

Estudio de biosensores electroquímicos basados en inmovilización enzimática

Margalida Esmeralda Artigues Cladera

<http://hdl.handle.net/10803/667847>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL

Título “Estudio de biosensores electroquímicos basados en inmovilización enzimática”

Realizada por Margalida Esmeralda Artigues Cladera

en el Centro IQS School of Engineering

y en el Departamento de Química Analítica y Aplicada

Dirigida por el Dr. Sergi Colominas Fuster y el Dr. Jordi Abellà Iglesias

A mi familia,

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a IQS el soporte para poder realizar esta Tesis mediante la concesión de un contrato predoctoral durante un periodo de tres años.

En segundo lugar, quiero agradecer al Dr. Jordi Abellà el haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo esta Tesis en la sección de Métodos Electrométricos. Gracias por enseñarme, dirigirme y, sobre todo, por la confianza depositada en mi desde el primer día.

También, quisiera agradecer al Dr. Sergi Colominas el apoyo, la confianza y el entusiasmo que me ha mostrado en todo momento. Muchas gracias por hacerme mejor científica y por ayudarme a crecer profesionalmente.

A los dos quiero dar las gracias por todos los consejos y por dejarme formar parte de esta pequeña familia, me he sentido siempre como en casa.

Por otro lado, quiero agradecer al Dr. Salvador Borrós por acogerme durante la realización de mis experiencias en el Grup d'Enginyeria de Materials y ayudarme a ampliar mis horizontes dentro de la química y de la tecnología de materiales. Gracias por las horas de dedicación, por la confianza y por las palabras sabias que siempre me ha dedicado.

También quiero dar las gracias al Dr. Francesc Broto y a la Dra. Cristina Ribas por ayudarme con las determinaciones cromatográficas. A César Alquezar por la paciencia y por todas las piezas mecanizadas. A Joan Gilabert y a Robert Texidó por ayudarme con las técnicas de plasma y compartir conmigo tantos momentos. A Sejin Oh por instruirme en la técnica de QCM-D.

Por otro lado, gracias a mi familia que me ha apoyado en todo momento y ha estado cerca a pesar de la distancia. A mi madre, gracias por los consejos y la paciencia. A mi padre, gracias por escucharme y entenderme. A mi hermana, gracias por hacerme reír y ser mi mejor amiga siempre. A mi hermano, gracias por protegerme y estar a mi lado.

Por último, quiero agradecer a todos los amigos que han compartido conmigo este viaje, tanto en los momentos buenos como en los menos buenos, haciéndolo más divertido y especial. Gracias a todos, especialmente a vosotros Edu, Marc, Xavi, Enric, Silvia, Itsaso, Rebu, Martí, Laura y Marina.

Resumen

Los biosensores electroquímicos son dispositivos de análisis que combinan la especificidad de las reacciones bioquímicas con la capacidad analítica de las técnicas electroquímicas. Gracias a esta combinación, es posible determinar de forma rápida, sensible y fiable distintos analitos en muestras con matrices complejas. Por ello, el uso de biosensores es una alternativa a los métodos clásicos de análisis para realizar procesos de control de calidad en distintos sectores industriales.

En la presente Tesis, se han desarrollado biosensores amperométricos enzimáticos basados en la inmovilización de oxidasas sobre una interfase electroquímica de nanotubos de óxido de titanio (IV) altamente ordenados (TiO₂NTAs). Para ello, se han estudiado diferentes procesos de inmovilización de enzimas basados en captura polimérica y en inmovilización covalente, y se han evaluado los parámetros analíticos de los biosensores desarrollados.

En los procesos de captura polimérica, se ha estudiado el uso de *kappa*-carragenina, 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y quitosano. Estos hidrogeles se han utilizado para la inmovilización del enzima glucosa oxidasa (GOx) y se ha observado que tanto HEMA como quitosano generan un microentorno favorable para la conservación de la actividad del enzima.

Para la inmovilización covalente, se ha utilizado pentafluorofenilmetacrilato (PFM) con el objetivo de generar enlaces entre las moléculas de enzima y la superficie del transductor. Para ello, se ha modificado la superficie de la interfase electroquímica TiO₂NTAs mediante dos técnicas de plasma: polimerización de PFM y sembrado del mismo polímero. Se ha observado que la superficie polimerizada de PFM (ppPFM) presenta mayor hidrofobicidad que la superficie en la que se ha realizado el sembrado de PFM (pgPFM) y que ello tiene influencia en la conformación que adoptan las moléculas de enzima. Mientras que en la superficie ppPFM predominan conformaciones con baja actividad, en la superficie pgPFM la mayor parte de la población de las moléculas de GOx adoptan conformaciones con actividad catalítica. Por estos motivos, los biosensores con sembrado por plasma de PFM presentan mayor sensibilidad frente a la presencia de glucosa que los biosensores basados en la polimerización de PFM.

Finalmente, se han desarrollado biosensores amperométricos de glucosa y de glutamato con matrices de inmovilización poliméricas y covalentes: Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano, Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano. Se han realizado determinaciones sobre muestras alimentarias empleando estos biosensores y los resultados se han comparado con los obtenidos con técnicas de referencia.

Resum

Els biosensors electroquímics són dispositius d'anàlisi que combinen l'especificitat de les reaccions bioquímiques amb la capacitat analítica de les tècniques electroquímiques. Gràcies a aquesta combinació, és possible determinar de forma ràpida, sensible i fiable diferents analits en mostres amb matrius complexes. Per tot això, l'ús de biosensors és una alternativa als mètodes clàssics d'anàlisi per a realitzar processos de control de qualitat en diferents sectors industrials.

En la present Tesi, s'han desenvolupat biosensors amperomètrics enzimàtics basats en la immobilització d'oxidases sobre una interfase electroquímica de nanotubs d'òxid de titani (IV) altament ordenats (TiO₂NTAs). Per a això, s'han estudiat diferents processos d'immobilització d'enzims basats en captura polimèrica i en immobilització covalent, i s'han avaluat els paràmetres analítics dels biosensors desenvolupats.

En als processos de captura polimèrica, s'ha estudiat l'ús de kappa-carragenina, 2-hidroxietilmetacrilat (HEMA) i quitosà. Aquests hidrogels s'han utilitzat per a la immobilització de l'enzim glucosa oxidasa (GOx) i s'ha observat que tant el HEMA com el quitosà generen un microentorn favorable per a la conservació de l'activitat biològica de l'enzim.

Per a la immobilització covalent, s'ha utilitzat pentafluorofenilmetacrilat (PFM) generació amb l'objectiu de generar enllaços entre les molècules d'enzim i la superfície del transductor. Per a això, s'ha modificat la superfície de la interfase electroquímica TiO₂NTAs mitjançant dues tècniques de plasma: polimerització de PFM i sembrat del mateix polímer. S'ha observat que la superfície polimeritzada de PFM (ppPFM) presenta major hidrofobicitat que la superfície en la qual s'ha realitzat el sembrat de PFM (pgPFM) i que això té influència en la conformació que adopten les molècules d'enzim. Mentre que en la superfície ppPFM predominen conformacions amb baixa activitat, en la superfície pgPFM la major part de la població de les molècules de GOx adopten conformacions amb activitat catalítica. Per aquests motius, els biosensors amb sembrat per plasma de PFM presenten major sensibilitat enfront de la presència de glucosa que els biosensors basats en la polimerització de PFM.

Finalment, s'han desenvolupat biosensors amperomètrics de glucosa i de glutamat amb matrius d'immobilització polimèriques i covalents: Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosa, Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosa i Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosa. S'han realitzat determinacions sobre mostres alimentàries emprant aquests biosensors i els resultats s'han comparat amb els obtinguts amb tècniques de referència.

Abstract

Electrochemical biosensors are analytical devices that combine the specificity of biochemical recognition processes with the analytical power of electrochemical techniques. Consequently, it is possible to perform rapid, sensitive and reliable determinations of different analytes present in complex samples. For this reason, the use of biosensors is an alternative to classical analytical methods to perform quality control processes in different industrial sectors.

In this work, we have developed enzymatic amperometric biosensors based on the immobilization of oxidases on an electrochemical interface of highly ordered titanium dioxide nanotubes array (TiO₂NTAs). Thus, processes of enzyme immobilization based on polymeric entrapment and covalent immobilization have been studied. The analytical parameters of these biosensors have been evaluated.

For polymeric entrapment processes, *kappa*-carrageenan, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and chitosan have been studied as immobilization matrices. These hydrogels have been used for the immobilization of the enzyme glucose oxidase (GOx) and it has been observed that both, HEMA and chitosan, generate a favorable microenvironment for the conservation of the activity of the enzyme.

For covalent immobilization, pentafluorophenylmethacrylate (PFM) has been used in order to generate bonds between the enzyme molecules and the surface of the transducer. Thus, the electrochemical interface TiO₂NTAs has been modified by two plasma techniques: polymerization of PFM and grafting of the same polymer. It has been observed that the polymerized surface of PFM (ppPFM) has a higher hydrophobicity than the surface in which the PFM has been grafted (pgPFM). Hydrophobicity has influence on the adopted enzyme molecules conformation. On the ppPFM surface, conformations with low activity predominate, and on the pgPFM surface most of the population of GOx molecules adopt conformations with catalytic activity. For these reasons, the biosensors with plasma grafted PFM show higher sensitivity in presence of glucose than the biosensors based on the PFM polymerization.

Finally, amperometric glucose and glutamate biosensors with polymeric and covalent immobilization matrices have been developed: Ti/TiO₂NTAs/GOx/Chitosan, Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Chitosan and Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Chitosan. These biosensors have been used to determine the glucose and glutamate content in different food samples. The results have been compared with those obtained with reference techniques.

Índice de contenidos

AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
RESUM.....	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ACRÓNIMOS	VII
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. BIOSENSORES EN EL ENTORNO ANALÍTICO	3
1.2. ARQUITECTURA DE UN BIOSENSOR	11
1.2.1. Elementos bioreceptores.....	12
1.2.1.1. Anticuerpos	14
1.2.1.2. Ácidos Nucleicos	17
1.2.1.3. Enzimas	19
1.2.2. Métodos de inmovilización de los bioreceptores	23
1.2.2.1. Membranas poliméricas	25
1.2.2.2. Inmovilización no-covalente sobre superficies sólidas.....	27
1.2.2.3. Hidrogeles	28
1.2.2.4. Configuración covalente	33
1.2.3. Transductores.....	36
1.2.3.1. Optométricos.....	36
1.2.3.2. Térmicos.....	38
1.2.3.3. Mecánicos	39
1.2.3.4. Electroquímicos	40
1.3. CARACTERIZACIÓN DE BIOSENSORES.....	51
1.4. BIOSENSORES COMERCIALES EN EL SECTOR AGROALIMENTARIO	55
1.5. NUEVAS OPORTUNIDADES EN EL DESARROLLO DE BIOSENSORES	61
2. OBJETIVOS	67
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
3.1. INTERFASE ELECTROQUÍMICA	70
3.1.1. Síntesis electroquímica de TiO ₂ NTAs.....	70
3.1.2. Modificación del tiempo de anodizado	76
3.2. ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN	79
3.2.1. Inmovilización en matrices poliméricas.....	80
3.2.1.1. Matrices de inmovilización en base carragenina	82
3.2.1.2. Matrices de inmovilización en base 2-hidroxietilmetacrilato.....	85
3.2.1.3. Matrices de inmovilización en base quitosano	95
3.2.1.4. Discusión de los resultados de la inmovilización por hidrogeles	104
3.2.2. Inmovilización covalente	106
3.2.2.1. Procesos de modificación de superficie.....	108
3.2.2.2. Estudio conformacional de las moléculas de GOx.....	116
3.2.2.3. Desarrollo de biosensores de glucosa	127
3.2.2.4. Discusión de los resultados obtenidos en la inmovilización covalente.....	137
3.2.3. Comparación de los métodos de inmovilización estudiados.....	140
3.2.4. Desarrollo de biosensores de glutamato.....	145
3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA	152
3.3.1. Proceso de análisis utilizando el biosensor Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano.....	152
3.3.2. Proceso de análisis utilizando el biosensor Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano.....	164
3.3.2. Proceso de análisis utilizando el biosensor Ti/TiO ₂ NTAs/GmOx/Quitosano	170
3.4. CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS REALES CON EL BIOSENSOR DE GLUCOSA	184
4. CONCLUSIONES.....	189
5. BIBLIOGRAFÍA	192

Acrónimos

Ab: Anticuerpo

AChE: Acetilcolinesterasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ag: Antígeno

AOAC: Association of Analytical Communities

AOx: Alcohol oxidasa

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Trifosfato de adenosina

BDE-47: 2,2',4,4'-tetrabromodifeniléter

BSA: Albúmina de suero bovino

CaE: Carboxilesterasa

CE: Contraelectrodo

CNT: Nanotubos de carbono

CV: Coeficiente de variación

CVD: Deposición química de vapor

iCVD: Deposición química iniciada de vapor

PECVD: Deposición química de vapor asistida por plasma

piCVD: Deposición química fotoiniciada de vapor

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EGDA: Etilenglicoldiacrilato

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent assay

FAD: Dinucleótido de flavina y adenina

FDA: Food and Drug Administration

FE-SEM: Microscopio electrónico de barrido con emisión de campo

GA: Glutaraldehído

GCE: Electrodo de carbón vítreo

GDH: Glucosa deshidrogenasa

GmOx: Glutamato oxidasa

GOx: Glucosa oxidasa

HEMA: Hidroxietilmetacrilato

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HRP: Horseradish peroxidase

ICH: Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos para Uso Humano

IgG: Inmunoglobulina G

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

K_M: Constante de Michaelis-Menten

LC: Límite de cuantificación

LD: Límite de detección

MAA: Ácido mercaptoacético

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

MG: Intermedio de glóbulo fundido

N: Conformación enzimática nativa

NHS: N-hidroxisulfosuccinimida

OPH: Hidrolasa organofosforada

OVA: Ovoalbúmina

PB: Azul de Prusia

PBS: Disolución tampón fosfato

PFM: Pentafluorofenilmetacrilato	s: Desviación estándar
pgPFM: PFM sembrado por plasma	SDS: Dodecilsulfato sódico
ppPFM: PFM polimerizado por plasma	SEM: Microscopio electrónico de barrido
PI: Patrón interno	SPE: Extracción en fase sólida
PMG: Intermedio de glóbulo pre-fundido	SPR: Resonancia del plasmón superficial
PPy: Polipirrol	TBPO: Peróxido de terc-butilo
PQQ: Pirroloquinolina quinona	TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina
PS: Poliestireno	TPA: Tiol-polietilenglicol-amina
PVC: Policloruro de vinilo	U: Conformación enzimática desplegada
QCM-D: Microbalanza de cristal de cuarzo con disipación de energía	WE: Electrodo de trabajo
RE: Electrodo de referencia	XO: Xantina oxidasa
RDE: Electrodo de disco rotatorio	YSI: Yellow Springs Instruments Company

1. Introducción

1. Introducción

Un sensor es un dispositivo que responde a un estímulo externo y lo convierte en una señal útil, que se puede medir utilizando un transductor adecuado [1]. Bajo esta definición, se agrupan un gran número de dispositivos que se utilizan a diario, tanto de forma cotidiana como en la industria. Los automóviles son un claro ejemplo de ello; en un coche es posible encontrar más de 60 sensores diferentes que permiten controlar distintos parámetros relacionados tanto con cuestiones técnicas como con el confort del usuario [2,3]. Existen muchos tipos de sensores que se pueden clasificar en función del estímulo externo al que respondan. De este modo, es posible encontrar sensores térmicos cuando responden a cambios en la temperatura, sensores mecánicos cuando responden a cambios de presión, sensores ópticos cuando responde a cambios en la intensidad lumínica, etc.

Entre todos los sensores existentes cabe destacar los sensores químicos, que son aquellos que responden a un estímulo químico convirtiéndolo en una señal medible. Estos sensores se utilizan para determinar y cuantificar distintos compuestos en una matriz específica y están formados principalmente por dos elementos, el receptor y el transductor (ver Figura 1.1). El elemento receptor interactúa con el analito y transforma la información química en algún tipo de variable medible. Después, el elemento transductor convierte esa variable medible en una señal analítica de utilidad.

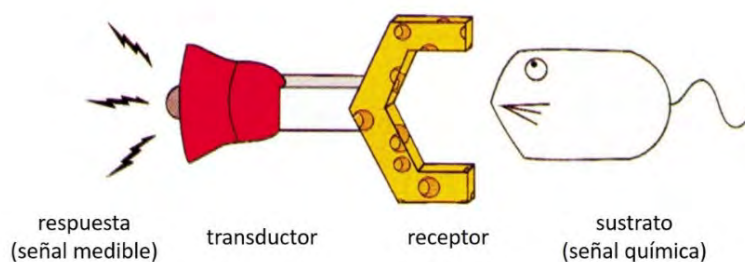


Figura 1.1. Alegoría de un sensor químico [4].

Existe un gran número de sensores químicos, que normalmente se clasifican en función del principio operativo del elemento transductor. Siguiendo esta clasificación, se encuentran los sensores electroquímicos, que son aquellos dispositivos en los que la información química se traduce en una señal eléctrica [5]. Hay una gran variedad de sensores electroquímicos y normalmente se clasifican en función de la propiedad electroquímica que pueden medir; los sensores conductimétricos miden cambios de conductividad, los sensores potenciométricos miden una diferencia de potencial y los sensores amperométricos miden una intensidad de corriente. De entre todos los sensores electroquímicos, en las últimas décadas los biosensores han ido tomando un mayor protagonismo.

Los biosensores son la extrapolación al entorno analítico de las reacciones específicas que tienen lugar dentro del organismo y de los mecanismos de reconocimiento biológicos. Se basan en el reconocimiento del analito por un agente biológico y en el registro de la señal derivada de la reacción entre ambos. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), los

biosensores se definen como dispositivos que utilizan reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células enteras, aislados, para determinar compuestos químicos, normalmente con una señal eléctrica, térmica u óptica [6].

En las últimas décadas, la investigación relacionada con los biosensores ha experimentado un crecimiento exponencial [7]. Los biosensores permiten realizar medidas directas sobre matrices complejas, de forma rápida y sencilla. Por estos motivos, es posible encontrar biosensores en sectores tan variados como el agroalimentario, el clínico, el medioambiental o el industrial. La amplia implantación de los biosensores en ámbitos tan distintos se debe a las ventajas que presentan frente al resto de dispositivos de análisis. Cabe destacar que la preparativa de muestra que requieren los biosensores es menor, en ocasiones incluso nula, en comparación con la preparativa requerida por otras técnicas de análisis. Por tanto, el proceso de determinación es más sencillo, consume menor tiempo y resulta más económico. Además, a diferencia de las determinaciones clásicas, los biosensores ofrecen respuestas rápidas que permiten monitorizar las concentraciones de analito a tiempo real.

Los biosensores se están empezando a posicionar dentro del campo del análisis químico. El dispositivo comercial más común es el utilizado para la determinación de glucosa en sangre [8], que ha supuesto un gran avance en el control de enfermedades como la diabetes, permitiendo una determinación rápida, sencilla y efectiva a tiempo real. El concepto de este dispositivo fue introducido por primera vez en el año 1962, por Leland C. Clark y Champ Lyons, quienes inmovilizaron por primera vez el enzima glucosa oxidasa (GOx) sobre un electrodo, con la finalidad de monitorizar electroquímicamente la glucosa presente en muestras de sangre [9]. Desde entonces, la investigación en el campo de los biosensores ha experimentado un gran crecimiento, no sólo en el ámbito clínico, sino en todos los sectores industriales. La relevancia de estos dispositivos en el entorno analítico queda patente en el elevado número de investigaciones centradas en el desarrollo de nuevos biosensores. En los apartados siguientes, se sitúan los biosensores en el entorno analítico actual y se detalla el funcionamiento de estos, así como algunas de sus aplicaciones más destacadas.

1.1. Biosensores en el entorno analítico

En el sector industrial, es imprescindible realizar un gran número de determinaciones analíticas a diario para poder garantizar el cumplimiento de los estándares de calidad. Por este motivo, se buscan procedimientos que permitan realizar la determinación analítica de forma rápida y sencilla, consumiendo el mínimo de recursos posibles. En este sentido, los biosensores están tomado un gran protagonismo como herramientas complementarias a los métodos clásicos de análisis. El elevado interés que despiertan los biosensores en el entorno analítico se debe, principalmente, a la posibilidad de realizar medidas directas sobre matrices complejas, de forma rápida, sencilla, específica y sin un elevado coste económico.

En los últimos años, las exigencias del control de calidad en todos los sectores industriales han ido en aumento, ya que se deben analizar materias primas, productos intermedios y productos finales como una herramienta para garantizar la calidad de los productos elaborados y la seguridad de los consumidores. En este entorno, los biosensores se presentan como una potente alternativa analítica, ya que se trata de dispositivos altamente específicos, de tamaño pequeño, portables y de bajo coste que permiten realizar medidas *in situ* y a tiempo real. De este modo, es posible agilizar el proceso de análisis y disminuir el coste económico. Por todas estas razones, en las últimas décadas, las investigaciones centradas en el desarrollo de biosensores han experimentado un crecimiento exponencial. En la Figura 1.2, se muestra la evolución del número de publicaciones que contienen la palabra “biosensor” como palabra clave desde la década de los 80 hasta el 2010 [10].

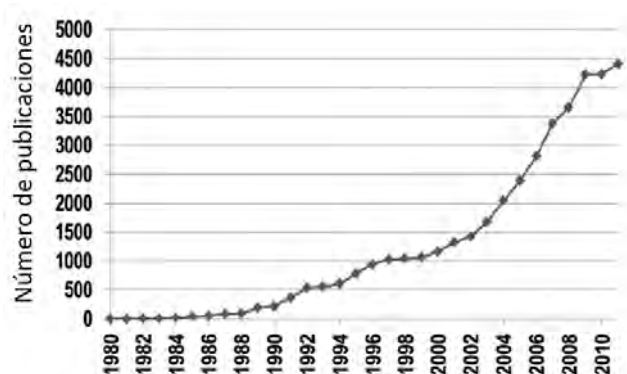


Figura 1.2. Número de publicaciones científicas en las que la palabra clave de búsqueda es “biosensor” desde el año 1980 hasta el año 2010 [10].

Como se presenta en la Figura 1.2, el campo de los biosensores ha presentado una rápida expansión en los últimos años. De hecho, este campo presenta una tasa de crecimiento anual del 60%, con un impulso principal en el entorno clínico, que representa un 30% del mercado analítico total [11]. El mercado mundial de los biosensores se valoró en 15.600 millones de dólares americanos en el año 2016, con la previsión de un incremento del 7,9% para el siguiente periodo [12]. Uno de los factores que más ha impulsado el crecimiento económico de este mercado, es el aumento de la preocupación por parte de los gobiernos sobre la salud pública.

Uno de los temas que más preocupan en Europa y Estados Unidos, es el elevado consumo de azúcar presente en las dietas modernas, ya que se asocia directamente a problemas de salud como la obesidad, la diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedades hepáticas [13]. Actualmente, dos de cada tres adultos y uno de cada tres niños sufren sobrepeso u obesidad en Estados Unidos [14], como consecuencia de la elevada ingesta de azúcar. Del mismo modo, el 52% de la población adulta de la Unión Europea presenta sobrepeso y un 17% de la misma es obesa [15]. Ante estas cifras, el control de los niveles de azúcar en los productos del sector alimentario y del sector farmacéutico se ha convertido en una prioridad. De hecho, el objetivo de la industria alimentaria es reducir la cantidad de azúcar añadido a los alimentos producidos con la finalidad de disminuir los casos de diabetes y obesidad. Para cumplir este propósito, es imprescindible establecer controles de calidad sobre materias primas y productos finales que garanticen que la cantidad de glucosa presente en los alimentos es la adecuada.

