Toward a Fast, Easy, and Versatile Immobilization of Biomolecules into Carbon Nanotube/Polysulfone-Based Biosensors for the Detection of hCG Hormone

Samuel Sánchez,*† Mònica Roldán,‡ Sandra Pérez,† and Esteve Fàbregas*†

Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry and Microscopy Facility, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

The aim of this study was the fabrication and characterization of biomembranes by the phase inversion (PI) method followed by their subsequent casting onto screen-printed electrodes (SPE) for biomedical applications. The combination of multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) as a transducer with polysulfone (PSf) polymer enables easy incorporation of biological moieties (hormones or antibodies), providing a 3D composite with high electrochemical response to corresponding analytes. Antibody/MWCNT/PSf biosensors were characterized by confocal scanning laser microscopy (CSLM), scanning electron microscopy (SEM), and electrochemical methods. For biomedical purposes, human chorionic gonadotropin (hCG) hormone was tested by competitive immunoassay. The detection limit was determined to be 14.6 mIU/mL with a linear range up to 600 mIU/mL. We concluded that the easy and fast incorporation of biomolecules by the PI method, as well as their stability and distribution throughout the 3D polysulfone composite, are testament to the utility for the versatile fabrication of biosensors for clinical diagnosis.

Advances in nanotechnology have greatly influenced the field of electrochemical biosensors over the past few years.^{1,2} Considerable attention has been paid to the development of new biocompatible and highly conductive materials for biosensing and biomedical applications.^{3–5} As such, there has been a recent surge in research on the immobilization of enzymes, proteins, and

antibodies onto polymers coupled to carbon nanotubes.⁶ A popular method for improving the sensitivity of sensors (including biosensors) is to incorporate nanoparticles^{7,8} and/or carbon nanotubes (CNTs).^{9,10}

CNTs are an important class of material due to their unique electronic, mechanic, and structural characteristics.¹¹ The fast electron transfer from redox proteins such as cytochrome c, ferritin, myoglobin, hemoglobin, and azurin has been reported.^{12–16} Recently, CNTs were coupled to microfluidic devices for real sample detection in food analysis.¹⁷

Various configurations have been developed for electrodes modified with carbon nanotubes. These include dispersing CNTs in different solvents (e.g., DMF^{18,19} and bromoform²⁰) and then casting them onto glassy carbon electrodes or packing polymer (binder) and nanotubes to form a composite matrix electrode (e.g., Teflon,¹ Nafion,²¹ chitosan,²² mineral oil,²³ inks,²⁴ PSf,^{25,26} and

* To whom correspondence should be addressed. Esteve Fàbregas Martínez and Samuel Sánchez, Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain. E-mail: Esteve.fabregas@uab.cat (E.F.); samuel.sanchez@uab.es (S.S.). Phone: (0034) 935812483. Fax: (0034) 935812359.

† Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry.

‡ Microscopy Facility.

- (1) Wang, J.; Musameh, M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2075.
- (2) Musameh, W.; Wang, J.; Merkoçi, A.; Lin, Y. *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 743.
- (3) Wohlstädter, J. N.; Wilbur, J. L.; Sigal, G. B.; Biebuyck, H. A.; Billadeau, M. A.; Dong, L.; Fischer, A. B.; Gudibbande, S. R.; Jameison, S. H.; Kente, J. H.; Leginus, J.; Leland, J. K.; Massey, R. J.; Wohlstädter, S. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1184.
- (4) Zhang, M.; Gorski, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2058.
- (5) Merkoçi, A.; Pumera, M.; Llopis, X.; Perez, B.; del Valle, M.; Alegret, S. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 826.

- (6) Joshi, P. P.; Merchant, S. A.; Wang, Y.; Schmidtke, D. W. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3183.
- (7) Wang, J. *Small* **2005**, *1*, 1036.
- (8) Willner, I.; Baron, R.; Willner, B. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1841.
- (9) Banks, G. E.; Moore, R.; Davies, T. V.; Compton, G. *Chem. Commun.* **2004**, 1804.
- (10) Britto, J. P.; Santhanam, K. S. V.; Rubio, A.; Alonso, J. A.; Ajayan, P. M. *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 154.
- (11) Ajayan, P. M. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1787.
- (12) Yin, Y.; Wu, P.; Lü, Y.; Du, P.; Shi, Y.; Cai, C. *Solid State Electrochem.* **2007**, *11*, 390.
- (13) Zhang, H.; Fan, L.; Yan, S. *Chem.—Eur. J.* **2006**, *12*, 7161.
- (14) Davis, J. J.; Coles, R. J.; Allen, H.; Hill, O. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *440*, 279.
- (15) Deo, R. P.; Wang, J.; Block, I.; Mulchandani, A.; Joshi, K. A.; Trojanowicz, M.; Scholz, F.; Chen, W.; Lin, Y. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *530*, 185.
- (16) Wang, J.; Tangkuaram, T.; Loyprasert, S.; Vazquez-Alvarez, T.; Veerasai, W.; Kanatharana, P.; Thavarungkul, P. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *581*, 1.
- (17) González-Crevillén, A.; Ávila, M.; Pumera, M.; González, M. C.; Escarpa, A. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7408.
- (18) Wang, J.; Kawde, A. N.; Musameh, M. *Analyst* **2003**, *128* (7), 912.
- (19) Wang, J. X.; Li, M.; Shi, Z.; Li, N.; Gu, Z. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1193.
- (20) Britto, J. P.; Santhanam, K. S. V.; Ajayan, P. M. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, *41*, 121.
- (21) Wang, J.; Musameh, M.; Lin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2408.
- (22) Liu, Y.; Qu, X.; Guo, H.; Chen, H.; Liu, B.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 2195.
- (23) Rubianes, M. D.; Rivas, G. A. *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 689.
- (24) Wang, J.; Musameh, M. *Analyst* **2004**, *129*, 1.
- (25) Sanchez, S.; Pumera, M.; Cabruja, E.; Fabregas, E. *Analyst* **2007**, *132* (2), 142.
- (26) Sanchez, S.; Pumera, M.; Fabregas, E. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23* (3), 332.

epoxy resin²⁷). Other examples include the immobilization of MWCNT onto basal plane pyrolytic graphite (BPPG) abrasively attached to an electrode surface.²⁸

Electrochemical immunosensors boast the specificity of immunochemical systems plus the advantages of electrochemical transducers (i.e., they are robust, sensitive, and cost-effective). The most crucial step in immunosensor design is the immobilization of the immunoreagent onto or into the electrode surface. Indeed, the quality of immobilization determines the sensitivity and reproducibility of the sensor.

A few papers on electrochemical immunosensors that use CNTs have been published in recent years.²⁹ Although the schemes reported in these publications enable surface immobilization or adsorption of antibodies as well as immunodetection based on electrochemical methods, none of them offer a cheap method for mass-production of sensors for biomedical or clinical diagnosis.

Porous, polymeric polysulfone (PSf) membranes have been prepared by the easy, fast, and cheap method of PI.^{30,31} This method is now widely used and has become evermore important in the biosensing field, owing to its high versatility and broad scope. Polysulfone membranes can be coupled to screen-printed technology for an amenable mass production, cost-effective, single-use biosensor with bioanalytical and biomedical applications. This membrane enables ready incorporation of enzymes,²⁵ antibodies,^{26,32} redox mediators,³³ proteins,³⁴ and hormones from aqueous solution. Once attached, these biomolecules exhibit long-term resistance in the matrix.

The synergy between CNTs and PSf yields a highly conductive composite that can easily be modified with biomolecules to serve as a platform for clinical diagnosis. The use of nanotechnologies for diagnostic applications shows great promise to meet the rigorous demands of the clinical laboratory for sensitivity, fast response, and cost-effectiveness.

Human chorionic gonadotrophin (hCG) is a glycoprotein that consists of two subunits (α and β). The latter is unique to hCG, and a specific pregnancy test for it are not subject to hormonal crossreactivity.³⁵ An important clinical parameter is the early diagnosis of ectopic pregnancy and for monitoring trophoblastic and testicular cancers, achieved by the determination of the β subunit from hCG.^{36,37}

Herein is described a versatile method for the construction of immunosensors whereby the biomolecules are immobilized within a MWCNT/PSf composite film. The membrane is cast onto screen-printed working electrodes to provide a single-use immunosensor, suitable for the rapid determination of hCG hormone

and IgG antibody. Confocal scanning laser microscopy (CSLM) was used as a new, nondestructive method for membrane characterization and quantification of immobilized immunofluorescence labeled antibodies. To the best of our knowledge, this is the first report of the 3D reconstruction of a biocomposite. In this work, the PI method was described as an immobilization tool for fast and cheap production of immunosensors for different biomedical applications.

MATERIALS AND METHODS

Polysulfone was obtained from BASF (BASF Ultrasons S 3010 natur, Frankfurt, Germany) and dissolved in *N,N*-dimethylformamide (DMF) from Panreac (Barcelona, Spain). Multiwalled carbon nanotubes (MWCNT; length, 0.5–200 μm ; external diameter, 30–50 nm; and internal diameter, 5–15 nm) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Further purification was accomplished by stirring the MWCNT in 2 M nitric acid (Panreac, Barcelona, Spain) for 24 h and drying at 80 °C in a furnace.²⁷ Bovine serum albumin (BSA) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), EDTA from Merck (Darmstadt, Germany), and potassium chloride from Fluka (Büchs, Switzerland). The H_2O_2 solution was prepared just before the experiments by diluting a 30% stock solution of H_2O_2 from Merck. Hydroquinone (HQ) (Sigma, Germany) was prepared just before the experiments and deoxygenized by bubbling nitrogen into the solution. The buffer used for the immunochemical reaction was phosphate buffer saline (PBS; 0.1 M KCl, 0.1 M phosphate sodium, pH 7.0). All solutions were prepared in doubly distilled water.

The immunologic reagents used were IgG from rabbit (RIgG) (I-5006), conjugated anti-Rabbit IgG peroxidase (HRP) (GaRIgG-HRP) (A-6667), and free anti-Rabbit IgG (R2004) provided from Sigma (St. Louis, MO). Anti-RIgG-Alexa568 was obtained from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Human chorionic gonadotropin (FZ30-AC40), β subunit of human chorionic gonadotropin (hCG- β) (FZ30-AC50), monoclonal antibody human chorionic gonadotropin (hCG- β)-HRP conjugated (FZ61-H10), and monoclonal antibody human chorionic gonadotropin (hCG- β) (FZ10-C25) were purchased from Europa Bioproducts Ltd. (England). Acheson carbon ink (Electrodag 400B), conductive silver ink (Electrodag 6037 SS), and insulating ink (Minico M 7000) were obtained from Acheson Colloids Co. (Scheemda, The Netherlands).

Biomolecule/MWCNT/PSf Biocomposite Preparation.

The composite membranes were prepared by mixing 100 μL of 7.5% (w/w) PSf–DMF solution with 100 μL of 5.0% (w/v) MWCNT–DMF suspension for 10 min under continuous stirring and then 5 min of sonication. MWCNTs were previously purified in nitric acid (6 M) for 24 h. Once a homogeneous mixture was obtained, it was printed by serigraphy onto either a bare SPGE for electrochemistry or a PC sheet for CSLM observations (Figure 1A). Immediately after printing, the polysulfone composite was precipitated by the PI method, whereby the membrane was immersed into an aqueous solution in which the nonsolvent (H_2O) displaces the solvent (DMF) (Figure 1B). In this stage, a small amount of antibody or hormone in solution can be immobilized simultaneously with the precipitation of the PSf to afford the biomembrane. Different modified membranes are shown in parts

- (27) Pumera, M.; Merkoçi, A.; Alegret, S. *Sens. Actuators, B* **2006**, *113*, 617.
(28) Salimi, A.; Banks, C. E.; Compton, R. G. *Analyst* **2004**, *129*, 225.
(29) O'Connor, M.; Kim, S. N.; Killard, A. J.; Forster, R. J.; Smyth, M. R.; Papadimitrakopoulou, F.; Rusling, J. F. *Analyst* **2004**, *129*, 1176.
(30) Mulder, M. *Basic Principles of Membrane Technology*; Kluwer Academia Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2000.
(31) Choi, J. H.; Jegal, J.; Kim, W. M. *J. Membr. Sci.* **2006**, *284*, 406.
(32) Sánchez, S.; Fàbregas, E. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (6), 965.
(33) Prieto, Simón.; Fàbregas, E. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (1), 131.
(34) González-Bellavista, A.; Atrian, S.; Muñoz, M.; Capdevila, M.; Fàbregas, E. Pending Patent.
(35) Snyder, J. A.; Haymond, S.; Parvin, C. A.; Gronowski, A. M.; Grenache, D. G. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 1830.
(36) Sinosich, M. J.; Torode, H.; Saunders, D. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **1993**, *33*, 307.
(37) Santandreu, M.; Alegret, S.; Fàbregas, E. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *396*, 181.

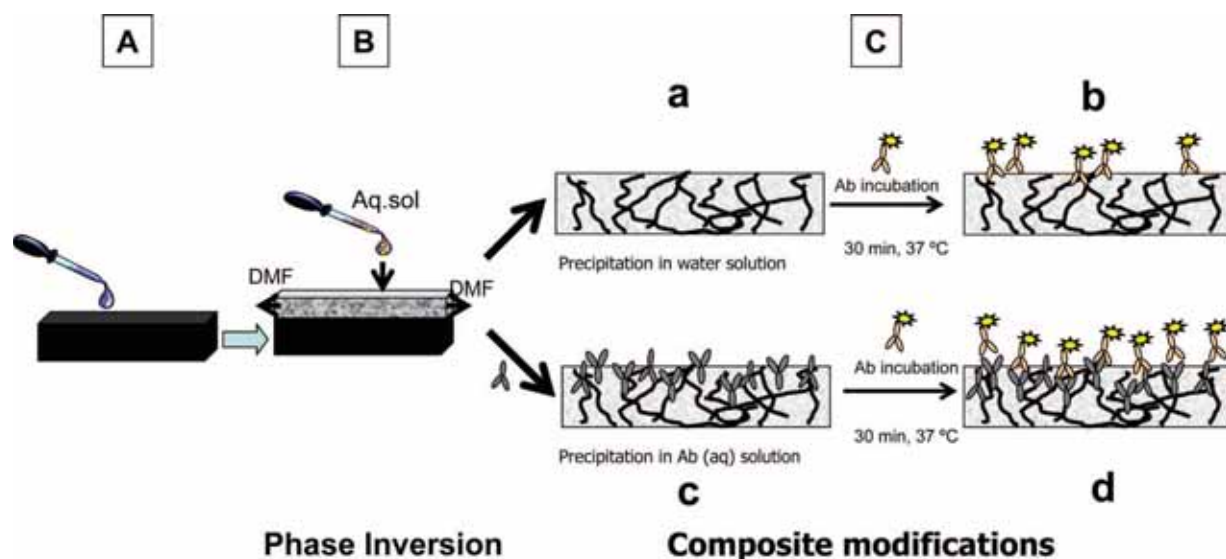


Figure 1. CNT/PSf composite fabrication and subsequent modifications by phase inversion (PI): (A) printing of the composite onto screen-printed working electrodes; (B) precipitation of the PSf composite by PI using aqueous solution; (C) different modifications of the composite (a) control composite, (b) nonspecific adsorption by incubation of the labeled antibody after precipitation, (c) immobilization of the antibody by PI (Alexa568 labeled is used for CSLM observations) and (d) immobilization of the primary antibody by PI and incubation in labeled antibody solution.

a–d of Figure 1C. HRP enzyme was used as a label for electrochemistry measurements and Alexa568 for CSLM characterization.

Preparation of the Screen Printed Immunosensor. The biomolecule/MWCNT/PSf biocomposite was printed by serigraphy to the screen-printed graphite electrode (SPGE) previously deposited onto a polycarbonate (PC) substrate. These graphite electrodes were prepared using three inks: silver conducting ink, carbon ink, and insulating ink that were consecutively printed and then cured in the furnace at 60 °C for 30 min. The area of the working electrode was 20 mm² (see scheme in Figure S3 of the Supporting Information).

Confocal Scanning Laser Microscopy Measurements. Confocal scanning laser microscopy (CSLM) was performed with a Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) using the following lenses: $\times 10$ (0.4 numerical aperture or NA), $\times 20$ (0.7 NA) dry, and $\times 63$ (1.4 NA) Plan-Apochromat oil immersion objective. CSLM was used for imaging in the fluorescence (excitation at 561 nm and emission at 580–730 nm) and reflection (excitation at 488 nm and emission at 480–500 nm) modes.

The projection integrates the maximum reflection intensities of each *X*, *Y* point of all stacks along the *Z*-axis in the whole membrane. Orthogonal sections of the membranes can be obtained optically by scanning a single line at different *Z* depths in the *X* or *Y* direction. From these data, an *XZ* or *YZ* profile is produced from a stack of *Z* sections (Figure 2, orthogonal section).

Images were processed using Leica Confocal Software (LCS) version 2.61. Mean fluorescence intensity (MFI) and integrated fluorescence intensity (IF) of Alexa 568-Antirabbit IgG were quantified using the Metamorph software package (Universal Imaging Corporation Downingtown, PA). The data sets were exported into Microsoft Excel for analysis. The intensity of each pixel had a value ranging from 0 to 255 levels of gray. The image was segmented into foreground and background by setting a

threshold, which separated the pixels of interest from the rest of the image. The same threshold was used for all samples.

Scanning Electron Microscopy Measurements. The composite was immersed in liquid N₂ and cut by a knife immediately in order to see its profile by SEM. The samples were glued to aluminum stubs, coated with gold in a sputter coater (Emitech K550X, Kent, U.K.), and observed by a Hitachi S-570 scanning electron microscope (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) using an accelerating voltage of 15 kV.

Electrochemical Measurements. Cyclic voltammograms (CVs) of the MWCNT/PSf electrodes were obtained to investigate whether a thick film of this composite enhances the electron-transfer process mediated by HQ when it is cast on a bare SPGE. Amperometric experiments were used to quantify the analyte (RIGG or hCG) into solution of the immunoassays.

Instrumentation. Amperometric experiments were performed with a Bioanalytical System (BAS) LC-4C amperometric controller connected to a BAS *X*–*Y* recorder. Cyclic voltammograms were recorded with the AUTOLAB PGSTAT10 electrochemical analyzer (Eco Chemie BV, The Netherlands). All experiments were carried out in a three-electrode cell. The Ag/AgCl reference electrode (900200, Orion Thermo; West Palm Beach, FL) was filled with 0.1 M KCl as an external reference solution. A platinum auxiliary electrode was used, and the working and reference electrodes were placed close together to minimize *IR* drop. A stirring bar (7 mm \times 2 mm) and a magnetic stirrer provided the convective transport during amperometric measurements (400 rpm). Incubations at controlled temperature were performed in an Eppendorf Thermomixer (model 5436, Kisker-Biotech, Barcelona, Spain).

RIGG Immunosensor Assay. The immunosensors were electrochemically characterized by sandwich immunoassay within the following method: After the preparation by PI method of the anti-RIGG/MWCNT/PSf immunosensor (immersing into an anti-RIGG 5 μ g/mL solution), a blocking treatment with 2% (w/v) BSA at 37 °C with stirring was used to prevent the nonspecific binding

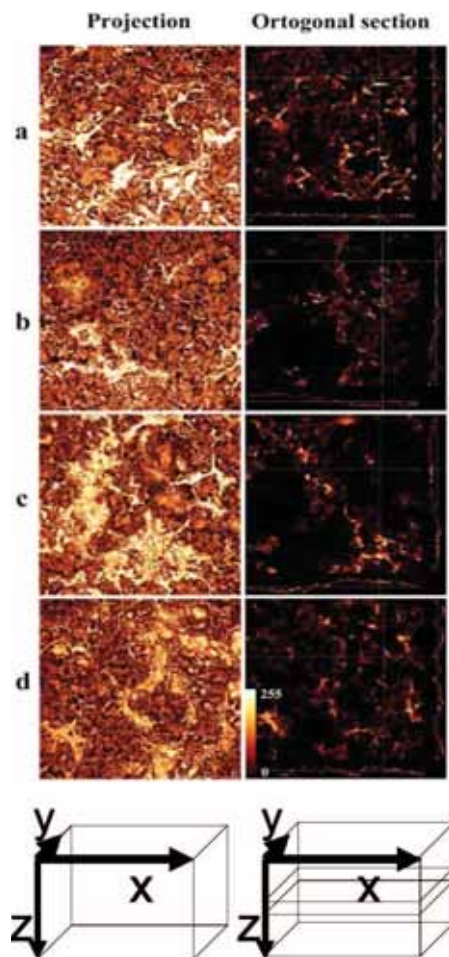


Figure 2. CSLM micrographs obtained in the reflection mode of four types of membranes (sample area, $775 \mu\text{m} \times 775 \mu\text{m}$). The different types of membranes are similar in morphology and porosity. Three-dimensional projections and orthogonal views of a series of 80–120 sections with a Z step of $0.9 \mu\text{m}$: (a) CNT/PSf composite (thickness, $104.38 \mu\text{m}$); (b) nonspecific adsorption of Alexa568 (thickness, $95.38 \mu\text{m}$); (c) Alexa 568 introduced by PI (thickness, $91.19 \mu\text{m}$); (d) RIgG introduced by PI and subsequent reaction with Alexa 568 by incubation (thickness, $74.70 \mu\text{m}$). Scale bar = $250 \mu\text{m}$.

of RIgG to the membrane. The next step was the incubation of RIgG analyte at 37°C for 30 min, followed by rinsing with PBS solution for 5 min. Secondary HRP labeled antibody (anti-RIgG-HRP $2 \mu\text{g}/\text{mL}$) was incubated at 37°C for 30 min, followed by 5 min of rinsing in PBS solution with stirring at the same temperature. The HRP enzymatic reaction was tracked by the addition of hydrogen peroxide to the bulk solution for the characterization of immunosensors using HQ as a mediator. Measurements were carried out in PBS buffer containing an electrolyte medium with magnetic stirring. A potential of -225 mV vs SCE electrode was applied to the working electrode. All measurements were performed at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) under ambient conditions. For comparison, we carried out the electrochemical experiments in nitrogen purged solution and we observed no differences in the signal response compared to the response of solution under ambient atmosphere.

Direct Immunoassay for hCG- β . In order to evaluate the immunosensor containing hCG- β , it was incubated with anti-hCG- β -HRP ($2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) solution for 30 min at 37°C while stirring.

Table 1. Mean Thickness and Depth of the Alexa568 Labelled Antibody for Membranes Modified Following Figure 1^a

	mean thickness (μm)	std error	Ab penetration (μm)	std error
(a) unmodified (PI)	121	10		
(b) unspecific adsorption	150	7	16	3
(c) Ab by phase inversion	105	7	22	2
(d) immunosensor	135	7	24	3

^a Data obtained from CSLM images like Figure S1. $n = 40$ for each modification.

Previously, the immunocomposite was prepared by the PI method immersing it into a solution of hCG- β ($18 \text{ mIU}/\text{mL}$) followed by 5 min of a washing step in PBS solution.

Competitive Immunoassay for hCG. The hCG/MWCNT/PSf immunosensors were immersed for 1 h into a solution containing the anti-hCG- β antibody ($0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$) previously incubated with different concentrations of hCG hormone (0, 100, 200, 400, and 1000 mIU/mL) in a BSA solution (incubation conditions: 1 h at 37°C while stirring). The higher the concentration of hormone is in the solution, the lower is the antibody concentration available to react with the hCG incorporated into the biocomposite.

The immunocomposite was previously prepared by the PI method immersing it into a solution of hCG ($100 \text{ mIU}/\text{mL}$) followed by 5 min of a washing step in PBS solution.

RESULTS AND DISCUSSION

Surface Characterization by CSLM and SEM. The resulting 3D matrix supported the incubation with either water or antibody solution; the structure, porosity, and roughness of the composite were preserved. Figure 2 shows the modifications of the membrane following parts a–d of Figure 1C. The four images show darker, compacted zones which correspond to deeper areas, as well as brighter, filamentous netlike zones that correspond to higher composite areas. Projections of the entire membrane thickness show no major differences in porosity and composite distribution as a function of treatment. These properties did not alter when antibodies were incorporated by PI in the precipitation process. The orthogonal section shows heterogeneously distributed pores but no sharp changes in the Z direction.

The reflective mode also enables the user to measure membrane thickness by a reconstruction of the X–Z profile of the membrane. Table 1 shows the mean thickness and standard error of each modification taken from $n = 40$ fields (20×2 samples). The data reveal differences in thicknesses according to membrane treatments that vary from 100 to $150 \mu\text{m}$. SEM imaging shows that the composite is porous, with a rough membrane thickness of about $150 \mu\text{m}$ (Figure 3). Figure S1 (Supporting Information) shows the profile (Z section) of the different modifications shown in parts a–d of Figure 1C.

Study of the Distribution of Antibodies in the Composites by CSLM. The phase inversion method has been carefully studied as an alternative method for the incorporation and immobilization of antibodies into the composite.

The fluorescent mode of CSLM enabled us to compare the penetration depth of the antibodies incorporated into the mem-

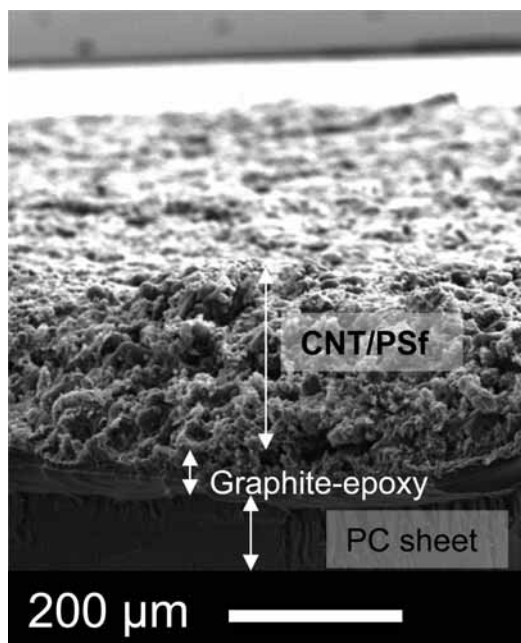


Figure 3. SEM image of the CNT/PSf composite profile. Scale bar = 200 μm .

brane by PI to that of the antibodies incorporated via incubation. No fluorescent signal was observed for the control sample (Figure S1a), since no antibodies were in the membrane, therefore demonstrating that none of the membrane components fluoresce on their own.

Various sections taken from the membrane surface up to a total depth of 15 μm were chosen according to the results from Figure S1 and Table 1. At the same concentration of Alexa-labeled antibody, 5 min of PI led to stronger fluorescence than did 30 min of incubation (parts b vs c of Figure 4A). Moreover, when PI was used, the antibodies were more dispersed in the X - Y and Z axes (Figure 4A,c). Random (i.e., nonperiodic) dispersion is desirable for immunosensing because it increases the probability that the antibody will interact with the diagnostic target (e.g., an antigen).

The secondary labeled antibody emitted a strong, widely distributed fluorescent signal due to the formation of the desired immunocomplex (Figure 4A,d). In contrast, nonspecific incubation of antibodies onto the composite led to a compact, heterogeneous signal distribution (Figure 4A,b). This does not facilitate contact between the antigen and the labeled antibody, and therefore the reliability of this biosensor is drastically lower than that of the biosensor based on PI immobilization. This behavior, which was observed by CSLM, can be quantified using the appropriate software (Metamorph) in order to characterize the distribution of the antibodies in the initial sections of the composite (Figure 4B,C).

As indicated by the plots in parts A and B of Figure 4, quantification of both total and mean fluorescence intensity of the different modifications is in concordance with the aforementioned results. The total fluorescence intensity from the incorporation of labeled antibodies into the composite matrix by PI was 4 times that from the immunosensor (parts c and d of Figure 4B). The immunosensor (Figure 4B,d) had 7 times greater total fluorescence intensity than did the sample from nonspecific adsorption

(Figure 4B,b). The mean fluorescence intensity distribution of every section (0.3 μm) from 0 to 15 μm depth is shown in Figure 4C. The plots are consistent with Figure 4A: the immunosensor and the nonspecific adsorption follow the same fluorescence distribution, whereby the signal is most concentrated at 0–3 μm of depth (parts b and d of Figure 4C) and then decreases quantitatively with depth. In contrast, when the antibodies were incorporated by PI, a random distribution of signal in function of depth was observed (Figure 4C,c). The porosity of the PSf polymer helps the antibody to penetrate deeper into the composite while the PSf is precipitating.

Using this technique, we concluded that the efficacy of PI in terms of quantity of antibodies immobilized into the membrane is at least 1 order of magnitude higher than that of the incubation method (Figure 4B), thus PI is more efficient and convenient than incubation for immobilizing and dispersing antibodies into the MWCNT/PSf matrix.

Electrochemical Characterization of MWCNT/PSf Electrodes. The designed MWCNT composite exhibits excellent electrochemical properties as observed by the strong increase in signal response in CV when cast onto SPGE. Parts A and B of Figure 5 show the CVs of a bare SPGE electrode and a MWCNT/PSf SPGE electrode, respectively, in PBS buffer (pH 7.0) (a) and after the addition of 1.6 mM of HQ to the buffer solution (b). At the MWCNT/PSf coated SPGE, the redox peak potentials were narrower ($E_{\text{pc}} = -0.122$ V and $E_{\text{pa}} = 0.327$ V) in comparison with those of the bare SPGE ($E_{\text{pc}} = -0.225$ V and $E_{\text{pa}} = 0.425$ V). Moreover, the MWCNT/PSf coated electrode had a peak current 10 times greater than that of the plain electrode (note the different Y-scale values in parts A and B of Figure 5). The fact the CVs of the redox peaks showed not only similar shapes but also narrower ΔE and higher sensitivity suggests that the MWCNT/PSf membrane offers better electron-transfer than bare SPGE.

Optimization of the Experimental Parameters of the Immunoassay. The optimal amperometric response occurred at pH 7.0 of the buffer solution (Figure S2A). Minimizing nonspecific adsorption is an inherent challenge in immunoassays. BSA solution at 2% w/v was determined experimentally to be the best blocking agent (data not shown) for an optimum blocking time of 15 min (Figure S2B). The inset of Figure S2B shows the amperometric responses of a RIGG/anti-RIGG-HRP/MWCNT/PSf immunosensor (Figure S2B,a) and of a MWCNT/PSf control sensor incubated with anti-RIGG-HRP (Figure S2B,b) to the H_2O_2 addition when 2% BSA was used as a blocking reagent.

It was observed that the immunosensors reach their higher amperometric response at 37 $^\circ\text{C}$, which agrees with the findings of previous studies.²⁶ Temperatures higher than 40 $^\circ\text{C}$ can cause denaturalization of proteins. The influence of applied potential on the amperometric response is plotted in Figure S2D. The steady-state current rose with the increasing negatively applied potential from 0 to -0.300 V, reaching its maximum response at -0.150 V, at which it plateaued. An applied potential of -0.225 V was selected for the immunoassay procedure.

Immunoassay for RIGG Antibody. Calibration of RIGG using a sandwich immunoassay is shown in Figure S3. The concentration of RIGG analyte was evaluated from 0.1 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The plot shows that in these optimized working conditions, the immuno-

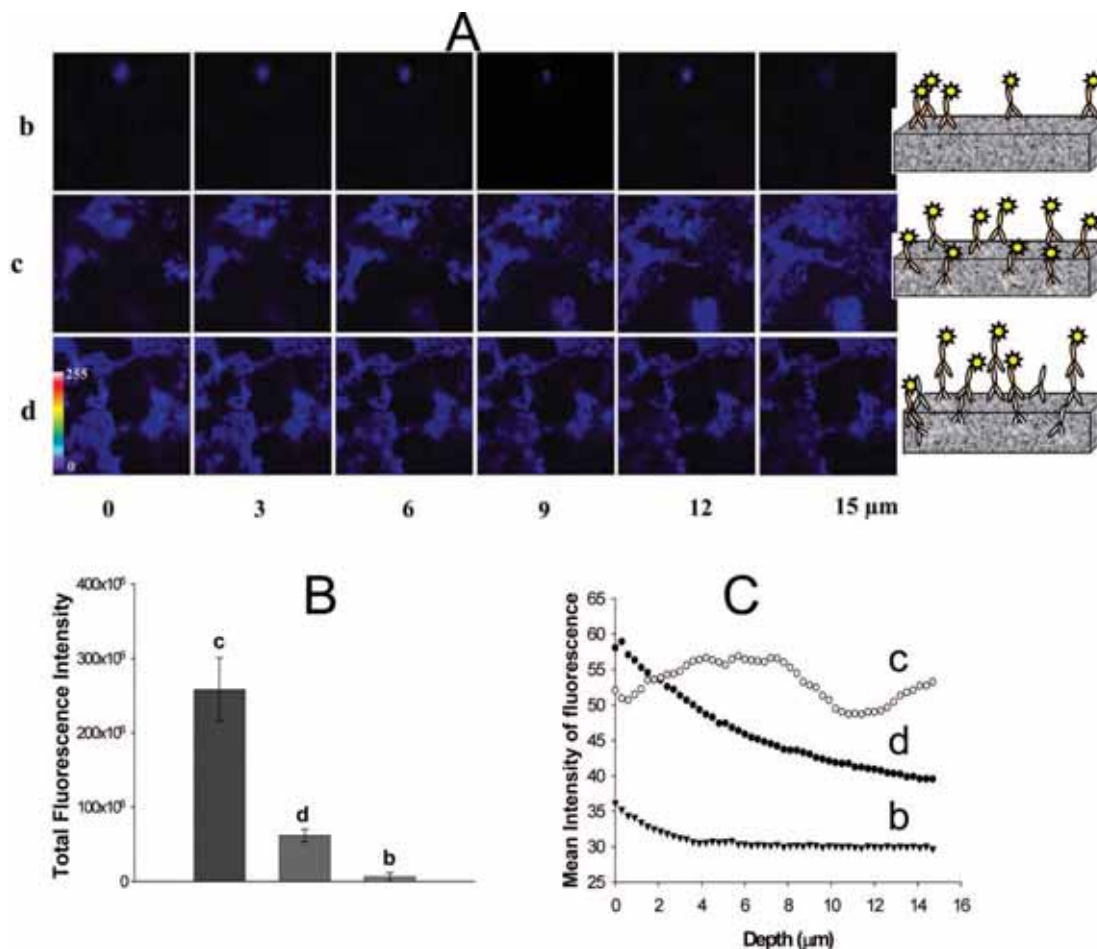


Figure 4. (A) Confocal Z-section ($59.52 \times 59.52 \mu\text{m}^2$) revealing the localization and distribution of antibodies in the first $15 \mu\text{m}$ of depth of the different membrane types. The numbers indicate the distance of the optical section from a zero-point set as the plane of the coverslip. All images were obtained in the fluorescence mode, (b) nonspecific absorption of Alexa-568, (c) Alexa-568 introduced into the composite by PI, (d) RIgG introduced by phase inversion and then reaction with Alexa-568 labeled antibody during sample incubation; (B) quantification of integrated fluorescence intensity; and (C) mean fluorescence intensity of Alexa 568-Antirabbit IgG incorporating the following b–d modifications as in part A.

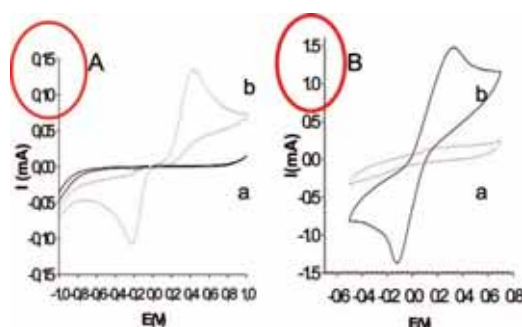


Figure 5. Cyclic voltammograms (CVs) of a bare SPGEB (A) and a CNT/PSf modified (B) electrode in PBS buffer (a) and after the addition of 1.6 mM of HQ to PBS ($\text{pH } 7.0$) buffer solution (b), at a scan rate of 100 mV/s .

sensor can discriminate among RIgG concentrations from 0.1 to $3 \mu\text{g/mL}$ with a detection limit of $0.1 \mu\text{g/mL}$ ($S/N = 3$).

The results obtained in sandwich immunoassay demonstrates, in concordance with CSLM results, a good interaction between the immunoreagents (immobilized and incubation solution) and the effectiveness of the immobilization by PI method. Furthermore, this demonstrates also a good interaction among the MWCNTs and the electroactive reagents (HRP and HQ).

Immunoassay for hCG Hormone. Direct immunoassay is plotted in Figure 6. The hCG- β /MWCNT/PSf immunosensors were incubated with anti-hCG- β -HRP antibody solution ($2.5 \mu\text{g/mL}$) for 30 min at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 6a). The control sensor was prepared by omitting the hormone in the MWCNT/PSf matrix (Figure 6b). The specific response was 6 times the nonspecific at the saturation point. The enzyme saturation was reached at a substrate concentration of 2.5 mM , using this H_2O_2 concentration for the next experiences. The results demonstrated good immobilization of the hormone into the composite and their specific reaction with the anti-hCG- β -HRP.

With the use of hCG/MWCNT/PSf biosensors, a competitive immunoassay was carried out for the hCG hormone detection. During the incubation of hCG analyte with anti-hCG- β -HRP, the antibody binds the β subunit of the hCG hormone. Then, the biosensor was immersed in the previous solution. An increase in concentration of added hCG hormone would lead to a proportional decrease of anti-hCG- β -HRP available to react with the immobilized hCG into the composite.

In this work, the quantitative determination of hCG was studied in the range up to 1000 mIU/mL . This is the typical range in commercial ELISA kits for the hCG test and the useful concentra-

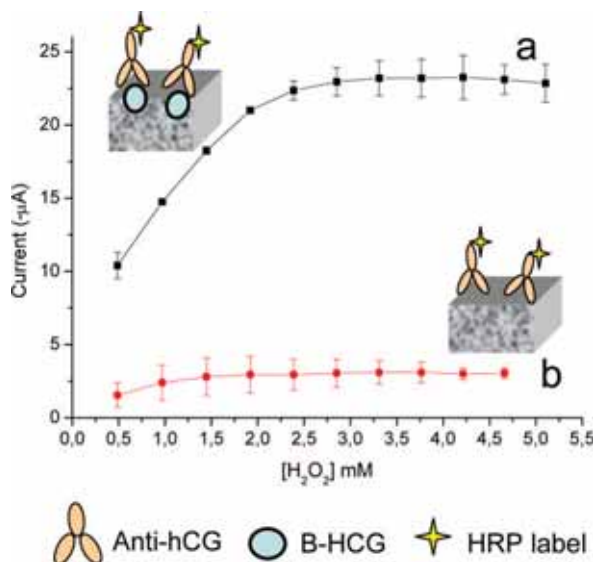


Figure 6. A) Direct immunoassay for hCG- β /CNT/PSf immunosensor incubated with anti-hCG- β . Sensor response to additions of peroxide substrate (a) and nonspecific control response (b). Working conditions: as optimized in Figure S2. $n = 3$.

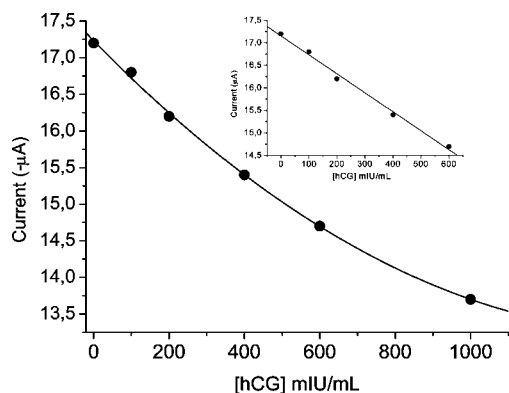


Figure 7. Competitive immunoassay for hCG hormone. The hCG/CNT/PSf composites contain 100 mIU/mL of hCG. The concentration of anti-hCG- β -HRP was fixed at 0.25 μ g/mL incubated with increasing concentrations of hCG hormone. Conditions as optimized in Figure S2.

tion range for the detection of ectopic pregnancy.³⁸ Data from Figure 7 show a linear range up to 600 mIU/mL and slightly lose linearity at higher concentrations, following a second degree polynomial equation. This linear range is several times wider than those reported previously.^{39–41}

(38) Condous, G.; Kira, E.; Lu, C.; Van Huffel, S.; Gevaert, O.; de Moor, B.; de Smet, F.; Timmerman, D.; Bourne, T. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **2005**, *26*, 770.

(39) Robinson, G. A.; Cole, V. M.; Forrest, G. C. *Biosensors* **1987/88**, *3*, 147.

(40) Thompson, J. C.; Mazoh, J. A.; Hochberg, A.; Tseng, S. Y.; Seago, J. L. *Anal. Biochem.* **1991**, *194*, 295.

The detection limit of the sensor was determined to be 14.6 mIU/mL (defined as twice the standard deviation of the blank solution) obtained from the linear regression of the inset in Figure 7 (current = $17.28 - 0.0046[\text{hCG}]$). It is comparable with previous works^{42,43} and with commercial ELISA kits.³⁷ Despite that this detection limit is higher than other reported heterogeneous immunoassays,^{44–46} the potential of our immunosensor is not diminished since the detection of the pathologies of interest (ectopic pregnancy, trophoblastic and testicular cancers) are found at higher concentrations.

CONCLUSIONS

In this article, we have demonstrated the versatility of the PI method for immobilizing antibodies and other interesting biospecies for clinical diagnosis such as hCG hormones into MWCNT/PSf composites. The matrix is robust to modifications, as revealed by CSLM which we believe that can offer an invaluable addition to biosensing research. The resulting matrix shows improved sensitivity compared to SPGE as demonstrated by cyclic voltammetry.

Furthermore, the excellent combination of the PSf with MWCNT results in a porous composite, with high conductivity and a large electroactive area. Its easy manipulation and preparation facilitates the cast onto disposable screen-printed electrodes. In future work, it would be interesting for the application of MWCNT/PSf composites and the screen-printed technology to real samples.

ACKNOWLEDGMENT

S.S. and E.F. would like to thank the Spanish Ministry of Education and Science (Grants MAT2003-01253 and CTQ2006-15681-C0) for its financial support. S.S. thanks to Dra. Gonzalez (Vigo University) for interesting immunoassay discussions.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Figures offering the membrane profile and antibody penetration depth into the composite obtained by CSLM, immunoassay optimization, and sandwich immunoassay for RIgG analyte. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review December 13, 2007. Accepted June 21, 2008.

AC7025282

(41) Shiku, H.; Hara, Y.; Matsue, T.; Uchida, I.; Yamauchi, T. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *438*, 187.

(42) Basu, A.; Shrivastav, T. G.; Maitra, S. K. *J. Immunoassay Immunochem.* **2005**, *26*, 313.

(43) Prasad, P. V.; Chaube, S. K.; Shrivastav, T. G.; Kumasi, G. L. *J. Immunoassay Immunochem.* **2006**, *27*, 15.

(44) Bagel, O.; Degrand, C.; Limoges, B.; Joannes, M.; Azek, F.; Brossier, P. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1447.

(45) Duan, C.; Meyerhoff, E. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1369.

(46) Chetcuti, A. F.; Wong, D. K.; Stuart, M. C. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4088.

Towards a fast, easy and versatile
immobilization of biomolecules into Carbon
nanotube/ Polysulfone based biosensors for the
detection of hCG hormone

Supporting Information

Samuel Sánchez^{a*}, Sandra Pérez^a, Mònica Roldán^b, Esteve Fàbregas^{a*}

^aSensors and Biosensors Group, Department of Chemistry; ^bMicroscopy Facility,

Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Contents:

Figure S1	Page 2
Figure S2	Page 3
Figure S3	Page 4

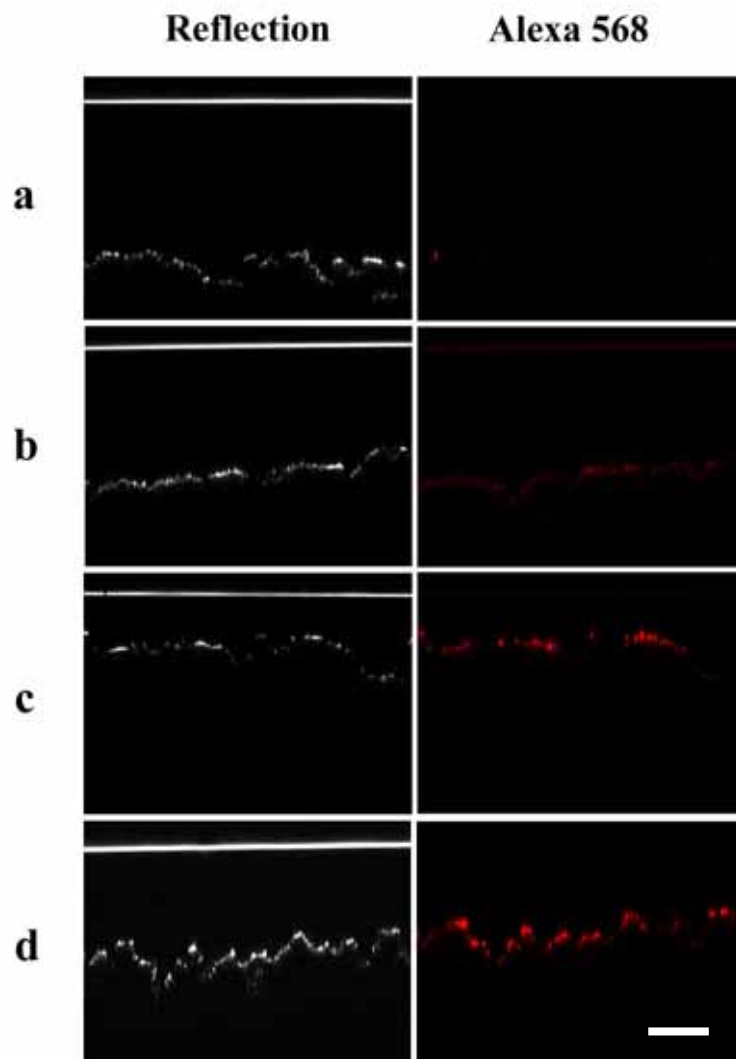


Fig. S1. X-Z optical section ($400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$) observed in CSLM, showing the membrane profile (Left column) and the antibody penetration (Right column) in (a) MWCNT200-PSf composite; (b) Unspecific Adsorption of Alexa568; (c) Alexa 568 introduced by PI in the composite; (d) RIGG introduced by PI and reaction with Alexa 568 in the process of incubation of sample. Scale bar = $75\ \mu\text{m}$.

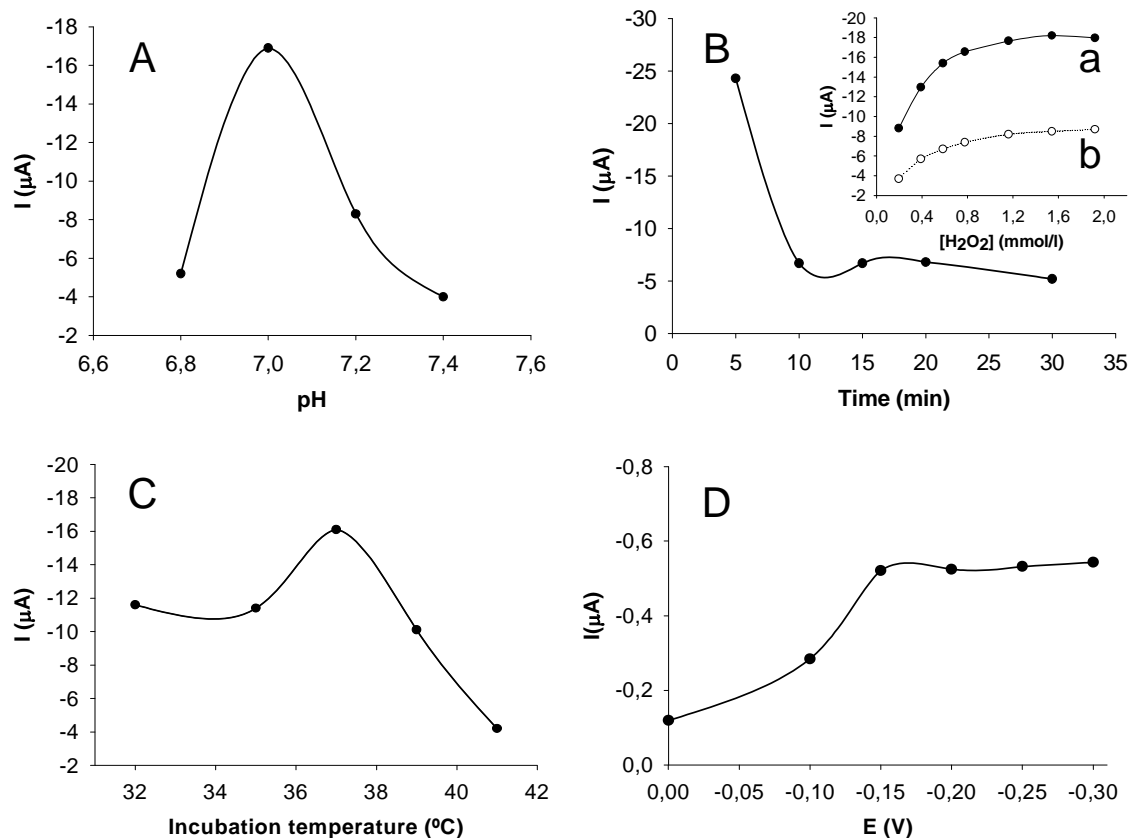


Fig. S2. Optimization of immunoassay parameters using the RIgG-Anti-RIgG-HRP modified MWCNT-PSf immunosensor. A) pH of buffer solution; B) Response of the non-specific adsorption with the blocking time using BSA protein; The inset shows the amperometric response for the immunosensor (a) and the non-specific adsorption (b). C) Effect of temperature on the incubation solution; D) Current plotted against the applied reduction potential to the working electrode. All experiments were performed at room temperature (25 $^{\circ}\text{C}$).

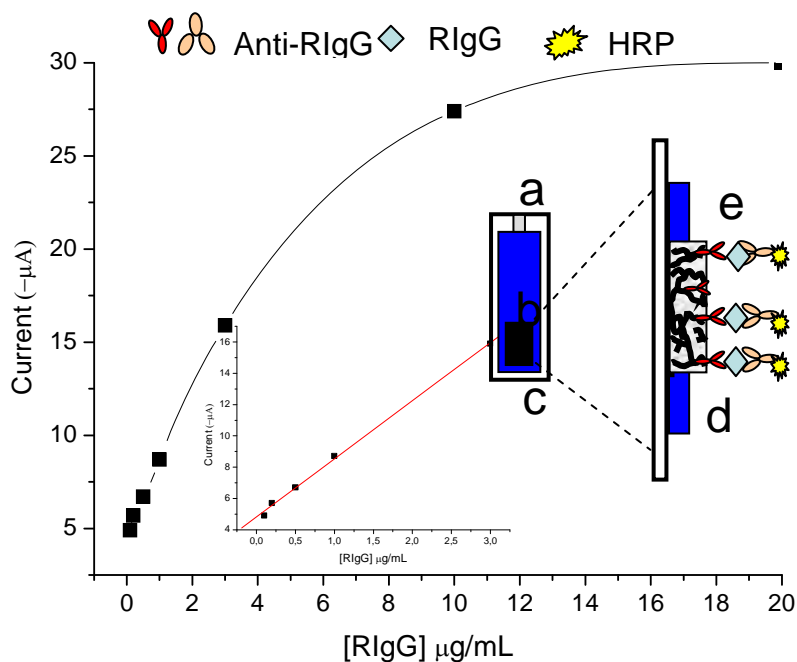


Figure S3. Sandwich immunoassay for an anti-RIgG/RIgG/anti-RIgG-HRP modified MWCNT-PSf immunosensor. Inset scheme represents the screen-printed graphite working electrode (SPGE). a) silver, b) isolating and c) graphite ink; d) Composite cast onto working area of the SPGE, e) sandwich immunoassay scheme for the determination of RIGG analyte. Inset plot shows linear regression. Working conditions: as optimized in Fig.5.

Artículo 2

Employing the Metabolic “Branch Point Effect” to Generate an All-or-None, Digital-like Response in Enzymatic Outputs and Enzyme-Based Sensors

S. Pérez, A. Vallée-Bélisle, E. Fàbregas, K. Plaxco, G. Palleschi and F. Ricci
Analytical Chemistry, **84**(2): 1076-1082

Employing the Metabolic “Branch Point Effect” to Generate an All-or-None, Digital-like Response in Enzymatic Outputs and Enzyme-Based Sensors

Sandra Perez Rafael,[†] Alexis Vallée-Bélisle,[‡] Esteve Fabregas,[†] Kevin Plaxco,^{‡,§} Giuseppe Palleschi,^{||,⊥} and Francesco Ricci^{*,||,⊥}

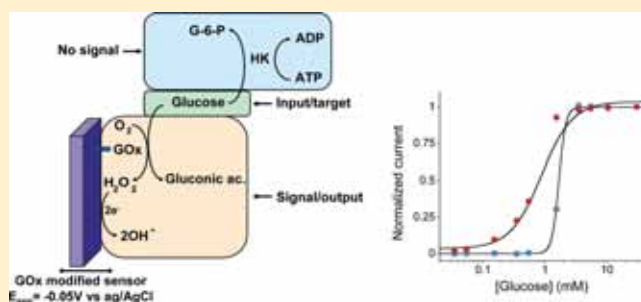
[†]Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

[‡]Department of Chemistry and Biochemistry and [§]Interdepartmental Program in Biomolecular Science and Engineering, University of California, Santa Barbara, California 93106, United States

^{||}Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, University of Rome, Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 00133, Rome, Italy

[⊥]Consorzio Interuniversitario Biostrutture e Biosistemi “INBB”, Viale Medaglie d’Oro 305, 00136 Rome, Italy

ABSTRACT: Here, we demonstrate a strategy to convert the graded Michaelis–Menten response typical of unregulated enzymes into a sharp, effectively all-or-none response. We do so using an approach analogous to the “branch point effect”, a mechanism observed in naturally occurring metabolic networks in which two or more enzymes compete for the same substrate. As a model system, we used the enzymatic reaction of glucose oxidase (GOx) and coupled it to a second, nonsignaling reaction catalyzed by the higher affinity enzyme hexokinase (HK) such that, at low substrate concentrations, the second enzyme outcompetes the first, turning off the latter’s response. Above an arbitrarily selected “threshold” substrate concentration, the nonsignaling HK enzyme saturates leading to a “sudden” activation of the first signaling GOx enzyme and a far steeper dose–response curve than that observed for simple Michaelis–Menten kinetics. Using the well-known GOx-based amperometric glucose sensor to validate our strategy, we have steepened the normally graded response of this enzymatic sensor into a discrete yes/no output similar to that of a multimeric cooperative enzyme with a Hill coefficient above 13. We have also shown that, by controlling the HK reaction we can precisely tune the threshold target concentration at which we observe the enzyme output. Finally, we demonstrate the utility of this strategy for achieving effective noise attenuation in enzyme logic gates. In addition to supporting the development of biosensors with digital-like output, we envisage that the use of all-or-none enzymatic responses will also improve our ability to engineer efficient enzyme-based catalysis reactions in synthetic biology applications.