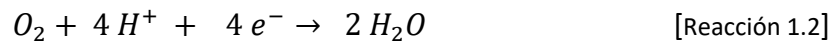
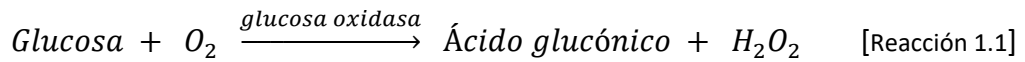
Actualmente, la concentración de glucosa en productos del sector alimentario se puede determinar aplicando diferentes técnicas de análisis [16–19], entre las que cabe destacar la colorimetría y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, la mayoría de los métodos adoptados para el control de calidad en productos alimentarios consumen tiempo y requieren personal altamente especializado. Además, las muestras analizadas pueden presentar matrices complejas que contienen especies interferentes que hay que eliminar antes de realizar la cuantificación. Esto implica que hay que realizar una etapa previa de preparativa de muestra. Los procesos de preparativa de muestra suelen implicar métodos complejos, tales como la extracción en fase sólida (SPE) o modificaciones químicas como la funcionalización con agentes fluorescentes. Estos tratamientos de muestra aumentan la complejidad, el tiempo y el coste del análisis. En este entorno, el desarrollo de métodos rápidos, baratos, prácticos y selectivos para determinar glucosa en alimentos sigue siendo una necesidad. Los biosensores de glucosa se han convertido en una opción muy atractiva debido a sus características prometedoras que satisfacen estas demandas de mercado.



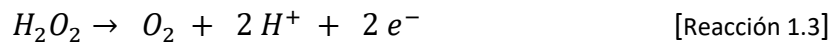
Figura 1.3. Dr. Champ Lyons y Dr. Leland C. Clark.

El primer biosensor de glucosa fue desarrollado por el Doctor en Bioquímica y Fisiología Leland C. Clark y el Doctor en Medicina Champ Lyons (ver Figura 1.3) en el año 1962, en el *Cincinnati Children's Hospital* [9]. Los doctores Clark y Lyons son considerados los padres de los biosensores, ya que este campo empezó a crecer gracias a las investigaciones que ambos realizaron sobre el *electrodo-enzima*, como ellos mismos lo denominaron en sus investigaciones. Si bien es verdad que hoy en día existe una gran variedad de biosensores, quizás los más difundidos son los biosensores enzimáticos electroquímicos. Esto se debe a que el dispositivo que diseñaron los doctores Clark y Lyons era un sistema enzimático, en el que se inmovilizó un enzima oxidoreductasa sobre la superficie de un electrodo para seguir la reacción electroquímica que se generaba. Por tanto, no se puede entender la evolución del campo de los biosensores sin antes conocer la historia particular del biosensor de glucosa.

El primer prototipo de biosensor de glucosa desarrollado por Clark y Lyons estaba compuesto por dos electrodos; inmovilizaron el enzima glucosa oxidasa (GOx) sobre una membrana semipermeable de diálisis que situaron sobre un electrodo de oxígeno y utilizaron otro electrodo de oxígeno sobre el que no había enzima [20]. La GOx cataliza la transformación de la glucosa en ácido glucónico, consumiendo oxígeno y liberando agua oxigenada (Reacción 1.1), sobre el electrodo de trabajo. Simultáneamente, se aplica un potencial catódico sobre el electrodo de platino del oxímetro que permite conocer la concentración inicial de oxígeno (Reacción 1.2). De este modo, es posible seguir la disminución de la concentración de oxígeno en el medio de medida por efecto de la enzima (GOx).



Así pues, la concentración de glucosa es directamente proporcional a la diferencia de concentraciones de oxígeno entre los dos electrodos utilizados. El primer modelo comercial de este biosensor de glucosa fue lanzado al mercado en 1975, por la empresa Yellow Springs Instruments Company (YSI) y fue comercializado para la medición directa de glucosa en 25 μL de muestra de sangre [20]. A partir de este primer modelo, se realizaron varias modificaciones con la intención de introducir mejoras. Uno de los cambios más importantes fue introducido en 1973, por Guilbault y Lubrano, quienes en lugar de seguir el consumo de oxígeno diseñaron un sistema para medir mediante amperometría la oxidación del peróxido de hidrógeno a oxígeno (Reacción 1.3) [21]. En esta configuración, la determinación de glucosa es directamente proporcional a la intensidad registrada con el electrodo de trabajo durante la amperometría, por tanto, el sistema es más simple que el diseño inicial de Clarck y Lyons.



Desde entonces, se empezaron a generar diferentes variantes del biosensor enzimático de glucosa, en los que se modificaba el diseño o el material del electrodo, el método de inmovilización del enzima o el propio enzima [22]. Todas estas modificaciones dieron lugar a tres generaciones distintas del biosensor de glucosa (ver Figura 1.4).

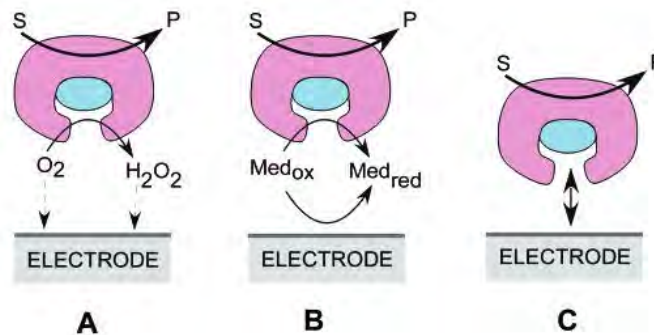
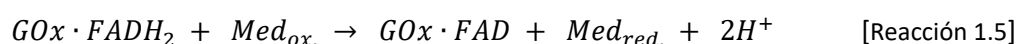
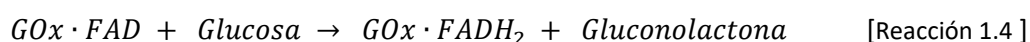


Figura 1.4. Generaciones del biosensor de glucosa: (A) los de primera generación basados en el uso de oxígeno como aceptor final de electrones, (B) los de segunda generación basados en el uso de mediadores redox y (C) los de tercera generación basados en la transferencia directa de electrones entre el centro activo del enzima y el transductor [20].

Los biosensores de primera generación (ver Figura 1.4.A) se sitúan entre la década de los 60 y los 70, y se basan en seguir la oxidación del H_2O_2 generado por la reacción enzimática a O_2 sobre la superficie del electrodo, al aplicar una diferencia de potencial. En estos biosensores, el aceptor final de electrones es el oxígeno disuelto en el medio de medida. El principal problema es que la solubilidad del oxígeno es limitada y que éste se va consumiendo a medida que transcurre la reacción enzimática (Reacción 1.1). Por tanto, la respuesta que ofrecen estos biosensores puede sufrir variaciones como consecuencia de la limitación por déficit de oxígeno [22]. Cabe mencionar, que en estos biosensores se sigue amperométricamente la oxidación del peróxido de hidrógeno a oxígeno (Reacción 1.2) al aplicar potenciales anódicos. Esto supone otro

problema importante, ya que existen muchos interferentes electroactivos en la medida de glucosa, como el ácido ascórbico, el ácido úrico o el acetaminofén, que pueden comprometer la selectividad y la exactitud de las medidas del biosensor [20].

Más adelante, durante los años 80, surgió la segunda generación de biosensores de glucosa (ver Figura 1.4.B) con la intención de corregir las limitaciones de los biosensores de la primera generación. En estos biosensores, se utilizaron mediadores redox, sustancias que asisten el proceso de oxidación o reducción facilitando el transporte de los electrones desde el sitio en el que tiene lugar la reacción hasta la superficie del electrodo. De este modo, el mediador transporta los electrones desde el centro activo del enzima hasta la superficie del electrodo [23,24], con la finalidad de mejorar la respuesta electroquímica del sensor. Uno de los principales problemas de los biosensores electroquímicos es la difícil accesibilidad al centro activo del enzima, que en muchos casos se encuentra rodeado de una capa proteica muy densa que actúa de barrera intrínseca ante el movimiento de electrones [7,25]. La glucosa oxidasa es uno de los enzimas que presenta esta estructura; se trata de una glicoproteína homodimérica en la que se encuentra una molécula de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) fuertemente anclado al centro activo de cada subunidad enzimática [26], que es el responsable de la actividad redox del enzima [27]. Por tanto, conseguir un buen contacto entre el FAD y la superficie del electrodo es uno de los objetivos principales al desarrollar esta clase de biosensores. La introducción de mediadores electroquímicos ha facilitado mucho esta tarea; al producirse la reacción enzimática el grupo FAD se reduce a FADH₂ (Reacción 1.4). A continuación, el mediador electroquímico se reduce, reoxidando el centro activo del enzima a FAD (Reacción 1.5). Finalmente, la forma reducida del mediador electroquímico es oxidada sobre la superficie del electrodo, generando una corriente eléctrica proporcional a la concentración de glucosa (Reacción 1.6). De este modo, se consigue que las medidas sean independientes de la concentración de oxígeno.



Alguno de los mediadores redox más utilizados en biosensores son la ferrocianida y compuestos derivados del ferroceno [28], aunque también se han utilizado otros compuestos como complejos de rutenio, compuestos derivados de la quinona y sales orgánicas conductoras [23]. La mayor parte de estos compuestos son sustancias tóxicas, por lo que no es posible utilizar los biosensores de segunda generación para realizar medidas *in-vivo* [20].

Por otro lado, además de la incorporación de mediadores electroquímicos, también se centraron muchos esfuerzos en desarrollar las tiras desechables que se utilizan actualmente para el autocontrol de la glucosa en sangre [29]. El primer glucómetro enzimático pensado para

el uso personal de los pacientes con diabetes fue lanzado al mercado en 1987, por la compañía MediSense Incorporated [30]. Posteriormente, en los años 90, surgió la tercera generación de biosensores de glucosa (ver Figura 1.4.C), en los que se eliminó el mediador electroquímico para establecer comunicación directa entre el centro activo del enzima y el electrodo [31]. La ausencia de mediador electroquímico permite una mayor sensibilidad y la posibilidad de utilizar el dispositivo para realizar medidas *in-vivo*. Por este motivo, se empezaron a diseñar dispositivos implantables por vía subcutánea, poco invasivos [32].

Actualmente, el mercado de los biosensores para controlar los niveles de glucosa en sangre está dominado por la empresa Abbott, que en 1996 adquirió MediSense [28]. Desde entonces, Abbott se ha posicionado al frente de este mercado lanzando distintos modelos de glucómetros FreeStyle®. Estos sistemas utilizan Glucosa Deshidrogenasa (GDH) en lugar de glucosa oxidasa, que se inmoviliza sobre un electrodo de nanotubos de carbono, en presencia de un mediador de osmio [33]. En este caso, la glucosa se oxida a gluconolactona y el cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ) presente en la GDH se reduce, entonces los electrones liberados son transportados por el mediador electroquímico de osmio al electrodo de trabajo (ver Figura 1.5).

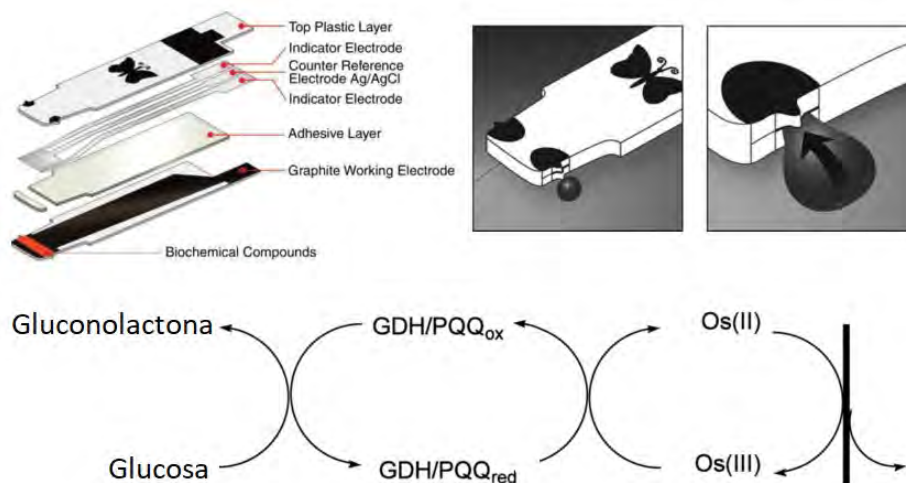


Figura 1.5. Representación esquemática de una tira desechable FreeStyle® para la determinación de glucosa y de las reacciones que tienen lugar [33,34].

Como se ha mencionado anteriormente, el biosensor de glucosa fue el primero en desarrollarse y abrió el camino para el desarrollo de muchos otros biosensores. El campo de los biosensores es ahora un área de investigación multidisciplinaria que une los principios de las ciencias básicas, física, química y biología, con los fundamentos de la nanotecnología, la electrónica y la medicina aplicada. Existen muchos prototipos de biosensores pensados para facilitar las tareas de determinación y cuantificación de analitos en entornos muy diversos.

En el sector industrial, este tipo de dispositivos son muy útiles en cuanto a control de calidad, tanto en materias primas, como en el proceso de producción y en producto final. Esto se debe a la rapidez de las medidas y al bajo coste de los dispositivos, que no requieren de personal altamente cualificado para su utilización. Un ejemplo es el control del grado alcohólico en muestras alimentarias, que se basan en un biosensor enzimático de etanol, inmovilizando el enzima alcohol oxidasa (AOx) sobre un electrodo [35]. El alcohol oxidasa cataliza la conversión

de los alcoholes a aldehídos, generando peróxido de hidrógeno (Reacción 1.7). Después se sigue electroquímicamente la oxidación del peróxido de hidrógeno liberado a oxígeno, del mismo modo que sucede con el biosensor de glucosa.



Del mismo modo que sucede en el entorno industrial, en otros sectores también hay ciertas metodologías analíticas que necesitan ser mejoradas para obtener una respuesta rápida, precisa y a tiempo real. Para ello, es necesario el desarrollo de biosensores. Por ejemplo, en el sector de la agricultura y de la ganadería es muy importante la detección e identificación de sustancias que causen enfermedades infecciosas en animales o vegetales que posteriormente podrían entrar en la cadena alimentaria [36]. El desarrollo de biosensores capaces de determinar bacterias como la *Salmonella* o la *Escherichia coli* es esencial para conseguir una toma de decisiones más rápida, evitando que estos patógenos infecciosos lleguen al producto final y minimizando los costes económicos que esto supone. Otro ejemplo en el que es necesario el desarrollo de biosensores que permitan determinaciones rápidas y precisas dentro del sector agrícola, es el control de medicamentos residuales para animales. El uso masivo de antibióticos y medicamentos en la cría de animales ha llevado a la aparición de fármacos residuales en alimentos de origen animal. Con la finalidad de evitar la introducción de estos fármacos en la cadena alimentaria, ya que pueden afectar a la salud de los seres humanos, se han desarrollado biosensores inmunológicos capaces de determinar estos compuestos a niveles de trazas [37].

También en el campo medioambiental, los biosensores son una herramienta útil, donde se utilizan como métodos de barrido en el control de la calidad ambiental. Por ejemplo, los biosensores basados en reacciones de inhibición enzimática se utilizan ampliamente para controlar la presencia de distintas clases de contaminantes en aguas, como pesticidas organoclorados y organofosforados, derivados de insecticidas, metales pesados o glicoalcaloides [38]. Estos dispositivos se basan en la capacidad de los analitos de inhibir las funciones biológicas de determinados enzimas tales como la acetilcolinesterasa (AChE), encargada de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ver Figura 1.6) [39].

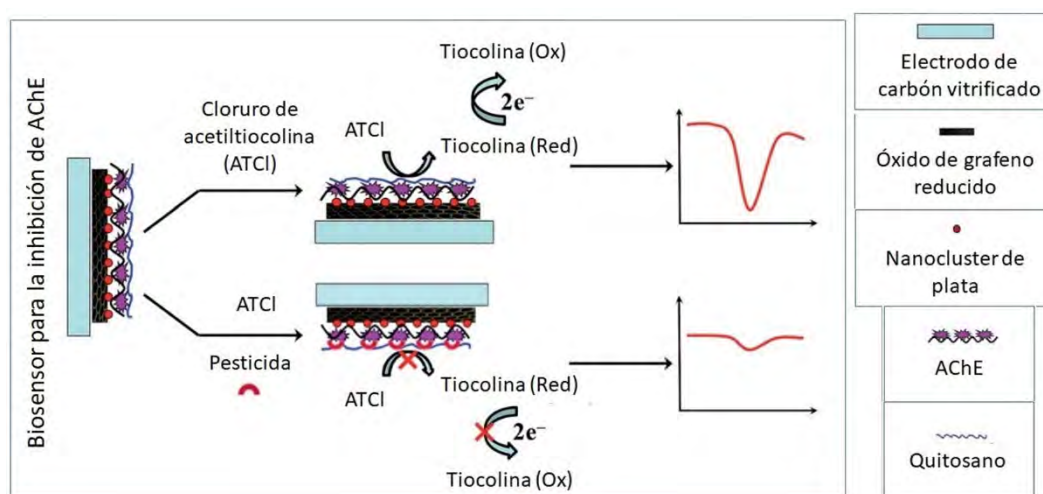


Figura 1.6. Representación esquemática de un biosensor de inhibición del enzima AChE para la determinación de pesticidas neurotóxicos [39].

Si bien es verdad que en las últimas décadas se han logrado muchos avances en el desarrollo de biosensores, aún quedan muchos aspectos a mejorar. Por ejemplo, en el caso del biosensor de glucosa para el control de la diabetes los dispositivos que se comercializan actualmente utilizan mediadores electroquímicos, por lo que se consideran biosensores de la segunda generación [34]. Esto se debe a que todavía no se ha conseguido realizar satisfactoriamente la detección de glucosa basada en la transferencia directa de electrones entre el enzima y el electrodo. Por este motivo, la tercera generación sigue representando un reto para la comunidad científica y muchas de las investigaciones se centran en conectar el centro activo del enzima con la superficie del electrodo, sin provocar modificaciones conformacionales en la estructura tridimensional de la proteína que afecten a su capacidad operativa [28,40,41].

Las dificultades en la mejora de las propiedades operacionales del biosensor de glucosa pueden extrapolarse a todo el campo de los biosensores. La realidad es que, a pesar de todos los esfuerzos realizados por parte de la comunidad científica, la mayoría de los biosensores descritos hasta el momento todavía no son suficientemente robustos para muchas aplicaciones del mundo real. La brecha entre investigación y mercado sigue siendo muy amplia. Las principales limitaciones que existen están relacionadas directamente con el coste en la fabricación, la estabilidad de las biomoléculas a corto y a largo plazo, la sensibilidad y la garantía de calidad que pueden ofrecer estos dispositivos [11]. Además, existen muchos problemas de interferentes al realizar medidas sobre matrices complejas de muestras reales, por lo que se obtienen resultados con elevadas desviaciones respecto a los métodos clásicos de referencia [35,42–44]. Como consecuencia, el campo de los biosensores sigue siendo un tema candente en la comunidad científica y se sigue generando un elevado número de publicaciones al respecto. Las investigaciones recientes se centran en la mejora de las características operacionales de los biosensores, con la finalidad de obtener sensores más sensibles, precisos y estables en el tiempo [45].

Con la finalidad de hacer del campo de los biosensores un mercado competente en el sector de la química analítica, es necesario realizar modificaciones sobre la arquitectura de los biosensores diseñados hasta el momento. Para variar la arquitectura de un biosensor, se pueden modificar distintos parámetros, desde la estructura del elemento transductor hasta la biomolécula que genera la respuesta de interés, pasando por la estrategia de inmovilización escogida. En el siguiente apartado, se explican de forma detallada cada uno de los componentes que conforman la arquitectura de un biosensor.

1.2. Arquitectura de un biosensor

Los biosensores son dispositivos capaces de unificar un elemento biológico con un elemento transductor, que transforma la información química en una señal eléctrica proporcional a la concentración de analito. Los biosensores se componen de tres grandes elementos: el elemento biológico o bioreceptor, el transductor y el sistema electrónico [46]. En primer lugar, el elemento que actúa de bioreceptor, es el que se une específicamente al analito de interés. En segundo lugar, el elemento transductor es el encargado de convertir la respuesta biológica generada en una señal eléctrica, óptica o mecánica medible. Finalmente, el sistema electrónico procesa esa señal para que pueda ser interpretada. En la Figura 1.7, se muestra la representación esquemática de las partes que componen un biosensor.

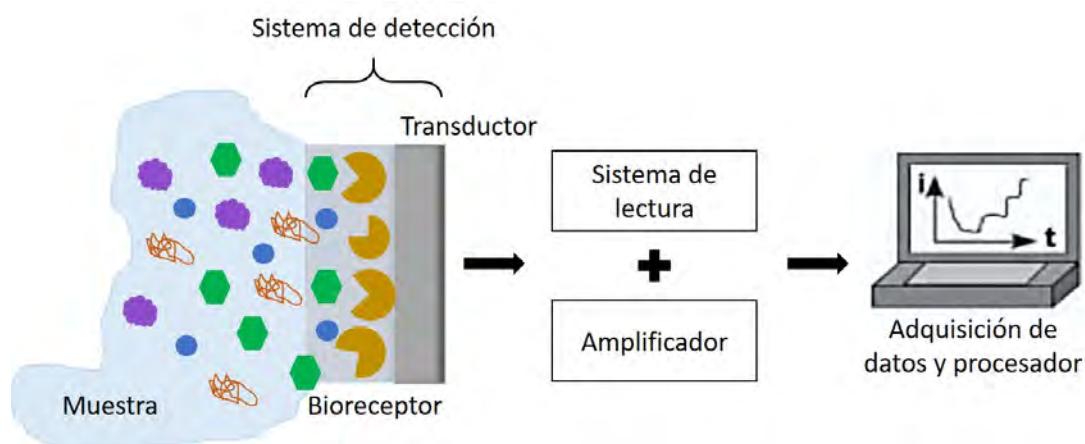


Figura 1.7. Representación esquemática de los componentes de un biosensor.

Los biosensores se pueden utilizar para determinar un gran número de analitos en muestras de origen muy variado; desde fluidos corporales hasta muestras agroalimentarias, pasando por cultivos celulares y muestras del sector medioambiental, entre otras. Esta capacidad se debe a la estructura que presentan estos dispositivos. Principalmente, a la elevada especificidad que aporta el elemento bioreceptor al sistema de medida. Son muchas las biomoléculas que se han utilizado a lo largo de los años para construir biosensores: enzimas, células, anticuerpos, microorganismos, ácidos nucleicos, orgánulos o tejidos [47]. Todas ellas dotan al biosensor de su elevada selectividad característica, ya que solamente ofrecen señal bioquímica al reconocer específicamente un compuesto concreto.

Por otro lado, el transductor se encarga de convertir la señal bioquímica producida por el bioreceptor en una señal medible. Después, esta señal es procesada, amplificada y representada por el sistema informático, para que el analista pueda interpretarla. De las combinaciones de diferentes bioreceptores y transductores surgen un número muy elevado de posibles biosensores. De entre todos los biosensores que se pueden encontrar en el mercado, los electroquímicos, especialmente los amperométricos, son los más utilizados [48].

Al diseñar un biosensor, hay que tener en cuenta varios factores sobre la estructura de este que pueden resultar críticos para el correcto funcionamiento del dispositivo final.

En primer lugar, hay que definir el analito objeto de estudio ya que la elección del bioreceptor depende directamente del analito. Además, es importante conocer las características del medio de medida, ya que deben ser propicias para que el bioreceptor presente actividad biológica. Idealmente, el bioreceptor debe generar una reacción independiente de parámetros físicos tales como el pH o la temperatura, ya que de este modo se evita realizar un pretratamiento a la muestra antes de realizar la determinación analítica [7].