Enzymes exhibit extraordinary specificity, selectivity, and catalytic activities, attributes that have led to their widespread use in research, industry, and medicine. In synthetic biology, for example, enzyme-catalyzed reactions are used for drug discovery¹ and the synthesis of biopharmaceuticals² and biofuels.^{3–5} Enzymes are also widely employed in biosensors as recognition and signaling elements for the detection of specific molecular analytes and confer to these platforms unprecedented performances in terms of sensitivity and selectivity.^{6–9} In recent years enzymatic reactions have been also used as the basis for novel biomolecular logic systems that could lead to the next generation of diagnostic. An example is the recently proposed use of enzyme logic gates responding to multiple inputs characteristic of specific diseases or injuries (i.e., biomarkers).^{10,11} The output of these enzyme logic gates can activate counteractions (e.g., drug delivery) against the specific disease, thus aiming to become integrated smart “sense/act” (biosensor-bioactuator) platforms.^{12,13}

Despite all their great attributes, enzymes also display some limitations. For example, the dose–response curve associated with the majority of enzymes follows the well-known Michaelis–Menten equation, producing a fairly shallow, hyperbolic increase in catalytic rate (the “response” or “output”) with increasing substrate concentrations (the “dose” or “input”). Because of the shape of this input–output curve the “dynamic range” of an enzymatic response is generally fixed: an 81-fold increase in substrate concentration is needed to drive most enzymes from 10% to 90% of their maximal product formation rate.^{14,15} This fixed dynamic range limits the utility of enzyme-based technologies in applications for which steeper dose–response curves are required. A steeper, nearly all-or-none “digital” response would be especially desired in biomolecular enzyme “logic gate” applications in order to

Received: October 11, 2011

Accepted: December 9, 2011

Published: December 9, 2011

reduce noise.^{16–19} In such logic operations, the normal physiological level of the biomarker is defined as the logic-0 level, and pathological levels are defined as logic-1 values. The separation between normal and pathological levels, however, is often narrow and thus it is sometimes difficult to strictly define the 0 and 1 logic-values of enzyme logic gates using the shallow input-output curves associated with most enzymes.

Recently, the groups of Wang, Privman, and Katz have spent efforts aimed at reducing the “noise” of biological logic gates, proposing the use of filters based on different mechanisms ranging from the use of enzymes with substrates that have self-promoter properties,²⁰ redox transformations,²¹ or pH-filters.²² Alternatively, the use of a biochemical filter that involves a partial back-conversion of the product generating the output signal was also proposed²³ leading to a much better discrimination between the 0 and 1 outputs. Of note, however, this mechanism does not solve the problem related to the definition of the 0- and 1-logic values of the inputs. That is, it would be crucial to find a method to achieve a digital-like output of enzyme systems at specific threshold concentrations of the input. A general strategy to steepen the input/output curves of enzyme-based response coupled with the ability to arbitrarily tune the dynamic range of enzymatic outputs and so the threshold at which the digital-like response is obtained would thus prove of great value.

Several mechanisms have been invented by evolution to solve the problem related to the graded outputs of enzymes. The best known of these is positive allosteric cooperativity, which involves two or more target binding sites that interact such that the first binding events increase the affinity of those that follow. Allosteric, however, requires subtle binding-induced conformational and functional changes and thus this approach to generating stepper input–output curves is likely expensive in terms of the number of evolutionary steps required to generate it and certainly quite challenging to engineer in artificial systems. Fortunately for us biomolecular engineers, however, cooperativity is not the only mechanism by which the input-output curves of enzymes can be manipulated. Indeed, several of the many approaches employed by nature *in vivo* to generate switch-like enzymatic response, such as multistep phosphorylation reactions, partial enzyme saturation and stoichiometric inhibitors appear quite simple and are likely amenable to exploitation in artificial technologies.¹⁴

Motivated by the above arguments here we have adapted the metabolic “branch point effect”^{24,25} to achieve steep input–output curves on enzyme-based systems. In this mechanism, which nature employs to generate ultrasensitive responses in some metabolic networks,^{24–28} two enzymes compete for a single substrate. If one of these has a higher affinity (lower K_m) it will sequester the substrate, reducing the response of the other enzyme. If the substrate concentration climbs above the threshold level at which the higher affinity “depletant” enzyme is saturated, then the output of the second enzyme will rise dramatically, producing a nearly all-or-none response. Using this mechanism we demonstrate an efficient and convenient approach to convert the hyperbolic dose–response curve of enzymes to a much steeper input/output response. We use the classic glucose electrochemical enzyme sensor as a model system to demonstrate and validate this approach and then apply this strategy to improve the performance of an enzyme-based AND logic gate.

■ MATERIALS AND METHODS

Apparatus, Electrodes, and Reagents. Amperometric measurements were carried out using a Portable Bipotentiostat μ stat 200 (DropSens, Spain). Carbon-based screen-printed electrodes (SPEs) were printed with a 245 DEK (Weymouth, U.K.) screen printing machine using the following inks: graphite-based ink (Elettrodag 421), silver ink (Electrodag 477 SS RFU) and insulating ink (Elettrodag 6018 SS). The substrate was a polyester flexible film (Autostat HT5) obtained from Autotype Italia (Milan, Italy). The printing procedure is already described in previous papers.²⁹ Each sensor consists of three printed electrodes, a carbon working electrode, a silver internal pseudoreference electrode and a carbon counter electrode. The diameter of the working electrode was 0.3 cm, resulting in an apparent geometric area of 0.07 cm². All chemicals from commercial sources were of analytical grade. All solutions were prepared with 0.05 M phosphate buffer +0.1 M KCl + 0.01 M MgCl₂, pH 7.4, unless otherwise specified. The standard solutions were made up daily in the same buffer. Glucose oxidase (GOx) (EC 1.1.3.4, type VII, 185 U/mg), horseradish peroxidase (HRP) (EC 1.11.1.7, 1550 U/mg), hexokinase (HK) (EC 2.7.1.1, 200 U/mg), Adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), *o*-phenyldiamine (OPD), FeCl₃, and K₃Fe(CN)₆ were all obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Preparation of Prussian Blue (PB) Modified Screen-Printed Electrodes. Because of the high overpotential required to detect H₂O₂, here we have used an electrochemical mediator (Prussian Blue) capable of catalyzing the reduction of H₂O₂ and thus allowing its detection at low applied potentials.^{30,31} PB modification²⁹ of SPEs was accomplished by placing a drop (10 μ L total volume) of a “precursor solution” onto the working electrode area. This solution is a mixture obtained by adding 5 μ L of 0.1 M potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) in 10 mM HCl to 5 μ L of 0.1 M ferric chloride in 10 mM HCl. The drop is carefully applied exclusively on the working electrode area. The electrodes are shaken gently on an orbital shaker for 10 min and then rinsed with a few milliliters of 10 mM HCl. The electrodes are then left for 90 min in an oven at 100 °C to obtain a more stable and active layer of Prussian blue. The PB modified electrodes are stored dry at room temperature in the dark and are stable for several months.

Preparation of GOx Membrane Glucose Biosensor. Glucose oxidase (GOx) was immobilized onto PB modified SPEs using a procedure optimized in a previous work.²⁹ Ten microliters of a mixture of glutaraldehyde, Nafion, and a solution of enzyme + BSA were added onto the working electrode area and the solution was allowed to dry for 45 min at room temperature; 150 μ L of the mixture have the following exact composition:

- 100 μ L of enzymatic solution (4 mg of BSA and 1 mg of GOx in 0.05 M phosphate buffer + 0.1 M KCl, pH 7.4);
- 20 μ L of glutaraldehyde (2.5% in water);
- 30 μ L of Nafion (5% in ethanol). The sensors prepared with this procedure are stable and ready for glucose measurement in batch and drop analysis.

Glucose Measurements with GOx Membrane Biosensor. Amperometric batch measurements of glucose were performed in a stirred phosphate buffer solution 0.05 M + KCl 0.1 M + MgCl₂ 0.01 M + HK 20 U/mL, pH 7.4 (10 mL) with an applied potential of –0.05 V versus internal reference

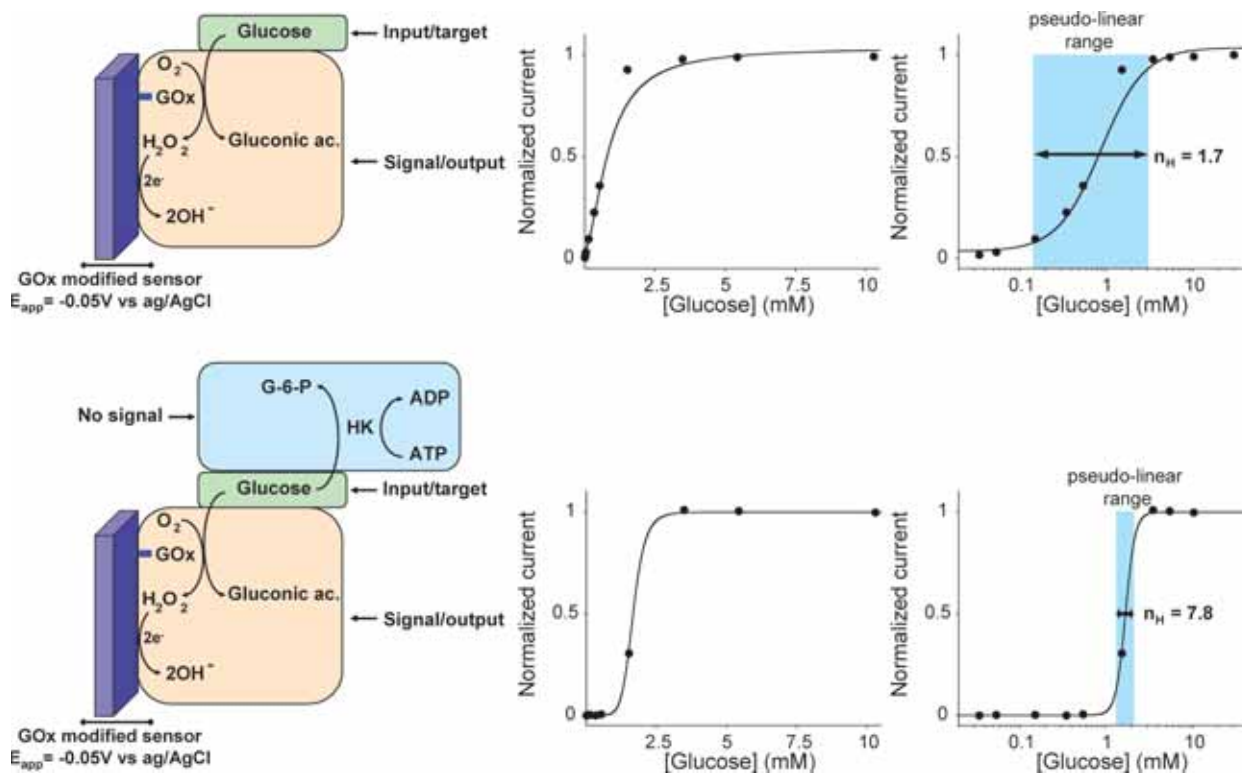


Figure 1. Here we convert the hyperbolic dose–response curve of an enzyme-based sensor into a steep all-or-none digital-like response by employing the “branch point effect”, a mechanism that occurs in some metabolic networks, where two enzymes compete for the same substrate.^{24–26} (top) As our testbed system we have used the well-known glucose amperometric sensor, which contains a surface-confined glucose oxidase (GOx) that shows a classic Michaelis–Menten response with a K_m of 0.8 mM. (bottom) By coupling this enzyme system with another higher affinity competing “depletant” enzyme (here hexokinase, HK) we can convert the hyperbolic Michaelis–Menten response of GOx into a digital-like output. When the total glucose concentration is equal or lower to the concentration of ATP, all the glucose is converted by HK to glucose-6-phosphate (G-6-P). The glucose is thus sequestered from the GOx, precluding signaling. When the total glucose concentration surpasses the concentration of ATP (the HK catalyzed reaction is saturated), a threshold response is achieved in which further addition of glucose drastically raises its effective concentration. This threshold effect generates a “pseudo-cooperative” dose–response curve in which the output signal arises much more rapidly than would occur in the absence of HK and ATP. In these operative conditions ($[ATP] = 1.25$ mM) the range of glucose concentration at which this sharp transition occurs is compressed to less than 2-fold. The use of the logarithmic scale in the x -axes (right) as opposed to a linear scale (center) renders it easier to evaluate the narrowing of the dose–response curve.

electrode (int. ref.). When a stable baseline current was reached, glucose was added and the current variation was recorded after 3 min. In a different embodiment the sensor was tested using “drop” chronoamperometric measurement. In this case a drop (70 μ L) of the above buffer solution containing different concentrations of glucose (see text for details) was added onto the electrode held in horizontal position at an applied potential of -0.05 V. The drop was added so as to cover all the three electrodes and to close the circuit. The current signal was measured after 3 min before and after three successive additions of ATP (2.5, 5, 7.5 mM). For the sake of clarity in all the figures the relative current (normalized) has been used in the y -axis. The RSD% of the developed sensors is $\sim 7\%$ ($n = 4$) and the actual current plateau values obtained are $0.53 (\pm 0.04)$ and $0.96 (\pm 0.08)$ μ A respectively in drop and batch measurements.

Composition of Logic Gate and Input Signals. The AND logic gate consisted of a 2.5 mL phosphate buffer solution 0.05 M + KCl 0.1 M + $MgCl_2$ 0.01 M + GOx 10 U/mL + HRP 23 U/mL, pH 7.4. A concentration of 0.17 mM of OPD was added to the solution to achieve a yes/no output signal. Of note, this concentration does not correspond to the actual glucose level (~ 0.6 mM) at which we observe the steep response for two reasons. The first is related to the fact that the

reaction between H_2O_2 and OPD catalyzed by HRP has a stoichiometric ratio of 3:2 (H_2O_2/OPD).³² The second is that the *real* concentration of H_2O_2 produced by GOx does not correspond to the concentration of glucose present in solution because the enzymatic reaction is already in the plateau region. Also in this case, for graphical purposes, normalized values were used. When GOx was used in solution (i.e., for logic gates applications) the plateau current value obtained in batch measurements was $2.9 (\pm 0.1)$ μ A.

RESULTS

To validate and demonstrate our strategy, we have selected glucose oxidase (GOx), an enzyme widely employed in sensors for the detection of blood glucose levels. This sensor employs a surface-confined glucose oxidase (GOx) to catalyze the oxidation of glucose. The resultant production of hydrogen peroxide is detected electrochemically, signaling the presence of the substrate.^{6–9} As expected, the dose–response curve of the glucose sensor obeys the Michaelis–Menten equation, producing a Michaelis–Menten constant (K_m) of 0.8 mM (Figure 1, top). To convert the hyperbolic dose–response curve associated with GOx catalyzed reaction into a steeper, digital-like response, we have created a “branch point effect” using hexokinase (HK) as the competing “depletant” enzyme

(Figure 1, bottom). HK, which possesses a much greater affinity for glucose than that of GOx,³³ will sequester glucose by converting it to glucose-6-phosphate, a species that is not recognized by GOx. [Of note, the glucose will also associate much faster to the free HK than to the electrode-bound GOx thus further increasing the HK catalytic rate]. Using this approach we readily compress the hyperbolic dose–response curve of this enzyme-based sensor^{14,15,24} by 1 order of magnitude, pushing the normally 81-fold dynamic range of the sensor to less than 2-fold (Figure 1, bottom).

The steepness of the input/output curve can be controlled by altering the ATP concentration. Higher sensitivities (steeper curves) occur when the ATP level is above the saturation limit of GOx ($[ATP]/K_m > 1$). Conversely, when the ATP concentration is in the range where GOx responds linearly to glucose levels the steepness of the resulting dose–response curve is only slightly higher than that in absence of ATP. To show this we have fitted our data to obtain pseudo-Hill coefficients, which, although our system is not classically cooperative, are analogous to the Hill coefficient commonly used to describe cooperative enzymatic systems.^{27,34} As expected, we observe a pseudo-Hill coefficient near unity ($n_H = 1.7$) for a glucose calibration curve obtained in the absence of ATP (Figure 2). [The slight deviation from the theoretical

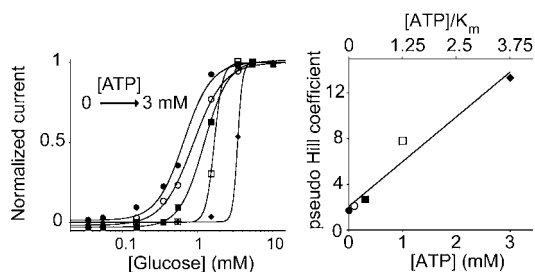


Figure 2. Steepness of the dose–response curve and the substrate concentration at which the threshold response is observed are both strong functions of the activity of the depletant enzyme. (left) Using HK as our depletant we can easily tune these values by varying the ATP concentration in the reaction mix (here we have employed 0.1, 0.3, 1.25, 3 mM ATP). To quantify the steepness of these dose response curves we have fitted them to the Hill equation to define pseudo-Hill coefficients.³⁴ (right) The pseudo-Hill coefficient increases monotonically as the $[ATP]/K_m$ ratio increases (by increasing the concentration of ATP), reaching 13 when this ratio is at 3.75 (at 3 mM ATP).

value of 1 is likely due to the limiting oxygen concentrations present in aqueous solution.⁷] Upon the addition of ATP, the pseudo-Hill coefficient climbs, reaching 2.1 at $[ATP] = 0.1$ mM ($[ATP]/K_m = 0.125$) before ultimately reaching 13.3 at $[ATP] = 3$ mM ($[ATP]/K_m = 3.75$) (Figure 2).

In addition to control the steepness of the dose–response curve, we can also control the threshold limit at which HK sequesters glucose (and thus control the threshold at which the sensor signals) by varying the concentration of ATP in the reaction mix. Specifically, HK sequesters glucose only when the ratio of ATP to glucose is more than one (Figure 2, left). That is, at $[ATP] = [\text{glucose}]$ the HK catalyzed reaction is saturated and the injection of any additional glucose produces a large rise in the relative concentration of free glucose, which can be now recognized by GOx thus generating an output signal. This provides a valuable tool to tailor the dynamic range over which the enzymatic output is activated.

The ability to achieve digital-like enzymatic responses, together with the possibility to arbitrarily tune the substrate concentration at which this threshold response can occur, should significantly improve the utility of enzymes in many applications ranging from enzymatic sensors to enzyme-logic gates. To demonstrate possible applications, we have employed our testbed glucose sensor and have constructed four glucose sensors, each of which we placed in a solution containing varying concentrations of ATP. Challenging them with injections of increasing glucose concentration, we create a set of sensors triggered at different glucose levels (see colored regions in Figure 3, left) within the clinically relevant range of

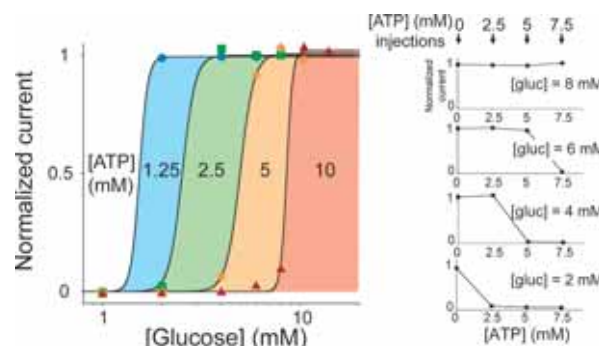


Figure 3. Extending the dynamic range of glucose sensors using multiple all-or-none glucose sensors triggered at different clinically relevant glucose concentrations. (left) Using our metabolic branch point strategy, we engineered four glucose sensors with variable threshold concentration by simply employing different ATP concentrations in the reaction mix (1.25, 2.5, 5, 10 mM). The colored regions define the glucose level at which each sensor is triggered. (right) In a different embodiment of this strategy, we used a single sensor and tested it after successive additions of ATP in the sample solution. A drop of solution containing different physiologically relevant concentrations of glucose (2, 4, 6, and 8 mM) and HK was placed on the sensor and the current was measured before and after three successive injections of ATP (2.5, 5, 7.5 mM). A yes/no response depending on the glucose level present in the sample was observed.

glycaemic levels in blood. In a different embodiment of this same strategy we have used a single glucose sensor and have performed three consecutive measurements following the injection of 3 different ATP concentrations (Figure 3, right). Doing so we were able to easily obtain high precision measurements of the concentration of glucose in the sample. Moreover, the metabolic branch point strategy not only enables a digital-like enzymatic response but also allows us to arbitrarily shift the useful dynamic range of the enzyme to higher, relevant concentrations than those defined by the K_m of the enzyme. As normal physiological concentrations of a biomarker (here glucose) can be higher than the K_m of the specific enzyme used, this can preclude accurate differentiation between normal and pathological concentrations. And while this problem has been efficiently overcome for glucose sensors by the introduction of diffusion mediators that push the sensor's dynamic range in line with physiologically relevant levels,⁷ the strategy we propose can be of utility in other specific applications such as those employing enzymes for logic systems.

To demonstrate the utility of the “branch point effect” strategy to logic gate systems, we have applied it to a previously described enzyme-based AND logic gate.^{10,11,35} Ideally, such logic gates should produce a yes/no (1/0) outcome that

corresponds to a “Sense/Act” or “Sense/Diagnose/Treat” response.^{10,11} Historically, however, a limitation of these systems was that the graded response signal observed with most enzymes renders it difficult to unequivocally define the 0 and 1 logic values of the biomolecular gate. Indeed, in the literature the 0 value of the input signal is usually defined as the complete absence of the biomaterial, a situation that rarely occurs under normal physiological conditions. Logic 1 values are likewise typically set to substrate concentrations well above those found even under pathological conditions. The ability to generate steeper, more digital enzymatic input/output curves and the possibility to tune the concentration of the input at which we observe the digital output could thus prove of utility in such applications. For these reasons, several efforts have been recently focused on the development of novel filtering systems to achieve digital output from enzymatic systems.^{16–23} Here we demonstrate for the first time that by using the “branch point effect” strategy, we can activate a model enzyme-logic gate in an all-or-none fashion at arbitrarily fixed input concentrations. To demonstrate this, we have applied our strategy to a classic enzyme-based AND logic gate which was recently described in several works.^{10,11,35} This logic gate, in its original format, is intended to give an output signal only in presence of two specific inputs (GOx, input A and glucose, input B). Although this is a very simple and basic example of enzyme logic gate it may give useful insights regarding the possibility to adopt this strategy for other, more complex, examples. As expected, the output signal of this logic gate (at fixed concentrations of GOx, input A, and varying the concentration of glucose, input B) is shallow. To define the 0- and 1-logic output values, we then define the threshold level using the branch-point effect. We did so by employing a biochemical filter composed of horseradish peroxidase (HRP) and o-phenylenediamine (OPD). The enzymatic reaction catalyzed by HRP sequesters the output signal (i.e., H₂O₂) of the AND logic gates (Figure 4, top). OPD in this case acts as the threshold level at which this sequestration event can occur. In fact, when the total concentration of H₂O₂ produced by the logic gate equals or is lower the OPD level the output signal will be effectively 0. Of note, this reaction is characterized by a stoichiometric ratio of 3:2 (H₂O₂/OPD)³² so this ratio has to be taken in consideration for a correct evaluation of the threshold level. As soon as the total concentration of H₂O₂ surpasses the OPD level we will observe a steep threshold response, which can be defined as 1 output (Figure 4, bottom). Only input values of glucose above a certain threshold (in the presence of GOx) will result in the activation of the logic gate. The digital-like transition between the 0 and 1 output state and the possibility of tuning this transition by varying the concentration of the filter represents an important step toward the design of multienzyme-catalyzed cascades logic gates with strong, unequivocal “sense/act” behavior.

CONCLUSIONS

Here, we have demonstrated a novel strategy to convert the graded Michaelis–Menten response of a typical enzyme-based system into a sharp all-or-none response. Our approach is inspired by the “branch point effect”, a situation that occurs in some metabolic networks in which two or more enzymes compete for the same substrate.^{24–28} We first used the well-known glucose amperometric sensor as a model system to demonstrate this strategy and its possible applications. Specifically, we coupled the signaling enzymatic reaction of

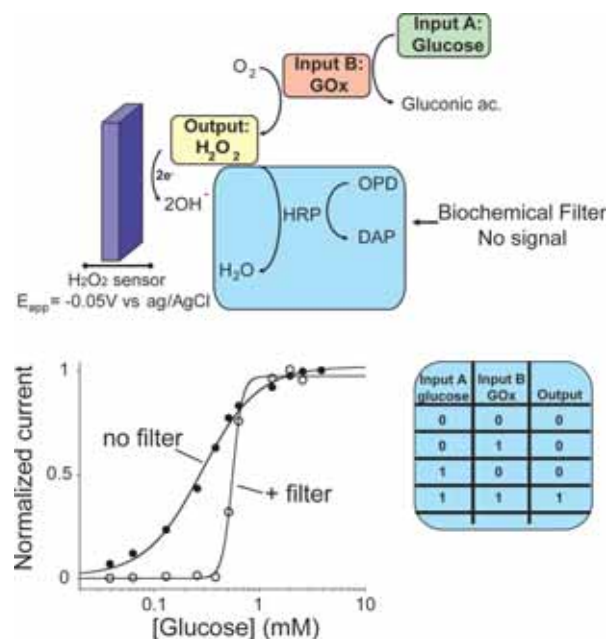


Figure 4. “Branch point effect” mechanism can be used as effective biomolecular filter for enzyme-based logic gates applications. (top) Here we show this by using an enzyme-based AND Boolean logic gate which is activate in an all-or-none fashion only at specific concentration of glucose (input A) and in the presence of GOx (input B). Here horseradish peroxidase (HRP) sequesters the output signal (H₂O₂) generated by the logic gate until a threshold level represented by the concentration of the HRP cosubstrate (o-phenylenediamine: OPD). (bottom) With this strategy we produce a steep, all-or-none digital output at an arbitrarily selected concentrations of input A, a response far more suitable for enzyme-based logic gate applications than the graded response typically produced by enzymes. Here we used a fixed concentration of GOx (input B) and increasing concentration of glucose (input A) in presence of HRP. When OPD is absent we observe the curve expected for simple, noncooperative binding (no filter). This converts into an all-or-none curve in presence of OPD (+filter).

GOx with a second, nonsignaling reaction catalyzed by the higher affinity enzyme HK. This latter reaction sequesters the target analyte up to an arbitrarily selected threshold concentration above which the signaling reaction is activated producing a steep dose–response curve. As a result we steepened the normally graded response of GOx until, ultimately, obtaining a discrete yes/no output similar to that of a multimeric cooperative enzyme with a Hill coefficient of greater than 13. The steep dose response curves we achieve open the door to a number of new biosensor applications. Perhaps the most obvious application, as demonstrated here, would be the creation of enzyme logic gates with effectively digital-like outputs, a field that has attracted increasing interest during last years. Additionally, the monitoring of drugs with narrow therapeutic windows, which requires high precision dosage to optimize their therapeutic effect, would be greatly improved with the development of steeper input/output biosensors. Another application provided by “branch point effect” is that it can help to extend the dynamic range of enzyme-based sensor above the saturation level of the enzyme. And while this problem has been cleverly solved for glucose sensors using diffusion mediators,⁷ the demonstration of alternative methods is of utility. Here we showed how this strategy allows us to finely and arbitrarily tune the glucose

concentration range over which the sensor is activated by controlling the secondary depleting reaction.

The branch-point effect is also likely versatile: the wide range of enzymatic reactions targeting the same substrate offers the possibility of using this strategy with a wide range of relevant targets. For example, the same digital-like behavior could be obtained by coupling a signaling oxidase enzyme and a nonsignaling dehydrogenase enzyme targeting the same substrate. The concentration of the dehydrogenase cofactor (either NAD⁺ or NADP⁺) would represent the threshold level at which we will observe the sharp response. We also note that a similar result would be achieved by using nonenzymatic depletant element. For example, a wide variety of periplasmic binding proteins are known to bind with high affinity several enzymatic substrates, including amino acids, peptides, simple and complex sugars, inorganic ions and metals.³⁶

Despite the above advantages, the strategy we propose is not without limitation. For example, the generation of the all-or-none response is achieved at the cost of a reduced affinity as the minimum target concentration giving a detectable signal (detection limit) is shifted toward higher concentrations. Moreover, we also note that the digital-like response is achieved at the cost of additional reagents, a drawback that can limit the applicability of the approach we propose. Finally, a careful control of the concentration of the reagents involved in the depleting reaction must be performed in order to avoid secondary reactions, a problem that can be particularly crucial in complex samples. This is for example true for the specific model system we have employed here. The use of a depleting reaction based on the use of ATP as substrate requires the control of the possible effect that endogenous ATP (or of species that can react with it) can have in the definition of the threshold response. Despite this, the endogenous level of ATP in clinical samples is normally very low (in the micromolar range)^{37,38} and thus its effect for this specific application is negligible.

To conclude, it is worthwhile to note that the branch point effect is only one of many mechanisms that nature uses to achieve bistability in natural systems, allowing signaling networks to convert continuously graded inputs into discrete outputs.^{39–41} These include positive feedback loops and double-negative feedback loops.^{42–45} Exploitation of these other strategies in the laboratory would likely also give rise to new tools to achieve all-or-none enzymatic systems and would greatly impact our ability to engineer more efficient enzyme-based catalysis reactions in synthetic biology applications.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: Francesco.ricci@uniroma2.it.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge members of their research groups for helpful discussions and comments on the manuscript. This work was supported by the Italian Ministry of University and Research (MIUR) through the project FIRB “Futuro in Ricerca”, by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CTQ2009-13873) and by the NIH grant AI076899. SPR would like to acknowledge the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) for the P.I.F. fellowship.

REFERENCES

- (1) Ro, D. K.; Paradise, E. M.; Quillet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; et al. *Nature* **2006**, *440* (7086), 940–943.
- (2) Koeller, K. M.; Wong, C. *Nature* **2001**, *409* (6817), 232–240.
- (3) Khalil, A. S.; Collins, J. J. *Nature Rev. Genet.* **2010**, *1* (5), 367–379.
- (4) Purnick, P. E. M.; Weiss, R. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10* (6), 410–422.
- (5) Himmel, M. E.; Ding, S.; Johnson, D. K.; Adney, W. S.; Nimlos, M. R.; Brady, J. W.; et al. *Science* **2007**, *315* (5813), 804–807.
- (6) Wang, J. *Electroanalysis* **2001**, *13* (12), 983–988.
- (7) Wang, J. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 814–825.
- (8) Bakker, E. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (12), 3285–3598.
- (9) D’Orazio, P. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *334* (1–2), 41–69.
- (10) Wang, J.; Katz, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (4), 1591–1603.
- (11) Katz, E.; Privman, V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (5), 1835–1857.
- (12) Manesh, K. M.; Halámek, J.; Pita, M.; Zhou, J.; Tam, T. K.; Santhosh, P.; et al. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (12), 3569–3574.
- (13) Windmiller, J. R.; Santhosh, P.; Katz, E.; Wang, J. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2010**, DOI: 10.1016.
- (14) Ferrell, J. E. Jr. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21* (12), 460–466.
- (15) Goldbeter, A.; Koshland, D. E. Jr. *Q. Rev. Biophys.* **1982**, *15*, 555–591.
- (16) Privman, V.; Pedrosa, V.; Melnikov, D.; Pita, M.; Simonian, A.; Katz, E. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25* (4), 695.
- (17) Privman, V.; Halámek, J.; Arugula, M. A.; Melnikov, D.; Bocharova, V.; Katz, E. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, *114* (44), 14103.
- (18) Wang, J.; Katz, E. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51* (1), 141.
- (19) Privman, V. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51* (1), 118.
- (20) Doron, A.; Portnoy, M.; Lion-Dagan, M.; Katz, E.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8937.
- (21) Ashton, P. R.; Ballardini, R.; Balzani, V.; Credi, A.; Dress, K. R.; Ishow, E.; Kleverlaan, C. J.; Kocian, O.; Preece, J. A.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Venturi, M.; Wenger, S. *Chem.—Eur. J.* **2000**, *6*, 3558.
- (22) Pita, M.; Privman, V.; Arugula, M. A.; Melnikov, D.; Bocharova, V.; Katz, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (10), 4507.
- (23) Halamek, J.; Zhou, J.; Halamkova, L.; Bocharova, V.; Privman, V.; Wang, J.; Katz, E. *Anal. Chem.* **2011**, in press.
- (24) Goldbeter, A.; Koshland, D. E. Jr. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 14441–14447.
- (25) Kim, S. Y.; Ferrell, J. E. Jr. *Cell* **2007**, *128* (6), 1133–1145.
- (26) LaPorte, D. C.; Walsh, K.; Koshland, D. E. Jr. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (22), 14068–14075.
- (27) Legewie, S.; Blüthgen, N.; Schäfer, R.; Herzog, H. *PLoS Comput. Biol.* **2005**, *1* (5), 0405–0414.
- (28) Legewie, S.; Schoeberl, B.; Blüthgen, N.; Herzog, H. *Biophys. J.* **2007**, *93* (7), 2279–2288.
- (29) Ricci, F.; Amine, A.; Palleschi, G.; Moscone, D. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18* (2–3), 165–174.
- (30) Ricci, F.; Palleschi, G. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21* (3), 389–407.
- (31) Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17* (6–7), 441–456.
- (32) Liu, H.; Wang, Z.; Liu, Y.; Xiao, J.; Wang, C. *Thermochim. Acta* **2006**, *443* (2), 173.
- (33) Wilson, J. E. *J. Exp. Biol.* **2003**, *206* (12), 2049–2057.
- (34) Hill, A. V. J. *Physiol.* **1910**, *40*, iv–vii.
- (35) Niazov, T.; Baron, R.; Katz, E.; Lioubashevski, O.; Willner, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, *103* (46), 17160–17163.
- (36) Dwyer, M. A.; Hellinga, H. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 495–504.
- (37) Gorman, M. W.; Feigl, E. O.; Buffington, C. W. *Clin. Chem.* **2007**, *53* (2), 318.
- (38) Bodin, P.; Burnstock, G. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1996**, *27* (6), 872.
- (39) Ferrell, J. E. Jr. *Curr. Biol.* **2008**, *18* (6), R244–245.
- (40) Buchler, N. E.; Louis, M. J. *Mol. Biol.* **2008**, *384* (5), 1106–1119.

- (41) Buchler, N. E.; Cross, F. R. *Mol. Syst. Biol.* **2009**, *5*, 272.
- (42) Novick, A.; Weiner, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1957**, *43*, 553–566.
- (43) Monod, J.; Jacob, F. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1961**, *26*, 389–401.
- (44) Griffith, J. S. *J. Theor. Biol.* **1968**, *20* (2), 209–216.
- (45) Ferrell, J. E. Jr. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14* (2), 140–148.

Artículo 3

Enzymatic Strategies to Construct L-Lactate Biosensors Based on Polysulfone/Carbon Nanotubes Membranes

S. Pérez, S. Sánchez and E. Fàbregas

Electroanalysis, **24**(4): 967-974

Enzymatic Strategies to Construct L-Lactate Biosensors Based on Polysulfone/Carbon Nanotubes Membranes

Sandra Pérez,^{*a} Samuel Sánchez,^b Esteve Fàbregas^a

^a Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Spain
tel.: +34935812118; fax: +34935812379

^b Institute for Integrative Nanosciences, IFW Dresden, Helmholtzstrasse 20, D-01069 Dresden, Germany

*e-mail: sandra.perez@uab.cat

Received: November 1, 2011

Accepted: January 19, 2012

Abstract

We present different strategies to construct amperometric L-lactate biosensors using the enzymes lactate dehydrogenase (LDH) and lactate oxidase (LOx). These biomolecules are incorporated into a polysulfone/carbon nanotubes composite matrix by means of an easy and rapid technique, i.e. inversion phase, and deposited onto carbon screen-printed electrodes. The use of redox mediators, Meldola's Blue and cobalt(II) phthalocyanine (CoPc) are necessary to reduce the working potential for the detection of NADH and H₂O₂ products. The working conditions for both biosensors have been optimized such as the pH, amount of immobilized enzyme and lifetime stability. LDH biosensor presents a linear interval range from 10⁻⁶ to 2 × 10⁻⁵ M L-lactate and a 3.7 × 10⁻⁷ M as limit of detection (LOD), and from 5 × 10⁻⁶ to 5 × 10⁻⁴ M and 3.4 × 10⁻⁶ M, in case of LOx, respectively.

Keywords: L-Lactate biosensors, Polysulfone, Carbon nanotubes, Lactate dehydrogenase, Lactate oxidase

DOI: 10.1002/elan.201100628

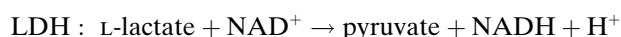
1 Introduction

L-Lactate plays an important role in several biochemical processes, since it is constantly produced from pyruvate by the lactate dehydrogenase (LDH) in a process of fermentation during normal metabolism and exercise. Therefore, its detection is fundamental in clinical diagnostics, fermentation and food analysis. Elevated blood lactate concentration can indicate multiple organ failures, death of the patient with septic shock or disorders such as hypoxia [1–4]. In medicine of sports, the level of lactate during exercise is an indicator for the training status and fitness. Lactate can also be found in many foods and beverages [5–7], such as in fermented milk products as yoghurt, buttermilk or cheese, is naturally produced by lactic acid bacteria, and it is also added to foods and beverages as acidulant or to modify the flavour (E270). In addition, in wine industry, it is monitored in the course of malolactic fermentation, where the conversion of malate to lactate acid occurs [8,9]. This fermentation leads to a de-acidification and softening of the wine's taste.

There are several procedures for determining lactate such as liquid and gas chromatography analysis, optical methods or chemical and enzymatic oxidation. Since they normally require pretreatment and time, it is necessary to develop more rapid, simple and accurate methods. Thus, herein we present disposable electrochemical biosensors as an alternative to traditional lactate measurements. In recent years, enzymatic amperometric biosensors have

been developed for specific determination of L-lactate in dairy products and clinical analysis [10–12].

Most lactate amperometric biosensors reported in literature are based in two enzymes; lactate dehydrogenase (LDH) or lactate oxidase (LOx), although it is also possible to work with cytochrome b₂ or lactate monooxidase (LMO)[13]. In first three cases, the reaction leads to pyruvate, and to acetate in the latter. The LOx and LDH catalysis reactions are described below.



When LDH is used in lactate biosensors, it needs an additional co-factor, the oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) which is reduced to NADH, the compound detected at the electrode. On the other hand, LOx is the most frequent enzyme employed in the design of amperometric biosensors which is followed by the detection of the H₂O₂ produced in the presence of O₂. However, in both cases, i.e. LDH and LOx, the direct reduction or oxidation of the reaction products require the application of high working potentials. A straightforward and undesired consequence brings other electroactive compounds usually present in real samples to eventually act as interferences. For this reason is important to develop different strategies to avoid this problem, being one of them the use of a bienzymatic configura-

ration. Normally, horseradish peroxidase (HRP) is combined with LOx to catalyze the oxidation of H_2O_2 , which allows the decrease of the overpotential [6,14]. Additionally, the use of electron transferring mediators also facilitates the electrochemical oxidation/reduction at lower operating potentials [7,15–18].

The crucial step on the fabrication of biosensors is the incorporation of enzymes onto electrodes. Various approaches have been developed to attach enzymes on the sensing layer, including adsorption [19], cross-linking [20], covalent attachment [21,22], conducting polymer entrapment [23,24] and confinement in sol-gel matrix [25]. In the present work, enzymes are incorporated easily inside a MWCNT/PS membrane by means the inversion phase technique. It consists of depositing a MWCNT/PS dispersion in dimethylformamide (DMF) onto the carbon working electrode and thereafter, to deposit an aqueous drop containing the biomolecules. Therefore, an exchange of the solvent by the non-solvent induces the coagulation of the PS; and as a consequence, biomolecules are trapped and incorporated into the polysulfone membrane. As a result, a composite constituted by multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) as conductive material containing polysulfone as polymeric matrix (PS) is obtained. Polysulfone polymer [26–31] offers unique properties for the easy incorporation of biological moieties and MWCNT, which provides high electrochemical response to corresponding analytes. Moreover, PS is also an attractive material since it presents a great chemical, biological and thermal stability, besides of its high resistance in extreme pH. Its porosity is controllable and it depends on the coagulation conditions of the phase inversion process and the polymer concentration. Due to these properties, polysulfone has been widely used as polymer for commercial microfiltration and ultrafiltration membranes.

Herein we present a study to find novel strategies to develop lactate biosensors with a broad detection range, a high sensitivity suitable for performing rapid assays. We construct of L-lactate biosensors as an approach to solve some of the classical drawbacks studying different configurations using the incorporation of LDH and LOx in the PS/MWCNT membrane. We aim for a comparative study of the performance of both enzymes in this type of membrane. The use of PS allows the easy and rapid incorporation of the all the components, MWCNT, enzymes and mediators, that normally are difficult to combine.

2 Experimental

2.1 Materials

Lactate oxidase (LOx) from *Pediococcus* species (20 units mg^{-1} solid), L-lactate dehydrogenase (L-LDH) Type VIII from chicken heart, sodium L-lactate, β -nicotinamide adenine dinucleotide, sodium phosphate dibasic anhydrous, potassium chloride, Meldola's blue, bovine albumin (BSA) and streptavidin from *Streptomyces avidinii* were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Germany).

Other redox mediators such as ferrocene, cobalt(II) phthalocyanine (CoPc) and tetrathiafulvalene from Alfa Aesar (Germany) were used. Polysulfone (PS) was obtained from BASF (BASF Ultrasons S 3010 natur, Frankfurt, Germany) and *N,N*-dimethylformamide (DMF) from Panreac (Barcelona, Spain). Multiwalled carbon nanotubes (MWCNT; length, 30–50 nm; and internal diameter, 5–15 nm) were provided from Aldrich (Steinheim, Germany). They have been purified by stirring them in nitric acid.

Measurements were taken in a phosphate buffer (0.1 M $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, 0.1 M KCl) and all solutions were prepared with water from PURELAB Ultra Laboratory Water Purification Systems.

Carbon screen-printed electrodes were supplied by DropSens (Ref. 110) (Oviedo, Spain). The strips consist on a carbon working electrode (4 mm diameter), a carbon counter electrode and a silver reference electrode.

2.2 Instruments

ULTRASONS J.P.Selecta 3000683 was used to sonicate the carbon nanotubes dispersion. Cyclic voltammograms were recorded with the AUTOLAB PGSTAT10 electrochemical analyzer (Eco Chemie BV, The Netherlands). Amperometric measurements were taken with a Bioanalytical System (BAS) LC-4C amperometric controller connected to a BAS X-Y recorder and a μ Stat 200 Bipotentiostat from Dropsens. The DropView software was used to control the instrument, register and perform the analysis of results.

2.3 Preparation of the Biosensors

Stable current responses are achieved by activation of the screen printed electrodes by means of cyclic voltammetry (5 cycles) in $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.05 M before the membrane deposition.

Carbon nanotubes contain impurities from metal particles and amorphous carbonaceous species that need to be eliminated [30]. Therefore, MWCNTs were purified by stirring in 6 M nitric acid for 2 hours and dried at 80 °C. In spite of this pre-treatment, is not possible eliminate all of these impurities [33]. To prepare the membrane, the first step is to dissolve 84 g PS in 1 mL DMF. Then, 1 mg of MWCNT was dispersed by sonication over 1 hour in 100 μL of the PS solution. This is a fundamental step since MWCNT tend to form aggregates because of van der Waals forces. Although this dispersion remained usable for two days, it was freshly prepared prior the preparation of new composites. Finally, 0.6 μL of suspension were deposited onto the working electrode covering completely its surface. Immediately afterwards, a drop of aqueous solution was added to form the membrane by phase inversion process. After casting during 5 min with the inversion phase solution, the biosensors were washed in phosphate buffer wherein they are stored at 4 °C until use.

3 Results and Discussion

We have constructed two types of L-lactate biosensors, based on the immobilization of LDH and on LOx, respectively. Both have been studied in different configurations due to their particular requirements.

3.1 LDH Biosensor

In this system the presence of two components is required, the enzyme LDH and its cofactor NAD^+ . The NADH produced in the enzymatic reaction is oxidized at high potentials; therefore, it is necessary to introduce a new element in the sensor configuration, i.e. Meldola's Blue as redox mediator, which allows decreasing the value of working potential.

3.1.1 Study of the Working Potential

To evaluate the working potential, the response of the biosensor was studied at different potential values in the range of -0.1 to 0.1 V. Measurements were carried out in a stirred 0.1 M PBS at pH 7.0 containing 5 mM of L-lactate and 3 mM NAD^+ and the inversion phase solution containing 500 U mL^{-1} of enzyme. Results obtained showed a clearly current increase from -0.1 to 0 V, at

higher potentials current signal remained constant. This indicates a range of potential adequate to work, because of the current signal not depends of this. As a result, we decided work at 0.05 V, the lower value which was in this range (Data not shown).

3.1.2 Study of the Mediator

Meldola's Blue is a phenoxazine that contains a naphthalene group which allows its use as redox mediator for NADH oxidation. Since it is soluble in aqueous and organic solvents, it was possible to study its behaviour in solution and into of membrane although results not presented small differences between both strategies. Thus, we proceeded to incorporate the mediator in the biosensor membrane in order to design a more compact configuration. Then, we studied the concentration of Meldola's Blue in the MWCNT/PS mixture by means of different L-lactate calibrations in stirred phosphate buffer at pH 7 and 3 mM of NAD^+ . Results in Figure 1A show that Meldola's Blue concentrations higher than 2 mg mL^{-1} exhibit a similar current response upon further increase on its concentration. Based on the acquired experience, although a concentration of 2 mg mL^{-1} would apparently form a good biocomposite membrane, a loss in some amounts by dissolution would drastically affect the ob-

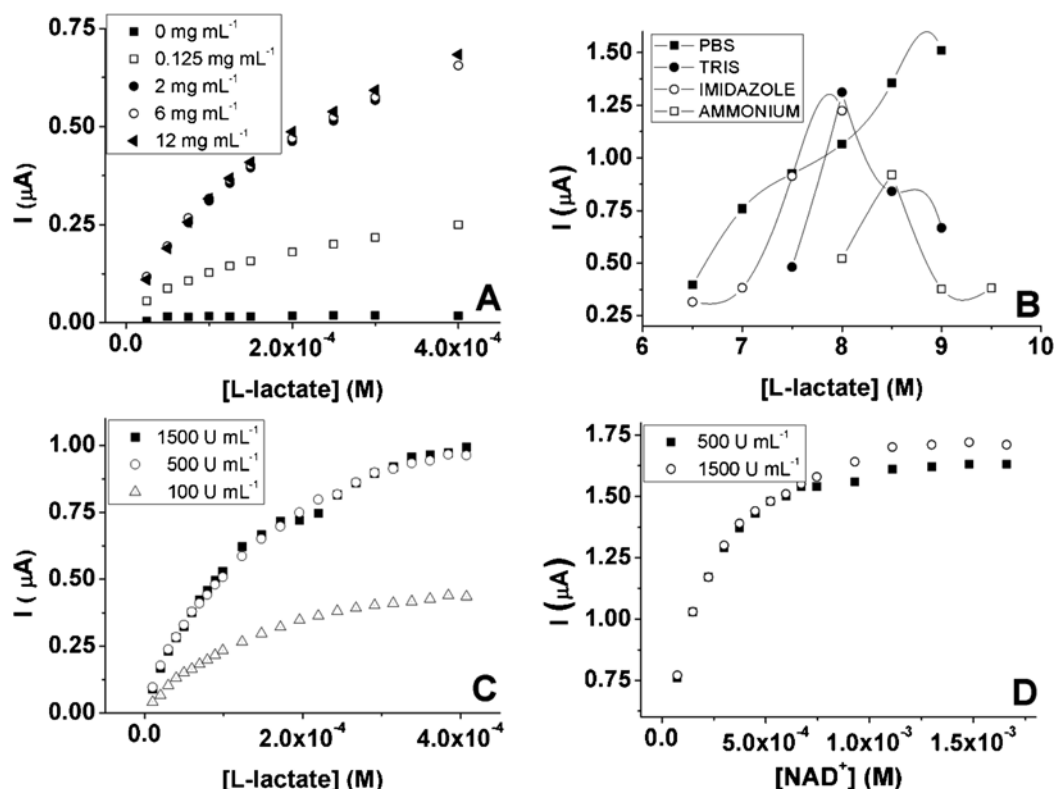


Fig. 1. A) Study of the concentration of Meldola's blue in PS/MWCNT dispersion. L-lactate calibrations were taken in phosphate buffer solution at pH 7. B) Measurements of 0.5 mM L-lactate in 4 different buffers solution, phosphate, imidazole, TRIS (tris-hydroxymethyl)aminomethane) and ammonium 0.1 M, and 0.1 M of KCl as electrolyte. C) Optimization of LDH concentration in phase inversion solution at a fixed NAD^+ concentration of 3 mM. D) NAD^+ calibrations using two biosensors with different amount of LDH in membrane, at a constant concentration of L-lactate of 2×10^{-2} M in phosphate buffer at pH 7.

tained responses. Therefore, 6 mg mL^{-1} was chosen as the optimum Meldola's Blue concentration.

3.1.3 Buffer Solution

The effect of pH and the buffer solution is important to improve the enzyme activity, and consequently, the response to L-lactate. We investigated four buffer solutions at different intervals of pH for each one. We tested phosphate, imidazole, TRIS (tris-hydroxymethyl)aminomethane) and ammonium buffer. Measurements were performed in a 0.5 mM L-lactate solution and the results obtained are represented in Figure 1B. In TRIS and ammonium buffers, we observed that the current signal showed certain instability, as well as in phosphate buffer from 8.5 to 9. The higher current signal was at pH 8 in the phosphate and imidazole solution, with a similar value. Thus, although both were presented as good alternative, we proceeded to use phosphate buffer solution.

3.1.4 LDH and NAD^+ Optimization

In enzymatic biosensors, the magnitude of response signal strongly depends on the enzymatic activity. As NAD^+ and LDH work coupled, it is crucial to optimize both concentrations. For this purpose, first we studied different amounts of LDH in the phase inversion solution using a fixed concentration of 3 mM of NAD^+ in solution (Figure 1C). L-lactate calibrations were similar for 1500 and $500 \text{ U LDH mL}^{-1}$, and the signal was lower in case of $100 \text{ U LDH mL}^{-1}$. It is necessary to confirm the LDH concentration to prepare the biosensor membrane and calculate NAD^+ concentration that allows producing correctly the L-lactate reactions. Thus, NAD^+ calibrations were carried out in a $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ L-lactate solution for 500 and $1500 \text{ U LDH mL}^{-1}$. In this case, the behaviour was similar for both concentrations, thus, to reduce the amount of enzyme, and consequently, its cost, concentration of $500 \text{ U LDH mL}^{-1}$ was selected. Moreover, in Figure 1D, the response to L-lactate shows saturation above 1 mM of NAD^+ , but to guarantee that the signal is not limited by its concentration, we decided to work always with a higher concentration, namely 3 mM .

3.1.5 Evaluation of LDH Biosensor

The repetitivity of the biosensor was examined in optimized conditions analysing 4 consecutive measurements of $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ L-lactate solution. We observed that between first and second measurements a loss of 30% of initial signal. However, after first signal obtained, next 3 replicates presented a good repetitivity with a *RSD* of 4.3%. The constructed biosensors exhibits linearity from 1×10^{-6} to 2×10^{-5} with a lower limit of detection, $3.7 \times 10^{-7} \text{ M}$. *LOD* calculated as 3 times standard deviation of the blank, obtaining this value from the standard error of estimate (see Figure 2), that is the standard deviation of residuals of regression. For these reasons, this biosensor is

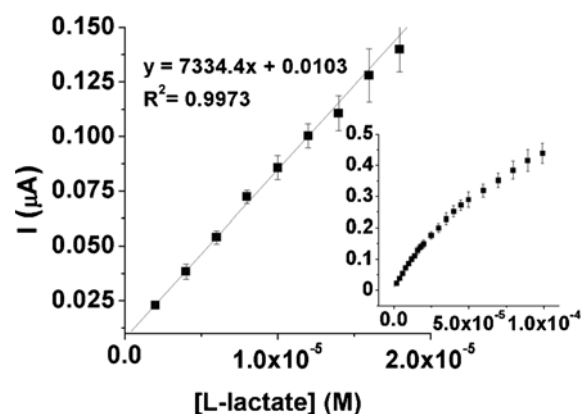


Fig. 2. L-Lactate calibration by LDH biosensor at pH 8 in phosphate buffer solution, and 3 mM of NAD^+ .

presented as a good alternative to classical methods to detect L-lactate in real samples.