En segundo lugar, hay que elegir los materiales óptimos para el elemento transductor. El transductor, además de ser capaz de reconocer la señal bioquímica generada, debe garantizar la estabilidad del bioreceptor, es decir, que éste mantenga su actividad biológica a lo largo del tiempo. Los componentes biológicos a menudo son poco estables fuera de su entorno natural, por lo que es muy importante generar entornos en los que el bioreceptor sea lo más estable posible. De este modo, se alarga el tiempo de vida útil del dispositivo final y se aumenta su sensibilidad. Para lograrlo, también es necesario diseñar una matriz de inmovilización propicia para el bioreceptor, que mantenga la estructura activa de este y lo proteja de los agentes agresivos del medio de medida.

Finalmente, hay que asegurar que el ensamblaje de todos los componentes propuestos va a generar un dispositivo analíticamente estable y fiable, que presente suficiente sensibilidad, precisión, exactitud, un amplio rango lineal y ninguna interferencia en la medida [7]. Conseguir todos estos objetivos no es una tarea trivial, ya que son necesarios conocimientos multidisciplinarios y hay que identificar cada uno de los factores que pueden influir sobre la medida final del biosensor.

1.2.1. Elementos bioreceptores

El elemento bioreceptor o elemento de reconocimiento biológico es el elemento distintivo de un biosensor. El bioreceptor es el encargado de reconocer al analito objetivo dentro de la matriz de la muestra. Esencialmente, un buen bioreceptor debe ser selectivo y sensible frente al analito de interés [49], ya que de esta forma se consiguen evitar las interferencias que puedan generar otras sustancias presentes en la muestra.

Los biosensores se pueden clasificar por el tipo de mecanismo de señalización biológica que utilizan. Siguiendo esta clasificación, los biosensores se dividen en dos grandes grupos: los biosensores catalíticos y los biosensores de afinidad [50] (ver Figura 1.8). Por un lado, en los biosensores catalíticos, el elemento de reconocimiento biológico cataliza la reacción de interés. Por tanto, puede decirse que las reacciones que tienen lugar están gobernadas por procesos cinéticos. Principalmente, se consideran como biosensores catalíticos a aquellos que utilizan enzimas como elemento de reconocimiento biológico (ver Figura 1.8.A).

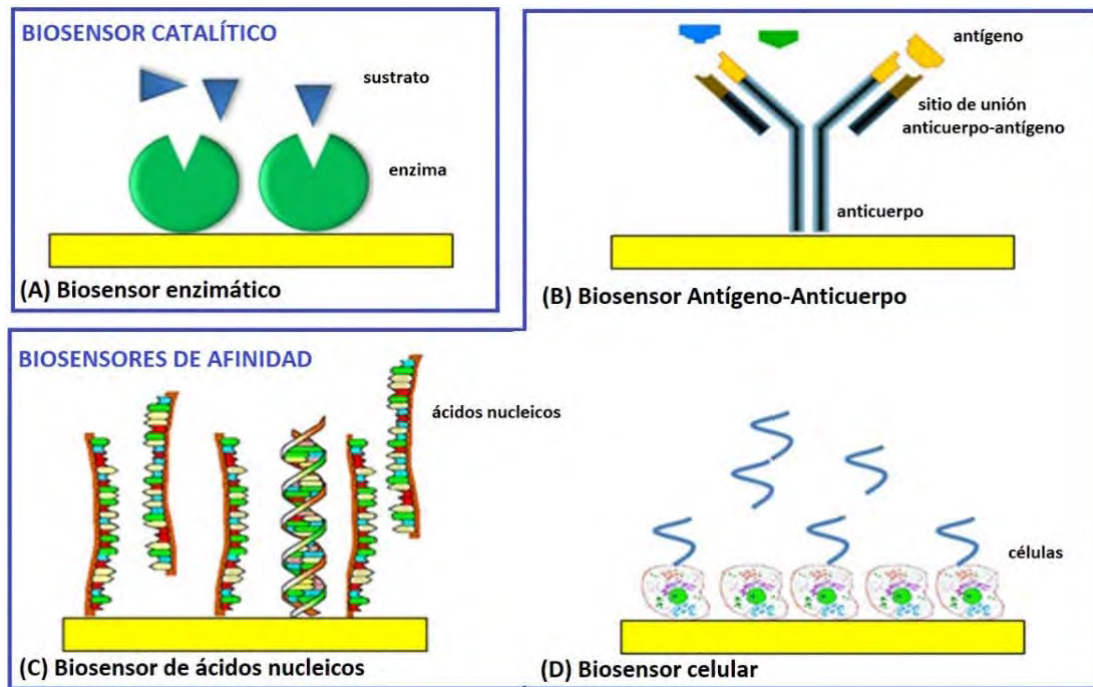


Figura 1.8. Diferentes tipos de biosensores en función del tipo de elemento bioreceptor que los compone: (A) enzimas, (B) anticuerpos-antígenos, (C) ácidos nucleicos y (D) células [49].

Por otro lado, los biosensores de afinidad se basan en la unión selectiva de ciertos compuestos biológicos con un analito específico, donde el reconocimiento biomolecular se rige por la forma y el tamaño del ligando y del receptor. De modo que, en los biosensores de afinidad, las reacciones que tienen lugar están gobernadas por procesos termodinámicos. En los biosensores de afinidad se utilizan como bioreceptores compuestos como anticuerpos (ver Figura 1.8.B), ácidos nucleicos (ver Figura 1.8.C) o células (ver Figura 1.8.D), entre otros.

Existe una gran diversidad de biosensores de afinidad, debido a la gran variedad de compuestos que se pueden utilizar como elemento de reconocimiento biológico. Los biosensores de afinidad más importantes son los inmunosensores, que son aquellos biosensores basados en la interacción entre un anticuerpo y un antígeno. También destacan los biosensores de ácidos nucleicos, en los que se inmovilizan cadenas simples y dobles de ácidos nucleicos sobre un transductor para generar una señal cuantificable. Dentro de los biosensores de afinidad, también se encuentran otros tipos menos frecuente de dispositivos, como los biosensores celulares o los biosensores biomiméticos [51].

Por un lado, en los biosensores celulares, se usa la célula viva como el elemento de reconocimiento bioespecífico. Se basan en la capacidad de la célula de detectar las condiciones intracelulares y extracelulares, así como los parámetros fisiológicos que la rodean y en la interacción entre la propia célula y un estímulo externo [49]. Esencialmente, se utilizan microorganismos como bacterias u hongos para desarrollar este tipo de biosensores.

Por otro lado, los biosensores biomiméticos son aquellos en los que se utiliza un agente bioreceptor artificial o sintético, que mimetiza la función biológica natural de otro compuesto [49]. Los receptores biomiméticos han surgido gracias a los avances en las técnicas de ingeniería

genética. Los aptámeros son los receptores biomiméticos más utilizados [52]. Los aptámeros son ligandos artificiales de ácidos nucleicos, que se comportan como anticuerpos y presentan una gran versatilidad (ver Figura 1.9); se pueden diseñar para reconocer específicamente aminoácidos, oligosacáridos, péptidos y proteínas. Aunque los aptámeros representan una buena alternativa para el futuro de los biosensores, presentan un gran problema, el coste que implica su obtención.

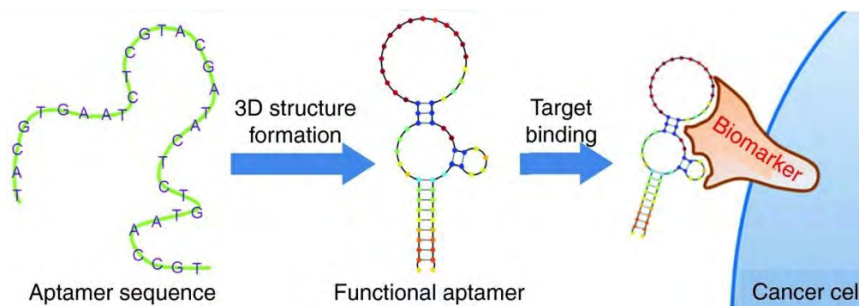


Figura 1.9. Representación esquemática del proceso de unión específica entre un aptámero y su analito [53].

A pesar de la gran diversidad de los biosensores de afinidad descritos en bibliografía, los biosensores catalíticos son los más estudiados y utilizados. Esto se debe a que los enzimas son biocatalizadores muy eficientes, que reconocen específicamente un sustrato y catalizan su transformación generando productos que fácilmente pueden ser determinados [54–56]. El uso de enzimas como elemento de reconocimiento biológico permite una gran versatilidad en el diseño de los biosensores, ya que existe un gran número de enzimas que pueden ser inmovilizados con este fin. Además, la reacción enzimática puede seguirse utilizando diferentes tipos de transductores. En general, los biosensores enzimáticos ofrecen bajos límites de detección y elevadas sensibilidades, además de presentar pocos interferentes [57].

De entre todos los elementos bioreceptores que existen dentro del campo de los biosensores, cabe destacar la importancia de los anticuerpos, los ácidos nucleicos y los enzimas. A continuación, se explica de forma detallada las características que presentan cada uno de ellos.

1.2.1.1. Anticuerpos

De todos los biosensores de afinidad que existen, los inmunosensores son los más utilizados para realizar determinaciones analíticas, ya que presentan una elevada afinidad por el analito diana y una elevada especificidad [58]. Los inmunosensores son aquellos dispositivos en los que se utiliza un anticuerpo (*Ab*) o un antígeno (*Ag*) como elemento bioreceptor. Los anticuerpos son proteínas globulares producidas por el sistema inmunitario con la finalidad de proteger el organismo de cuerpos extraños. Estos cuerpos extraños se denominan antígenos. Los anticuerpos se enlazan a los antígenos de manera selectiva para que queden marcados, de esta forma el organismo los puede reconocer como dañinos y puede proceder a su eliminación. La gran selectividad de los anticuerpos se basa en la estereoespecificidad, ya que el enlace se da solamente al reconocer una parte del antígeno con una determinada configuración espacial.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos policlonales reconocen diversas regiones proteicas de un antígeno y se obtienen a partir de un suero [58]; se inyecta reiteradamente un antígeno a un animal con la intención de generar una respuesta inmune, entonces se toma una muestra de sangre del animal y se purifica el suero, donde se ha generado la mezcla de anticuerpos policlonales de interés. En cambio, los anticuerpos monoclonales reconocen una región más específica del antígeno, se trata de moléculas idénticas porque se generan a partir de una misma célula madre [59]. Habitualmente, los anticuerpos monoclonales se utilizan más que los anticuerpos policlonales en el desarrollo de inmunosensores. Esto se debe a que los anticuerpos monoclonales son más homogéneos en su estructura molecular, presentan las mismas características de anclaje y se pueden producir en grandes cantidades [60], obteniéndose dispositivos más selectivos.

Por tanto, los biosensores que se basan en la unión altamente específica entre el *Ag* y el *Ab* ofrecen una gran especificidad y aportan unos límites de detección bajos, ya que presentan relativamente pocas interferencias [58]. Cuando el *Ag* y el *Ab* se encuentran, se transforman en un complejo antígeno-anticuerpo responsable de la detección y cuantificación del analito.

La determinación analítica a partir de la generación del complejo antígeno-anticuerpo, puede realizarse de distintos modos. Uno de los más comunes consiste en utilizar marcadores que generen una señal medible por el detector (ver Figura 1.10). Existe un gran número de marcadores que se pueden utilizar con esta finalidad: enzimas, cofactores, inhibidores de fluorescencia o compuestos redox, entre otros [59]. De entre la gran variedad de marcadores que existen, los enzimas son uno de los más utilizados. Se enlaza un enzima al *Ab* o al *Ag*, de modo que la detección se rige por la reacción enzimática. El enzima anclado, reacciona con un sustrato determinado presente en la muestra y genera una señal medible por el transductor.

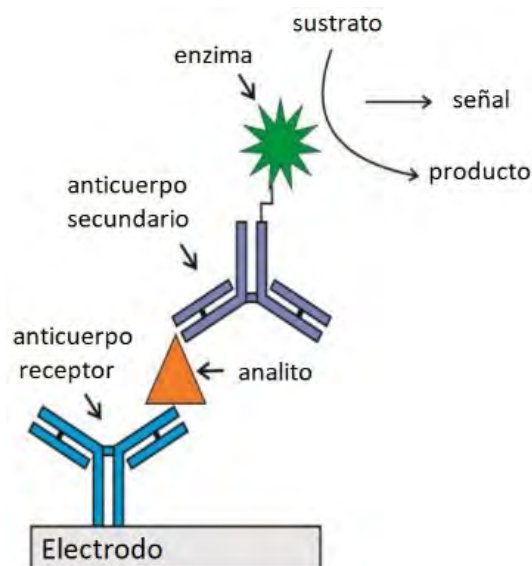


Figura 1.10. Representación esquemática de un inmunosensor electroquímico con marcaje enzimático [61].

Uno de los enzimas más utilizados en el desarrollo de inmunosensores, es la horseradish peroxidase (HRP), que participa en la reducción de H_2O_2 por acción del sustrato [62]. En general,

el HRP es un enzima muy utilizado en bioquímica porque presenta una gran habilidad para amplificar señales débiles, aumentando la posibilidad de detectar el analito de interés en una matriz compleja. Además, la HRP es muy interesante como inmunomarcador porque presenta una gran capacidad para conjugarse con los anticuerpos, haciendo que el proceso de marcaje sea sencillo. La HRP cataliza la oxidación de distintos sustratos orgánicos por acción del peróxido de hidrógeno. La reacción enzimática se suele seguir de forma electroquímica, utilizando un electrodo como transductor, o espectrofotométricamente, ya que muchos de los sustratos de la HRP son especies cromogénicas [63]. Por ejemplo, la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), un compuesto muy utilizado en inmunosensores, al oxidarse genera un compuesto de color azul que puede cuantificarse por absorción molecular en la región del visible [64]. El TMB como marcador se usa, por ejemplo, para determinar la cantidad de progesterona bovina que contiene la leche justo después de ser ordeñada [36].

Un ejemplo de inmunosensor enzimático en el que se utiliza HRP es el biosensor para la detección del virus causante de la enfermedad de Newcastle. La enfermedad de Newcastle se produce por el virus *Paramyxovirus aviar*, que afecta a las aves y se transmite a los humanos por contacto con los animales infectados. Se trata de una enfermedad altamente infecciosa por lo que es necesario realizar controles rutinarios que sean rápidos y fiables dentro del sector avícola, para poder garantizar la calidad de los productos generados. Una solución propuesta es el uso de un inmunosensor enzimático [65] en el que se inmoviliza el antígeno del virus que causa la enfermedad marcado con HRP. Se utiliza como sustrato tetrametilbenzidina, que reacciona con peróxido de hidrógeno gracias a la acción catalítica de la HRP. Entonces, se monitoriza amperométricamente la variación de la concentración de H_2O_2 y se correlaciona con la presencia o no del virus en la sangre del animal.

Otro ejemplo, es el biosensor desarrollado por Yan-Yan Song en 2013 [66]. El objetivo del biosensor es determinar proteínas poco abundantes en muestras del sector clínico. La arquitectura del biosensor presenta forma de sándwich, como puede verse en la Figura 1.11.

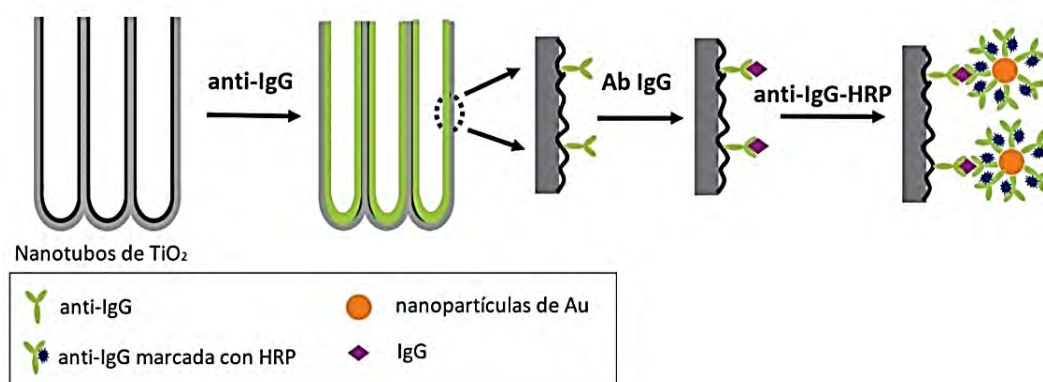


Figura 1.11. Inmunosensor electroquímico para determinar proteínas en muestras clínicas, en el que se utiliza el enzima HRP como marcador de un antígeno. Se sigue amperométricamente la reducción de H_2O_2 a H_2O y se asocia la concentración de peróxido de hidrógeno a la concentración de proteínas presentes en la muestra [66].

El biosensor que se presenta en la Figura 1.11, es un dispositivo electroquímico en el que se utilizan nanotubos de óxido de titanio (IV) como transductor electroquímico. Estos nanotubos

se recubren con el antígeno de la inmunoglobulina G (IgG) sin marcador enzimático, al que se unirá la IgG siempre que esté presente en la muestra. Por otro lado, se marca el antígeno anti-IgG con el enzima HRP y se inmoviliza sobre nanopartículas de oro. Entonces, la IgG presente en la muestra se enlaza al antígeno con y sin marcador, generando una estructura de sándwich anclada al transductor. Solamente si la muestra contiene el anticuerpo IgG habrá señal electroquímica. Por tanto, se asocia la medida de la intensidad generada al reducirse el peróxido de hidrógeno con la concentración de proteínas IgG presentes en la muestra.

1.2.1.2. Ácidos Nucleicos

Desde que Watson y Crick propusieron la estructura de doble hélice para el ácido desoxirribonucleico (ADN) en 1953 [67,68], la identificación y secuenciación de las moléculas de ácidos nucleicos ha recibido mucha atención por parte de la comunidad científica. Los ácidos nucleicos son cadenas poliméricas de nucleótidos unidos mediante enlaces fosfodiéster, que contienen la información genética necesaria para la síntesis de proteínas. Las secuencias de ácidos nucleicos, que son únicas y diferentes para cada organismo vivo, virus o patógeno, se utilizan en diferentes procesos de análisis para identificar y cuantificar diferentes analitos, por ejemplo en el diagnóstico de enfermedades [69], en la determinación y cuantificación de ácidos nucleicos [70] o incluso para detectar moléculas dañadas de ADN [71].

La hibridación del ADN ofrece una herramienta para la obtención de información específica de la secuencia de ácidos nucleicos de manera rápida, simple y relativamente barata. Los biosensores que en los que se utilizan ácidos nucleicos como elemento de reconocimiento biológico, se basan en este proceso de hibridación de ADN. Se utiliza la reacción de unión específica entre dos cadenas complementarias de ADN para formar, mediante puentes de hidrógeno entre nucleótidos, una cadena doble [72]. En esta clase de biosensores, se inmoviliza una cadena relativamente corta de ADN de una sola hebra en la superficie de un transductor. Entonces, se da la hibridación con la secuencia complementaria a la cadena inmovilizada presente en la muestra, en una región específica del ADN, produciéndose una señal bioquímica que el elemento transductor convierte en una señal medible (ver Figura 1.12). Normalmente, estos biosensores son electroquímicos. Esto se debe a que los dispositivos electroquímicos pueden miniaturizarse de forma sencilla, además de ofrecer respuestas precisas, sensibles y rápidas.

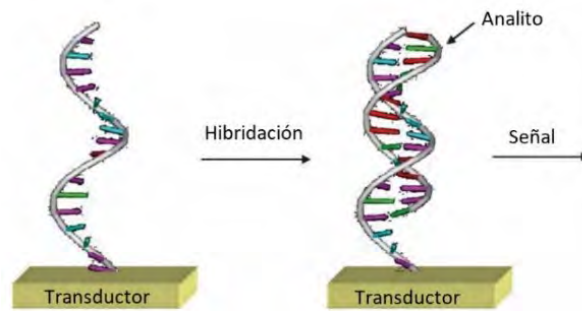


Figura 1.12. Representación esquemática del funcionamiento de un biosensor de hibridación de ADN y los pasos involucrados en la detección de una secuencia específica de ADN [73].

La inmovilización del fragmento de cadena de ADN tiene que realizarse de tal modo que se mantenga su estabilidad, reactividad y accesibilidad frente al analito objetivo. De este modo, puede producirse la hibridación. Además, las condiciones experimentales de trabajo, como la temperatura, la fuerza iónica o el pH del medio, deben controlarse meticulosamente para que el rendimiento de la reacción sea elevado. De este modo, se obtienen dispositivos selectivos y sensibles.

Existen dos tipos de biosensores de ácidos nucleicos, en función del método utilizado para monitorizar la hibridación del ADN: los biosensores que utilizan marcadores y los que no los utilizan. Cabe mencionar que los biosensores en los que se utilizan marcadores son significativamente más populares que los biosensores en los que no se utilizan dichos marcadores. Esto se debe a que el uso de marcadores ofrece más versatilidad en el diseño del biosensor, además de ser más sensibles y selectivos [73]. Como marcadores electroquímicos se pueden utilizar diferentes moléculas, entre las que destacan enzimas como la horseradish peroxidase (HRP) o fosfatasas alcalinas, nanopartículas o liposomas [73].

Susan R. Mikkelsen fue una pionera en el uso de marcadores redox para el desarrollo de biosensores de hibridación de ADN [74]. El biosensor que diseñó en 1994 se utilizó para determinar la secuencia de ADN que provoca la fibrosis quística, que presentaba el 70% de los pacientes estudiados. La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por provocar la acumulación de mucosidad en los pulmones, el tubo digestivo y otras áreas del cuerpo. Se trata de una enfermedad potencialmente mortal, ya que la acumulación de mucosidad suele provocar infecciones pulmonares debido a la presencia de bacterias como la *Pseudomonas* o el *Staphylococcus*. El dispositivo diseñado por Mikkelsen utiliza como marcador redox el compuesto de coordinación tris(bipiridina)cobalto (III) $[\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}]$, enlazado a las hebras de ADN inmovilizadas sobre un electrodo de pasta de carbono. El biosensor permite seguir el proceso de hibridación con la secuencia de ADN alterado que provoca la enfermedad, pero no muestra señal ante el ADN normal.

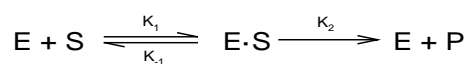
Por otro lado, también es posible conseguir medidas sensibles utilizando sensores de ADN libres de marcadores electroquímicos. En estos biosensores, la detección se basa en medir cambios en las propiedades eléctricas de una interfaz conductora. Para ello, se pueden incluir membranas conductoras en el diseño del biosensor, como por ejemplo películas de polipirrol que permitan controlar los cambios de la conductividad durante el proceso de hibridación de las

cadena de ADN [75]. También es posible medir cambios de flexibilidad, ya que las hebras simples de ADN inmovilizadas al inicio son más flexibles que las hebras dobles que resultan de la hibridación [73]. Finalmente, también es posible seguir la oxidación de las bases nitrogenadas guanina. Este último es, con mucho, el método sin marcaje más utilizado, en parte debido a su simplicidad y en parte debido a su versatilidad [76].

Existen otros modos en la interacción del ADN que pueden utilizarse para el desarrollo de biosensores electroquímicos de ácidos nucleicos. En particular, es posible diseñar esta clase de biosensores para la detección de moléculas pequeñas que interactúan con la capa de ácidos nucleicos inmovilizada, como por ejemplo drogas o carcinógenos [77]. La acumulación de estas moléculas sobre el ADN confinado sobre la superficie del electrodo se puede utilizar para medir la concentración de estas a nivel de trazas. Por tanto, los dispositivos obtenidos permiten estudiar el efecto de ciertas sustancias sobre la secuencia del ADN, lo que supone un gran avance en el estudio de enfermedades genéticas [70]. Además, también es posible aplicar estos dispositivos como una herramienta en el desarrollo de investigaciones criminales.

1.2.1.3. Enzimas

Los biosensores enzimáticos están basados en la inmovilización de enzimas sobre la superficie del elemento transductor. En estos biosensores el elemento de reconocimiento biológico es el enzima, que puede reconocer específicamente a un analito concreto dentro de una matriz compleja. Los enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de reacciones químicas en el interior de los organismos vivos y pueden acelerar por un factor de 100 a 1000 una reacción espontánea [25]. Se trata de macromoléculas que actúan al reconocer un sustrato específico, formando un complejo enzima-sustrato que favorece la cinética de la conversión del sustrato en producto (Reacción 1.8). Por tanto, el principio de funcionamiento se basa en la acción catalítica y en la capacidad de unión específica del enzima. Por este motivo, los biosensores enzimáticos también son conocidos como biosensores catalíticos.



[Reacción 1.8]

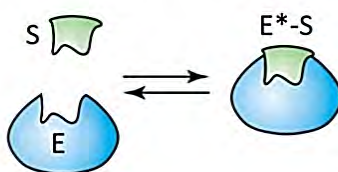
Donde E es el enzima, S es el sustrato, $E \cdot S$ es el complejo enzima/sustrato y P es el producto de reacción. De este modo, es posible determinar la concentración del analito de interés mediante dos modelos, o bien se mide la transformación catalítica del analito a otro producto, o bien es posible que el analito inhiba la acción catalítica del enzima y que se mida la disminución en la concentración del producto generado [50].

En general, los biosensores enzimáticos presentan una gran ventaja frente al resto de biosensores, ya que son altamente selectivos e incluso a veces presentan estéreo-especificidad [25]. Los enzimas suelen ser muy específicos tanto para el sustrato que catalizan como para el tipo de reacción de la que participan. Esta elevada especificidad se ve reflejada en el biosensor,

que presentará pocas interferencias en la reacción enzimática y, por tanto, será muy sensible en la medida del analito de interés.

La elevada especificidad que presentan los biosensores enzimáticos puede explicarse mediante el modelo de llave-cerradura y el modelo del encaje inducido (ver Figura 1.13). El modelo de llave-cerradura dice que el enzima y el sustrato poseen complementariedad geométrica, es decir, que sus estructuras encajan perfectamente la una en la otra [78]. Mientras que el modelo del encaje inducido sugiere que los enzimas son estructuras flexibles que adquieren diferentes conformaciones espaciales en el proceso catalítico; de modo que al formarse el complejo enzima/sustrato el centro activo del enzima se deforma para poder encajar con el sustrato y que tenga lugar la reacción [78]. El centro activo de un enzima es una zona determinada de su estructura en la que tiene lugar la interacción enzima/sustrato.

a) Modelo de llave-cerradura



b) Modelo del encaje inducido

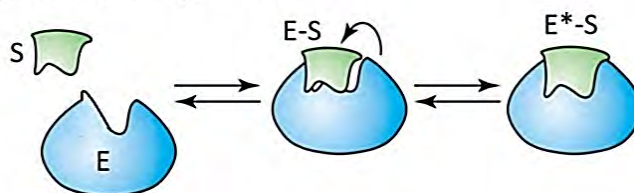


Figura 1.13. Representación esquemática de los modelos de a) llave-cerradura y b) encaje inducido, que explican la formación del complejo enzima/sustrato en las reacciones enzimáticas [79].

Por otro lado, los biosensores enzimáticos también presentan algunas desventajas frente al resto de biosensores, relacionadas con la activación y la desactivación de las moléculas de enzima [80]. La acción catalítica del enzima está influenciada por muchos factores, como la concentración de sustrato, la temperatura del medio, la presencia de inhibidores competitivos y no competitivos, la fuerza iónica y el pH. Todos estos factores influyen sobre la estabilidad del enzima y, consecuentemente, sobre la eficiencia de la reacción enzimática. Por tanto, pequeños cambios en el microambiente que rodea las moléculas de enzima pueden afectar a la capacidad operacional del biosensor, acortando su tiempo de vida útil. Por este motivo, hay un gran número de investigaciones centradas en mantener o mejorar la actividad catalítica de los enzimas a largo plazo, por ejemplo modificando las estrategias de inmovilización [55,81,82].

Como se ha mencionado en el apartado 1.1, el primer biosensor en ser desarrollado fue el biosensor enzimático de glucosa [9]. La glucosa oxidasa (GOx) es el enzima más utilizado en el desarrollo de biosensores enzimáticos, debido a su relación directa con el control de la diabetes. Sin embargo, existe un amplio abanico de enzimas que se pueden utilizar para desarrollar biosensores enzimáticos. La elección del enzima correcto es función del analito de interés y del

tipo de reacción que catalice el enzima. En la Tabla 1.1, se muestran las distintas categorías en las que se clasifican los enzimas en función del tipo de reacción en la que participan.

Tabla 1.1. Clasificación de los enzimas en función del tipo de reacción en la que participan [83].

Familias de enzimas	Tipo de reacción catalítica
Oxidoreductasas	Reacción de reducción/oxidación
Transferasas	Transferencia de grupos moleculares de una molécula a otra
Hidrolasas	Ruptura hidrolítica de enlaces químicos
Liasas	Ruptura de enlaces C-C, C-S, C-N y otros enlaces no peptídicos por otros medios distintos a la hidrólisis o la oxidación
Isomerasas	Reordenamiento intramolecular
Ligasas	Formación de enlaces entre dos moléculas

Actualmente, existe un elevado número de biosensores enzimáticos que permiten la determinación de diferentes analitos en matrices de orígenes diversos. De entre todos los enzimas disponibles para desarrollar estos biosensores, las oxidoreductasas, son los enzimas más utilizados. Esto se debe a que muchas de las reacciones químicas y bioquímicas implican procesos de reducción y oxidación, que pueden ser catalizados con la presencia de esta clase de enzimas [84]. Dentro de las oxidoreductasas, cabe destacar dos subclases: las oxidasas y las deshidrogenasas. De hecho, los biosensores comerciales para la determinación de glucosa en sangre utilizan tanto la glucosa oxidasa como la glucosa deshidrogenasa.

Las oxidasas, como la glucosa oxidasa o el alcohol oxidasa, utilizan oxígeno molecular como último aceptor de electrones y liberan H_2O_2 , por lo que es sencillo seguir la reacción electroquímica. En cambio, las deshidrogenasas utilizan como aceptor de electrones otros compuestos diferentes al oxígeno, como los cofactores nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$). Estos cofactores permiten el desarrollo de biosensores electroquímicos muy sensibles, pero es necesario inmovilizarlos sobre la superficie del transductor conjuntamente con el enzima o bien suministrarlos externamente para que se dé la reacción enzimática [85]. Por este motivo, normalmente son más utilizadas las oxidasas que las deshidrogenasas.

Hay muchos ejemplos de biosensores enzimáticos en los que se utilizan oxidoreductasas como elemento de reconocimiento biológico. Desde la determinación de glucosa, lactato y glutamato [86] o fructosa [87] en muestras del sector alimentario, hasta la determinación de colesterol [88] o amino ácidos [89] en el entorno clínico, entre otros. De entre todos ellos, el biosensor enzimático para la determinación de etanol ha despertado mucho interés [90–92]. El consumo de alcohol es un hábito común en la sociedad actual, pero su abuso genera un gran número de efectos adversos para la salud, desde varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, apoplejía, cirrosis hepática y pancreatitis entre otros [92]. Además, el abuso en el consumo de alcohol representa un peligro para la seguridad de las personas, ya que se trata de uno de los principales causantes de accidentes de tráfico; en España el 12% de los accidentes de tráfico graves o mortales de 2017 fueron causados por el consumo de alcohol [93]. Por este motivo,

controlar los niveles de alcohol en sangre a tiempo real representa una preocupación creciente tanto en el entorno clínico como para la seguridad automovilística. En la Figura 1.14, se muestra un ejemplo de biosensor bienzimático para la determinación de alcohol en una muestra de sudor.

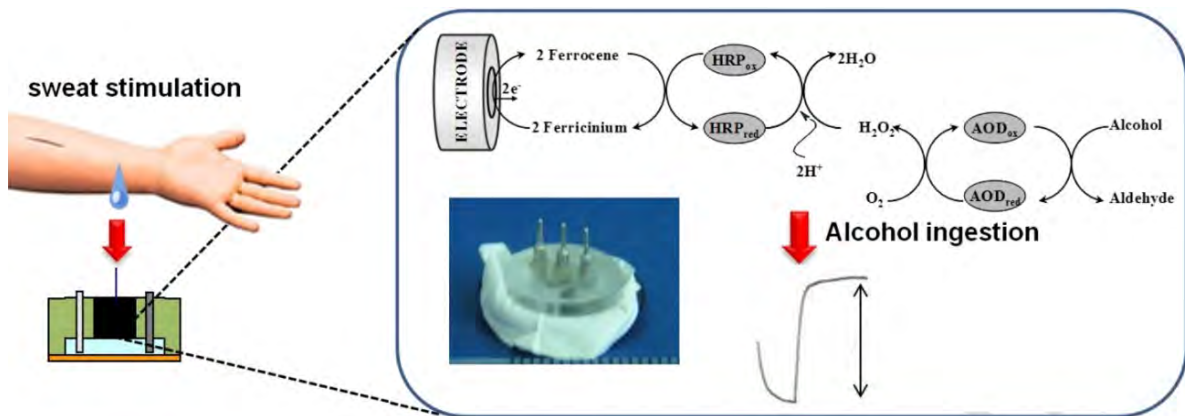


Figura 1.14. Biosensor electroquímico para la determinación de alcohol en muestras de sudor basado en la inmovilización simultánea de alcohol oxidasa y HRP [94].

Además de los biosensores en los que se utilizan oxidoreductasas, hay una amplia variedad de biosensores en los que la reacción catalítica no incluye un proceso de oxidación/reducción. Por ejemplo, los biosensores que utilizan transferasas se pueden utilizar para determinar acetato [95] o en la determinación de xenobióticos [83], sustancias sintéticas que no existen en la naturaleza y que pueden participar en el metabolismo humano. También es posible encontrar biosensores en los que se inmovilicen hidrolasas, como por ejemplo para la determinación de sacarosa en muestras del sector alimentario [96]. Por otro lado, para la determinación del ácido cítrico se utilizan liasas [97] y para la determinación de mutaciones en el ADN se utilizan ligasas [98].

La inmensa cantidad de enzimas disponibles ofrece una gran flexibilidad en el desarrollo de biosensores. El tipo de reacción que cataliza el enzima escogido va a definir el tipo de elemento transductor sobre el que se desarrollará el biosensor. Como se ha mencionado anteriormente, normalmente los biosensores enzimáticos suelen ser biosensores electroquímicos, ya que la sensibilidad y rapidez de las técnicas electroquímicas con la elevada especificidad de las reacciones biológicas.

Al diseñar un biosensor enzimático es importante tener en cuenta diversos factores, como por ejemplo la estabilidad operacional o la capacidad de uso del dispositivo a largo término. La estabilidad operacional es función de la afinidad que sienta el enzima por la superficie del transductor, mientras que la capacidad de utilización a largo término depende de la estabilidad del enzima en las condiciones de medida y de la capacidad de las técnicas de inmovilización para retener el enzima sobre el transductor sin que éste sufra modificaciones. Por tanto, la inmovilización de los enzimas es un paso clave durante la preparación de sensores enzimáticos. Existen distintas técnicas para inmovilizar el elemento bioreceptor y se debe escoger la más adecuada en función de las características del propio bioreceptor. En el apartado siguiente se presentan los principales métodos de inmovilización que se pueden utilizar en el diseño de un biosensor.

1.2.2. Métodos de inmovilización de los bioreceptores

Uno de los parámetros clave para el correcto funcionamiento de un biosensor, es la inmovilización del elemento bioreceptor sobre la superficie del transductor [99]. El proceso de inmovilización debe hacerse de tal modo que se mantenga la estructura tridimensional activa del bioreceptor y su orientación espacial. Además, tanto el analito como los productos derivados de la reacción biológica tienen que poder difundir entre el sitio activo en el que tiene lugar la reacción y la matriz de la muestra [100].

El proceso de inmovilización es importante, independientemente del tipo de bioreceptor que se utilice para el desarrollo del biosensor. Sin embargo, este proceso es especialmente significativo cuando se trata de biosensores enzimáticos. La mayoría de los enzimas que se utilizan en el desarrollo de biosensores son proteínas globulares. Las proteínas globulares, como la GOx, pueden presentar al menos en cuatro conformaciones diferentes, que surgen en el proceso de plegamiento/desplegamiento que tienen lugar en el proceso catalítico. Entonces, es posible que la proteína presente su estructura nativa (N), que mantiene toda la actividad catalítica, una estructura intermedia, como el estado de glóbulo fundido (MG) o el estado de glóbulo pre-fundido (PMG), o bien el estado desplegado (U), que no presenta actividad enzimática [101] (ver Figura 1.15). Cada una de estas estructuras depende de diversos factores externos, como la temperatura o el pH del medio. Por ejemplo, se conoce que el patrón de plegamiento/desplegamiento de la glucosa oxidasa es función del pH; a pH 7,0 es estable la conformación nativa de la GOx, mientras que a pH más ácidos que 6,0 la proteína empieza a adoptar la conformación de los intermedios [102,103]. Esto es importante desde el punto de vista de la inmovilización de los enzimas para el diseño de biosensores, ya que las características de la matriz de inmovilización van a condicionar la conformación que adoptarán las moléculas de enzima. Si durante el proceso de inmovilización se retiene una gran cantidad de moléculas de enzima, pero la mayor parte de ellas presentan una conformación no activa, la sensibilidad del dispositivo final se verá comprometida. Por tanto, el proceso de inmovilización no será provechoso.

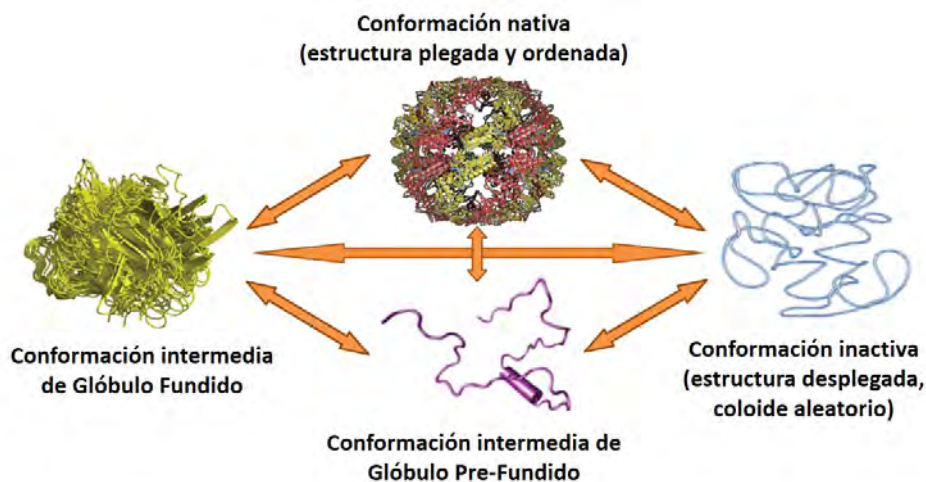


Figura 1.15. Estructuras conformacionales que pueden adoptar las proteínas cuaternarias durante el proceso de plegamiento/desplegamiento [104].

Existen un gran número de técnicas de inmovilización que pueden utilizarse en el desarrollo de biosensores. La elección del método de anclaje es función de las características del propio bioreceptor, así como de otros factores extrínsecos de la molécula inmovilizada. Por ejemplo, si se pretende desarrollar un biosensor implantable, los materiales utilizados en su fabricación, incluyendo la etapa de inmovilización, deberán ser biocompatibles y no tóxicos. Además, la simplicidad y el coste del proceso de inmovilización son dos puntos clave para la elección de este, sobre todo pensando en la producción a gran escala del dispositivo final. Finalmente, el método de inmovilización elegido debe garantizar la estabilidad del bioreceptor en las condiciones de uso y almacenaje del dispositivo desarrollado.

En los últimos años, se ha desarrollado una amplia variedad de métodos para ensamblar el elemento bioreceptor con el elemento transductor [105]. Por ejemplo, el confinamiento de una disolución de enzima entre una membrana de permeabilidad selectiva y la superficie del transductor era un método muy utilizado en los inicios del desarrollo de biosensores enzimáticos. Sin embargo, este sistema no es muy estable y no permite la producción de sensores a gran escala, por lo que no es un método muy utilizado actualmente. En la Figura 1.16, se muestran los métodos de inmovilización más utilizados en los últimos años.

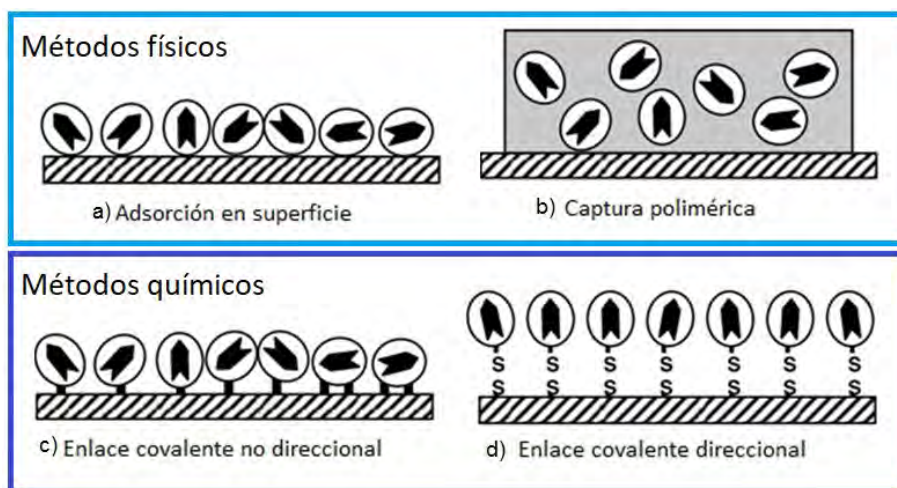


Figura 1.16. Métodos de inmovilización del elemento bioreceptor sobre un transductor [106].

Los métodos de inmovilización se clasifican en dos grandes grupos: métodos físicos y métodos químicos. Los métodos físicos son la adsorción (Figura 1.16.a) y la captura polimérica (Figura 1.16.b), mientras que la formación de enlaces covalentes (Figura 1.16.c y Figura 1.16.d) entra en la categoría de método de inmovilización químico. Los métodos de inmovilización físicos son más sencillos que los métodos químicos y, además, se pueden utilizar sobre prácticamente cualquier tipo de bioreceptor ya que perturban relativamente poco la naturaleza del bioreceptor.

De entre todas las técnicas de inmovilización, la adsorción es la más simple y la más versátil, ya que permite retener prácticamente cualquier tipo de bioreceptor sobre un soporte adsorbente. Aunque también es la técnica que ofrece menor estabilidad al sistema porque es muy sencillo que los elementos adsorbidos se desorban después de realizar una medida. Por este motivo, las investigaciones relacionadas con el desarrollo de nuevos biosensores se centran

en técnicas de inmovilización distintas a la adsorción, como la captura polimérica o bien métodos químicos. Utilizando estas técnicas, es posible obtener biosensores más estables en el tiempo, ya que la unión entre el bioreceptor y la superficie del transductor es una unión permanente. Sin embargo, los procesos son más complejos y requieren más recursos.

Como se ha mencionado anteriormente, existe un amplio espectro de protocolos de inmovilización en el marco de la biotecnología, de los que puede beneficiarse enormemente el campo de los biosensores. A continuación, se explican en más detalle las técnicas de inmovilización más importantes y utilizadas en los últimos años para el desarrollo de nuevos biosensores.

1.2.2.1. Membranas poliméricas

Dentro de los métodos físicos de inmovilización, se encuentra el confinamiento en una película polimérica. Se trata de un método sencillo de inmovilización, en el que el elemento bioreceptor queda retenido entre la superficie del elemento transductor y una fina película de un material polimérico. De este modo, se obtiene una estructura de sándwich, en la que el elemento bioreceptor no puede escapar. Al aplicar esta técnica de inmovilización, se obtienen biosensores con vidas útiles más elevadas en comparación con la adsorción. El confinamiento polimérico es un método sencillo que no requiere una gran cantidad de reactivos. Solamente son necesarios polímeros capaces de retener el bioreceptor sin modificar ni su estructura ni su actividad biológica, y que sean permeables al analito de interés, para que la reacción biológica pueda tener lugar. Hay un gran número de polímeros que pueden utilizarse con esta finalidad, entre los que cabe destacar el Nafion, el acetato de celulosa y el polipirrol.

El Nafion es una resina polimérica perfluorada que contiene grupos sulfonatos (ver Figura 1.17). Estos grupos crean zonas hidrófilas en la estructura de la membrana, mientras que las cadenas perfluoradas son hidrofóbicas. En contacto con el agua, los grupos aniónicos se separan de los segmentos hidrofóbicos formando canales con cargas negativas. De este modo, bajo el efecto de una pequeña diferencia de potencial el Nafion permite el paso de cationes pero discrimina los aniones, eliminando un gran número de posibles interferentes en la medida del biosensor [107]. El Nafion, además de aportar selectividad al sistema, presenta una serie de propiedades que lo convierten en un material muy interesante para el desarrollo de biosensores; se trata de un material químicamente inerte, que presenta una elevada estabilidad térmica, una elevada resistencia mecánica y propiedades antiincrustantes [108]. Por todos estos motivos, el Nafion es un polímero que se utiliza en el desarrollo de biosensores, especialmente en la fabricación de biosensores enzimáticos electroquímicos [108].

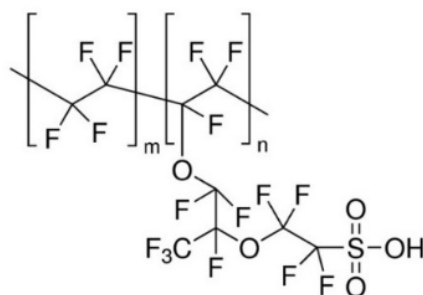


Figura 1.17. Estructura molecular del Nafion.

El Nafion ha despertado un gran interés en el desarrollo de biosensores en el entorno clínico. Esto se debe a que, dentro del cuerpo humano hay un gran número de sustancias con carga negativa que actúan de interferente en la medida de los biosensores desarrollados, como por ejemplo el ascorbato y el urato. La capacidad del Nafion para discriminar estos analitos aporta selectividad al biosensor. Un ejemplo es el biosensor enzimático de glucosa diseñado por Jinhua Chen en 2004 [109]. Este biosensor consiste en un electrodo de grafito sobre el que se depositaron nanotubos de carbono y nanopartículas de platino, para aumentar la sensibilidad del dispositivo. Seguidamente, se sumergió el electrodo en una disolución de GOx durante 12 h. Finalmente, se depositó una pequeña cantidad de disolución de Nafion y se dejó evaporar, obteniéndose de forma sencilla un biosensor selectivo de glucosa.

Otro de los polímeros que se utilizan en el desarrollo de biosensores es el acetato de celulosa [107]. La estructura polimérica del acetato de celulosa presenta huecos de un tamaño determinado, que permite la discriminación de interferentes por sus dimensiones. El acetato de celulosa retiene moléculas con un tamaño superior a 5000 Da y permite el paso de moléculas pequeñas, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno [107]. Por este motivo, el acetato de celulosa es una buena opción si la muestra presenta grandes moléculas, como proteínas. Por ejemplo, en el diseño de un biosensor de glucosa para muestras de fluidos corporales, el acetato de celulosa evita el paso de moléculas como el ácido ascórbico, la bilirrubina, la creatinina, la glicina, la cisteína, el ácido úrico y la urea [110].