3.1.6 Reusability and Storage

In order to evaluate the long-term operation of our biosensor, we tested two strategies to store them: (i) keeping the biosensors in dried conditions and (ii) immersing them in phosphate buffer solution, both at 4°C . After 24 h, results showed that dried biosensors lost 100% of its initial signal. Although results in case of phosphate solution were better, the signal was only 30% of first day. The possibility that loss of mediator caused the decreasing in current signal was discarded. Since by adding Meldola's Blue to the working solution when signal was lower, the amperometric response of the biosensors showed no differences. Thus, this can be attributed to a loss of the enzyme from the polysulfone membrane to the solution. To tackle this problem we tuned the density and porosity of this membrane. Thus, we decided to test different solvents as alternative to DMF, wherein PS is soluble such as *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) or chloroform, although in any case we obtained good results. Therefore, we thought was convenient work with DMF.

3.2 LOx Biosensor

Following the same experimental steps to construct the LDH biosensors, LOx was employed to develop L-lactate biosensors. The enzyme was incorporated in the PS/MWCNT membrane by phase inversion phase and it involved L-lactate and molecular oxygen to produce enzymatically hydrogen peroxide. This product also requires high values of working potential to be measured by the sensor.

3.2.1 LOx Biosensor Response and Mediator Study

The response of biosensor to L-lactate in absence of redox mediators was tested. As it is shown in Figure 3, biosensor which contained only the enzyme oxidase starts

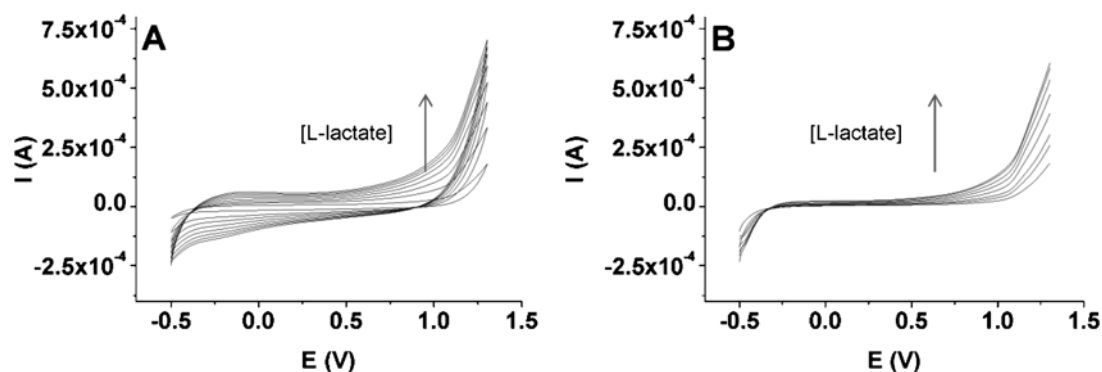


Fig. 3. Cyclic voltammograms (A) and linear sweep voltammetry (B) responses to L-lactate from 0 to 1×10^{-2} M in phosphate buffer solution (pH 7) by a LOx/MWCNT/PS biosensor using a 5 mg LOx mL^{-1} as inversion phase solution.

to detect L-lactate at values of working potential above 0.5 V. Moreover, we can observe in the cyclic voltammograms and linear sweep voltammetry graphics (Figures 3A and B) an increase in current signal as L-lactate concentration in the solution buffer is higher. Since at 0.6 V other substances can be detected and act as interferences, we proceeded to minimize the operational potential using redox mediators. Firstly, we tested with Meldola's Blue, as the biosensor based on LDH. L-lactate calibrations were carried out at 0.05 V, but the current signal fell in consecutive experiments. Therefore, we employed a mediator soluble in DMF but not in aqueous solution. For this reason, ferrocene (Fc), tetrathiafulvalene (TTF) and cobalt phthalocyanine (CoPc) were tested. They were incorporated into the membrane by the PS solution in DMF, and carbon nanotubes. The concentrations of mediator in DMF were optimized to obtain a good adherence of membrane to the support substrate and homogeneity. In the case of ferrocene (20 mg mL^{-1} of DMF), experiments were measured at 0.3 V and results presented the same behaviour as Meldola's Blue. Besides, biosensor based on TTF (12 mg mL^{-1} of DMF) showed low current signals at 0.2 V. On the other hand, using a high concentration of CoPc (150 mg mL^{-1}), at 0.35 V, we achieved a good repetitivity between replicates of L-lactate calibrations. We tested different amounts of CoPc, from 2 to 150 mg mL^{-1} in DMF/PS solution. At values lower than 150 mg mL^{-1} , the signal decreased rapidly in consecutive replicates. Thus, CoPc was chosen for the study with LOx biosensors, using this highest amount of mediator to prepare the membrane.

3.2.2 LOx Optimization

It is important to evaluate the amount of LOx incorporated in the PS membrane by phase inversion. This amount has to be enough to catalyze the reaction of L-lactate to pyruvate, and not exceed this value if it is not necessary. Then, L-lactate calibrations were taken applying 0.6 V as a working potential. For this reason, we carried out the optimization of LOx in phase inversion solution, using 3 different biosensors of 5, 10 and $20 \text{ mg LOx mL}^{-1}$. L-lac-

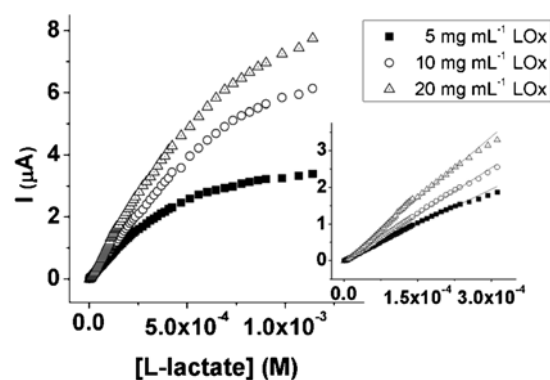


Fig. 4. Different L-lactate curves calibration at 0.6 V, using three biosensors of 5, 10 and $20 \text{ mg LOx mL}^{-1}$ as phase inversion solution. Measurements were carried out in a phosphate buffer at pH 7.

tate calibrations obtained are shown in Figure 4. Linear interval range varied in each curve, from 1×10^{-6} to 2×10^{-4} , 2.5×10^{-4} and 3×10^{-4} respectively. A higher sensitivity was obtained at a higher LOx concentration although it was thought that 5 mg mL^{-1} was enough to study this biosensor.

3.2.3 Reusability and Storage

Biosensors were stored at 4°C dipped in phosphate buffer solution since dried enzymes suffered an inactivation in the same way than biosensors based on LDH. In additional experiments, we proceeded to study their long-term stability. During 20 days, two replicates at 1×10^{-4} M of L-lactate were carried out with the same biosensor prepared first day. Results in Figure 5A showed that after one day the current signal decreased 45% and it was constant for 2 more days. However, from 20 days, the signal was lower, 30% of its initial value, and presented a high standard deviation. As a consequence, it is convenient to work with sensors within the first days after their construction. However, this fact not represents a serious problem since the biosensor preparation is fast and the response is reproducible for the same day.

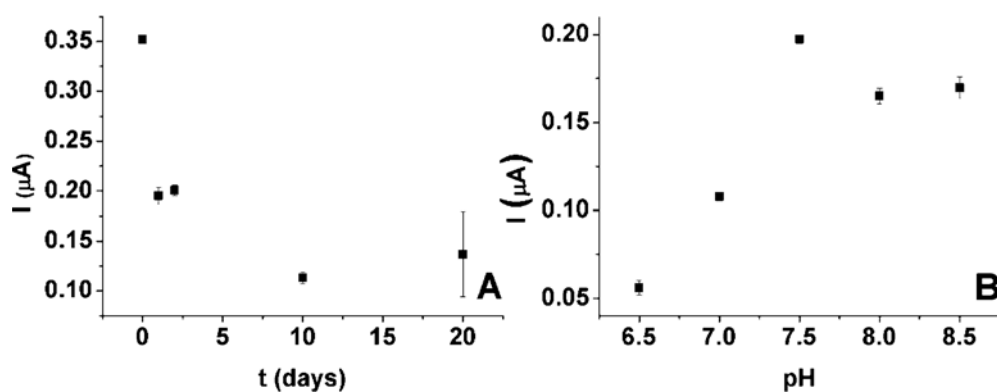


Fig. 5. A) Biosensor current at 10^{-4} M L-lactate versus time. Measurements were carried out at pH 7.5, 0.35 V in phosphate buffer solution. B) Study of pH of in phosphate buffer solution. Measurements were carried out per duplicate at 10^{-4} M L-lactate concentration.

3.2.4 Study of pH

The enzyme activity can be modified by the pH of buffer solution and it is a crucial step to evaluate the behaviour of biosensor based-on LOx versus this parameter. We studied the pH in the interval from 6.5 to 8.5. All amperometric measurements were carried out in a 10^{-4} M of L-lactate in phosphate buffer solution. Results in Figure 5B showed that at pH 7.5, we obtained the higher current, corresponding to the highest activity of the enzyme. Therefore, pH 7.5 was chosen as the optimum value to work with our biosensor.

3.2.5 Working with a Drop

Previous studies were taken in stirred buffer solution, but the use of screen-printed electrodes enables the analysis of samples by just depositing a drop of sample solution to obtain a current signal. This is of great advantage since it reduces the required amount of sample, decreases the size of the analytical device and makes it more portable. We proceeded to test our biosensor depositing a drop of 50 μL of solution covering three electrodes to close the system. Five replicates consecutives of L-lactate calibration were carried out in these conditions, increasing the concentration of L-lactate in each drop. Only forty seconds were enough to obtain a stable current signal. Moreover, results in Figure 6. showed a good repetitivity and linearity. In this case, L-lactate reaches the enzyme by diffusion through the membrane, a process slower than in stirred solutions, although it also implies obtaining a lower current signal. However, our measurements presented acceptable values of current and makes this type of measurement a great alternative to stirred solutions.

In order to evaluate the linear interval of response to L-lactate, calibrations from 5×10^{-6} to 10^{-2} were carried out. Curve lost linearity from 5×10^{-4} M, obtaining an appropriate and large linear interval to apply the biosensor for the L-lactate determination in real samples. In addition, we also evaluated the limit of detection for this biosensor. It was calculate in the same way as LDH biosen-

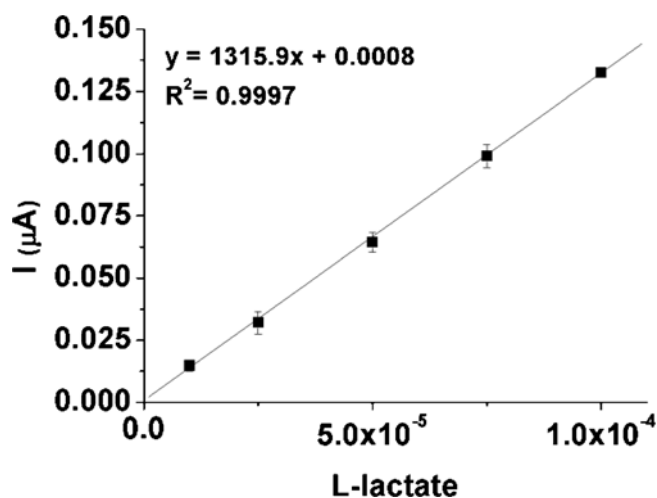


Fig. 6. L-lactate calibration obtained depositing a drop of solution. Current signal were taken after 40 s, at pH 7.5 in a phosphate buffer.

sor, 3 times the value of blank standard deviation, in this case 3.4×10^{-6} M. The repetitivity of measures was also calculated by means 3 replicates at 5×10^{-5} M of L-lactate at the same sensor where the results showed a good RSD of 5.3%.

3.3 Comparison of LOx and LDH Biosensors

After the construction and evaluation of LDH and LOx biosensors, we compared their performance for the detection of lactate solutions. These biosensors present common drawbacks since high applied potentials are required to detect H_2O_2 and NADH. Nonetheless, they present some significant differences. In case of LDH biosensor, the incorporation of the cofactor (NAD^+) is needed to carry out the L-lactate detection. In addition, the reduction of NADH takes place through intermediate radicals giving rise to electrode fouling and lack of stability [31]. The experimental results have been collected in the Table 1. As can be seen, LDH biosensor presents a

Table 1. Comparison of different parameters and data performance for amperometric L-lactate biosensors. a) and b) correspond to our LDH and LOx biosensors respectively. (n/a) indicates no data given.

Enzyme	Material working electrode	Mediator, co-factor	Potential	pH	Linear interval range (M)	LOD (M)	Sensitivity ($\mu\text{A/M}$)	Storage stability	RSD (%)	Reference
a) L-LDH (EC 1.1.1.27), chicken heart Type VIII, ≥ 400 U/mg protein	MWCNT/PS onto acarbon screen printed electrodes	Meldola's blue, NAD^+	50 mV vs. Ag/AgCl	8	10^{-6} – 2×10^{-5}	3.7×10^{-7}	7334	1 day, 30% of initial signal after 2 days	4.3	-
L-LDH (EC 1.1.1.27); rabbit muscle 811 U/mg	MWCNT/chitosan onto screen-printed electrodes	NAD^+	600 mV vs. Ag/AgCl	8	5×10^{-6} – 1.2×10^{-4}	7.6×10^{-7}	8300	65% of initial signal after 7 days	10%	[35]
L-LDH (EC 1.1.1.27); rabbit muscle 6U	Graphite screen printing ink	Meldola's blue, NAD^+	0 mV vs. Ag/AgCl	n/a	2×10^{-5} – 2×10^{-4}	10^{-5}	1020	Single use	n/a	[5]
L-LDH; rabbit muscle 811 U/mg	Poly-5,2'-5,2''-terthiophene-3'-carboxylic acid/MWCNT onto Au electrode	NAD^+	300 mV vs. Ag/AgCl	6.8	5×10^{-6} – 9×10^{-5}	10^{-6}	10600	98% of initial signal after 30 days	4.3	[36]
b) LOx (EC 1.13.12.4); <i>Peddiococcus sp.</i>	MWCNT/PS onto carbon screen printed electrodes	Cobalt(II) phtalocyanine	350 mV vs. Ag/AgCl	7.5	5×10^{-6} – 5×10^{-4}	3.4×10^{-6}	1315	30% of initial signal after 20 days	5.3	-
LOx (EC 1.1.3.2), <i>Peddiococcus sp.</i> 0.0004 U	Composite Poly-L-lysine matrix onto glassy carbon electrode	Cobalt(II) phtalocyanine	600 mV vs. Ag/AgCl	7	0 – 1.43×10^{-4}	5×10^{-7}	1020	< 50% of initial signal after 18 days	n/a	[37]
LOx (EC 1.1.3.2), <i>Peddiococcus sp.</i>	Water-based screen-printed carbon ink	Cobalt(II) phtalocyanine	400 mV vs. Ag/AgCl	7.3	1×10^{-3} – -6×10^{-3}	2.89×10^{-5}	3.63	n/a	9	[38]
LOx, <i>Peddiococcus sp.</i>	Glassy carbon	Quinone	-100 mV vs. Ag/AgCl	6	5×10^{-5} – 1.5×10^{-3}	5×10^{-5}	4.9	50% of initial signal after > 4 weeks	n/a	[39]

lower LOD than the LOx based biosensor, whereas the linear interval range is wider in the second case. Despite of storage stability showed by LDH, the advantage of that biosensor is its high sensitivity. Moreover, in Table 1, we have shown some L-lactate biosensors published in literature, which have common characteristics with our sensors such as the redox mediator or the material of working electrode. Regarding to the linear interval range of L-lactate, LOx biosensors also present large values than LDH in general. On the one hand, our biosensors show higher sensitivity in comparison with the bibliography. Although the stability of our biosensors is lower than other reported lactate sensors, mainly in case of LDH, one should note that the use of screen-printed electrodes which are cheap and enables their single use without the need of reutilization.

4 Conclusions

We have demonstrated the capability of PS/CNTs membrane to immobilize either LDH or LOx by phase inversion technique, which is a fast and easy to control. Combining this membrane onto the screen-printed electrode, we have produced biosensors to detect L-lactate. Besides, this type of matrix allows the incorporation of redox mediators making the biosensor more compact. Meldola's blue as a redox mediator permits to work a low potential to detect NADH. In case of LOx, CoPc was also incorporated to reduce the H_2O_2 overpotential. This fact is important because is possible to reduce the number of interferences at the biosensor response. In addition, screen-printed electrodes also allow measurements to be carried out either in stirred solutions or by using a small drop, which reduces the volume of samples employed in the L-lactate analysis and the experimental complications and facilitates the field assays.

Acknowledgements

We thank the *Spanish Ministry of Science and Innovation* for its financial support (CTQ2009-13873). Sandra Pérez would like to acknowledge to *UAB* for the P.I.F. fellowship.

References

- [1] J. Bakker, P. Gris, M. Coffernils, R. J. Kahn, J.-L. Vincent, *Am. J. Surg.* **1996**, *171*, 221.
- [2] G. J. Kost, T. H. Nguyen, Z. P. Tang, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2000**, *124*, 1128.
- [3] J. D. Artiss, R. E. Karcher, K. T. Cavanagh, S. L. Collins, V. J. Peterson, S. Varma, B. Zak, *Am. J. Clin. Pathol.* **2000**, *114*, 139.
- [4] J. D. Huang, Z. Song, J. Li, Y. Yang, H. B. Shi, B. Y. Wu, J. I. Anzai, T. Osa, Q. Chen, *Mater. Sci. Eng. C, Biomimetic Supramol. Syst.* **2007**, *27*, 29.
- [5] A. Avramescu, S. Andreescu, T. Noguier, C. Bala, D. Andreescu, J. L. Marty, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 25.
- [6] F. Ghamouss, S. Ledru, N. Ruille, F. Lantier, M. Boujtita, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 158.
- [7] N. Nikolaus, B. Strehlitz, *Microchim. Acta* **2008**, *160*, 15.
- [8] M. Gilis, H. Durliat, M. Comtat, *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 11.
- [9] F. Mazzei, F. Botre, G. Favero, *Microchem J.* **2007**, *87*, 81.
- [10] A. M. Herrero, T. Requena, A. J. Reviejo, J. M. Pingarron, *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 556.
- [11] F. Mazzei, F. Botre, G. Favero, *Microchem J.* **2007**, *87*, 81.
- [12] A. A. J. Torriero, E. Salinas, F. Battaglini, J. Raba, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *498*, 155.
- [13] N. G. Patel, A. Erlenkotter, K. Cammann, G. C. Chemnitz, *Sens. Actuators B, Chem.* **2000**, *67*, 134.
- [14] B. Serra, A. J. Reviejo, C. Parrado, J. M. Pingarron, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 505.
- [15] H. X. Ju, L. Dong, H. Y. Chen, *Talanta* **1996**, *43*, 1177.
- [16] J. Katrlík, A. Pizzariello, V. Mastihuba, J. Svorec, M. Stred'ansky, S. Miertus, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *379*, 193.
- [17] A. Parra, E. Casero, L. Vazquez, J. Jin, F. Pariente, E. Lorenzo, *Langmuir* **2006**, *22*, 5443.
- [18] B. Prieto-Simon, E. Fabregas, A. Hart, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2663.
- [19] A. Parra, E. Casero, L. Vazquez, F. Pariente, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *555*, 308.
- [20] S. A. M. Marzouk, V. V. Cosofret, R. P. Buck, H. Yang, W. E. Cascio, S. S. M. Hassan, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2646.
- [21] F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze, P. G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 531.
- [22] J. Haccoun, B. Piro, L. D. Tran, L. A. Dang, M. C. Pham, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1325.
- [23] S. Suman, R. Singhal, A. L. Sharma, B. D. Malthotra, C. S. Pundir, *Sens. Actuators B, Chem.* **2005**, *107*, 768.
- [24] M. Trojanowicz, O. Geschke, T. K. V. Krawczyk, K. Cammann, *Sens. Actuators B, Chem.* **1995**, *28*, 191.
- [25] T. M. Park, E. I. Iwuoha, M. R. Smyth, R. Freaney, A. J. McShane, *Talanta* **1997**, *44*, 973.
- [26] A. Gonzalez-Bellavista, S. Atrian, M. Munoz, M. Capdevila, E. Fabregas, *Talanta* **2009**, *77*, 1528.
- [27] S. Sanchez Ordóñez, E. Fabregas, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 965.
- [28] S. Sanchez, M. Pumera, E. Fabregas, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 332.
- [29] C. Torras, F. Ferrando, J. Paltakari, R. Garcia-Valls, *J. Membrane Sci.* **2006**, *282*, 149.
- [30] S. Sanchez, M. Roldan, S. Perez, E. Fabregas, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6508.
- [31] S. Sanchez, M. Pumera, E. Fabregas, J. Bartroli, M. Jose Esplandiú, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7721.
- [32] M. Giovanni, A. Ambrosi, M. Pumera, *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 1806.
- [33] M. Pumera, *Langmuir* **2007**, *23*, 6453.
- [34] S. Cosnier, M. Fontecave, C. Innocent, V. Niviere, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 685.
- [35] Y.-C. Tsai, S.-Y. Chen, H.-W. Liaw, *Sens. Actuators B: Chem.* **2007**, *125*, 474.
- [36] M. M. Rahman, M. J. A. Shiddiky, M. A. Rahman, Y.-B. Shim, *Anal. Biochem.* **2009**, *384*, 159.
- [37] E. I. Iwuoha, A. Rock, M. R. Smyth, *Electroanalysis* **1999**, *11*, 367.
- [38] F. J. Rawson, W. M. Purcell, J. Xu, R. M. Pemberton, P. R. Fielden, N. Biddle, J. P. Hart, *Talanta* **2009**, *77*, 1149.
- [39] J. Haccoun, B. Piro, V. Noel, M. C. Pham, *Bioelectrochemistry* **2006**, *68*, 218.

Artículo 4

Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples

S. Pérez and E. Fàbregas

Analyst, **137**(16): 3854-3861

Cite this: *Analyst*, 2012, **137**, 3854

www.rsc.org/analyst

PAPER

Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples†

Sandra Pérez* and Esteve Fàbregas

Received 17th February 2012, Accepted 11th June 2012

DOI: 10.1039/c2an35227c

A novel amperometric bienzymatic biosensor has been developed based on the incorporation of Lactate Oxidase (LOx) and Horseradish Peroxidase (HRP) into a carbon nanotube/polysulfone membrane by the phase inversion technique onto screen-printed electrodes (SPEs). In order to improve the sensitivity and reduce the working potential, experimental conditions have been optimized and ferrocene has also been incorporated into the membrane as a redox mediator of the enzymatic reactions, which allows the reduction of H₂O₂ at −100 mV. Measurements were carried out in phosphate buffer solution at pH 7.5 and under batch conditions. The biosensor response time to L-lactate was only 20 s and showed a good reproducibility (RSD 2.7%). Moreover, the detection limit was 0.05 mg L^{−1} of L-lactate with a linear interval range from 0.1 mg L^{−1} to 5 mg L^{−1}. Finally, the biosensor has been applied to the determination of L-lactic acid in different wine and beer samples. Then, the results obtained with the biosensor were compared with the ones obtained using, as a reference method, a commercial kit based on spectrophotometric measurements, obtaining an excellent agreement between the results, validating our approach.

Introduction

Determination of L-lactic acid is important in several areas such as clinical diagnostics,¹ sports medicine² and food analysis.³ Particularly in wine, L-lactic acid is mainly produced from the decomposition of L-malic acid during malolactic fermentation.⁴ In the winemaking industry, the course of malolactic fermentation is monitored by the decrease of L-malic acid concentration and the increase of L-lactic acid level. The control of this process is important given that it contributes to the mouthfeel of wine, enhancing the body and flavour persistence of wine, and producing wines of greater palate softness and roundness. If this process occurs in the bottle and is uncontrolled the wine will appear to the consumer to still be fermenting; thus being not suitable for commercialization, and preventing significant economic losses with its control. The primary objective of this transformation is to deacidify the wine, at the same time it also increases the biological stability of the wine and improves its organoleptic properties. For these reasons, following the levels of malate and lactate in wines could be considered as a quality test.

Several analytical procedures for the determination of L-lactic acid, such as liquid,⁵ ion-exchange^{6,7} and gas chromatography^{8,9} or colorimetric methods¹⁰ based on enzymatic reactions, have been reported. Generally, the problem of these methods is that they are arduous, time-consuming and laborious, and some of

them also need some sample pre-treatment and reagent preparation.¹¹ Therefore, biosensors represent an alternative to classical methods of analysis with huge advantages; *i.e.* a rapid, simple and direct measurement besides their low cost production. Usually, developed lactate biosensors are based on lactate dehydrogenase (LDH) or oxidase (LOx) enzymes.^{11–17} On the one hand, biosensors based on dehydrogenases require the presence of NAD⁺, a cofactor which is reduced to NADH and makes the enzymatic system more sophisticated and expensive.¹⁶ Besides this, the incorporation of this cofactor into the biosensor is not easy and could cause a limitation in the lifetime if not enough NAD⁺ was immobilized. Otherwise, in the case where it is not possible its incorporation results in the usage of large amounts of this cofactor to be added to the measuring cell, increasing in this way the cost. On the other hand, lactate oxidases contain the cofactor FAD in its structure, which catalyze the conversion of lactate and O₂ to pyruvate and H₂O₂, respectively. Given that the oxidation of H₂O₂ occurs at high potentials, other species can be oxidised and act as interferences, ascorbate being the most typical one.^{18–20} In order to avoid these problems, there are some strategies to reduce the working potential. Usually this could be achieved with the development of bienzymatic biosensors using Horseradish Peroxidase (HRP),^{21–23} with the use of redox mediators^{16,23–25} or even combining both approaches.²³ In this manner, bienzymatic biosensors combine the enzymes lactate oxidase and horseradish peroxidase, using Ferrocene (Fc) as a mediator for the amperometric detection of H₂O₂. LOx catalyzes the oxidation of lactate to pyruvate through the reduction of O₂ to hydrogen peroxide, which is then reduced to H₂O by HRP and finally, detected at the

Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2an35227c

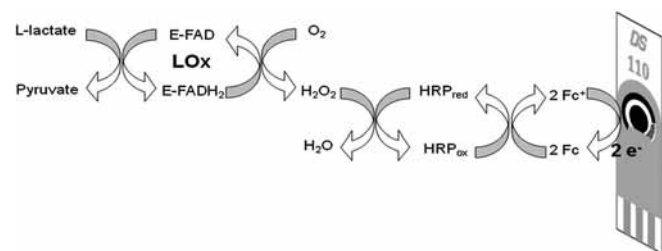
electrode surface through the reduction of ferrocenium generated (Scheme 1). In that case, a reduction potential might be applied to detect the H₂O₂ produced. Some of the analytical characteristics of these biosensors are summarized in Table 1.