Por otro lado, las membranas poliméricas conductoras son otra opción, principalmente para el desarrollo de biosensores electroquímicos. Uno de los polímeros conductores más utilizados con este propósito es el polipirrol [111]. El polipirrol se ha utilizado en el desarrollo de un gran número de biosensores electroquímicos, principalmente en biosensores enzimáticos [112–114]. Normalmente, el polipirrol se obtiene por electropolimerización a partir de su monómero, el pirrol. Una de las características más atractivas de esta membrana polimérica, es que durante la polimerización, es posible introducir las moléculas del bioreceptor en la propia estructura polimérica [111]. De este modo, el bioreceptor queda co-polimerizado en la misma membrana, que después se deposita sobre la superficie del electrodo.

1.2.2.2. *Inmovilización no-covalente sobre superficies sólidas*

Los métodos no covalentes son métodos de inmovilización físicos. Dentro de esta clasificación, el método de inmovilización más sencillo es la adsorción del bioreceptor sobre una superficie adsorbente, como el carbón activo. Generalmente, la adsorción se consigue con dos posibles métodos [57]. El primer método consiste en mantener en contacto prolongado la superficie adsorbente con una disolución que contiene la biomolécula de interés. El segundo método se basa en depositar una pequeña cantidad de disolución del bioreceptor sobre el transductor y dejar que se seque, después eliminar el exceso de moléculas que no han sido adsorbidas. Así pues, siguiendo cualquiera de los dos métodos, se forma una capa del bioreceptor sobre la superficie del transductor a la que el analito puede acceder libremente.

El método de adsorción implica una unión física directa entre el bioreceptor y un soporte insoluble, gracias a interacciones hidrofóbicas, electroestáticas, fuerzas de van der Waals o puentes de hidrógeno [115]. Gracias a la sencillez de este método es posible utilizarlo para anclar al transductor prácticamente cualquier tipo de bioreceptor. Sin embargo, el tiempo de vida útil de los biosensores obtenidos siguiendo esta técnica es más bajo en comparación con otras técnicas de inmovilización. Esto se debe a que las interacciones entre el bioreceptor y el soporte físico son débiles, por tanto, el proceso de inmovilización puede revertirse fácilmente cambiando las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura o polaridad del disolvente). Es decir, es fácil que el bioreceptor se desorba y el biosensor pierda su capacidad de detección. Por este motivo, los biosensores construidos con esta técnica normalmente ofrecen baja reproducibilidad. Además, al utilizar la inmovilización no covalente surge otro inconveniente y es que la orientación de las moléculas inmovilizadas es aleatoria.

A pesar de las limitaciones intrínsecas del método de adsorción, esta técnica se utiliza para realizar pruebas preliminares en la construcción de biosensores, por ejemplo para conocer si el elemento bioreceptor es capaz de detectar al analito de interés [116]. También es un método muy utilizado en la fabricación de biosensores desechables, en los que el tiempo de vida útil del dispositivo no es un punto crítico a tener en cuenta durante el desarrollo del mismo, ya que solamente sirven para realizar una única medida.

Al seleccionar la adsorción como método de inmovilización, uno de los puntos más importantes a tener en cuenta es el material del elemento transductor. Hay que tener presente que la adsorción ocurre por la interacción de equilibrio entre el bioreceptor (adsorbato) y los sitios de unión correspondientes en la superficie de soporte (adsorbente). Por tanto, el material del transductor debe facilitar esa interacción y ser un buen adsorbente. Hay una gran variedad de materiales que se pueden utilizar con esta finalidad, los más populares son la sílice, el carbón activo y algunos polímeros sintéticos como el policloruro de vinilo (PVC). Sin embargo, cabe destacar que en los últimos años los nanomateriales han tomado una mayor relevancia frente a los transductores convencionales [117]. Estos materiales permiten aumentar el área activa del transductor, por lo que permiten la inmovilización de un mayor número de moléculas. De este modo, se consiguen biosensores más sensibles y se mejora el rendimiento analítico general del dispositivo final.

Los nanotubos de carbono (CNT) son uno de los materiales más utilizados en el desarrollo de biosensores por adsorción (ver Figura 1.18). Esto se debe a que el carbono es un excelente adsorbente, por tanto, se inmovilizan un elevado número de biomoléculas, y a la capacidad de los CNT de promover las reacciones de transferencia de carga. Esta última característica los convierte en un material muy utilizado en el desarrollo de biosensores electroquímicos. Un ejemplo es el uso de CNT para el desarrollo de biosensores electroquímicos de glucosa [118]. La principal ventaja de estos biosensores es la sencillez del proceso de inmovilización, ya que solamente es necesario incubar la disolución de GOx durante unas 12 h sobre los nanotubos [109] o bien dejar secar unos 20 μ L de disolución de GOx sobre los mismos [119].

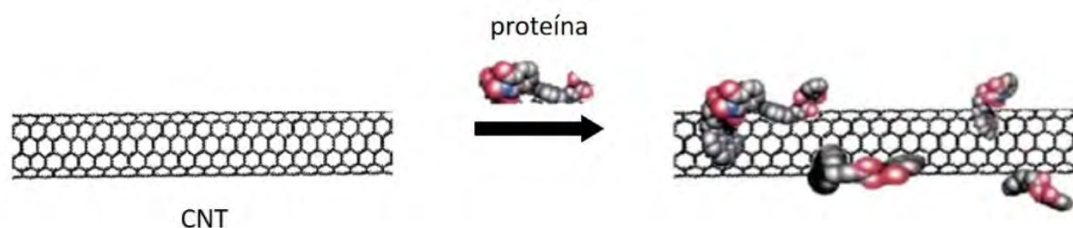


Figura 1.18. Representación del proceso de adsorción de proteínas sobre nanotubos de carbono [120].

Por otro lado, el uso de membranas de intercambio iónico representa otra alternativa dentro de las técnicas de inmovilización no covalente [116]. Estos materiales son polímeros porosos que contienen grupos cargados que pueden interactuar con moléculas que presenten una carga opuesta. De este modo, la inmovilización del bioreceptor se da por interacciones electrostáticas. El principal problema de este tipo de biosensores es que presentan baja reproducibilidad. Esto se debe a que la cantidad de moléculas inmovilizadas es función de la fuerza iónica del medio, que depende tanto de la concentración de iones como de la carga que éstos presenten. Así pues, una pequeña modificación de la fuerza iónica repercute directamente en la sensibilidad del biosensor. Por ejemplo, si la fuerza iónica es demasiado alta, es muy probable que los aniones y cationes de la disolución interactúen entre ellos, produciendo un efecto atenuador sobre el transductor. De este modo, se inmovilizará una menor cantidad de bioreceptor y se observará una disminución en la sensibilidad del biosensor.

A pesar de que las técnicas de inmovilización no covalente representan una alternativa muy sencilla en el desarrollo de biosensores, sus inconvenientes (baja reproducibilidad y estabilidad en el tiempo) hacen que muchas veces se opte por métodos más complejos. Una posible alternativa, es el uso de hidrogeles.

1.2.2.3. Hidrogeles

Una forma sencilla de inmovilización de biomoléculas para la obtención de biosensores es el encapsulamiento en hidrogeles. Esta técnica se basa en la restricción física del bioreceptor en un espacio finito. Esto se consigue aplicando una matriz tipo red que retiene el bioreceptor pero permite el paso del analito y de los productos [121]. Un hidrogel presenta una estructura

polimérica tridimensional de cadenas flexibles que tienen la capacidad de retener moléculas de agua. Cuando esto sucede, el hidrogel se hincha y aumenta de volumen. Los hidrogeles son polímeros hidrófilos y habitualmente biocompatibles, que permiten mantener un microambiente favorable para el bioreceptor. En este entorno, parámetros como el pH local o la polaridad del medio están más controlados en comparación con otras técnicas de inmovilización, por lo que aumenta la estabilidad del bioreceptor. Gracias a estas condiciones controladas, se consigue una mayor población biológicamente activa de las moléculas del bioreceptor. Por tanto, se obtienen biosensores con mayor capacidad operacional y con mayores tiempos de vida útil en comparación con otras técnicas de inmovilización.

Otra ventaja del uso de hidrogeles es que el proceso de obtención es relativamente sencillo. Habitualmente, para obtener un hidrogel es suficiente con disolver el monómero en caliente y dejar enfriar. Una vez que la disolución se enfría, se forma el hidrogel. Este es el caso de un gran número de hidrogeles, como el quitosano, el agar-agar, la carragenina, el alginato o el colágeno [122–126]. Aunque también es posible aplicar métodos más sofisticados para la obtención de hidrogeles, como por ejemplo la deposición química fotoiniciada en fase vapor (piCVD) sobre la superficie del transductor del hidrogel poli(2-(hidroxietilmetacrilato)), más conocido como poli-HEMA [127].

Existe un amplio abanico de hidrogeles que pueden utilizarse como matrices de inmovilización y principalmente se clasifican en dos grandes grupos [116]. Por un lado, se encuentran los polímeros de origen natural, entre los que cabe destacar los polisacáridos, como el quitosano, el alginato o la carragenina, y las proteínas como el colágeno o la gelatina. Por otro lado, los polímeros sintéticos, como los metacrilatos, representan una opción más versátil, ya que es posible adaptar su estructura química, su morfología y sus propiedades físicas según más convenga a la aplicación final.

Uno de los hidrogeles de origen natural más utilizados en el desarrollo de biosensores, especialmente biosensores enzimáticos, es el quitosano [81]. Se trata de un polisacárido lineal formado por cadenas de β -(1,4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina distribuidas de forma aleatoria [122]. El quitosano es un polímero de origen natural, que se obtiene industrialmente a partir de la desacetilación de la quitina, uno de los polímeros naturales más abundantes del planeta Tierra, después de la celulosa [122]. La quitina es un polímero de cadena larga que constituye el material estructural de las paredes celulares de los hongos, de la rádula de los moluscos, de los picos de los cefalópodos y de los exoesqueletos de crustáceos e insectos [128]. En la Figura 1.19 se muestran las estructuras moleculares de la quitina y del quitosano.

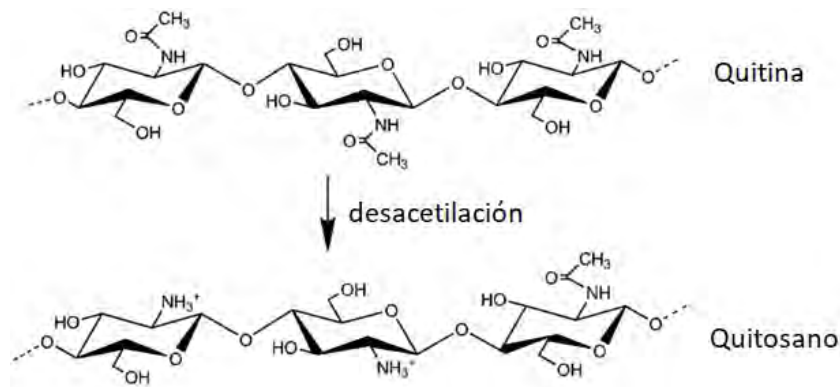


Figura 1.19. Estructura molecular de la quitina y del quitosano [129].

La estructura del quitosano le otorga propiedades químicas y biológicas únicas [81]. El quitosano es un polímero bifuncional que presenta grupos amino ($pK_a \approx 6,5$) y grupos hidroxilo. Los grupos amino hacen que se trate de una estructura catiónica, porque normalmente se encuentran protonados. El quitosano es insoluble en agua, pero gracias a la presencia de grupos amino en su estructura, es posible que se disuelva en soluciones ácidas con pH alrededor de 6,5. Para que la disolución del quitosano sea posible, permitiendo la formación de un gel, es necesario que el grado de desacetilación sea superior o igual al 80% [81]. Además, la elevada densidad de cargas positivas del quitosano permite su adhesión a superficies cargadas negativamente, se agrega con compuestos polianiónicos y es capaz de quelar iones de metales pesados. Estas propiedades, conjuntamente con su biocompatibilidad, no toxicidad y afinidad por las proteínas, entre otras, hacen que el quitosano tenga un gran abanico de aplicaciones en distintos sectores industriales [129]. Por ejemplo, el quitosano es muy interesante en el desarrollo de biosensores implantables, para dispositivos en el sector clínico o en el sector alimentario, ya que se trata de un material ecológico, biodegradable y seguro para los seres humanos.

Otro polímero natural muy interesante en el desarrollo de biosensores es la carragenina. La carragenina es un polisacárido aniónico que se extrae de las algas rojas marinas y que se utiliza mucho en la industria alimentaria como espesante y gelificante, especialmente en alimentos cárnicos [130]. Se trata de un polímero lineal de galactosa sulfatada, compuesto por unidades repetitivas de los disacáridos β -D-galactopiranososa y α -D-galactopiranososa, que se pueden enlazar por distintos puntos. En función del número y la posición de los grupos sulfato, se identifican tres tipos de carragenina primarias: iota (ι -), kappa (κ -) y lambda (λ -) carragenina [130] (ver Figura 1.20).

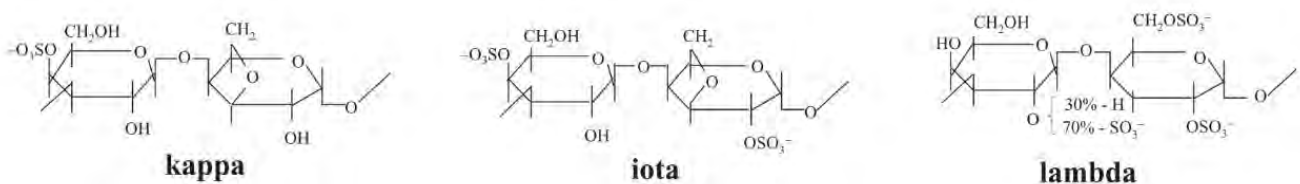


Figura 1.20. Estructura molecular de la kappa-, iota- y lambda-carragenina [131].

Los tres tipos de carragenina primarias son solubles en agua caliente, pero no todos pueden formar geles al enfriarse. La κ -carragenina y la ι -carragenina forman geles térmicamente reversibles, que varían en la textura y en la elasticidad, mientras que la λ -carragenina no gelifica [131]. Las propiedades mecánicas de la carragenina varían en función del tipo, pero también se pueden modificar añadiendo cationes a las estructuras poliméricas [132]. Las propiedades de la carragenina obtenida finalmente varían en función del catión o de la combinación de cationes que se utilicen para modificar la estructura polimérica. Por ejemplo, la κ -carragenina forma hidrogeles rígidos en presencia de Ca^{2+} y la ι -carragenina forma hidrogeles elásticos en presencia de K^+ , aunque los dos pueden interactuar con iones calcio y potasio.

Además de los hidrogeles naturales, también hay algunos hidrogeles sintéticos de gran interés en el desarrollo de biosensores. Los polímeros sintéticos presentan grupos reactivos que aportan ciertas propiedades a la matriz inmovilizadora, haciéndola más eficaz. Este es el caso de los acrilatos y los metacrilatos, polímeros cuyo grupo reactivo es un carboxilo y que forman matrices cargadas negativamente. Uno de los metacrilatos de mayor interés en el desarrollo de biosensores es el hidroxietilmetacrilato (HEMA) y sus derivados [127,133]. Los hidrogeles basados en HEMA han sido ampliamente investigados y utilizados, principalmente en aplicaciones biomédicas, debido a su no toxicidad y a su biocompatibilidad [134]. Además, es un material muy utilizado en dispositivos implantables, ya que no genera anticuerpos, por tanto, no hay rechazo por parte del paciente. Otra de sus aplicaciones principales está relacionada con la liberación controlada de medicamentos solubles en agua [134]. El HEMA es un hidrogel muy hidrófilo y normalmente es necesario utilizar un agente reticulante para controlar sus propiedades de gel y evitar que se disuelva en agua. Así pues, normalmente se obtienen hidrogeles de HEMA co-polimerizado con otro elemento que aporta rigidez a su estructura, como por ejemplo el etilenglicoldiacrilato (EGDA). En la Figura 1.21, se muestran las estructuras moleculares del HEMA y del EGDA.

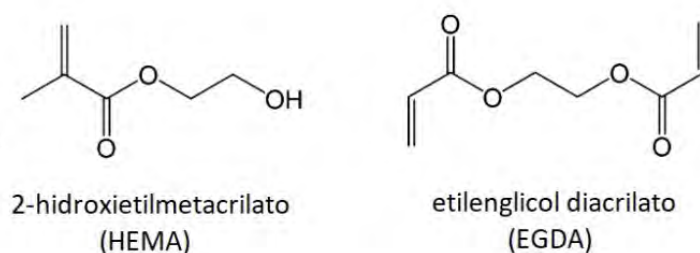


Figura 1.21. Estructuras moleculares del hidroxietilmetacrilato (HEMA) y del etilenglicoldiacrilato (EGDA).

Como se ha mencionado anteriormente, el HEMA es un hidrogel biocompatible y biodegradable utilizado en diversas aplicaciones. En el desarrollo de biosensores, se trata de una excelente matriz de inmovilización, ya que ofrece un microentorno favorable para el elemento bioreceptor, conservando su estructura biológicamente activa [135,136]. Además, los hidrogeles obtenidos de HEMA forman una red polimérica con un tamaño de malla pequeño, por lo que se evita el paso de grandes moléculas y se bloquean un gran número de posibles interferentes [127]. También se conoce que al depositar finas películas del hidrogel sobre la

superficie del transductor, este queda protegido de la posible adhesión de proteínas no deseadas, sin que su respuesta se vea alterada [127]. De este modo, se obtienen biosensores con elevadas sensibilidades.

Existen distintas formas para obtener un recubrimiento del hidrogel HEMA, entre las que cabe destacar la deposición química iniciada en fase vapor (iCVD). Se trata de un proceso de polimerización al vacío, en un solo paso y sin disolventes, en el que los monómeros en fase vapor se convierten directamente en películas poliméricas. La ventaja principal de esta técnica de polimerización es que el hidrogel obtenido no hay que purificarlo ni secarlo, ahorrando etapas de síntesis. Además, es posible personalizar la estructura y las propiedades del hidrogel obtenido de forma sencilla, solamente variando la proporción de los vapores que se dejan entrar en el reactor [134]. Para que tenga lugar la reacción de polimerización, solamente es necesario aplicar un agente iniciador para que la desencadene. Como iniciador, se puede utilizar una sustancia como el peróxido de terc-butilo (TBPO) [134] o se puede aplicar luz ultravioleta [127]. El iniciador genera radicales que, al chocar con las moléculas del monómero provocan la formación de enlaces entre ellos y empieza la polimerización (ver Figura 1.22).

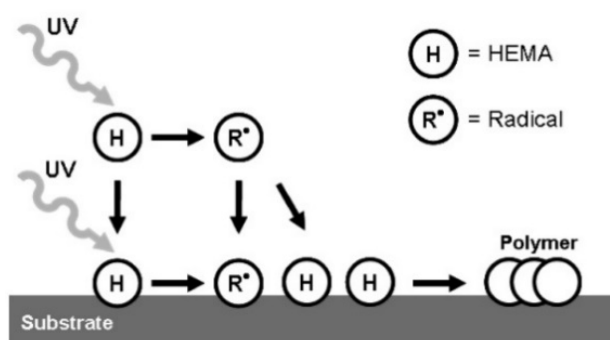


Figura 1.22. Mecanismo de polimerización del HEMA con el método de deposición química foto-iniciada de vapor (piCVD) [127].

Los hidrogeles en base HEMA resultan una opción atractiva como matrices de inmovilización debido a su versatilidad y a la facilidad de síntesis. Además de la síntesis por CVD, es posible obtener hidrogeles de HEMA por vía húmeda de forma sencilla, ya que se da la fotopolimerización cuando se somete al monómero a luz ultravioleta en presencia de un fotoiniciador [137]. Una de las ventajas de utilizar HEMA es que se puede co-polimerizar con distintos agentes para funcionalizar la membrana polimérica final. Por ejemplo, es posible inmovilizar fluoresceína en la red polimérica del hidrogel para generar un sensor de pH [138].

Además de los hidrogeles presentados en este capítulo, existen muchos otros que pueden utilizarse en el desarrollo de biosensores, por ejemplo el agar-agar [91], el colágeno [126] o la albúmina de suero bovino (BSA) [139], entre otros.

Aunque los hidrogeles presentan un gran número de ventajas como matrices de inmovilización (facilidad de aplicación, hidrofilia y biocompatibilidad) también cuentan con algunos inconvenientes. Una de las principales desventajas se focaliza en el control difusional de las diferentes especies implicadas en la reacción biológica [46,57]. Es decir, para que la reacción de

interés tenga lugar, el analito debe superar la barrera física del hidrogel y llegar hasta la zona correcta del bioreceptor. Además, normalmente la distribución del bioreceptor es irregular y la inmovilización no presenta orientación, por lo que se incrementa la dificultad de que el analito encuentre al bioreceptor. Por estos motivos, algunos autores se decantan por utilizar metodologías de inmovilización más complejas, como la formación de enlaces covalentes.

1.2.2.4. Configuración covalente

Las técnicas de inmovilización covalente consisten en la formación de enlaces covalentes entre el elemento bioreceptor y el elemento transductor. Cuando el bioreceptor se une de forma covalente al soporte, los enlaces que se forman son muy duraderos, por lo que la vida útil del biosensor suele ser elevada. Sin embargo, conseguir la formación de dichos enlaces no es sencillo. Normalmente, es necesario llevar a cabo una o varias etapas en las que se modifica la superficie del elemento transductor con grupos funcionales apropiados para la inmovilización del bioreceptor.

En comparación con otras técnicas de inmovilización, la configuración covalente es una de las más complejas, aunque también es la que ofrece una inmovilización más efectiva. Hay estudios que se centran en la comparación de los métodos de adsorción frente a los métodos de unión covalente [140]. Por ejemplo, se inmoviliza α -amilasa por adsorción y utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) para crear enlaces covalentes con el enzima y se comparan los rendimientos de inmovilización en cada caso, después de lavar los biosensores con una disolución de cloruro sódico. Para el método de adsorción sólo se inmoviliza un 20% del total de las moléculas de enzima iniciales, mientras que utilizando el método covalente se obtiene un rendimiento de inmovilización del 77%.

Como se ha mencionado anteriormente, la configuración covalente implica la vinculación entre un grupo funcional específico presente en el elemento bioreceptor y otro grupo funcional presente en el elemento transductor. Para que esto suceda, es necesario aplicar técnicas de modificación de superficie para funcionalizar correspondientemente el transductor. Los grupos funcionales que normalmente se utilizan para crear estos enlaces covalentes son aminas primarias (-NH₂), carboxilos (-COOH), alcoholes (-OH) y tioles (-SH) [141].

Una técnica muy utilizada es la de recubrir con oro la superficie del transductor y enlazar un mercaptano, como el ácido mercaptoacético o el ácido mercaptopropiónico, mediante la creación de enlaces entre el oro y el azufre. Entonces, queda libre el grupo carboxílico para que se enlace a él una amina (presente en el bioreceptor) formando un enlace amida. La formación de enlaces amida es una técnica muy utilizada en la inmovilización de enzimas, ya que contienen muchos grupos amino disponibles. Un ejemplo de inmovilización por formación de puentes disulfuro, es el caso del biosensor enzimático para detectar glucosa descrito por Degang Fu (ver Figura 1.23) [142]. El sensor consiste en un electrodo de titanio sobre el que se han hecho crecer matrices ordenadas de nanotubos de TiO₂. Sobre estos nanotubos, se depositaron nanopartículas de oro. Las nanopartículas se modifican con ácido mercaptoacético (MAA), que

se une al oro formando un enlace Au-S. Seguidamente, se activan los grupos carboxílicos del ácido mercaptoacético para que el grupo amino de la glucosa se ancle al carbonilo, utilizando EDC y NHS.

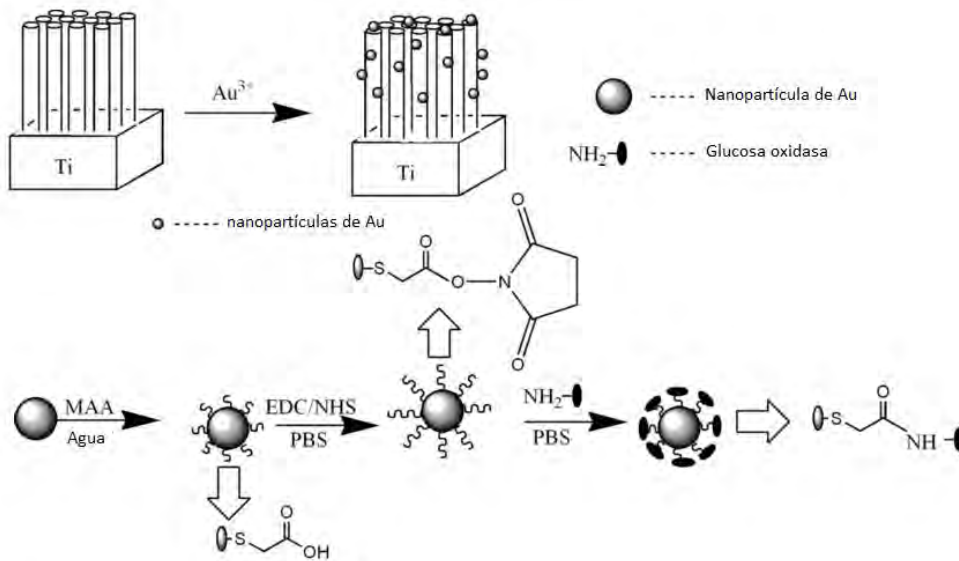


Figura 1.23. Inmovilización covalente de GOx para la generación de un biosensor [142].

También es posible recurrir a otras técnicas de modificación de superficie, como la generación por plasma de una película polimérica que recubre de forma homogénea la superficie del transductor. Uno de los polímeros más utilizados para la aplicación de esta técnica es el pentafluorofenilmetacrilato (PFM) [143–145]. El PFM ha despertado un gran interés como membrana de recubrimiento activo, ya que presenta grupos éster altamente reactivos que pueden utilizarse para enlazar covalentemente biomoléculas, así como promover la adhesión y la proliferación celular [144]. Los grupos éster que quedan expuestos en el PFM reaccionan con los grupos amino, que deben estar presentes en el elemento a inmovilizar, formando enlaces amida (ver Figura 1.24).

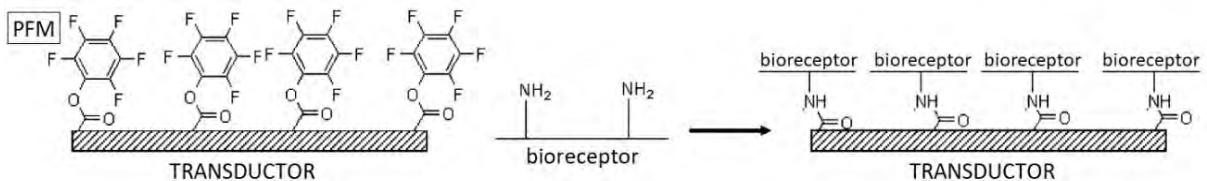


Figura 1.24. Representación esquemática de la reacción de formación de enlace covalente entre una película de PFM y un bioreceptor que contiene grupos amino en su estructura [145].

La polimerización por plasma del pentafluorofenilmetacrilato permite obtener de forma sencilla recubrimientos homogéneos, sin alterar las propiedades de la superficie a recubrir. Además, el uso de PFM permite obtener superficies muy versátiles en las que se pueden inmovilizar un gran número de compuestos, siempre que presenten grupos amino en su estructura. Un ejemplo, es la inmovilización de albúmina de suero bovino (BSA), una proteína que contiene una elevada cantidad de grupos amino disponibles en su estructura, sobre soportes rígidos de poliestireno [146].

Por otro lado, si el bioreceptor de interés no contiene grupos amino en su estructura, también es posible utilizar PFM para inmovilizarlo covalentemente. En este caso, hay que añadir algún paso intermedio en el proceso de modificación de superficie para que se genere otro tipo de enlace covalente. Por ejemplo, es posible utilizar PFM para inmovilizar cadenas de ADN sobre la superficie de nanotubos de carbono [147]. En este caso particular, se tiene una suspensión de nanotubos de carbono sobre un soporte de poliestireno y se recubren de una fina película de PFM, polimerizado por plasma. A continuación, se enlaza covalentemente al PFM un polietilenglicol funcionalizado con un grupo amina y un grupo tiol (TPA), de modo que se forma un enlace amida y el tiol queda expuesto para seguir reaccionando. Finalmente, se forma un puente disulfuro entre el grupo expuesto del TPA y la cadena de ADN. En la Figura 1.25, se muestra una representación esquemática de la superficie obtenida.

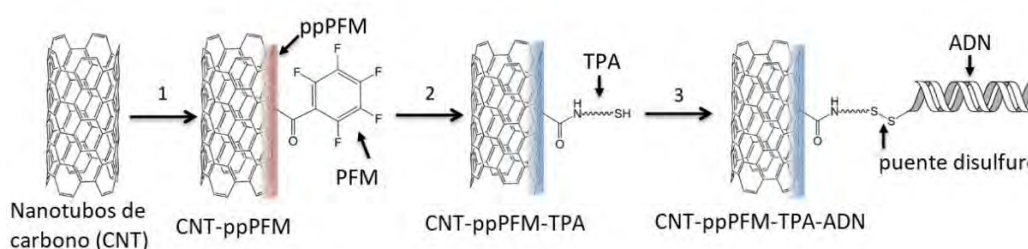


Figura 1.25. Representación esquemática de la inmovilización covalente de ADN sobre nanotubos de carbono [147].

La polimerización por plasma es una técnica que puede utilizarse con distintos polímeros, en función del grupo funcional que más convenga para la correcta inmovilización de la biomolécula de interés. De este modo, es posible obtener transductores muy versátiles que permiten la inmovilización de muchos compuestos.

Dentro de la configuración covalente, también se encuentran las técnicas de *crosslinking* [141]. Se trata de la unión de dos o más moléculas mediante la formación de enlaces covalentes, para obtener una matriz polimérica con cierto grado de reticulación. En este método, se inmoviliza el elemento bioreceptor en la misma matriz polimérica. Esto se consigue co-polimerizando el bioreceptor en la propia red polimérica. En el proceso de reticulación, se usan agentes bifuncionales para modificar las propiedades del polímero obtenido. Actualmente, las especies más utilizadas en las técnicas de *crosslinking* son los aldehídos, ya que proporcionan una ruta sencilla y en condiciones suaves, basada en la reacción entre los grupos amina para generar enlaces iminia [148]. El glutaraldehído es el compuesto más eficaz para la formación de enlaces cruzados entre las cadenas poliméricas. Sin embargo, su uso está limitado como consecuencia de su elevada toxicidad.

Normalmente, las técnicas de inmovilización covalente aportan mayor grado de dificultad en el desarrollo de un biosensor. Como se ha mencionado anteriormente, en la mayoría de los casos es necesario realizar procesos de modificación de superficie. Estos procedimientos suelen ser complejos, contar con varios pasos de síntesis y utilizar reactivos tóxicos, peligrosos o de elevado coste. Sin embargo, los enlaces obtenidos entre el bioreceptor y el transductor son mucho más resistentes en comparación con otras técnicas de inmovilización. Por tanto, hay que tener presentes distintos factores al seleccionar la mejor estrategia de inmovilización. Por un lado, el

grado de dificultad del proceso de construcción, así como el coste económico, además del tipo del tipo de bioreceptor que se vaya a inmovilizar. Y, por otro lado, hay que tener también en cuenta el material o la función de elemento transductor.

En el siguiente apartado, se explican de forma detallada los distintos tipos de transductores que existen para el desarrollo de biosensores, así como sus características principales.

1.2.3. Transductores

El elemento transductor es una parte fundamental del biosensor. Se trata del encargado de convertir la señal derivada de la reacción biológica en una señal química medible, que pueda ser interpretada por el analista.

El elemento transductor se clasifica en función del tipo de señal que es capaz de generar. Siguiendo este criterio, los biosensores se dividen, según el elemento transductor que utilicen, en tres tipos: optométricos, mecánicos y electroquímicos [141]. Los transductores optométricos generan una señal óptica (color, intensidad lumínica), los transductores mecánicos generan una respuesta mecánica (masa, temperatura) y los transductores electroquímicos generan una señal eléctrica (intensidad de corriente, potencial, conductividad).

En las últimas décadas, se han llevado a cabo un gran número de investigaciones centradas en mejorar las propiedades del elemento transductor, que han dado como resultado biosensores miniaturizados, más económicos, más rápidos y más sensibles [50]. En los siguientes apartados, se detallan las características de los principales transductores disponibles para el desarrollo de biosensores.

1.2.3.1. *Optométricos*

Los biosensores optométricos son aquellos en los que se genera una respuesta óptica medible, es decir, miden cambios en las propiedades de la radiación electromagnética. Existe una gran variedad de transductores ópticos, tantos como tipos distintos de técnicas espectroscópicas existen: transductores de absorción UV/visible, bioluminiscencia y quimioluminiscencia, fluorescencia, fosforescencia, refracción o dispersión entre otros [48].

Los biosensores ópticos proporcionan medidas directas, rápidas y en tiempo real de un gran número de sustancias químicas y biológicas [141]. Así pues, se están desarrollando diferentes biosensores ópticos para su aplicación en áreas tan diversas como el sector alimentario, la seguridad, el control medioambiental o la medicina, tanto en diagnósticos de rutina como en la investigación médica [49]. A pesar de los avances tecnológicos conseguidos, la comercialización de los biosensores ópticos es complicada. Esto se debe, principalmente, a la dificultad de integrar el bioreceptor y el transductor en un dispositivo miniaturizado, así como en el elevado coste que supone el desarrollo de biosensores ópticos [141]. Aun así, existen muchos estudios

centrados en el uso de transductores optométricos. De hecho, existe una gran variedad de biosensores ópticos, que se dividen en dos grandes grupos: los que requieren la presencia de un marcador colorimétrico, de fluorescencia o luminiscente para generar la señal medible y aquellos en los que la señal medida se genera directamente de la interacción entre el bioreceptor y el transductor [149]. De entre todos los transductores optométricos disponibles, cabe destacar los colorimétricos, los de fluorescencia y los de resonancia del plasmón superficial (SPR).

Los transductores basados en la resonancia del plasmón superficial han recibido una gran atención en los últimos años [141]. Un plasmón es la medida más pequeña o cuanto de la oscilación de un plasma, del mismo modo que un fotón es un cuanto de energía electromagnética. Es decir, un plasmón es la medida de las fluctuaciones en la densidad de cargas eléctricas que se producen en un plasma. Cuando estas fluctuaciones se dan sobre la superficie de materiales conductores, se habla de plasmón superficial. La excitación de los plasmones superficiales sobre soportes metálicos mediante luz polarizada es conocida como resonancia de plasmones superficiales (SPR) [149]. Así pues, si se aplica luz sobre la superficie metálica, se produce un movimiento de los electrones libres de conducción que ofrece resistencia para recuperar la situación inicial de equilibrio. Por tanto, se forma un sistema que funciona como un oscilador armónico donde cada cuanto es un plasmón. De esta manera, cuando la frecuencia de la luz incidente coincide con la frecuencia del plasma, en el espectro de emisión se observa una variación de la energía reflejada/transmitida que se conoce como absorción resonante [149]. Por tanto, los biosensores SPR se basan en la medición de la variación de la longitud de onda o en el ángulo de reflexión a lo largo del tiempo.

En los biosensores SPR, se inmoviliza el bioreceptor sobre la superficie metálica del transductor, de modo que cuando el analito interactúa con el elemento de reconocimiento biológico se produce un cambio en la masa adherida a la superficie. Este cambio de masa provoca una variación en la densidad electrónica superficial y, por tanto, un cambio en la absorción resonante. Este cambio es el que se monitoriza [150]. En la Figura 1.26 se muestra la representación de un biosensor SPR típico.

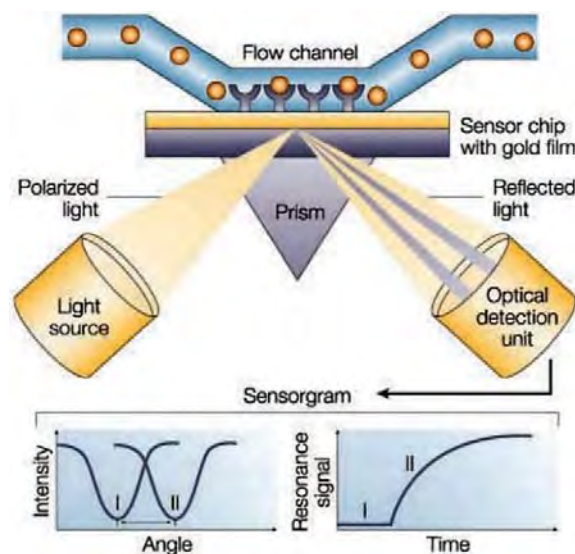


Figura 1.26. Representación esquemática de un biosensor SPR típico [150].

Los biosensores SPR han llamado mucho la atención porque permiten realizar medidas directas, sin necesidad de marcadores y a tiempo real. Sin embargo presentan algunos inconvenientes, como la complejidad del principio de funcionamiento o la baja selectividad, ya que si se adsorben compuestos sobre la superficie del transductor también se producirá un cambio en la densidad electrónica del metal, falseando los resultados [141]. Por este motivo, muchos investigadores se inclinan por utilizar otras estrategias de detección, como la absorción molecular o la fluorescencia.

Los transductores ópticos basados en la variación de la técnica de absorción molecular en la región del UV y del visible han sido ampliamente utilizados en el desarrollo de biosensores. Esto se debe a que, en muchos casos, la variable a medir es un cambio de coloración que puede verse a simple vista. Por tanto, se simplifica la instrumentación necesaria para realizar la medida.

Por otro lado, se encuentran los transductores de fluorescencia. Dentro de los biosensores ópticos, los de fluorescencia son los más utilizados debido a la elevada selectividad y sensibilidad que ofrecen [83]. En los biosensores de fluorescencia, se mide la intensidad lumínica de emisión producida cuando una sustancia en un estado energético excitado decae a su estado energético fundamental. Por ejemplo, los transductores de fluorescencia se utilizan en la inmovilización de deshidrogenasas, ya que es posible seguir el proceso de fluorescencia relacionado con la reducción/oxidación del cofactor NAD(P)H (con una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de absorción a 450 nm) [151]. Sin embargo, en la naturaleza existen relativamente pocos compuestos capaces de emitir fluorescencia. Por este motivo, la mayor parte de los biosensores de fluorescencia se consiguen mediante la utilización de marcadores fluorescentes que se inmovilizan o bien al bioreceptor o bien al analito de interés. Los marcadores fluorescentes suelen ser compuestos caros, con tiempos de vida útil cortas y están influenciados por un gran número de factores externos (pH o temperatura, entre otros) que pueden variar entre muestras [152].

1.2.3.2. *Térmicos*

Los transductores térmicos son aquellos en los que se mide un cambio en la temperatura del medio. Estos transductores se basan en la idea general de que todas las reacciones biológicas generan o absorben calor y en la capacidad de medir el cambio de temperatura que se produce [153]. Así pues, los transductores térmicos sirven para medir cambios en la temperatura al producirse la reacción biológica entre el analito y el bioreceptor. Entonces, se puede correlacionar este cambio de temperatura con la cantidad de reactivos consumidos o con la cantidad de productos formados.

En un inicio, los transductores térmicos solamente se utilizaban para la inmovilización de enzimas, aunque actualmente su uso se ha extendido a la retención de células y anticuerpos [154]. En los biosensores térmicos, el elemento bioreceptor se inmoviliza directamente sobre el elemento transductor por *crosslinking* o por encapsulamiento polimérico. En cualquier caso, el cambio de temperatura se puede realizar utilizando o bien un termistor o bien una termopila

[49]. Un termistor es un sensor de temperatura por resistencia y su funcionamiento se basa en la variación de la resistividad que presenta un semiconductor con la temperatura. En cambio, una termopila está compuesta por varios termopares conectados entre sí que miden un gradiente de temperatura y lo convierten en energía eléctrica.

La principal ventaja de los transductores térmicos es que son dispositivos muy estables, que ofrecen medidas sensibles y que permiten la miniaturización del sistema [49]. Sin embargo, también presentan inconvenientes; se trata de sistemas poco específicos, ya que cualquier reacción que tenga lugar va a generar un cambio de temperatura y es difícil mantener siempre la misma señal de fondo, por lo que disminuye la repetibilidad [48].

1.2.3.3. Mecánicos

Los transductores mecánicos son aquellos en los que se mide un cambio de presión o de la cantidad de masa depositada en la superficie del mismo transductor. Dentro de este grupo cabe destacar los transductores piezoeléctricos [141,155], que se basan en el reconocimiento de un cambio de peso producido como consecuencia de la reacción biológica de interés. En estos casos, el transductor es un cristal piezoeléctrico, que al ser sometido a una tensión mecánica vibra a una frecuencia determinada y adquiere polarización eléctrica. De este modo, al producirse un cambio en la masa del cristal éste vibra a una frecuencia diferente y se genera una diferencia de potencial determinada. Por tanto, si se inmoviliza un bioreceptor sobre el cristal piezoeléctrico, es posible medir el cambio en la masa producido por la interacción entre el bioreceptor y el analito de interés.

A pesar de que hay muchos cristales que presentan efecto piezoeléctrico, los cristales de α -cuarzo son los más usados en el desarrollo de biosensores, ya que sus propiedades químicas, mecánicas y eléctricas lo convierten en un material único [50]. En este entorno, la aplicación más extendida del α -cuarzo es para la construcción de biosensores con microbalanzas de cristal de cuarzo con disipación de energía (QCM-D) [156]. En estos dispositivos, el elemento transductor es un cristal de cuarzo sobre el que se depositan electrodos metálicos en las dos caras. Entonces, al aplicar un determinado voltaje entre los electrodos, el cristal empieza a vibrar a una determinada frecuencia (f) que se registra en continuo. Cuando se introduce otro elemento sobre el cristal, como por ejemplo el analito de interés, se produce un cambio en la frecuencia de vibración que queda registrado. En la Figura 1.27, se muestra un ejemplo de aplicación de QCM-D en el que se inmovilizan células [157].

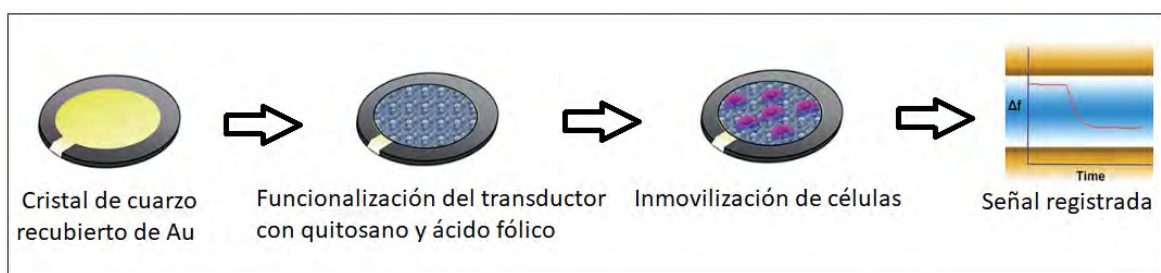


Figura 1.27. Sensor de QCM-D utilizado para determinar la presencia de células [157].

La tecnología de la QCM-D ha sido ampliamente utilizada para caracterizar procesos de inmovilización de biomoléculas como proteínas o anticuerpos, gracias a la elevada sensibilidad que ofrece frente a cambios en la masa y en la viscoelasticidad en estudios a tiempo real [158–160]. En esta configuración, la frecuencia (f) y la disipación de energía (D) provenientes de la oscilación del cristal de cuarzo, se registran simultáneamente.

Los cambios en la frecuencia se relacionan con cambios de masa. Así pues, un incremento en la masa inmovilizada en la superficie del cristal genera de forma proporcional una disminución en la señal de frecuencia registrada (Δf), siguiendo la ecuación de Sauerbrey:

$$\Delta m = -\frac{C \cdot \Delta f}{n} \quad \text{[Ecuación 1.1]}$$

Donde Δm es el cambio en la masa de la superficie del cristal ($\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}$), C es la sensibilidad másica (para una oscilación de frecuencia de 5 MHz, el valor de C equivale a $17,7 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$) y n es el número de sobretono (1, 3, 5, 7, etc.).

Por otro lado, los cambios en la disipación de energía se relacionan con las propiedades viscoelásticas de la película biológica que recubre el transductor. Por tanto, es posible registrar la señal de disipación (D) proveniente de la película depositada sobre el elemento transductor, definiendo esta disipación como la ratio entre la energía disipada y la energía almacenada durante la reacción biológica (ver Ecuación 1.2).

$$D = \frac{E_{\text{disipada}}}{2\pi \cdot E_{\text{almacenada}}} \quad \text{[Ecuación 1.2]}$$

Los biosensores construidos con transductores para QCM-D son dispositivos extremadamente sensibles. Como la variable que se mide es la variación de la masa sobre el cristal, se trata de dispositivos muy versátiles, con un amplio abanico de posibles aplicaciones. Uno de sus usos más destacados es para el desarrollo de biosensores de ácidos nucleicos, que permiten realizar determinaciones de hibridación de cadenas de ADN [156]. En estos biosensores, se inmoviliza una secuencia de ácidos nucleicos y se prueba si la muestra contiene la secuencia complementaria. Si se da la hibridación entre las cadenas, hay un aumento de peso que se refleja como una disminución en la frecuencia.

1.2.3.4. Electroquímicos

Los transductores electroquímicos son aquellos en los que la respuesta biológica se transforma en una señal eléctrica. De entre la gran variedad de transductores que existen, los electroquímicos son los más utilizados, ya que permiten seguir de forma sencilla la reacción de interés [48]. Además, los transductores electroquímicos son económicos, permiten la miniaturización del dispositivo final, son portables, la construcción del biosensor resulta sencilla y permiten trabajar con muestras complejas sin necesidad de preparativa de muestra [50]. Por estos motivos, el mercado de los biosensores está dominado por los biosensores electroquímicos [12] (ver Figura 1.28).

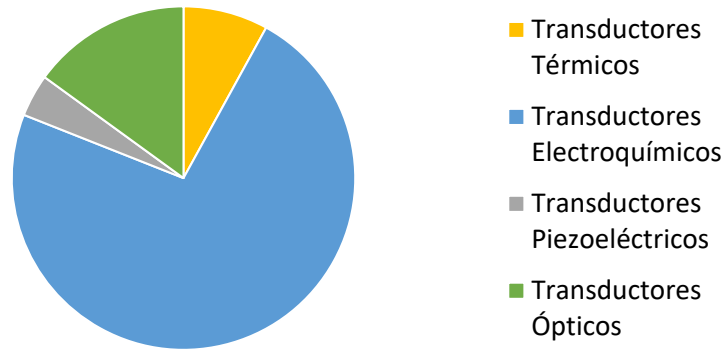


Figura 1.28. Repartición de los distintos tipos de transductores en el mercado global de los biosensores en 2014 [12].