Moreover, in the last few years, new strategies for the determination of L-lactate based on biochemical logic gates have appeared in the literature. These strategies combine the specificity of enzymes with digital information processing, obtaining a binary response (1/0) instead of a quantitative value. For instance, an AND/IDENTITY logic gate based on lactate oxidase, horseradish peroxidase and glucose oxidase was designed with the aim of processing biochemical information related to the normal and pathophysiological conditions.²⁹

Enzymes have been incorporated into polysulfone (PS) membranes by phase inversion (PI). This technique has been used in recent years for the immobilization of different biomolecules.^{16,24,30–35} A thin film of polymer solution (in DMF) is deposited onto the surface of the electrode and then immersed into an aqueous solution (non-solvent) that contains the biomaterial. Thus, causing an exchange of the solvent by the non-solvent and the precipitation of the membrane, biomolecules present in aqueous solution are trapped and incorporated into the polysulfone membrane. Polysulfone^{36–39} is an attractive material because of its chemical and biological stability,⁴⁰ high resistance in extreme pH, thermal stability and porosity. Also its porous size is controllable depending on the polymer concentration, batch conditions in the phase inversion process, *etc.* Due to all these properties, it has been used for many applications as a polymer for commercial microfiltration and ultrafiltration membranes.

The combination of a PS polymer membrane with Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) as a transducer^{30–32,36} offers unique properties for the easy incorporation of biological moieties, providing a composite material with a high electrochemical response to the corresponding analyte. Since carbon nanotubes were discovered by Iijima,⁴¹ they have received a great deal of attention as an electrode material. CNTs have been used in sensing applications because of their excellent electrical properties, high surface-to-volume ratio, high chemical stability and minimization of surface fouling onto electrochemical devices. However, CNTs also display remarkable catalytic properties towards the oxidation of numerous biological substances such as acetaminophen, dopamine, urate, ascorbate, *etc.* and as a consequence of this, their selectivity decreases.⁴²

Herein, we report the development of an amperometric biozymetric biosensor for the determination of L-lactate based on a MWCNT/PS membrane deposited onto screen-printed electrodes, where LOx and HRP were incorporated by the phase



Scheme 1 Schematic diagram of the reactions involved for the lactate determination.

Table 1 Some analytical characteristics of L-lactate biosensors

Enzymes	Material working electrode	Mediator, cofactor	Potential	pH	Linear interval range (M)	LOD (M)	Sensitivity ($\mu\text{A M}^{-1} \text{mm}^{-2}$)	Stability	RSD (%)	Samples	Reference
LOx (EC. 1.1.3.12.4); <i>Peddiococcus</i> sp./HRP type II from <i>horseradish</i>	MWCNT/PS onto carbon screen printed electrodes	Ferrocene	-100 mV	7.5	1.1×10^{-6} to 5.6×10^{-5}	5.6×10^{-7}	1168.8	40% of its original response after 2 weeks	2.7	Wine and beer	This work
LOx (EC. 1.1.3.12.4); <i>Peddiococcus</i> sp.	MWCNT/PS onto carbon screen printed electrodes	Cobalt(II) phthalocyanine	350 mV vs. Ag/AgCl	7.5	5.0×10^{-6} to 5.0×10^{-4}	3.4×10^{-6}	104.7	30% of initial signal after 20 days	5.3	—	16
LOx (EC. 1.1.3.2); <i>Peddiococcus</i> sp./HRP type II from <i>horseradish</i>	3-mercaptopropionic acid self-assembled monolayer SAM-gold electrode	Tetraethylfulvalene Ag/AgCl	-50 mV vs. Ag/AgCl	6.5	4.2×10^{-7} to 2.0×10^{-5}	4.2×10^{-7}	383.7	91% of initial signal after 5 days	8.3	Synthetic wine	26
LOx (EC. 1.1.3.2); <i>Peddiococcus</i> sp.	Glutaraldehyde/polyppyrole onto Pt	—	—	7	0.2×10^{-2}	—	1.0	86% of initial signal after 2 days	1.6	Tomatoes juice	27
LOx (EC. 1.1.3.2); <i>Peddiococcus</i> sp./HRP type II from <i>horseradish</i>	Chitosan/MWCNT onto gold electrodes	Ferrocyanide	-50 mV vs. Ag/AgCl	7	5.0×10^{-6} to 3.4×10^{-4}	1.66×10^{-6}	925.5	90% of initial sensitivity -after 15 months	3.7	Wine and food samples	28
HRP from <i>horseradish</i>	Nylon/polyazetidine onto an oxygen Clark electrode	—	-650 mV vs. Ag/AgCl	7	5.6×10^{-5} to 3.4×10^{-3}	2.8×10^{-5}	231.6 $\mu\text{A M}^{-1}$ (area not declared)	180–200 assays	2.8	Wine	22
LOx (EC. 1.1.3.2); <i>Peddiococcus</i> sp./HRP (EC. 1.1.1.7); type II	Graphite/Teflon	Ferrocene	0.0 mV vs. Ag/AgCl	7.4	5.0×10^{-6} to 1.0×10^{-4}	1.4×10^{-6}	60	60 days	6.6	Yogurt, red wine	23

inversion technique. In this fashion, several works have demonstrated the advantages of this PS/CNTs composite matrix and its ability to easily immobilize biomolecules in a few minutes.³⁰ Hence, the benefits of these membranes combined with the use of commercial SPEs offer the possibility of developing a more portable system which in addition could allow carrying out on-field analyses. Now is the first time that a MWCNT/PS based biosensor has demonstrated its applicability towards the determination of compounds in real samples, in this case, the quantification of L-lactate in wine and beer samples, comparing its results with those obtained by a reference method.

Experimental

Reagents and solutions

Lactate oxidase from *Pediococcus* species (20 units mg⁻¹), peroxidase, type II from horseradish (188 units mg⁻¹), sodium L-lactate, sodium phosphate dibasic anhydrous, potassium chloride, Bovine Serum Albumin (BSA) and Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs; length 0.5–200 μm and outer diameter 30–50 nm), sodium citrate tribasic dehydrate, L(+)-ascorbic acid, sodium succinate dibasic hexahydrate, gallic acid, L-malic acid, D(+)-glucose monohydrate, ethanol, and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich® Chemie (Steinheim, Germany) and sodium tartrate from Alco (Terrassa, Spain). Polysulfone was obtained from BASF (BASF Ultrasons S 3010 natur, Frankfurt, Germany). *N,N*-Dimethylformamide (DMF) and nitric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Ferrocene (Fc) was purchased from Alfa Aesar (Germany). Kit acid L-lactic liquid (Steroglass SQPE052029) was purchased from RAL, *técnica para el laboratorio*, S.A. (Barcelona, Spain).

All solutions were prepared with deionised water obtained from PURELAB® Ultra Laboratory Water Purification Systems, and measurements were taken in a phosphate buffer (0.1 M HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻, 0.1 M KCl, pH 7.5). MWCNTs were previously purified by stirring them in 6 M nitric acid for 2 hours and dried at 80 °C.

Wine and beer samples

In order to test the applicability of the developed biosensor to food industry analysis, a total of 15 samples were acquired at the local supermarket and analyzed. The formed set includes 8 wines (6 red, 1 rosé and 1 white) and 7 beer samples. Only one sample of white and rosé wine was considered given this type of wine is not usually subjected to malolactic fermentation, therefore it was very difficult to find some samples with a significant amount of lactic acid. Moreover, this parameter is not of interest in these cases given it does not provide relevant information to the wine. Detailed information of the wines and beers used as well as the results obtained are summarized in Table 2.

Apparatus

Amperometric and voltammetric measurements were taken using a μStat 200 Bipotentiostat from Dropsens (Oviedo, Spain). DropView software package was used to control the instrument, register and perform the analysis of the results. Carbon screen-printed electrodes (SPEs) were supplied by DropSens (Ref. 110)

(Oviedo, Spain), which consist of a carbon working electrode (4 mm diameter), a carbon counter electrode and a silver reference electrode in the same support. Spectrophotometric measurements were carried out using a Spectronic Helios Epsilon spectrophotometer from Thermo Electron Scientific Instruments LLC (Madison, WI, USA). “Ultrasons 3000683” from J.P. Selecta (Barcelona, Spain) has been used for sonication.

Biosensor preparation

In a previous step prior to biosensor preparation, SPEs were electrochemically activated using cyclic voltammetry in 0.05 M potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]) in order to improve their signal-to-noise ratio (*S/N*).^{5,43} For this, the potential sweeps between -0.6 V and +0.6 V vs. Ag/AgCl pseudoreference electrode, with a scan rate of 100 mV s⁻¹ and a step potential of 9 mV (Fig. S1A, see ESI†). In this manner, only five cycles were necessary to activate the electrodes and get stable responses. In this way, the noise in current signals was drastically reduced as can be seen in Fig. S1B†, where chronoamperometric measurements corresponding to successive additions of K₃[Fe(CN)₆] were done before and after SPE activation. These activation processes are commonly used and achieved with pre-anodization treatments, where the improvement in *S/N* is usually attributed to the role of increased surface functionalities and roughness or removal of the surface contaminants. These activations have a stripping or renewing effect on the surface of the carbon electrodes, in a similar manner as the polishing step carried out with conventional carbon electrodes in order to renew its surface, not applicable in SPEs due to its nature.

The polysulfone composite membranes were prepared by Phase Inversion (PI) following the methodology previously established.³³ To assemble the PS/MWCNT/Fc/LOx/HRP membrane, the first step was to prepare the PS solution. For this, 84 mg of PS were dissolved in 1 mL of DMF. Then, 50 μL of this solution were mixed with 5 mg of ferrocene and 1 mg of MWCNT. The as-prepared CNTs usually aggregate into bundles because of the van der Waals forces, therefore it was necessary to sonicate for 1 hour to obtain a homogeneous dispersion. Next, 0.6 μL of PS/MWCNT/Fc/DMF paste was deposited onto the Dropsens SPE working electrode. Finally, to incorporate LOx and HRP, 5 μL of an aqueous solution of these enzymes (phase inversion solution) were added over the previous paste, causing the coagulation of the membrane through the phase inversion process. The phase inversion solution contains 10 mg mL⁻¹ of LOx, 38 mg mL⁻¹ of HRP and 38 mg mL⁻¹ of BSA in phosphate buffer solution at pH 7.5. The phase inversion process only took 5 minutes, and afterwards the biosensor was dipped for 5 minutes in a buffer phosphate solution under continuous stirring to clean the sensor. The modified electrodes with films incorporating the enzyme were stored in phosphate buffer solution pH 7.5 at 4 °C.

Amperometric measurements

Amperometric measurements were carried out in batch mode in an open vessel at room temperature (25 °C). First, the bienzymatic biosensor was immersed in the electrochemical cell containing 10 mL of PBS buffer (0.1 M H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ and 0.1 M KCl at pH 7.5) under forced convection by stirring the solution

Table 2 Concentrations of L-lactate in various beverage samples determined using amperometric and spectrophotometric methods

Samples		Sensor concentration (g L ⁻¹)	Confidence interval ^a (g L ⁻¹)	RSD (%)	Kit concentration (g L ⁻¹)	Difference (%)
Red wines	<i>Serrasegué</i>	1.06	0.08	2.8	1.03	-2.9
	<i>Valls</i>	0.53	0.03	1.9	0.55	3.6
	<i>Terres negres 1</i>	0.76	0.03	1.3	0.79	3.8
	<i>Terres negres 2</i>	0.79	0.03	1.3	0.81	2.5
	<i>Terres negres 3</i>	0.76	0.07	1.3	0.77	1.3
	<i>Campo viejo</i>	1.11	0.03	2.7	1.14	2.6
White wines	<i>Gandesa</i>	0.93	0.02	0.9	0.94	1.1
Rose wines	<i>Gourmet</i>	0.88	0.04	2.3	0.88	0.0
Beers	<i>Voll Damm</i>	0.067	0.004	3	0.071	5.6
	<i>Carrefour</i>	0.16	0.01	2.5	0.17	5.9
	<i>Moritz</i>	0.277	0.004	0.6	0.28	1.1
	<i>San Miguel</i>	0.030	0.001	1.7	0.029	-3.4
	<i>Adlerbrau</i>	0.047	0.002	2.1	0.048	2.1
	<i>San Miguel (alcohol-free beer)</i>	0.043	0.003	3	0.044	2.3
	<i>Xibeca (Damm)</i>	0.053	0.003	2.4	0.055	3.6

^a Confidence intervals calculated with a confidence level of 95% $n = 3$ and $t_{\text{tab}} = 4.303$.

for 3 minutes until the current intensity became stable. Then, additions of L-lactate of known concentration were done, with a biosensor response time of only 20 seconds, and readings were taken under steady-state conditions as the average of the last 5 seconds (10 measurements with an interval of 0.5 s). Measurements were done in replicate, and the results given are the averages of the repeated measurements with their corresponding Relative Standard Deviations (RSD).

As shown in Scheme 1, lactate is oxidised to pyruvate by LOx generating H₂O₂, which is then reduced to H₂O by HRP and finally detected at the electrode surface through the reduction of ferrocenium generated. After the study of the optimal working potential, measurements were carried out at -100 mV vs. reference electrode.

Spectrophotometric measurements

For comparison purposes, wine and beer samples were also analyzed using a spectrophotometric commercial kit for the detection of L-lactate as the reference method. The kit was also based on enzymatic reactions, where L-lactic acid is oxidized to pyruvate by means of the enzyme L-Lactate Dehydrogenase (LDH) and the cofactor Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺). As this reaction is in equilibrium, and in the presence of pyruvate and NADH it is far in favour in the formation of lactate, it is needed to remove the pyruvate from the system in order to dehydrogenate lactate completely. For this, pyruvate is withdrawn from the media by its conversion to alanine in the presence of the enzyme D-Glutamate Pyruvate Transaminase (D-GPT). Finally, the amount of NADH formed in the above coupled reactions is measured by the increase in absorbance at 340 nm, and stoichiometrically related to the amount of L-lactic acid present in the sample.

Results and discussion

Amount of enzyme in membrane

First of all, the amount of LOx enzyme used for the PI process in the biosensor preparation was evaluated.¹⁶ For this, three

different PI solutions containing different amounts of enzyme were prepared: 5, 10 and 20 mg mL⁻¹ LOx in PBS. Then, as described in the biosensors preparation section, but without the incorporation of HRP and Fc, three different PS/MWCNT/LOx biosensors were constructed and its response was evaluated by means of their amperometric calibration curves towards L-lactate at 600 mV vs. reference electrode to detect the H₂O₂ produced. The linear interval and sensitivity of calibrations increase with the amount of enzyme incorporated into the membrane,^{16,44} with a high improvement from 5 to 10 mg mL⁻¹ of LOx, but a less significant effect from 10 to 20 mg mL⁻¹. Thus, 10 mg mL⁻¹ of LOx was chosen as the optimal enzyme concentration due to the gain obtained in its response when employing more enzyme does not justify its increase.

Once optimized the amount of LOx used for the biosensor construction, an excess of HRP was also incorporated³¹ into the PI solution. As said, this enzyme catalyzes the conversion of hydrogen peroxide to water, allowing the reduction of the working potential from 600 mV to -100 mV vs. reference electrode. Given that in the bienzymatic system the response of the biosensor will depend on HRP_{ox} generated in the second enzymatic reaction, and to guarantee that our signal is kinetically related to the substrate we want to determine (L-lactate acid), we must have the system controlled by the first reaction. Therefore, a higher proportion of HRP (*ca.* 500 units, 2.5 times more than LOx³¹) was added to the phase inversion solution. This was to make sure that in the case of enzyme saturation, all the lactate that reacts will be detected. In addition, the PI solution also contains 10 mg mL⁻¹ of BSA⁴⁵ to improve the retention of enzymes into the PS membrane and as a consequence, the biosensor reproducibility. This is because the protein provides a more "comfortable" environment for the enzyme; since it could be expected that the immobilization of enzymes on a membrane will at least change its hydrophobicity, its surface charge and morphology; then, the use of BSA would be beneficial to improve these conditions, hence enhancing its immobilization and increasing at the same time its stability.

Electrochemical behaviour

In order to study the optimal working potential to carry out the L-lactate determination, cyclic voltammetry and amperometry measurements were performed. First, the enhancement of the signal when incorporating ferrocene as a mediator into the membrane was evaluated. For this, two different biosensors were prepared, one without the mediator in its membrane (PS/MWCNT/LOx/HRP) and the other with the mediator incorporated into it (PS/MWCNT/Fc/LOx/HRP). Then, the two biosensor responses were evaluated by cyclic voltammetry in a 0.1 g L⁻¹ solution of L-lactate in PBS buffer pH 7.5. As can be seen in Fig. 1A, the reduction potential when ferrocene is absent is around -0.1 V, whereas in the case that the sensor contains ferrocene, this is around 0.1 V. Despite working without ferrocene is possible, the current intensity obtained in L-lactate calibrations is much higher in the case of PS/MWCNT/Fc/LOx/HRP. Therefore, this configuration was the one chosen for further experiments with lactate.

Once the benefits of the incorporation of ferrocene into the membrane were confirmed, the next step was to carry out an amperometric study in order to find the optimal working potential. Fig. 1B shows the maximum reduction signal at 0 V. Although even at this potential it was possible to obtain a good L-lactate response, owing to the fact that in real samples other species can be oxidized and act as interferences at this potential, -100 mV was selected as the working potential. At this potential, the reactions showed in Scheme 1 take place and L-lactate is detected.

Effect of pH buffer solution

Lastly in order to find the optimal measurement conditions, the influence of the pH in the biosensor response was also studied. In this case, pH has two different effects that must be considered: the enzymes activity (both for LOx and HRP) and the mediator (Fc). In order to study the biosensor response at different pHs, amperometric measurements of a 1 mg L⁻¹ L-lactate solution were taken in PBS buffer from pH 6.5 to 8.5. For each pH, two replicas of the measurements were done. As shown in Fig. 2, for pH values between 6.5 and 7.5 the reduction current increases steeply as the pH increases, until pH 7.5 when it reached the maximum value; then for pH values higher than 7.5, the response decreased again. Therefore, this pH was selected as the optimum

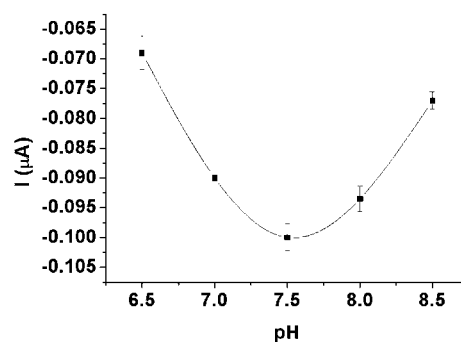


Fig. 2 Study of the pH of the phosphate buffer solution. Batch amperometric measurements were carried out in duplicate at a constant concentration of 1 mg L⁻¹ of L-lactate, 0.1 M H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ and 0.1 M KCl, at -0.1 V.

and further experiments with the biosensor were carried out at pH 7.5.

Storage stability and linear interval range

Two different strategies to store the prepared biosensors were tested in order to attain longer lifetime and enzyme activity for the biosensor. The first strategy was to keep the biosensor dried at 4 °C. However, under these conditions biosensors lost almost all of its activity in one day, *i.e.* the sensitivity of the current response decreased *ca.* 90%. Hence, another strategy was attempted to improve its storage stability. For this, biosensor was kept at 4 °C as before, but immersed in 0.1 M PBS (pH 7.5) solution. With this, results improved significantly, although the response still decays slightly compared with the first day. Then it decreased slowly every day as shown in Fig. 3, keeping up to *ca.* 40% of its original response after 2 weeks of storage. Therefore, all electrodes were stored in buffer solution at 4 °C between measurements.

Once all the experimental conditions and the membrane composition were optimized, the next step was to evaluate the linear behaviour of the biosensor towards L-lactate. Thus, the calibration plot between 0.1 and 25 mg L⁻¹ was built from the batch measurements based on addition of different microvolumes of a L-lactate 0.1 g L⁻¹ solution to PBS buffer. Then, linear least-squares regression was fitted and it was observed that

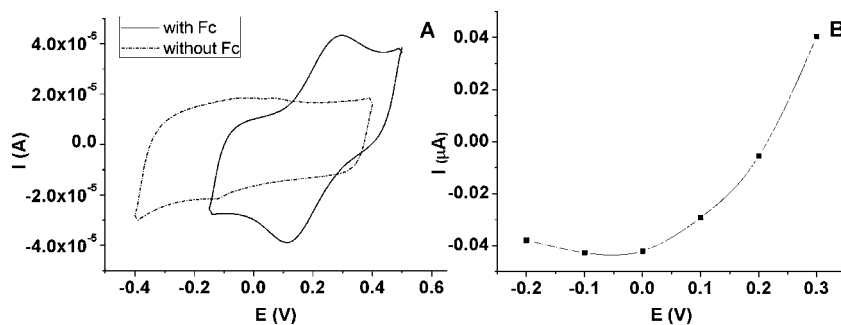


Fig. 1 Study of the working potential. (A) Cyclic voltammetric measurements were performed with a biosensor in the presence or absence of ferrocene as a mediator inside the membrane (scan rate = 100 mV s⁻¹). (B) Batch measurements were carried out by varying the working potential. All measurements were carried out at a 0.5 mg L⁻¹ L-lactate solution in PBS (pH 7.5).

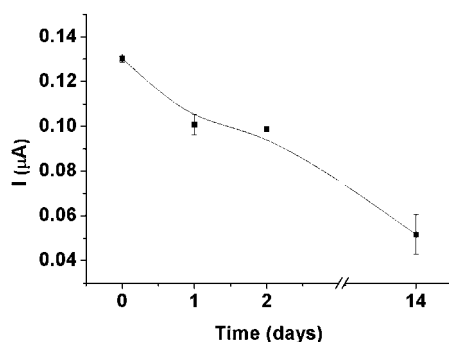


Fig. 3 Lifetime stability. Amperometric measurements were performed at 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.5 and 1 mg L⁻¹ of L-lactate solution.

for values higher than 5 mg L⁻¹ there was a loss of linearity as shown in Fig. 4. Therefore, it was chosen the interval between 0.1 and 3.5 mg L⁻¹ as the linear interval range for the PS/MWCNT/Fc/LOx/HRP biosensor towards L-lactate and the one used to carry out further measurements.

Reproducibility

The reproducibility of the developed biosensor was evaluated in two different manners. First, the reproducibility of its response towards a standard solution of L-lactate was compared. In this manner, five replicates of the biosensor response towards a 1 mg L⁻¹ L-lactate solution were taken. Results showed a good reproducibility between measurements, with an RSD of 2.7%. In addition, the reproducibility between calibrations was also tested performing three successive replicates of L-lactate calibration between 0.5 and 3.5 mg L⁻¹ (Fig. 5). Results were also highly reproducible in the chosen working range with a RSD of 1.4% for the slopes of the different calibrations, and a Limit of Detection (LOD) of 0.053 mg L⁻¹ of L-lactate. LOD is defined as the concentration corresponding to three times the blank standard deviation. The Standard Error of Estimate (SEE) could be taken as an estimation of the blank standard deviation, that it is the standard deviation of the residuals from the regression calculation. Therefore, LOD was calculated from the regression of the five calibration curves. In Fig. 5 a calibration curve for L-lactate has been represented, where values of each concentration were taken as the average of 5 replicates.

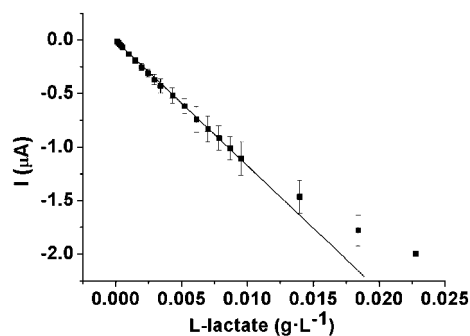


Fig. 4 Evaluation of the biosensor response and linear range towards L-lactate. Measurements were carried out at a 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.5.

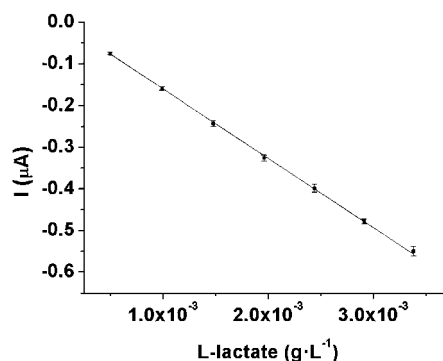


Fig. 5 L-Lactate calibration curves as average of five replicates for successive calibrations with the same biosensor. Measurements were performed at phosphate buffer solution (pH 7.5).

Biosensor's response

In order to evaluate our biosensor behaviour, a comparison of different performance parameters with other reported amperometric L-lactate biosensors has been carried out (Table 1). These biosensors have been developed using different types of supports, such as gold, platinum or carbon electrodes. The vast majority also used mediators such as ferrocene, ferrocyanide, tetrathiafulvalene or cobalt(II) phthalocyanine in order to decrease the working potential, otherwise the potential to carry out the measurements would be much higher, around +650 mV vs. Ag/AgCl. Moreover, as can be seen, HRP is frequently used as a second enzyme to catalyze the reduction of H₂O₂ produced in the first reaction. Regarding the linear interval range for L-lactate, biosensors reported present similar values, between 1.5 and 2 orders of magnitude, and normally starting nearly 10⁻⁶ M. In this sense, developed biosensor displayed an excellent sensitivity of 1168.8 mA M⁻¹ mm⁻², combined with one of the lowest LOD and RSD values in comparison with the other reported ones. However, its main drawback is its stability, keeping only 40% of its initial signal after 2 weeks, whereas in the case of other published L-lactate biosensors this value is higher. Despite this disadvantage, this does not represent a significant problem since SPEs are meant to be used in a disposable manner.

Interferences study

In order to ensure its applicability to real samples, potentially interfering substances contained in wine and beer samples were evaluated, namely mallic acid (which is converted to lactate during malolactic fermentation); gallic acid (as one of the major phenolic compounds found in wine and beer); glucose (along with fructose, which is one of the main fermentable sugars in wine grapes); ethanol (since wine and beer have a 12–16% v/v and 3–9%, respectively); ascorbic acid (naturally present and often added as anti-oxidant); and also tartaric acid, succinic acid, citric acid and acetic acid (as part of the main compounds found in wines and usually considered for the preparation of synthetic wine).^{46,47} The effect of all these compounds was checked carrying out amperometric measurements in PBS buffer with a concentration of 2 mg L⁻¹ of each one and comparing the results with those obtained for the same L-lactate concentration. As can be seen in Fig. 6, under the optimized experimental conditions

selected for the determination of L-lactate, only gallic and ascorbic acids showed some response, representing 1.7 and 10.2% of L-lactate current signal, respectively. In the case of gallic acid, the studied concentration was close to the total phenolic content in red wine (2.16 g L^{-1}) and in beer samples (0.52 g L^{-1}) once the dilution factor applied to those samples for the determination of L-lactate has been taken into account, and in the case of ascorbic acid, its usual concentration in wine varied between 5 and 12 mg L^{-1} , lower than the content of L-lactate. For both interferences, although some response was obtained, taking into account the dilution step prior to L-lactate determination in wine (1 : 1000–2000) and in beer samples (1 : 200), they could not be considered as significant interferences in the L-lactate determination. Nevertheless, it must be reckoned that some matrix effect was observed when the biosensor was applied to real sample measurements. In this way, it was studied that the presence of ethanol, normally 12% v/v in wine, reduced *ca.* 20% the sensitivity of the biosensor (Fig. 7), also considering the dilution step.

Assay in real samples

Finally, to evaluate the biosensor applicability in food analysis, concretely in the analysis of lactic acid in alcoholic beverages, it was tested with real wine and beer samples. As the subject of investigation, 8 wines and 7 beer samples were analyzed separately both with the biosensor and a spectrophotometric commercial kit for the detection of L-lactate as a reference method, and the results obtained were compared in order to validate its performance.