Dentro de los transductores electroquímicos se pueden diferenciar tres subclases, en función de la propiedad eléctrica que sea medida: los sensores conductimétricos, que miden la conductividad del medio; los transductores potenciométricos, que miden una diferencia de potencial; los transductores amperométricos, que registran la intensidad de corriente. Normalmente, los transductores potenciométricos y conductimétricos son menos utilizados que los transductores amperométricos [161]. Uno de los principales motivos es la sensibilidad del dispositivo final; aunque los biosensores potenciométricos permiten realizar determinaciones en un amplio margen de concentraciones, la sensibilidad que ofrecen es menor a la de los biosensores amperométricos [8].

En cuanto a los transductores conductimétricos, su uso no está muy extendido debido a la falta de especificidad de la determinación conductimétrica. Los transductores conductimétricos miden un cambio en la conductividad eléctrica de un medio determinado, utilizando dos electrodos que están separados una cierta distancia [141]. La conductividad de una disolución depende de la variación de la movilidad de los iones presentes en el medio de medida. Cada especie iónica tiene una movilidad determinada, por tanto, si las especies del medio cambian como consecuencia de una reacción, la conductividad del medio se verá afectada. Los transductores conductimétricos miden esa variación de especies iónicas, como consecuencia de la reacción biológica de interés. Los transductores conductimétricos se han utilizado principalmente para el desarrollo de biosensores enzimáticos, ya que las reacciones enzimáticas producen cambios en la fuerza iónica del medio [141]. Por ejemplo, inmovilizando nitrato reductasa sobre la superficie de un electrodo de oro es posible determinar la presencia de nitratos en muestras de agua [162].

Por otro lado, los transductores potenciométricos se basan en la medida de la diferencia de potencial entre un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo. Los transductores potenciométricos más utilizados son los electrodos selectivos de iones como el electrodo de pH. En los biosensores potenciométricos, la concentración de analito se relaciona con el potencial medido gracias a la ecuación de Nernst (Ecuación 1.3).

$$E = K + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln Q \quad \text{[Ecuación 1.3]}$$

Donde E es el potencial registrado por el electrodo en Voltios, R es la constante universal de los gases ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T es la temperatura de trabajo en grados Kelvin, n es el número de electrones transferidos, F es la constante de Faraday (96.487 C) y Q es el coeficiente de reacción. La constante K tiene en cuenta todas las contribuciones de potencial del sistema.

Normalmente, el elemento transductor de los biosensores potenciométricos está formado por un electrodo selectivo de iones como electrodo de trabajo. Los electrodos más usados con esta finalidad son el electrodo de pH, electrodos selectivos a iones como el Na^+ , el K^+ o el NH_4^+ , y electrodos de gases como el de CO_2 [25]. Sobre el electrodo de trabajo se inmoviliza el bioreceptor y se mide la diferencia de potencial contra el electrodo de referencia, que en la mayoría de los casos está integrado al de trabajo. Un ejemplo de biosensor potenciométrico es el biosensor para determinar urea [163]. En este biosensor, se inmoviliza ureasa sobre la superficie del electrodo de trabajo, esta enzima cataliza la hidrólisis de la urea en amonio. Entonces se mide la concentración de iones amonio formados gracias a la presencia de un electrodo selectivo de iones NH_4^+ .

Por otro lado, los transductores amperométricos se basan en la medida en continuo de la intensidad que se produce durante una reacción de reducción o de oxidación. Para poder cuantificar el analito de interés presente en la muestra, se aplica una diferencia de potencial constante que permita mantener al electrodo de trabajo en la región límite del control difusional. De este modo, la intensidad registrada es directamente proporcional a la concentración de la especie de interés, siguiendo la ecuación de Cottrell pertinentemente modificada para un electrodo plano (Ecuación 1.4) [106]. Los biosensores amperométricos ofrecen respuestas rápidas y sensibles a pequeñas concentraciones de analito.

$$I_D = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad [\text{Ecuación 1.4}]$$

Donde I_D es la intensidad que circula en el estado estacionario en Amperios, n es el número de electrones que participan en la reacción, F es la constante de Faraday (96.487 C), A es el área del electrodo en cm^2 , D es el coeficiente de difusión del analito (cm^2/s), t es el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario en segundos y C es la concentración de analito en M .

Los transductores amperométricos permiten trabajar en dos modos: amperométrico y voltamétrico [7]. En el modo amperométrico, la corriente derivada de la reacción biológica se mide al aplicar un potencial constante. En cambio, en el modo voltamétrico, la corriente producida durante la reacción biológica se mide al aplicar variaciones controlada de potencial.

La principal aplicación de los transductores amperométricos es en el desarrollo de biosensores enzimáticos, ya que existe un elevado número de enzimas que participan en reacciones de reducción y oxidación [116]. Debido al gran número de reacciones enzimáticas que generan como producto peróxido de hidrógeno, normalmente los biosensores amperométricos se basan en monitorizar la intensidad de corriente generada al oxidar o reducir H_2O_2 para determinar la concentración de analito presente en la muestra. De este modo es posible obtener biosensores amperométricos enzimáticos para la determinación de glucosa (glucosa oxidasa) [164], de

colesterol (colesterol oxidasa) [88] o de capsaicina (horseradish peroxidase), el componente activo de los pimientos picantes [165], entre muchos otros compuestos.

Los transductores electroquímicos se pueden dividir en dos grandes componentes, la interfase electroquímica y el sistema electrónico. La interfase electroquímica es el material o materiales que constituyen el propio transductor, sobre el que se inmoviliza el bioreceptor. Mientras que el sistema electrónico es la componente encargada de procesar la información proveniente de las reacciones de interés. Así pues, al diseñar un biosensor electroquímico, es fundamental conocer las características de ambos componentes para maximizar las características operacionales del dispositivo final.

Interfase electroquímica

Uno de los factores más importantes para que un biosensor electroquímico funcione correctamente, es que la superficie sobre la que se inmoviliza el bioreceptor permita el paso de corriente eléctrica. Así pues, los nanomateriales metálicos o semiconductores pueden desempeñar la función de interfase electroquímica [166]. Además, debido a la elevada superficie específica que presentan estos nanomateriales, es posible inmovilizar un gran número de moléculas de enzima, aumentando la sensibilidad del sensor. También cabe mencionar, que existen distintos estudios que demuestran que la incorporación de nanopartículas metálicas a la superficie del electrodo ayuda a mejorar la actividad biológica y la estabilidad de algunas biomoléculas, como los enzimas [156, 157].

Desde la exitosa primera síntesis de nanotubos de carbono en el año 1991 [169], el interés por los nanomateriales ha ido en aumento en la comunidad científica. Otro punto clave en el desarrollo de nanoestructuras fue la síntesis de nanoporos de alúmina propuesta por Mosuda en el año 1995 [170], ya que abrió la puerta a la obtención de nanoestructuras con otros materiales, como el TiO_2 o el V_2O_5 [171]. De hecho, la obtención de nanotubos de óxido de titanio (IV) es un tema que ha despertado un gran interés en los últimos años [172]. Esto se debe a la combinación de las propiedades del óxido de titanio con la elevada superficie específica que presentan los nanotubos, que permite la inmovilización de un mayor número de biomoléculas y un aumento en la respuesta electroquímica. El óxido de titanio (IV) es un material biocompatible, es decir, que no es rechazado por los tejidos del cuerpo humano y que además es farmacológicamente inerte, no provoca reacciones alérgicas del sistema inmunitario. Así pues, las propiedades de semiconductor eléctrico y la biocompatibilidad de este material lo convierten en un elemento transductor idóneo en el diseño de biosensores electroquímicos, en entornos médicos y clínicos [172].

El óxido de titanio (IV) puede presentar distintas estructuras cristalinas (rutilo, anatasa y brookita) que presentan diferentes propiedades. El TiO_2 se encuentra de forma natural en los minerales con el mismo nombre que su estructura cristalina (ver Figura 1.29).

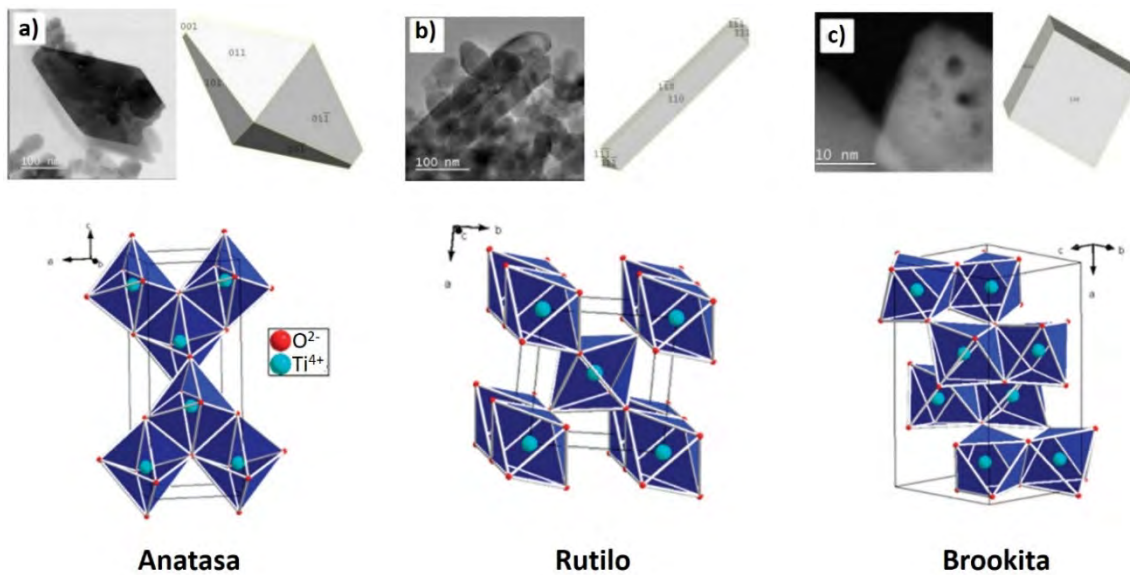


Figura 1.29. Estructuras cristalinas de los minerales de TiO_2 (a) anatasa, (b) rutilo y (c) brookita [173,174].

Tanto la anatasa como el rutilo presentan estructuras cristalinas tetragonales, aunque los ángulos interfaciales que presentan cada una de ellas son distintos. La anatasa se convierte en rutilo al ser sometida a un tratamiento térmico por encima de los $700\text{ }^\circ\text{C}$ [175]. Durante la síntesis electroquímica de TiO_2 , las estructuras que suelen formarse son amorfas. Pero es posible transformarlas en anatasa aplicando un tratamiento térmico por encima de $300\text{ }^\circ\text{C}$ [175]. De todas las estructuras del óxido de titanio, la anatasa es la más activa en cuanto a reacciones catalíticas y la que presenta una mayor biocompatibilidad.

Los nanotubos de TiO_2 presentan un gran número de aplicaciones potenciales en el sector industrial, en el campo de la medicina y en el medioambiental, gracias a la morfología que presentan, a la elevada superficie específica y a que favorecen los procesos de transferencia de carga. Por ejemplo, dentro del sector energético se está estudiando el papel que pueden desempeñar estas nanoestructuras como cátodos para las baterías de litio [176] o como catalizadores y componentes de membrana en celdas de combustible [177]. Por otro lado, también se están llevando a cabo estudios en los que se utilizan los nanotubos de dióxido de titanio como soportes de catalizadores altamente dispersados, ya que la elevada superficie específica facilita la dispersión del catalizador [178]. Además, dentro de las aplicaciones biológicas de los nanotubos de TiO_2 se está estudiando la posibilidad de utilizarlos en procesos de liberación controlada de fármacos [179], así como la posibilidad de utilizar las nanoestructuras como soporte para cultivos celulares [180].

En función de cuál sea la aplicación final de los nanotubos sintetizados, las dimensiones óptimas de los mismos van a variar. Se ha demostrado que el efecto de la morfología de las matrices de nanotubos de TiO_2 afecta a la adhesión de moléculas, a la capacidad de esparcimiento y al crecimiento y diferenciación celular [181]. Las dimensiones de estas nanoestructuras pueden controlarse en función de las condiciones de síntesis aplicadas. Existen distintos métodos para la obtención de nanotubos de TiO_2 , entre los que cabe destacar la

deposición sol-gel [182], la síntesis hidrotérmica alcalina [183] y la síntesis por anodización electroquímica del titanio [184].

Por un lado, la deposición sol-gel es un método que utiliza las propiedades morfológicas de materiales con estructuras conocidas y caracterizadas para crear un molde a partir del cual se van a obtener las nanoestructuras de TiO_2 por deposición [185]. La morfología de las nanoestructuras de óxido de titanio (IV) es función de la morfología del material que se utilice como molde. Aunque se trata de un método sencillo, presenta ciertos inconvenientes, como por ejemplo que en la mayoría de los casos hay que sacrificar el material que se utiliza para realizar el molde, por lo que se incrementa el coste de la síntesis. Para llevar a cabo la síntesis de nanomateriales de TiO_2 por deposición sol-gel, es muy importante que la superficie del material que va a actuar de molde esté completamente limpia y sin imperfecciones, para garantizar que el sol-gel se va a adherir correctamente. Entonces se prepara un gel que contenga el TiO_2 y se hace precipitar sobre la superficie del molde. Cuando el material se ha adherido correctamente, se retira el molde. El molde se puede eliminar de distintos modos, como por ejemplo por pirolisis o por disolución selectiva.

Por otro lado, la síntesis hidrotérmica alcalina consiste en someter dióxido de titanio amorfo a condiciones de elevada temperatura y presión en presencia de una base, con lo que se consigue disolver el TiO_2 inicial y recristalizarlo en forma de nanotubos. En 1998, Kasuga [186] describió por primera vez un método simple para la obtención de nanotubos de TiO_2 , en el que se trataba óxido de titanio (IV) amorfo con una disolución 10 M de NaOH a 120 °C durante 20 h y posteriormente se lavaban con HCl (0,1 N). En general, los nanotubos obtenidos al aplicar la síntesis hidrotérmica alcalina presentan una morfología multicapa, con una separación entre capas de unos 0,70 nm, presentando un rango de diámetros internos comprimido entre 2 y 20 nm [183].

En cuanto al crecimiento de nanotubos de dióxido de titanio mediante anodizado, se trata de un proceso que consiste en someter una lámina de titanio a un determinado potencial anódico durante un cierto tiempo, utilizando un electrolito adecuado, para favorecer la aparición del TiO_2 . La primera síntesis electroquímica de matrices de nanotubos de TiO_2 reportada fue la publicada por C. Grimes en 2001 [187], en la que se anodizaron láminas de Ti durante 20 min utilizando como electrolito una disolución acuosa de HF al 0,5 % y aplicando un potencial constante durante todo el proceso. El proceso de anodización descrito por Grimes se llevó a cabo en un sistema de dos electrodos. Se conectó una lámina de titanio a una fuente de potencial y se sumerge en una disolución que actúa de electrolito, para que funcione como ánodo. El cátodo se conecta a la misma fuente de potencial y se sumerge en la misma disolución electrolito, utilizándose un electrodo de platino. Al aplicar una diferencia de potencial determinada, se fuerza al movimiento de electrones, dándose la reacción de oxidación del titanio en el ánodo y la reducción del electrolito o el disolvente en el cátodo.

Durante las primeras síntesis anódicas, se desconocía el mecanismo mediante el cual se obtenían los nanotubos de TiO_2 , pero actualmente se conoce en mayor detalle este mecanismo [188,189]. En la Figura 1.30, se muestra el proceso que tiene lugar durante esta síntesis anódica.

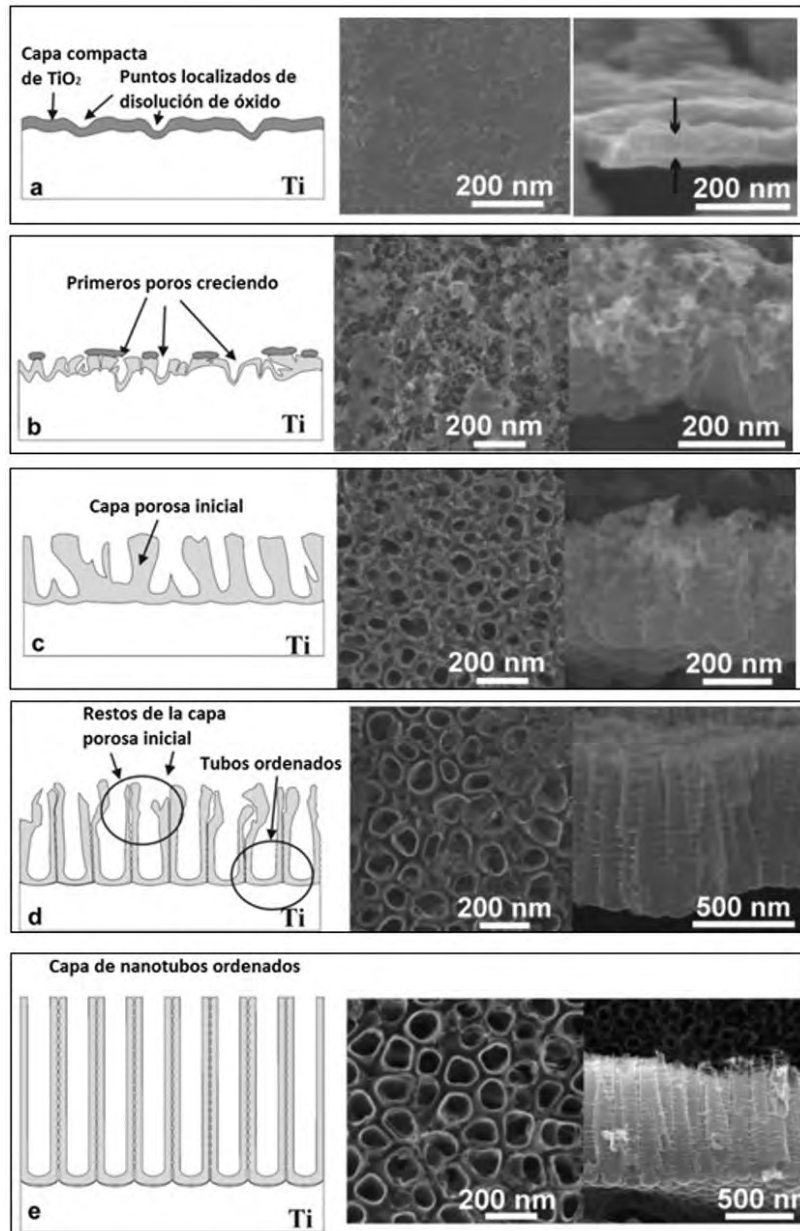
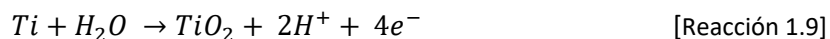


Figura 1.30. Representación esquemática y secuencia de micrografías SEM de los distintos estados de formación de nanotubos de TiO_2 por medio de anodizado. El proceso se detiene a distintos tiempos para poder tomar las micrografías SEM: (a) 0 min, (b) 3 min, (c) 10 min, (d) 30 min y (e) 1 h [190].

El proceso empieza con el crecimiento de una capa de óxido sobre la superficie metálica debido a la interacción entre los átomos del metal y los aniones O^{2-} o OH^- presentes en el medio (Figura 1.30.a). Una vez formada la capa de óxido, estos aniones migran a través de la misma hasta alcanzar la interfase metal/óxido para seguir reaccionando con el metal. Al mismo tiempo, especies catiónicas de titanio (IV) migran a través del metal hasta llegar a la misma interfase metal/óxido, donde se ven afectados por el campo eléctrico aplicado en el medio y son atraídos hasta la interfase óxido/electrolito. Este proceso es la disolución del óxido en la interfase óxido/electrolito y se trata de un proceso de disolución asistida por el campo eléctrico, ya que debido al mismo los enlaces Ti-O se ven polarizados, volviéndose más débiles y siendo más sencillo que se dé la disolución (Figura 1.30.b).

Por otro lado, quedan aniones O^{2-} libres, que viajan de nuevo a través de la interfase metal/óxido y reaccionan otra vez con la superficie metálica. De este modo, se da un proceso de disolución química del metal (formación del óxido metálico), forzado por la acidez del electrolito que favorece el movimiento de cargas. Las reacciones químicas que tienen lugar durante este proceso se muestran a continuación [188].

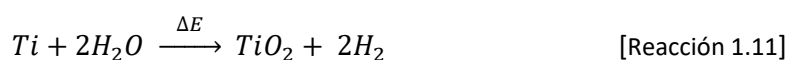
En el ánodo la oxidación del metal:



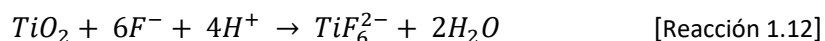
En el cátodo la reducción del disolvente:



La reacción global de formación del óxido de titanio:



Para que se dé la primera etapa del proceso de formación de la matriz de nanotubos de TiO_2 , el electrolito debe permitir tanto la formación del óxido como su disolución, creando un equilibrio entre ambos procesos. Para conseguir este equilibrio, es importante tener en cuenta que la solubilidad del TiO_2 es menor en medios alcalinos o neutros que en medios ácidos. Por ese motivo, se usan como electrolitos disoluciones ácidas. Además, también se suelen incorporar aniones fluoruro a los electrolitos, ya que ayudan a la disolución del óxido en pequeñas zonas muy localizadas, siguiendo la reacción que se describe a continuación [188].



En las primeras etapas del proceso de anodizado, la disolución asistida por el campo eléctrico domina sobre la disolución química del metal, debido al relativamente fuerte campo eléctrico que se forma sobre toda la superficie de la fina capa de óxido. En ese punto del proceso, se da la disolución muy localizada de pequeñas zonas del óxido que forman pequeños agujeros en la capa de pasivación. Esta disolución localizada en la capa de TiO_2 se explica mediante la Reacción 1.12, ya que los aniones fluoruro atacan al óxido creando pequeños centros de formación de poros, que con el tiempo van a hacerse más grandes y más numerosos por toda la superficie (Figura 1.30.c).

Por otro lado, la migración de especies catiónicas de titanio (IV) desde el metal hasta la interfase óxido/electrolito provoca la formación de más TiO_2 . De este modo, la velocidad de crecimiento del óxido se iguala a la velocidad de disolución del mismo, haciendo que el grosor de la capa de pasivación permanezca constante. Sin embargo, la profundidad de los poros sigue creciendo (Figura 1.30.d). Los poros dejan de crecer, formándose una matriz perfectamente ordenada, cuando la velocidad de disolución del óxido de titanio presente en la boca de los tubos se iguala a la velocidad de formación de óxido en la base del tubo (Figura 1.30.e). El crecimiento de los nanotubos de TiO_2 se debe fundamentalmente al equilibrio entre la oxidación electroquímica y la disolución química.

Al estudiar la respuesta a lo largo del tiempo de una lámina de titanio sometida al proceso de anodizado descrito anteriormente, pero en ausencia de iones fluoruro, la curva intensidad-tiempo registrada decrece de forma exponencial y no vuelve a crecer, como puede verse en la Figura 1.31. En cambio, al estudiar como varía la intensidad a lo largo del tiempo de una lámina de titanio sometida al mismo proceso en un medio rico en fluoruros, se observa como la curva obtenida decrece al principio y luego vuelve a aumentar. La disminución inicial de la intensidad es consecuencia del aumento de la resistencia debido a la formación de la capa de pasivación. Y el posterior aumento de intensidad es debido al proceso de disolución de la capa de pasivación que da lugar a la formación de los nanotubos. Lo que indica que la presencia de iones fluoruro juega un papel importante en la obtención de matrices ordenadas de estas nanoestructuras [171].