As previously said, the optimal working potential for amperometric determinations with the developed biosensor was between -100 and 0 mV vs. reference electrode, since the electrochemical interferences are minimum in this range. Given that, applying lower potentials (more negatives ones) contributes to the diminution of the electrochemical interferences, -100 mV was the one chosen to carry out L-lactate measurements. This is mostly important in wine samples, where phenolic compounds are easily oxidizable.

The electrochemical assay of real samples was performed by means of the standard addition method to avoid any matrix effect, given a slight decrease was observed in the sensitivity when calibrations were carried out in wine or beer. Moreover, sample dilution was required in order to fit the expected concentration value with the biosensor linear range. In this way, the dilution

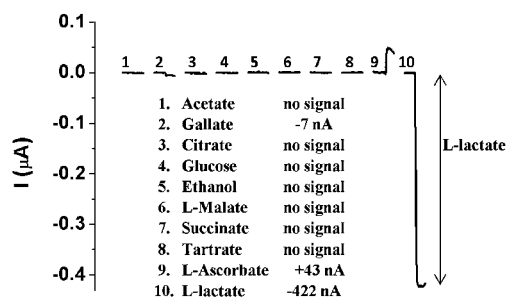


Fig. 6 Study of interferences. All the compounds evaluated have been studied at a concentration of 2 mg L^{-1} in a phosphate buffer solution (pH 7.5), also a comparison with the current response obtained with the same concentration of L-lactate is shown.

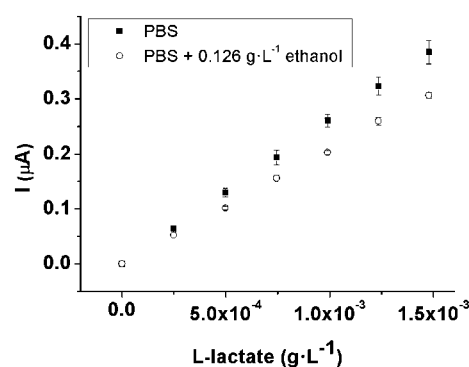


Fig. 7 Study of the influence of ethanol in the sensitivity of calibration curve to L-lactate. Measurements were carried out with the same biosensor in phosphate buffer solution at pH 7.5 in the presence or absence of ethanol. 0.126 g L^{-1} was the concentration evaluated, which corresponds to a 1 : 1000 dilution of the normally content in wine (12% v/v).

factor was from 1 : 1000 to 1 : 2000 for wine samples and 1 : 200 for beers. All amperometric determinations were done in triplicate analysis for each sample, calculating L-lactate concentration from the calibration plot built after the addition of 6 stocks. Low L-lactate concentration values were able to be determined with our biosensor, as we can see for example in beer samples. However, the results obtained for other white wines assayed are not reported here since, in general, they do not present significant L-lactate levels. This is due to this type of wines are not usually subjected to malolactic fermentation⁴ and therefore, L-lactic acid concentration in white wines is not significant. Results obtained with the biosensor are summarized in Table 2 and expressed as g L^{-1} of L-lactate.

Then, these results were plotted vs. those obtained with the commercial kit in order to compare both methodologies and to validate biosensor results; in addition, this comparison would be also useful to detect any interference effect if there was observed some lack of correlation between the two methodologies. From Fig. 8, it could be seen that the results obtained by our biosensor showed a good agreement with those obtained with the spectrophotometric method based on the determination of NADH formed. Linear least-squares regression was fitted and the characteristic parameters were calculated, obtaining a satisfactory

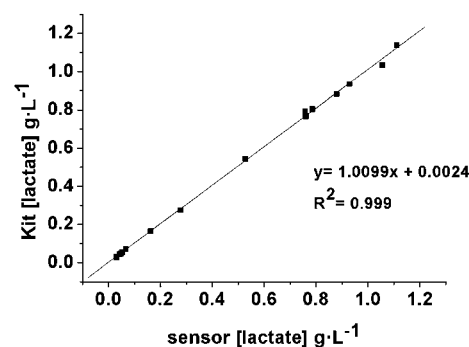


Fig. 8 Comparison of the results obtained with the biosensor (y axis) and those obtained with the reference spectrophotometric method (x axis) for L-lactate determination. Error bars correspond to biosensor replicate analysis ($n = 3$).

correlation ($r^2 = 0.999$) with slope value near one (1.01 ± 0.02) and intercept near zero (0.002 ± 0.012), containing both theoretical 1.0 and 0.0 values in the confidence interval. These parameters show that there are no significant differences between the results obtained with both methodologies and validate the applicability of the developed biosensor for L-lactic determination in wine and beer samples.

Conclusions

A bienzymatic biosensor for L-lactate determination based on the coimmobilization of LOx and HRP, and the usage of ferrocene as a mediator has been developed. The immobilization onto the SPE was achieved by a polysulfone/carbon nanotubes membrane. Besides its easy and fast preparation in only one step and considering the excellent property of polysulfone to incorporate all of the components involved in the amperometric measurement into a single membrane, this device has proven to have high accuracy, high sensitivity, low limit of detection and a fast throughput. Nevertheless, the shelf-life stability is not very high and might improve in future experiments.

Finally, to assess biosensor applicability to the food analysis field, this latter was applied to the determination of L-lactate in wine and beer samples. Since wine samples contain different substances that may be able to act as interferences, a low negative potential was applied thanks to the mediator effect. Measurements were carried out employing the standard addition method, and compared with the ones obtained using a spectrophotometric commercial kit for the determination of L-lactate as a reference method. This comparison demonstrated the applicability of the biosensor through the validation of the results obtained, demonstrating the reliability of our biosensor that besides reduces the analysis time to 18 min (5 min for the biosensor vs. 23 min for the spectrophotometric kit). Although in this case we have only focused on beverage field analysis, additional applications for this biosensor would be also possible employing the same strategy with different types of samples.

Acknowledgements

We would like to thank the *Spanish Ministry of Science and Innovation* for its financial support (CTQ2009-13873). Sandra Pérez would like to acknowledge to Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) for the P.I.F. fellowship.

References

- 1 T. J. Kim, L. Freml, S. S. Park and T. J. Brennan, *J. Pain*, 2007, **8**, 59–66.
- 2 A. Poscia, D. Messeri, D. Moscone, F. Ricci and F. Valgimigli, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 2244–2250.
- 3 V. P. Zanini, B. L. de Mishima and V. Solis, *Sens. Actuators, B*, 2011, **155**, 75–80.
- 4 P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud, *Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*, Wiley-Blackwell, London, 2000.
- 5 J. Wang, M. Pedrero, H. Sakslund, O. Hammerich and J. Pingarrón, *Analyst*, 1996, **121**, 345–350.
- 6 W. Boonkong, P. Sangvanich, A. Petsom and N. Thongchul, *Chem. Eng. Technol.*, 2009, **32**, 1542–1549.
- 7 B. Prusisz, K. Mulica and P. Pohl, *J. Food Drug Anal.*, 2008, **16**, 95–103.
- 8 A. Caligiani, M. Cirlini, G. Palla, R. Ravaglia and M. Arlorio, *Chirality*, 2007, **19**, 329–334.
- 9 R. M. Peña, J. Barciela, C. Herrero and S. Garcia-Martin, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 2788–2794.
- 10 F. Noll, in *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. H. U. Bergmeyer, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK, 3rd edn, 1988, vol. VI, pp. 582–588.
- 11 N. Nikolaus and B. Strehlitz, *Microchim. Acta*, 2008, **160**, 15–55.
- 12 F. Palmisano, D. Centonze and P. G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.*, 1994, **9**, 471–479.
- 13 F. Palmisano, D. Centonze, M. Quinto and P. G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.*, 1996, **11**, 419–425.
- 14 M. D. Leonida, D. T. Starczynowski, R. Waldman and B. Aurian-Blajeni, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 832–837.
- 15 A. Parra, E. Casero, L. Vazquez, F. Pariente and E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **555**, 308–315.
- 16 S. Pérez, S. Sánchez and E. Fàbregas, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 967–974.
- 17 M. R. Romero, F. Garay and A. M. Baruzzi, *Sens. Actuators, B*, 2008, **131**, 590–595.
- 18 U. Spohn, D. Narasaiah, L. Gorton and D. Pfeiffer, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **319**, 79–90.
- 19 K. Wang, J. J. Xu and H. Y. Chen, *Sens. Actuators, B*, 2006, **114**, 1052–1058.
- 20 N. G. Patel, A. Erlenkotter, K. Cammann and G. C. Chemnitz, *Sens. Actuators, B*, 2000, **67**, 134–141.
- 21 F. Ghamouss, S. Ledru, N. Ruille, F. Lantier and M. Boujtita, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **570**, 158–164.
- 22 F. Mazzei, F. Botre and G. Favero, *Microchem. J.*, 2007, **87**, 81–86.
- 23 B. Serra, A. J. Reviejo, C. Parrado and J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.*, 1999, **14**, 505–513.
- 24 B. Prieto-Simón, E. Fàbregas and A. Hart, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 2663–2668.
- 25 A. Avramescu, T. Noguer, M. Avramescu and J. L. Marty, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 203–213.
- 26 M. Gamella, S. Campuzano, F. Conzuelo, J. A. Curiel, R. Munoz, A. J. Reviejo and J. M. Pingarrón, *Talanta*, 2010, **81**, 925–933.
- 27 F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze and P. G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, **15**, 531–539.
- 28 R. Monosik, M. Stredansky, G. Greif and E. Sturdik, *Food Control*, 2012, **23**, 238–244.
- 29 E. Katz, V. Privman and J. Wang, *Towards Biosensing Strategies Based on Biochemical Logic Systems*, 2010.
- 30 S. Sánchez, M. Roldan, S. Pérez and E. Fàbregas, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6508–6514.
- 31 S. Sánchez, M. Pumera, E. Cabruja and E. Fàbregas, *Analyst*, 2007, **132**, 142–147.
- 32 S. Sánchez, M. Pumera and E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **23**, 332–340.
- 33 S. Sánchez Ordoñez and E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 965–972.
- 34 A. Gonzalez-Bellavista, S. Atrian, M. Munoz, M. Capdevila and E. Fàbregas, *Talanta*, 2009, **77**, 1528–1533.
- 35 X. Cetó, F. Céspedes, J. Capdevila and M. del Valle, *Talanta*, 2011, **85**, 1207–1212.
- 36 J. H. Choi, J. Jegal and W. N. Kim, *J. Membr. Sci.*, 2006, **284**, 406–415.
- 37 C. Torras, F. Ferrando, J. Paltakari and R. Garcia-Valls, *J. Membr. Sci.*, 2006, **282**, 149–161.
- 38 J. Macanás de Benito, Dissertation/thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, 2006.
- 39 M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, Kluwer Academic, Dordrecht, 1996.
- 40 G. Pozniak, B. Krajewska and W. Trochimczuk, *Biomaterials*, 1995, **16**, 129–134.
- 41 S. Iijima, *Nature*, 1991, **354**, 56–58.
- 42 F. Pariente, F. Tobalina, G. Moreno, L. Hernandez, E. Lorenzo and H. D. Abruna, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 4065–4075.
- 43 P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P. J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía and A. Costa-García, *Electrochim. Acta*, 2008, **53**, 3635–3642.
- 44 V. Sanz, J. Galban, S. de Marcos and J. R. Castillo, *Talanta*, 2003, **60**, 415–423.
- 45 X. H. Chen, Y. B. Hu and G. S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**, 1005–1013.
- 46 O. R. Rial, R. C. Yague, G. B. Cancho and G. J. Simal, *J. Chromatogr. A*, 2002, **942**, 41–52.
- 47 N. Amann, *Analytix*, 2007, 6–7.

Supplementary information

Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples

Sandra Pérez*, Esteve Fàbregas

Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN

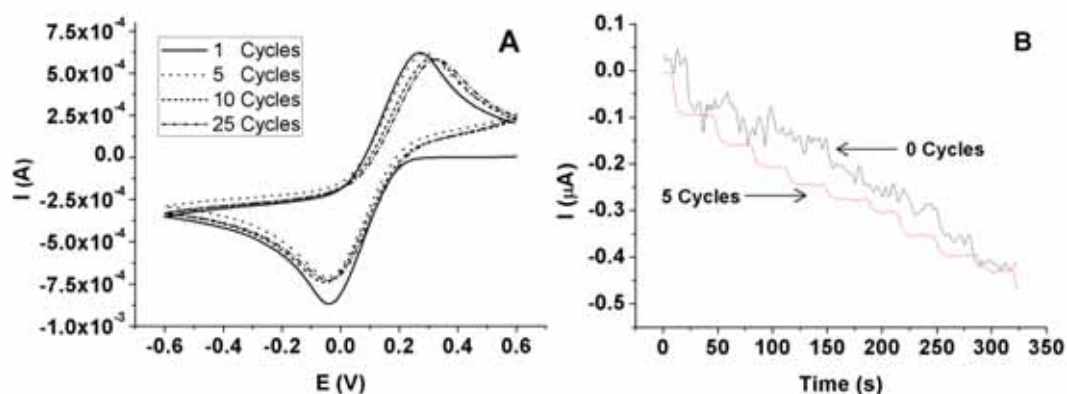


Figure S1. (A) Activation of Dropsens carbon electrodes. Different voltammetric cycles in 0.05 M $K_3[Fe(CN)_6]$ were performed without membrane to improve the stability of the signal when carrying the amperometric measurements. (B) Chronoamperometric measurements corresponding to additions of $[Fe(CN)_6]^{3-}$ with Dropsens electrode before (solid line) and after (dashed line) the stabilization.

* E-mail: Sandra.perez@uab.cat; tel: +34 93 5812118; fax: +34 93 5812379

7. Anexos

7. Anexos

V. Amperometric biosensor for the determination of Histamine in fish samples

S. Pérez and E. Fàbregas

Artículo 5

Amperometric biosensor for the determination of Histamine in fish samples

S. Pérez and E. Fàbregas

Amperometric biosensor for the determination of Histamine in fish samples

Sandra Pérez*, Jordi Bartrolí and Esteve Fàbregas

Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN

Abstract

A bienzymatic biosensor employing diamine oxidase (DOx) and horseradish peroxidase (HRP) for the detection of histamine in fish samples has been developed and optimized in this work. These enzymes have been co-immobilized into a polysulfone/carbon nanotubes/ferrocene membrane by means of phase inversion technique onto screen-printed electrodes. The electrochemical measurements have been carried out in phosphate buffer solution at pH 8.0 in batch mode and low applied potential (-50 mV vs. Ag/AgCl, KCl 0.1M) to minimize the interferences. Developed biosensor exhibits high sensitivity ($1.9 \cdot 10^7$ nA·M⁻¹), low limit of detection ($1.7 \cdot 10^{-7}$ M), high storage stability and excellent reproducibility, obtaining a linear interval range from $3 \cdot 10^{-7}$ to $2 \cdot 10^{-5}$ M.

Finally, applicability of the biosensor to the estimation of histamine content in different fish samples has been assessed; obtaining a good correlation between results obtained with the biosensor and those obtained with the reference method (ELISA) in case of sardines, mackerel and greater weever.

Keywords: amperometric biosensor; histamine; diamine oxidase; fish; polysulfone; carbon nanotubes

* E-mail: sedna.pr@gmail.com; tel: +34 93 5812118; fax: +34 93 5812379

1. Introduction

Some biogenic amines (BA) are considered indicators of an earlier microbial decomposition in fish or shellfish, although they are also present in a variety of food (Halasz, Barath, Simonsarkadi, & Holzapfel, 1994; Lange & Wittmann, 2002; Silla Santos, 1996; Stratton, Hutkins, & Taylor, 1991) and beverage (Di Fusco, Federico, Boffi, Macone, Favero, & Mazzei, 2011; Lopez, Tenorio, Gutierrez, Garde-Cerdan, Garijo, Gonzalez-Arenzana, et al., 2012) such as meat, eggs, chocolate, cheese or wine. BA are low-molecular-weight organic bases with different structures, formed primarily by the decarboxylation of their precursor amino acids. The most important BA related with spoilage in food are histamine (His), putrescine (Put) and cadaverine (Cad); being histamine one of the most biologically active compounds from those (Stratton, Hutkins, & Taylor, 1991). Therefore, it is crucial to determine its level since it causes scombroid syndrome without altering the fish normal appearance and odour (Wantke, Hemmer, Haglmuller, Gotz, & Jarisch, 1996). When consumed, this compound affects the normal functions of heart, smooth muscle, motor neurons and gastric acid secretion (Lehane & Olley, 2000; Shalaby, 1996; Stratton, Hutkins, & Taylor, 1991).

Histamine appears in fish such as mackerel, tuna, bonito, sardines and anchovies, resulting as an inappropriate refrigerated handling or preserving after being caught (Carelli, Centonze, Palermo, Quinto, & Rotunno, 2007). For this reason, it is important to develop rapid and low-cost methods for the determination of histamine as an alternative to the classical ones, which mainly involve the use of chromatographic techniques such as the reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Alberto, Arena, & de Nadra, 2002; Lange, Thomas, & Wittmann, 2002), cation-exchange chromatography (CEC) (Triki, Jimenez-Colmenero, Herrero, & Ruiz-Capillas, 2012), gas chromatography (GC) (Awan, Fleet, & Thomas, 2008; Fernandes & Ferreira, 2000) or thin layer chromatography (TLC) (Lapa-Guimaraes & Pickova, 2004). In addition, due to the low optical absorbance of aliphatic amines in the ultraviolet (UV) region, HPLC methods need the usage of a pre- or post-column derivation step to facilitate their detection; requiring long time analysis and increasing its cost. Alternatively, enzymatic determination of BA by means of amperometric (Boka, Adanyi, Virag, Sebela, & Kiss, 2012), spectrophotometric (Pessatti, Fontana, & Pessatti, 2004), fluorimetric (Cortacero-Ramirez, Arraez-Roman, Segura-Carretero, & Fernandez-Gutierrez, 2007) or chemiluminometric (Zhao, Yong, Shi, & Liu, 2009) detection methods have also been carried out to solve these drawbacks. In this context, biosensors offer low price, rapid and short time analysis methods (Asuncion Alonso-Lomillo, Dominguez-Renedo, Matos, & Julia Arcos-Martinez, 2010; Male, Bouvrette, Luong, & Gibbs, 1996). They are mainly based on the use of amine oxidases, which convert the analyte to the corresponding aldehyde, NH_3 and H_2O_2 (Equation 1).



The consumption of O_2 (Hernandez-Cazares, Aristoy, & Toldra, 2011) or the generation of H_2O_2 (Draisci, Volpe, Lucentini, Cecilia, Federico, & Pallechi, 1998; Tombelli & Mascini, 1998) are usually monitored to measure the advance of the reaction, and therefore to quantify BA. In the case of the detection of hydrogen peroxide, the application of high potential is required to carry out the measurements; which

may lead to have other compounds that can act as interferences. Hence, with the combination of peroxidases enzymes and amine oxidases or using redox mediators (Asuncion Alonso-Lomillo, Dominguez-Renedo, Matos, & Julia Arcos-Martinez, 2010), it is possible to detect H₂O₂ at lower applied potentials, a common strategy for the construction of amperometric biosensors.

The immobilization of enzymes is a crucial step in the development of biosensors. In the recent years, phase inversion technique has been used due to its easy and fast incorporation of biomolecules into membranes (Cetó, Céspedes, Capdevila, & del Valle, 2011; Pérez, Sánchez, & Fàbregas, 2012; Sánchez, Roldan, Pérez, & Fàbregas, 2008). Some polymers such as polysulfone allow the use of this approach, which consist in depositing a thin film of polymer solution (diluted in a solvent) onto the electrode surface and then immerse it into an aqueous solution (non-solvent) that contains the biomaterial. Then, there is an exchange of the solvent by the non-solvent, which causes the precipitation of the membrane, and consequently, biomolecules present in the non-solvent are trapped and incorporated into the polysulfone membrane taking advantage of this process. This material presents high chemical, biological and thermal stability and also high resistance at extreme pH values. Moreover, its porosity can be controlled by varying the bath conditions as the temperature, which allows modulating the active surface of the membrane, or even by changing its composition. Polysulfone is a non conducting polymer, thus, the introduction of a conducting material (Choi, Jegal, & Kim, 2006; Pérez, Sánchez, & Fàbregas, 2012) is a required step for the development of amperometric biosensors. In this way, MWCNT (1991) offer excellent electrochemical properties since they provide high current response, large surface-to-volume ratio, great chemical stability and minimization of the surface fouling onto electrochemical devices. All these properties make CNTs an excellent choice to be considered as a transducer.

Herein, we present a new approach to develop an amperometric screen-printed biosensor for the determination of Histamine based on the immobilization of Diamine oxidase and Horseradish peroxidase, by phase inversion technique, into a MWCNT/PS/ferrocene membrane. Experimental conditions have been optimized in order to find the optimal conditions that enhance its response characteristics. Finally, developed biosensor has been tested in the determination of Histamine level in different real fish samples to assess its applicability, comparing the obtained values with the ones using a reference method.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Diamine Oxidase (DAO) from plant (526 units·mL⁻¹) was supplied by MoLiRom (Roma, Italy). Peroxidase Type II from Horseradish (HRP) (188 units·mg⁻¹), Histamine dihydrochloride, sodium phosphate dibasic anhydrous, potassium chloride, L-tryptophan, L-lysine, L-tyrosine, L-histidine and Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNT; length 0.5-200 µm and outer diameter 30-50 nm) were purchased from Sigma-Aldrich© Chemie (Steinheim, Germany). Polysulfone (PS) was obtained from BASF (BASF Ultrasons S 3010 natur, Frankfurt, Germany). N,N-dimethylformamide (DMF) and nitric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain) and Ferrocene (Fc) from Alfa Aesar (Germany).

Veratox® kit ELISA for Histamine quantification was supplied by Nirco Diagnóstico & Investigación (Barcelona, Spain).

Deionised water obtained from PURELAB® with Ultra Laboratory Water Purification Systems was used to prepare all solutions. Measurements were carried out in a phosphate buffer solution (0.1 M $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, 0.1 M KCl). MWCNTs were previously purified by stirring them in 6 M nitric acid for 2 hours and dried at 80 °C (Pérez, Sánchez, & Fàbregas, 2012).

2.2. Apparatus

Voltammetric measurements were taken by a μStat 200 Bipotentiostat from Dropsens (Oviedo, Spain) and the DropView software package was used to control the instrument, register and perform the analysis of the results. Amperometric measurements were carried out either with the Dropsens Bipotentiostat or a LC-4C amperometric detector (BAS Bioanalytical System Inc., U.S.). Optical measurements were performed on a TECAN Sunrise microplate reader. Sonication was carried out by an “Ultrasons 3000683” and centrifugation by Angular 6 Centrifuge, both from J.P.Selecta (Barcelona, Spain).

Carbon screen-printed electrodes (SPE) consist in a carbon working electrode (4 mm diameter), a carbon counter electrode and a silver reference electrode; in the case of dual screen-printed carbon electrodes (DSPE), same configuration was used, but with two carbon working electrodes. All of them supplied by DropSens (Oviedo, Spain): references 110 and C1110, respectively.

2.3. Biosensor preparation

Prior to the membrane deposition onto the carbon working electrode, screen-printed electrodes (SPE) were electrochemically activated by means of cyclic voltammetry as described in previous works (Pérez, Sánchez, & Fàbregas, 2012). This step increases signal-to-noise ratio (S/N) and improves the stabilization of the current signal in further experiments. In this way, only 5 cycles in 0.05 M potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) solution prepared in phosphate buffer 0.1 M $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ and 0.1 M KCl at pH 7.5 were enough to carry out this activation step. For this, potential was sweep between -0.6 V and +0.6 V vs Ag/AgCl reference electrode with a scan rate of $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ and a step potential of 9 mV (Pérez, Sánchez, & Fàbregas, 2012).

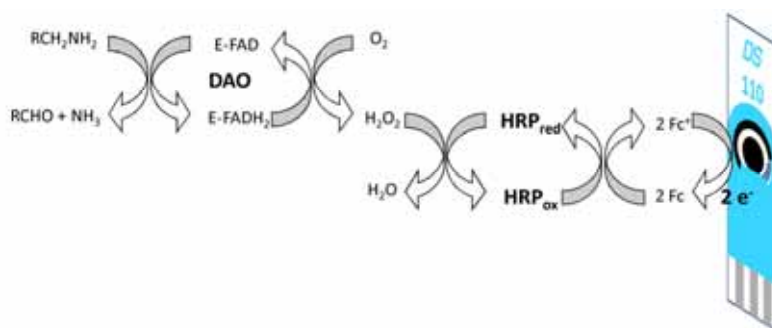
The immobilization of Diamine Oxidase (DAO) and Horseradish Peroxidase (HRP) into the polymeric membrane was achieved by means of the Phase Inversion technique (PI) (Pérez, Sánchez, & Fàbregas, 2012). First of all, 84 mg of PS were dissolved in 1 mL of DMF. Then, 100 μl of this solution were mixed with 5 mg of ferrocene and 1 mg of MWCNT. As is well known, MWCNT usually tend to aggregate into bundles because of the Van der Waals forces, thus to avoid that, the mixture was sonicated for 1 hour in order to get a stable (ca. 2 days) and homogeneous dispersion; obtaining the membrane paste.

For the membrane formation, 0.6 μl of PS/MWCNT/Fc/DMF paste were placed onto the SPE working electrode and immediately, 5 μl of the phase inversion solution containing both enzymes were added over the paste, causing the coagulation of the membrane and the entrapment of the biomolecules at the same time; in only five minutes. Lastly, a washing step of 5 extra minutes in a stirred buffer solution was necessary to ensure the elimination of any remaining DMF.

The same procedure was followed in the case of dual screen-printed electrodes (DSPE), where both working electrodes were modified with the PS/MWCNT/Fc membrane. In this case, PI process took place employing the enzymatic solution as the precipitating solution for one of the electrodes, whereas for the other one, only phosphate buffer was used. Taking into account that the area of the working electrodes is minor, only 0.3 μl of PS/MWCNT/Fc/DMF and 2.5 μl of phase inversion solution were employed for the membrane coagulation process. In all the cases, prepared biosensors were stored in phosphate buffer solution (pH 7.5) at 4 $^{\circ}\text{C}$ while not in use.

2.4. Amperometric measurements

As shown in scheme 1, DAO in presence of amines or diamines and O_2 catalyzes its decomposition to the corresponding aldehyde, ammonia (NH_3) and peroxide. Then, generated peroxide is reduced to H_2O through the action of HRP enzyme, and finally, the current signal detected at the electrode surface corresponds to the reduction of ferrocenium generated.



Scheme 1. Schematic diagram of the reactions involved in the bienzymatic system for the determination of histamine.

Amperometric measurements were carried out in batch mode by using the modified SPEs, in an open vessel at room temperature. The first step was to immerse the biosensor in an electrochemical cell containing 10.0 mL of phosphate buffer solution (0.1 M $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ and 0.1 M KCl at pH 7.5), under constant stirring and applying a potential of -50 mV vs. screen-printed Ag/AgCl reference electrode, except for its optimization study where it was varied. After 3 minutes, which were required to reach a stable current intensity baseline, additions of histamine were done. Biosensor response time was only 20 seconds, where taken readings correspond to the steady-state signal from the average of the last 5 seconds (10 measurements with an interval of 0.5 s). In this manner, all measurements were done in replicate and the results given are the averages of the measurements with their corresponding Relative Standard Deviations (RSD).

The same procedure was also followed in the case of DSPEs, where the obtained biosensor signal (working electrode containing both enzymes in its membrane) was corrected by the one from the second working electrode (blank membrane). In this way, it was possible to eliminate the biosensor response towards any electrochemical active compounds present in real samples (background signal) which could interfere in the histamine determination.

2.5. ELISA measurements

Real samples were also measured with a reference method to assess the reliability of the developed biosensor. As a reference method for the quantification of histamine in fish samples, Neogen's Veratox kit ELISA for Histamine was used. It is a competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay which allows quantifying histamine in the interval range from 2.5 to 40 ppm. The assay is based on the competition of enzyme-labeled histamine (conjugate) with free histamine in the samples, or the one of the controls when building the calibration plot, for the antibody binding sites. After a washing step, enzyme substrate was added, which reacts with the bounded conjugate producing a change of colour (from red to blue). Then, the test plate was read in a microwell reader at 620 nm to yield optical densities. Finally, obtained readings were interpolated into the calibration plot built with the controls through a log-logit transformation, extracting the concentration in each sample. The entire assay was carried out at room temperature.

2.6. Real samples preparation

Different fish samples such as anchovies, tuna, sardines, mackerels, shrimps and greater weever, which have been studied in order to test the developed biosensor, were acquired from a local fishmonger's shop. Prior to carry out the amperometric and ELISA measurements, samples needed to be pretreated in order to extract the biogenic amines. Therefore, they were firstly cleaned and eviscerated, cutting thick slices from back of the pectoral fin, halfway to vent and posterior to the vent. Then, they were blended to obtain a homogenous mixture. 10 g of this mixture plus 90 mL of water were added to an extraction bottle and shaken during 20 seconds to suspend the fish tissue and improve the extraction process. After approximately 5 minutes, this procedure was repeated 2 more times, and later the extract was centrifuged at 4 °C for five minutes. Subsequently, the supernatant was recovered and filtered through a Neogen filter syringe (cellulose), being fish samples now suitable for analysis.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the biosensor working conditions

In order to establish which was the optimal working potential to perform the histamine determination, a study of the signal obtained when varying the applied potential in the electrochemical system was carried out. As previously mentioned, the obtained signal is due to the H₂O₂ produced in the second catalytic reaction, which normally requires the application of high potentials. Herein, the developed approach is based on the bienzymatic system (DOx/HRP) together with the incorporation of ferrocene as a redox mediator, which allows reducing this potential to -50mV vs Ag/AgCl, as can be observed in Figure 1A. This value was selected as the optimal working potential because it showed the combination of the highest and the major stable current response to histamine (0.2 mM), comparing with the signal obtained in phosphate buffer solution at the same working potential.

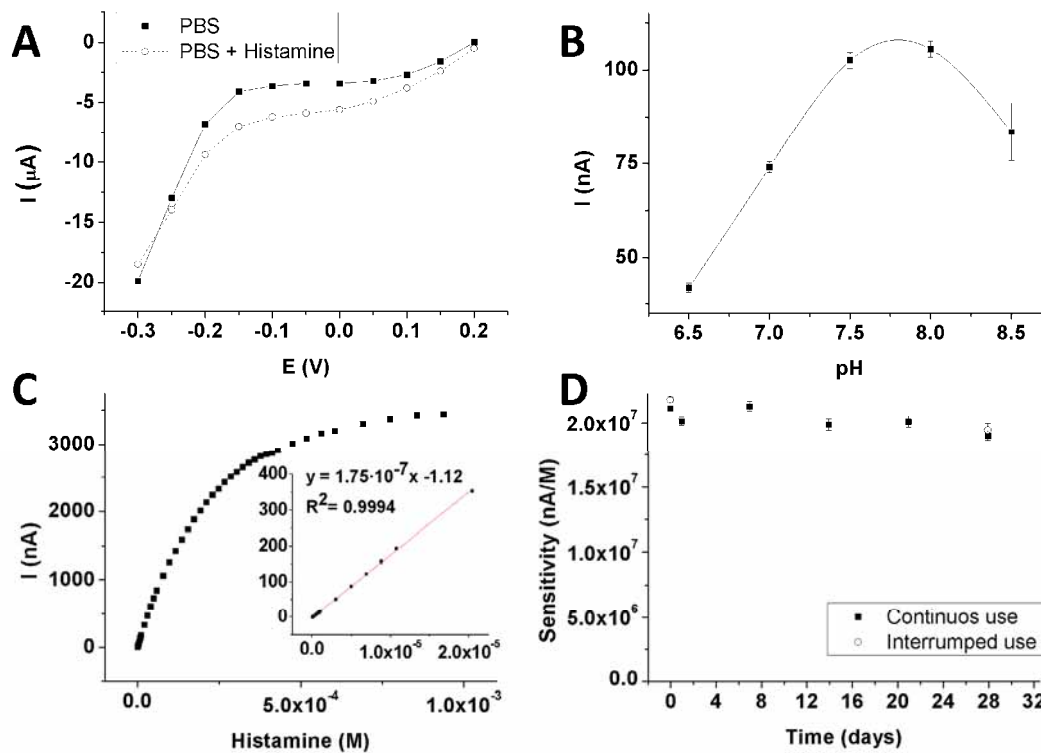


Figure 1. **A)** Study of the working potential. Batch measurements were carried out in (○) phosphate buffer solution at pH 7.5 ($0.1 \text{ M H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) and (■) a 0.2 mM histamine solution in the same buffer, varying the working potential applied. The phase inversion solution to prepare the biosensor contained $250 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ of DOx and $3760 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ of HRP. **B)** Study of the influence of the pH in the biosensor response towards a $5 \mu\text{M}$ histamine solution in phosphate buffer ($0.1 \text{ M H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$). Measurements were carried out at -50 mV in duplicate. The biosensor was prepared using a solution of $250 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ of DOx and $3760 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ of HRP as the phase inversion solution. **C)** Study of the linear interval range of the biosensor from histamine calibration curves. Measurements were carried out in duplicate in phosphate buffer solution at pH 8.0. **D)** Evaluation of the storage stability of two histamine biosensors during one month by comparison of its sensitivity. When not in use, biosensors were stored at 4°C in buffer phosphate solution at pH 8.0.

Given the importance of the pH in the activity of enzymes, a study of the pH of the phosphate buffer solution was also carried out. For this, its influence in the signal towards a $5 \mu\text{M}$ histamine solution at different pH values (from 6.5 to 8.5) was investigated. As shown in Figure 1B, it was found that there was a steeply increase in the biosensor response as the pH increased, until reaching its maximum at pH 8.0. Then, from 8.0 to 8.5 there was a decline in its response combined with a huge decrease in the reproducibility. Hence, taking into account this response profile, pH 8.0 was chosen as the optimal one to perform further experiments.

Finally, another crucial factor to study was the amount of enzymes (Scheme 1) required to carry out the phase inversion process. In order to determine their optimal concentrations, and considering that the recorded signal is a combination of both enzymes action, optimization of their amount was performed separately in two steps. For this, several biosensors were constructed varying the concentration of the enzymes in the phase inversion solution, evaluating then their response towards histamine.

First, the influence of HRP amount on the PI solutions was considered. Hence, using a constant concentration of DOx ($250 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), HRP amount on the PI solution was varied from 0 to $9400 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

After construction of the different biosensors, its characterization was carried out, and sensitivity and RSD values extracted from the calibration plot were used to choose the optimum value (Table 1). As can be observed, there is an increase of the sensitivity if comparing the response of biosensors when they contain or not HRP. Moreover, as can be seen in Table 1, results showed lower RSD values for the biosensors corresponding to a HRP concentration of 940 and 4700 U·mL⁻¹ in the PI solution. Hence, as a compromise between obtained RSD and in order to guarantee that enough amount in case the HRP could be lost from the PS membrane, 4700 U·mL⁻¹ was selected as the concentration in the phase inversion solution.

As before, a second test for the optimization of DOx was done; but in this case, keeping constant the HRP concentration previously chosen and varying DOx amount. As expected, calibrations showed that sensitivity increased as well as DOx did, rising values practically equal over 250 U·mL⁻¹. Consequently, this was chosen as the optimum concentration of DOx in the PI solution. Hence, to perform further experiments and prepare new biosensors, PI solution had 4700 U·mL⁻¹ of HRP and 250 U·mL⁻¹ of DOx.

Table 1. Optimization of HRP and LOx concentration in the phase inversion solution for the biosensors preparation.

HRP (U·mL ⁻¹) ^a	0	470	940	4700	9400
Sensitivity (nA/M)	1.65·10 ⁷	2.05·10 ⁷	1.78·10 ⁷	1.96·10 ⁷	1.80·10 ⁷
Standard deviation (nA·M⁻¹)	1.7·10 ⁶	2.4·10 ⁶	1.0·10 ⁵	1.7·10 ⁵	1.2·10 ⁶
RSD %	10.4	11.8	0.6	0.9	6.8
DOx (U·mL ⁻¹) ^b	5.26	27.8	105	250	375
Sensitivity (nA·M⁻¹)	1.88·10 ⁶	7.35·10 ⁶	1.31·10 ⁷	1.87·10 ⁷	1.94·10 ⁷
Standard deviation (nA·M⁻¹)	5.7·10 ⁴	3.2·10 ⁵	2.8·10 ⁵	1.0·10 ⁵	6.4·10 ⁵
RSD %	3.0	4.4	2.1	0.5	3.3

a: (DOx = 250 U/mL), b: (HRP = 4700 U·mL⁻¹)

3.2. Characteristics of the biosensor

Histamine biosensors were further characterized with regard to its linear interval range, storage and operational stability and its reproducibility. Figure 1C shows the study of the linear interval range carried out by means of duplicate measurements after additions of different amounts of histamine in the electrochemical cell, obtaining a calibration curve from 3·10⁻⁷ to 9·10⁻⁴ M. Results indicated that the interval range where the enzymatic system works linearly was almost two orders of magnitude, from 3·10⁻⁷ to 2·10⁻⁵ M, as can be seen in the amplification of the first points of the calibration plot.

Storage stability of the developed biosensor was established in two different ways: continuous and interrupted use. For this, two sensors were prepared in the same conditions and their sensitivity in histamine calibrations was evaluated during a month. While the response of the first biosensor was studied periodically by triplicate in different days during this time, the response towards histamine of the second, was only evaluated after its preparation and the last day of the study. Biosensors were stored at 4°C and immersed in phosphate buffer solution at pH 7.5 when not in use. Results represented in Figure 1D showed the evolution of this sensitivity, demonstrating excellent and similar storage stability in both cases, since the decrease was only 9.9 and 10.7%, respectively. Besides, the operational stability was also

examined after 35 consecutive calibrations in one day. In this case, it was observed that sensitivity difference between the first and the last calibration was reduced in 19%, an excellent value taking into account that usually SPEs are thought to be used in a disposable manner.

Lastly, in order to test the reliability of the developed biosensor, it was also important to evaluate its reproducibility. On the one hand, it was interesting to demonstrate the reproducibility of the biosensor construction, which was evaluated by comparison of the histamine calibrations between $2.5 \cdot 10^{-6}$ to $1.5 \cdot 10^{-5}$ M for 5 different sensors. On the other hand, repeatability of the biosensor response after 5 consecutive calibrations using the same one was studied, again under the same experimental conditions as the previous test. In both cases a high reproducibility was obtained, with values of 6.5 % and 5.6 %, respectively, calculating these values from the slopes of histamine calibration in the indicated concentration interval range. Moreover, the Limit of Detection (LOD) towards histamine was $1.7 \cdot 10^{-7}$ M, defined as the concentration corresponding to three times the blank standard deviation. Alternatively, it could be taken the Standard Error of Estimate (SEE) as an estimation of the blank standard deviation, that it is the standard deviation of the residuals from the regression calculation. Therefore, in our case, LOD was calculated from the regression of the five calibration curves.

3.3. Study of interferences

The study of the principal interfering compounds is a crucial step to evaluate the response of the biosensor prior to the analysis of real samples to ensure its applicability. For this reason, biosensor response towards some of the potentially interfering substances in fish was studied, namely, amino acids involved in the biosynthesis of amines such as histidine, tyrosine, tryptophan and lysine.

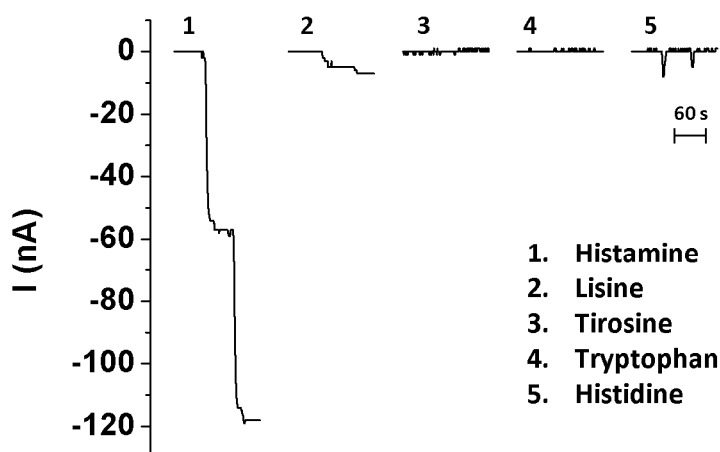


Figure 2. Study of interferences. Comparison between histamine and potentially interfering amino acids: lysine, tyrosine and tryptophan. Chronoamperometric measurements after two additions of standard solutions (every 60 s) for each compound were performed in phosphate buffer solution at pH 8.0. Final concentrations after each addition correspond to $2.5 \cdot 10^{-6}$ and $5 \cdot 10^{-6}$ M.

The effect of this type of substances was examined by comparison of the signal obtained for a $2.5 \cdot 10^{-6}$ and a $5 \cdot 10^{-6}$ M histamine standard solution vs. the signal obtained for solutions of the same concentration of those amino acids. As can be seen in Figure 2, results demonstrate that these amino acids have a slightly influence in the histamine determination since lysine was the only one that produces some noticeable amperometric response at these concentrations levels and under selected measurement conditions, representing only a 5.9 % of the histamine response when compared. However, it should be taken into account that the amount of these substances may vary in each type of fish and in addition, it also evolves in time (Silla Santos, 1996); hence, in some special cases, it could interfere in major or minor grade to the analysis.

3.4. Assay in fish samples

Different types of fish samples were analysed with the developed biosensor. The main purpose of this variety was to evaluate in which fish species the biosensor was able to quantify the amount of histamine with good reliability because of depending on the sample, the production of histamine and other BA, namely cadaverine, putrescine or other interfering compounds may vary. Hence, their concentration levels are different and can influence in histamine determination. In this sense, it should be said that diamine oxidase also catalyzes the reaction of these other BA, consequently, biosensor samples analysis give us the total biogenic amines content.

The quantification of histamine was carried out with the two modified biosensors, SPE and DSPE. Also, in both approaches, its quantification was performed first by means of direct interpolation in the histamine calibration plot and secondly, the standard addition method was used in order to counteract any possible matrix effect. Under the optimum established conditions, measurements were carried out in an electrochemical cell containing 10.0 mL of phosphate buffer at pH 8.0 and under an applied potential of -50 mV. Moreover, a dilution step, which may vary depending on the sample, between 1:25 and 1:400 was required to fit in the biosensor linear interval range. All amperometric measurements were done in triplicate; and in the case of the direct interpolation, a recalibration of the biosensor was done every 3 samples to guarantee a correct histamine determination.

As can be seen in Table 2, there are no high differences in general between both methods (direct interpolation and standard addition), concluding that the matrix effect was not so critical. Besides, no significant differences were found between the two types of biosensors employed (SPEs and DSPEs) in the histamine determination, inferring that no background signal correction was required given the low potential applied. However, in the case of tuna, histamine analysis was not possible by means of SPE biosensor since some oxidative currents that interfere with the determination were registered. Hence, by using DSPE biosensor and due to the fact that the responsible compounds are directly oxidized by the transducer, without being the enzymes involved at all in that process, DSPEs offered the advantage of correcting this background signal, allowing to carry out the correct quantification of histamine.

Table 2. Concentrations of histamine in different fish samples determined by means of SPEs, DSPEs and ELISA kit. Results obtained by amperometric measurements are expressed with their interval of confidence (n=3, confidence level of 95%).

Sample	$(\mu\text{g Histamine} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sample})$				ELISA
	Differential measurements		No differential measurements		
	Interpolation	Standard addition	Interpolation	Standard addition	
Sardine (fresh)	94 ± 15	98 ± 11	100 ± 16	87 ± 3	83
Sardine (24 hours)	97 ± 20	97 ± 15	94 ± 7	93 ± 5	87
Sardine (30 hours)	108 ± 31	110 ± 23	109 ± 8	107 ± 6	102
Sardine (96 hours)	151 ± 16	134 ± 25	184 ± 8	176 ± 16	134
Sardine (168 hours)	190 ± 38	190 ± 28	208 ± 19	186 ± 16	152
Mackerel (fresh)	44 ± 3	41 ± 3	41 ± 3	34 ± 7	38
Greater weever (fresh)	23 ± 2	23 ± 1	27 ± 4	23 ± 2	23
Anchovy (fresh)	26 ± 3	25 ± 2	26 ± 1	23.1 ± 0.9	20
Anchovy (24 hours)	43 ± 2	42.5 ± 0.5	42 ± 1	41 ± 3	28
Defrosted shrimp	89 ± 8	87 ± 3	86 ± 9	96 ± 19	201
Tuna (fresh)	26 ± 8	24 ± 8	-	-	125

Moreover, the evolution of histamine in fish samples, when those were stored at 4°C, was also studied during one week. The evolution of the process of degradation in terms of total biogenic amines was evaluated for sardine, anchovies and mackerel samples. Obtained results are shown in Figure 3, and as can be seen, in the three types of samples there was a clear tendency in the increase in BA content, demonstrating in this way an increment of toxicity as the time of storage increases. As said, histamine and other BA concentration in fish increase after being caught due to an inappropriate refrigerated handling or simply because fish goes bad. Hence, its concentration levels could be used as an indicator of fish quality or freshness, and its control is very important to avoid scombroid syndrome, which results from eating spoiled fish.

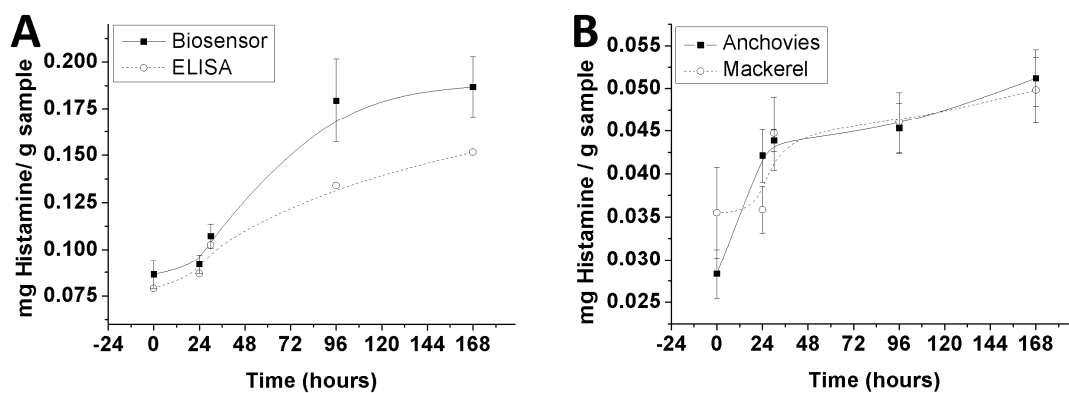


Figure 3. Evolution of total biogenic amines content in (A) sardines and (B) anchovies and mackerel samples. Samples were stored at 4 °C and determinations were carried out by direct interpolation of the measurements in a histamine calibration plot employing developed SPE biosensor. In case of sardines, values of histamine concentration were compared with those obtained with the ELISA kit.

Finally, results obtained by the amperometric method were compared with those obtained by the ELISA kit, which was used as a reference method and that quantifies only free histamine as explained in section 2.5. On the one hand, developed biosensor shows a good agreement with the reference method in the case of sardines, mackerel and greater weever. However, the results of the evolution of histamine levels in sardines sample when stored at 4°C, which was studied during several days with the biosensor and with the ELISA kit, started to differ after 96 hours between both methodologies, as can be observed in Figure 3A. This could be explained by the fact that histamine is the first biogenic amine that appears during the degradation process; hence, it could be assumed that this discrepancy corresponds to the production of other BA that might be also detected by the biosensor. On the other hand, anchovies, shrimp and tuna samples do not present such a good correlation with the results obtained by the immunoassay. This fact can also be attributed to the production of different biogenic amines. Therefore, it can be concluded that the developed biosensor can be employed to quantify histamine in sardines, greater weever and mackerel with a high reliability.

4. Conclusions

The present work reports the development, optimization and application in fish samples of a histamine bienzymatic biosensor based on PS/MWCNT/Fc membrane, where DOx and HRP enzymes have been immobilized by means of phase inversion technique. This easy and fast methodology allows the development of a compact biosensor that contains all the elements required to carry out the amperometric measurement, namely enzymes, transducer and the redox mediator.

The developed biosensor exhibits advantages over other methods such as short time analysis, low detection limit, high sensitivity, storage stability, as well as good reproducibility and repeatability with acceptable RSD values. In addition, the biosensor offers a lower cost per analysis in comparison to ELISA kit or chromatographic methods, usually employed as reference methods.

Finally, obtained results suggest that this approach is a reliable alternative method for the quantification of histamine in samples such as sardines, mackerel and great weever.

Acknowledgements

We would like to thank the *Spanish Ministry of Science and Innovation* for its financial support through the project *CTQ2009-13873*. Sandra Pérez would like to acknowledge to *Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)* for the P.I.F. fellowship.

References

- Alberto, M. R., Arena, M. E., & de Nadra, M. C. M. (2002). A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. *Food Control*, *13*(2), 125-129.
- Asuncion Alonso-Lomillo, M., Dominguez-Renedo, O., Matos, P., & Julia Arcos-Martinez, M. (2010). Disposable biosensors for determination of biogenic amines. *Analytica Chimica Acta*, *665*(1), 26-31.
- Awan, M. A., Fleet, I., & Thomas, C. L. P. (2008). Determination of biogenic diamines with a vaporisation derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, *111*(2), 462-468.
- Boka, B., Adanyi, N., Virag, D., Sebela, M., & Kiss, A. (2012). Spoilage Detection with Biogenic Amine Biosensors, Comparison of Different Enzyme Electrodes. *Electroanalysis*, *24*(1), 181-186.
- Carelli, D., Centonze, D., Palermo, C., Quinto, M., & Rotunno, T. (2007). An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products. *Biosensors & Bioelectronics*, *23*(5), 640-647.
- Cetó, X., Céspedes, F., Capdevila, J., & del Valle, M. (2011). A new amperometric bienzymatic biosensor based on biocomposites for the determination of gluconic acid in wines. *Talanta*, *85*(2), 1207-1212.
- Choi, J. H., Jegal, J., & Kim, W. N. (2006). Fabrication and characterization of multi-walled carbon nanotubes/polymer blend membranes. *Journal of Membrane Science*, *284*(1-2), 406-415.
- Cortacero-Ramirez, S., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2007). Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*, *100*(1), 383-389.
- Di Fusco, M., Federico, R., Boffi, A., Macone, A., Favero, G., & Mazzei, F. (2011). Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *401*(2), 707-716.
- Draisci, R., Volpe, G., Lucentini, L., Cecilia, A., Federico, R., & Palleschi, G. (1998). Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food Chemistry*, *62*(2), 225-232.
- Fernandes, J. O., & Ferreira, M. A. (2000). Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines,

- polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*, 886(1-2), 183-195.
- Halasz, A., Barath, A., Simonsarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). BIOGENIC-AMINES AND THEIR PRODUCTION BY MICROORGANISMS IN FOOD. *Trends in Food Science & Technology*, 5(2), 42-49.
- Hernandez-Cazares, A. S., Aristoy, M. C., & Toldra, F. (2011). An enzyme sensor for the determination of total amines in dry-fermented sausages. *Journal of Food Engineering*, 106(2), 166-169.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354(6348), 56-58.
- Lange, J., Thomas, K., & Wittmann, C. (2002). Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 779(2), 229-239.
- Lange, J., & Wittmann, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(2), 276-283.
- Lapa-Guimaraes, J., & Pickova, J. (2004). New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2), 223-232.
- Lehane, L., & Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58(1-2), 1-37.
- Lopez, R., Tenorio, C., Gutierrez, A. R., Garde-Cerdan, T., Garijo, P., Gonzalez-Arenzana, L., Lopez-Alfaro, I., & Santamaria, P. (2012). Elaboration of Tempranillo wines at two different pHs. Influence on biogenic amine contents. *Food Control*, 25(2), 583-590.
- Male, K. B., Bouvrette, P., Luong, J. H. T., & Gibbs, B. F. (1996). Amperometric biosensor for total histamine, putrescine and cadaverine using diamine oxidase. *Journal of Food Science*, 67(5), 1012-1016.
- Pérez, S., Sánchez, S., & Fàbregas, E. (2012). Enzymatic Strategies to Construct L-Lactate Biosensors Based on Polysulfone/Carbon Nanotubes Membranes. *Electroanalysis*, 24(4), 967-974.
- Pessatti, T. L. P., Fontana, J. D., & Pessatti, M. L. (2004). Spectrophotometric determination of histamine in fisheries using an enzyme immunoassay method. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 268, 311-316.
- Sánchez, S., Roldan, M., Pérez, S., & Fàbregas, E. (2008). Toward a fast, easy, and versatile immobilization of biomolecules into carbon nanotube/polysulfone-based biosensors for the detection of hCG hormone. *Analytical Chemistry*, 80(17), 6508-6514.

- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690.
- Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 213-231.
- Stratton, J. E., Hutkins, R. W., & Taylor, S. L. (1991). BIOGENIC-AMINES IN CHEESE AND OTHER FERMENTED FOODS - A REVIEW. *Journal of Food Protection*, 54(6), 460-470.
- Tombelli, S., & Mascini, M. (1998). Electrochemical biosensors for biogenic amines: a comparison between different approaches. *Analytica Chimica Acta*, 358(3), 277-284.
- Triki, M., Jimenez-Colmenero, F., Herrero, A. M., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Optimisation of a chromatographic procedure for determining biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system. *Food Chemistry*, 130(4), 1066-1073.
- Wantke, F., Hemmer, W., Haglmüller, T., Gotz, M., & Jarisch, R. (1996). Histamine in wine - Bronchoconstriction after a double-blind placebo-controlled red wine provocation test. *International Archives of Allergy and Immunology*, 110(4), 397-400.
- Zhao, S., Yong, H., Shi, M., & Liu, Y.-M. (2009). Quantification of biogenic amines by microchip electrophoresis with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216(26), 5155-5159.