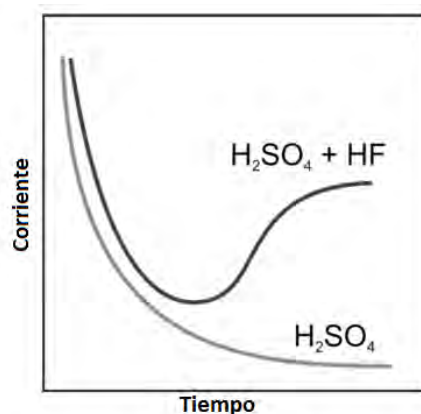


Figura 1.31. Curvas intensidad-tiempo de un proceso de anodizado de Ti en presencia y en ausencia de iones F⁻ [171].

Una de las ventajas principales de la síntesis anódica de nanotubos de TiO₂ es que las dimensiones de las estructuras obtenidas son fácilmente controlables. El diámetro del nanotubo es directamente proporcional al potencial aplicado [191]. En cambio, la longitud y el espesor de pared de los nanotubos de TiO₂ vienen determinados por la relación entre las velocidades de formación y disolución de la capa de óxido [190, 191]. La velocidad de disolución puede alterarse en función de la concentración de iones fluoruro presentes en el medio, a mayor concentración mayor velocidad de disolución. Y la velocidad de formación de TiO₂ se ve alterada en función de la facilidad que ofrezca el medio al transporte de materia. Por ejemplo, el uso de disolventes orgánicos polares en lugar de agua como electrolito, hace disminuir la tendencia de formar una capa compacta de óxido, favoreciendo la formación de nanotubos más largos. Esto se debe a la menor concentración de iones O²⁻ y OH⁻ del medio.

En la Figura 1.32 se muestra una micrografía obtenida con un microscopio electrónico de barrido con emisión de campo (FE-SEM) de nanotubos de TiO₂ sintetizados mediante un proceso de anodizado.

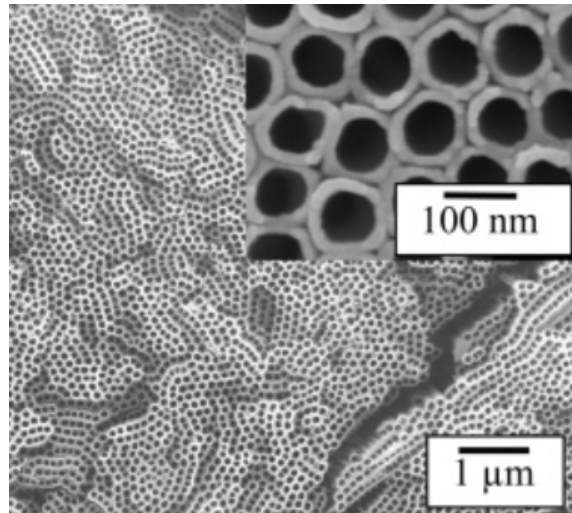


Figura 1.32. Micrografía FE-SEM de nanotubos de TiO_2 obtenidos a partir de una lámina de titanio anodizada a 60V, en un medio 0,25% NH_4F /1% H_2O en etilenglicol [193].

Como se muestra en la Figura 1.32, se obtienen matrices de nanotubos de TiO_2 que presentan distintas alturas, pero con diámetros de poro muy homogéneos. Pensando la utilidad de estas matrices como interfase electroquímica en el desarrollo de biosensores electroquímicos, la elevada uniformidad en las dimensiones de los nanotubos obtenidos es una ventaja, ya que permite mejoras considerables en la estabilidad y sensibilidad de los biosensores desarrollados [193]. Además, la elevada superficie específica que se consigue con estas interfases electroquímicas, permite la inmovilización de un mayor número de biomoléculas [194].

Así pues, gracias a todas las propiedades descritas hasta el momento, juntamente con la versatilidad que ofrece el proceso de síntesis anódica, las matrices de Ti/nanotubos de TiO_2 son un candidato idóneo para el desarrollo de biosensores.

Sistema electrónico

El sistema electrónico permite la amplificación y el procesamiento de la respuesta electroquímica generada en la interfase electroquímica. De este modo, se convierte la respuesta del biosensor en una señal que puede ser interpretada por los analistas. En la Figura 1.33, se muestran todos los componentes de un biosensor electroquímico.

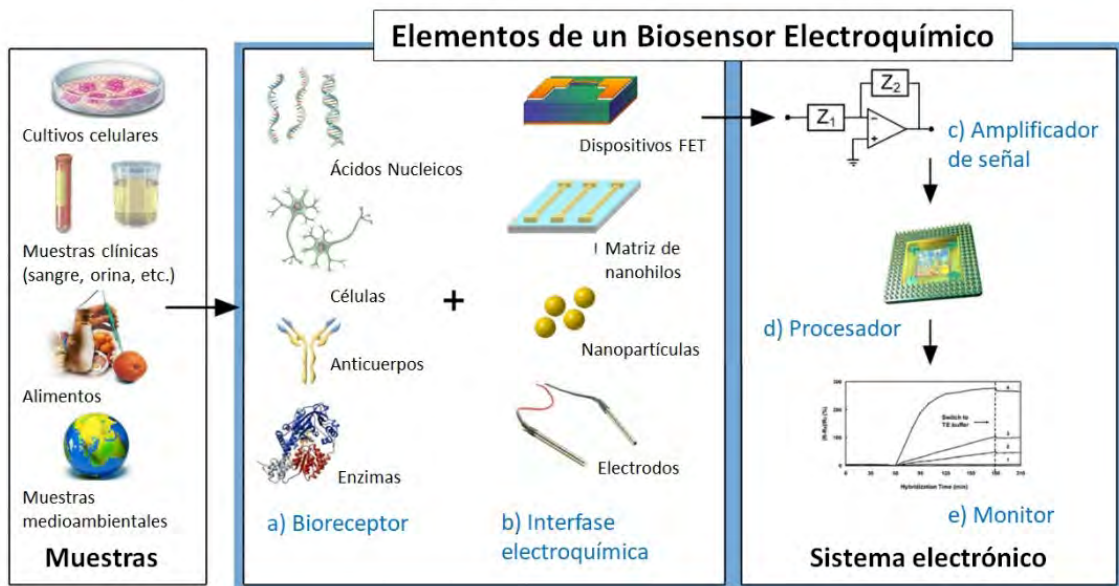


Figura 1.33. Elementos y componentes típicos de un biosensor electroquímico [7].

Como puede verse en la Figura 1.33, el sistema electrónico se compone de un amplificador de señal, un procesador y un monitor en el que se representa la señal medida. Habitualmente, el sistema electrónico de un biosensor electroquímico consiste en un instrumento capaz de aplicar un potencial controlado sobre un electrodo (potenciostato) o bien una corriente conocida en la celda electroquímica (galvanostato), permitiendo controlar y medir voltaje, intensidad y cargas, todo conectado a la celda electroquímica en la que tiene lugar la reacción [195]. La celda electroquímica puede ser un sistema con tres electrodos: electrodo de trabajo (WE), contraelectrodo (CE) y electrodo de referencia (RE). La celda electroquímica también puede ser un sistema de dos electrodos, en el que solamente participan el WE y el CE.

La mayoría de los instrumentos presentan conjuntamente la configuración de galvanostato y potenciostato, permitiendo mayor versatilidad al usuario. En modo potenciostático, se aplica un potencial conocido y se registra intensidad de corriente. Mientras que en modo galvanostático, se aplica una corriente conocida entre el electrodo de trabajo y el contra electrodo y se registra potencial. Al utilizar un potenciostato/galvanostato, se garantiza que el valor especificado por el usuario será controlado con precisión en cualquier momento durante la medición, por lo que se obtienen medidas altamente reproducibles. El instrumento está compuesto por una serie de circuitos eléctricos que permiten registrar y amplificar la señal electroquímica.

En esta configuración, se encuentran un total de tres puntos de conexión con la celda electroquímica: WE, CE y RE. De modo que, las medidas de potencial se realizan entre el RE y el WE, mientras que las medidas de corriente siempre se dan entre el WE y el CE. En algunos casos, se incluye una toma de tierra que se utiliza para eliminar el ruido eléctrico del sistema. En los sistemas de dos electrodos, los conectores correspondientes al CE y al RE se cortocircuitan.

Finalmente, la señal amplificada obtenida es procesada por un programa informático que es capaz de graficar la información para que, posteriormente, el analista pueda interpretarla.

1.3. Caracterización de biosensores

Cuando se desarrolla un biosensor, es necesario establecer procedimientos analíticos que garanticen el correcto funcionamiento del dispositivo final. Al igual que en el desarrollo de cualquier otro tipo de técnica de análisis químico, se debe realizar un proceso de calibración que garantice la fiabilidad del resultado obtenido. En caso de que los resultados obtenidos no sean satisfactorios, es necesario realizar modificaciones en el diseño del biosensor para mejorarlo. En este proceso de desarrollo y optimización, es necesario determinar una serie de parámetros analíticos relacionados con la respuesta del biosensor. Este proceso se conoce como validación.

Actualmente, los procesos de validación son un requerimiento regulatorio indispensable en muchos sectores, especialmente en la industria farmacéutica y en la industria alimentaria [196]. La *Food and Drug Administration* (FDA) define el proceso de validación como la aportación de pruebas documentales que aportan un elevado grado de confianza de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con sus especificaciones predeterminadas y atributos de calidad [196].

Al implementar un nuevo procedimiento de análisis, hay una serie de parámetros analíticos que se deben estudiar, siguiendo las indicaciones del Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH). Estos parámetros son la especificidad, la linealidad, el rango, la exactitud, la precisión, la repetibilidad, la precisión intermedia, la reproducibilidad, el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) [196]. Para cada parámetro, se definen una serie de valores límite, llamados especificaciones, que serán función del tipo de muestra a analizar, de la técnica analítica aplicada y del analito a determinar.

La validación de procedimientos analíticos en los que se incluye el uso de biosensores es un tema relativamente nuevo y existe poca bibliografía relacionada con este tema. Sin embargo, la realización de los procesos de validación es muy importante, ya que aporta fiabilidad sobre las medidas del biosensor. Además, se trata de un requisito indispensable para la comercialización del dispositivo final. Al tratarse de procedimientos que incluyen elementos biológicos, el proceso de validación debe tener en cuenta factores como la estabilidad de las biomoléculas o el tiempo de vida útil de las mismas. A continuación, se describen los parámetros analíticos más importantes que deben estudiarse durante el desarrollo de nuevos biosensores.

Rango lineal

La linealidad y el rango son dos conceptos que normalmente aparecen juntos como rango lineal. Por un lado, el rango de un procedimiento analítico es el margen de concentraciones en el que ese método concreto es apropiado. Por otro lado, la linealidad es el margen de concentraciones en el que se obtiene una respuesta lineal al aplicar ese método específico. Así pues, el rango lineal da información sobre el margen de concentraciones del analito de interés en el que el procedimiento analítico aplicado va a generar resultados exactos y precisos [196].

Para conocer el rango lineal de un método analítico, normalmente se construye una recta de calibrado; se representa la señal obtenida con el biosensor generada al añadir una concentración de analito conocida en el medio de medida. De este modo, se obtiene un gráfico en el que debe haber una zona lineal. Para determinar si realmente existe esta linealidad, la comunidad científica establece que el coeficiente de correlación (R^2) debe ser superior a 0,99 [197].

Al diseñar un biosensor, es necesario conocer cuál es la concentración promedio a la que se encuentra el analito dentro de la muestra que va a ser analizada. Entonces, hay que ajustar el rango lineal para poder realizar la determinación con la mínima preparativa de muestra posible. Por ejemplo, el rango normal de concentraciones de glucosa en sangre está comprendido entre 3 mM y 8 mM [194]. Por este motivo, los rangos de linealidad de los biosensores de glucosa actuales es relativamente amplia, aproximadamente comprendida entre 0,1 mM y 30 mM [198] y permiten la cuantificación de muestras de sangre. Sin embargo, si se desea cuantificar otro tipo de muestras sin tratar con contenidos más elevados de glucosa, como por ejemplo muestras alimentarias, esos márgenes no son suficientes.

Sensibilidad, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

La sensibilidad de un método analítico es la capacidad que este ofrece para detectar o cuantificar una pequeña cantidad de analito con suficiente fiabilidad. Cuanto más elevada es la sensibilidad, menores cantidades de analito se pueden determinar. Según la IUPAC, la sensibilidad de un método analítico se define como la pendiente de la curva de calibrado, tratándose de una característica del método de análisis que depende sólo del proceso de medida [199] (ver Figura 1.34). Por tanto, la sensibilidad es el cociente entre la variación de señal asociada a un determinado analito y la variación de su concentración o cantidad.

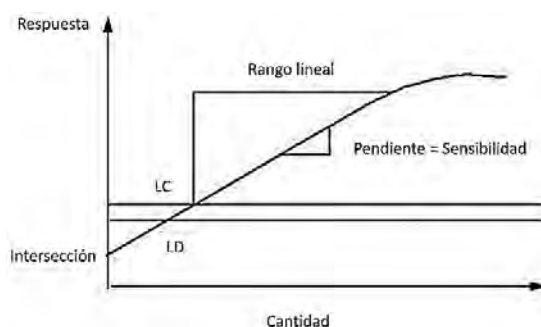


Figura 1.34. Representación del rango lineal, la sensibilidad, el límite de cuantificación y el límite de detección [200].

La sensibilidad de un método analítico está directamente relacionada con el límite de detección (LD) del mismo. El límite de detección se define como la señal proveniente de la mínima cantidad de analito que es posible detectar con suficiente certeza [199]. Es decir, es la mínima cantidad de analito que el método analítico permite diferenciar de la señal del blanco. Así pues, cuanto menor sea el LD mayor será la sensibilidad del método.

Otro parámetro analítico importante relacionado con la sensibilidad es el límite de cuantificación (LC). El LC se define como la mínima cantidad de analito que es posible cuantificar con suficiente confianza aplicando el método analítico [199]. Del mismo modo que sucede con el LD, cuanto menor sea el LC mayor será la sensibilidad del biosensor.

Exactitud y precisión

Para cualquier instrumento analítico, incluidos los biosensores, hay dos parámetros que deben cumplirse para poder definir los resultados obtenidos como fiables: la precisión y la exactitud. Por un lado, es necesario que los errores aleatorios del proceso de medida estén por debajo de un cierto nivel, de modo que las mediciones repetitivas sean reproducibles. Por otro lado, el biosensor debe ofrecer valores cercanos al valor esperado. De este modo, se obtienen biosensores precisos y exactos.

La precisión hace referencia a la dispersión del conjunto de valores obtenidos de repetidas mediciones de la concentración del analito de interés [199]. Cuando menor sea la dispersión entre las medidas, mayor será la precisión del método analítico. En cambio, la exactitud es la desviación que existe entre el valor obtenido de la determinación analítica y un valor de referencia dado [199]. En la Figura 1.35, se observa una representación de las definiciones de precisión y exactitud.

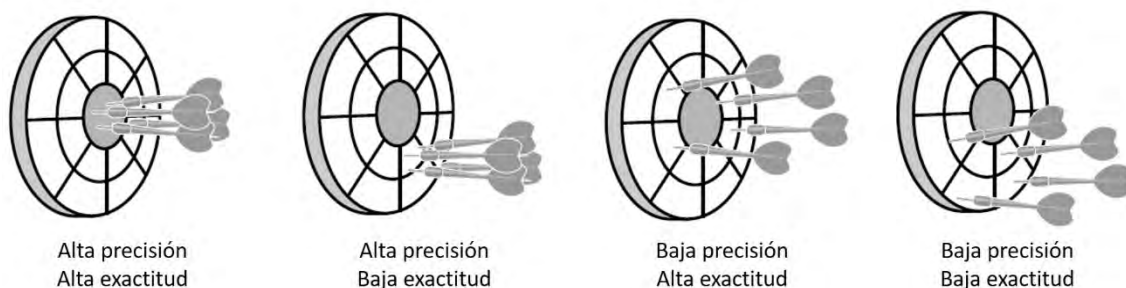


Figura 1.35. Diferenciación entre los conceptos de exactitud y precisión [201].

Para determinar la exactitud de los resultados obtenidos con un biosensor, estos se tienen que comparar con un valor de referencia. Este valor de referencia se puede obtener analizando la misma muestra con una técnica de análisis clásica, como la cromatografía, o bien se puede determinar el grado de recuperación al realizar una adición de concentración conocida de analito sobre la muestra a determinar [202]. En cambio, para determinar la precisión de los resultados obtenidos con un biosensor, es necesario realizar replicados de las determinaciones analíticas. Estos replicados se pueden realizar modificando diferentes parámetros para conocer distintos grados de precisión. Existen tres grados posibles de precisión: la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad [203].

Por un lado, la repetibilidad del método analítico se conoce al realizar varias determinaciones de la misma muestra utilizando el mismo biosensor, en el mismo laboratorio y en un periodo corto de tiempo (habitualmente en el mismo día). Cuanto menor sea la desviación entre los valores obtenidos tras cada determinación, mayor será la repetibilidad del método.

Por otro lado, la reproducibilidad se conoce al realizar varias determinaciones analíticas sobre una misma matriz utilizando distintos instrumentos (biosensores), en distintos laboratorios, en periodos de tiempo largos (habitualmente entre distintos días) y por distintos analistas. De este modo, la reproducibilidad tiene en cuenta las diferentes condiciones que pueden afectar al método de análisis.

Finalmente, la precisión intermedia es un grado medio de precisión en el que se evalúa la desviación entre las medidas al variar solamente alguna de las condiciones que pueden afectar al método analítico. Por ejemplo, la precisión intermedia se puede evaluar realizando medidas sobre una misma muestra durante distintos días con diferentes biosensores en el mismo laboratorio y con el mismo analista.

La precisión es un parámetro importante, ya que ningún resultado analítico tiene significado real si no se puede estimar el error del dispositivo de medida, el biosensor en este caso. Sin embargo, no hay mucha información en la literatura relacionada con la precisión de los biosensores desarrollados hasta el momento. Normalmente, los valores bibliográficos se limitan a valores de sensibilidad y rango lineal y prácticamente no se disponen de datos de precisión [167,204–208].-Cuando se trabaja con elementos biológicos la probabilidad de que la respuesta del dispositivo presente elevada variabilidad se incrementa frente a los dispositivos clásicos de medida. Un claro ejemplo son los biosensores enzimáticos. Al inmovilizar enzimas sobre un transductor, no siempre se va a lograr inmovilizar el mismo número de moléculas o, si se logra, no todas van a presentar la misma conformación espacial. Por tanto, la respuesta de un biosensor es mucho más variable que la respuesta de un sensor clásico.

Selectividad

La selectividad hace referencia a la capacidad del biosensor de discriminar entre el analito de interés y el resto de los compuestos presentes en la muestra. En principio, un biosensor es un dispositivo altamente selectivo, ya que el elemento bioreceptor aporta selectividad al sistema. Sin embargo, es raro encontrar un sensor que solamente responda a un único compuesto, ya sea por la falta de especificidad del bioreceptor o por la presencia de sustancias detectables por el transductor.

Los enzimas son los compuestos biológicos que aportan mayor selectividad, ya que se unen específicamente a un compuesto concreto o a un conjunto de compuestos con estructura similar [209]. Por ejemplo, la glucosa oxidasa es altamente selectiva para la glucosa en presencia de otros azúcares. Sin embargo, los biosensores amperométricos de glucosa pueden presentar como interferentes sustancias electroactivas, como el ácido ascórbico o el acetaminofén, que pueden interferir en la medida de glucosa disminuyendo la selectividad del biosensor [20].

Por tanto, al evaluar la selectividad de un biosensor, hay que tener en cuenta todas las sustancias que pueden afectar a la determinación del analito de interés. Tanto a los compuestos que pueden interactuar con el bioreceptor, como los que pueden ser directamente detectados por el elemento transductor.

Factores de tiempo: tiempo de respuesta y tiempo de vida útil

Al diseñar un biosensor, se busca que el tiempo de respuesta sea rápido para poder realizar determinaciones analíticas en el menor tiempo posible. Los biosensores requieren algún tiempo para permitir que el sistema llegue al equilibrio. Este tiempo se conoce como tiempo de

respuesta. Para los biosensores, los tiempos de respuesta pueden variar desde unos pocos segundos hasta unos minutos; hasta 5 minutos suele ser aceptable, pero si el tiempo excede 10 minutos, se considera demasiado largo [209]. En cualquier caso, los tiempos de respuesta demasiado largos normalmente se compensan en gran medida por la simplicidad de la medición y el tiempo mínimo de preparación de la muestra.

Por ejemplo, aunque la respuesta de los biosensores de glucosa actuales es prácticamente instantánea, es necesario esperar unos 60 s entre medidas para garantizar que la respuesta es estable [210].

Otro factor temporal a tener en cuenta en el desarrollo de biosensores es el tiempo de vida útil del dispositivo final. Cabe mencionar que el tiempo de vida útil de un biosensor puede estar relacionado con dos parámetros distintos: la estabilidad operacional y la estabilidad a largo plazo. En primer lugar, la estabilidad operacional hace referencia al tiempo que puede funcionar en continuo un biosensor sin perder la sensibilidad inicial. En segundo lugar, la estabilidad a largo plazo hace referencia al tiempo que puede funcionar el biosensor, aplicando periodos de reposo. En los periodos de reposo el biosensor se puede guardar en seco, pero habitualmente se conserva sumergido en una disolución adecuada y a una temperatura controlada.

El tiempo de vida útil de un biosensor principalmente está condicionado por la estabilidad del elemento biológico, que por lo general suele ser relativamente baja. Por este motivo, hay un gran número de investigaciones recientes centradas en la estabilización del elemento de reconocimiento biológico. Normalmente esta estabilización se consigue modificando las condiciones de la matriz de inmovilización. Y en todos los estudios relacionados con el desarrollo de nuevos biosensores se incluyen estudios que muestran cómo la respuesta del biosensor cambia con el tiempo en horas, días e incluso meses.

Siguiendo con el ejemplo de los biosensores amperométricos de glucosa, la estabilidad de la glucosa oxidasa en los diseños actuales permite realizar medidas con el mismo dispositivo hasta aproximadamente 60 días después de la preparación del biosensor, sin que la respuesta se vea afectada. En estos dispositivos, aproximadamente unos 90 días después de la construcción del biosensor la señal disminuye a la mitad [211]. Pero además de los biosensores de glucosa, existe una gran variedad de biosensores para la determinación de analitos muy dispares de los que también es necesario conocer sus parámetros analíticos. En el siguiente apartado, se habla sobre algunos biosensores comerciales con aplicación en el sector agroalimentario.

1.4. Biosensores comerciales en el sector agroalimentario

Desde que surgieran los primeros biosensores, la mayor parte de las investigaciones que se han llevado a cabo se han centrado en el desarrollo de dispositivos para el análisis de muestras del sector clínico. De hecho, los biosensores para aplicaciones médicas o para el cuidado de la salud son los que dominan la cuota de mercado actual [8]. A pesar de ello, el uso de biosensores en otros sectores como el agroalimentario ha experimentado un crecimiento significativo [206,

207]. En este entorno, en el que los procesos analíticos que garantizan la calidad del producto final y la seguridad del consumidor son una prioridad, los biosensores se convierten en un complemento útil de los métodos clásicos de análisis.

Debido al incremento en el nivel de exigencia en la calidad y seguridad de los productos agroalimentarios, cada vez más se requieren nuevas metodologías de análisis rápidas, sencillas y fiables para la determinación de analitos de interés. Una de las mayores preocupaciones de las empresas alimentarias es garantizar la seguridad de sus productos y, al mismo tiempo, la del consumidor final. Por este motivo, la determinación rápida y fiable de aquellos agentes que pueden provocar enfermedades o intoxicaciones se ha convertido en una prioridad [212]. Ante esta nueva necesidad de mercado, algunas empresas se están empezando a centrar en el desarrollo de biosensores con aplicaciones específicas dentro del sector agroalimentario. Estas aplicaciones se pueden clasificar en tres grandes grupos: garantía de calidad y seguridad alimentaria, control de procesos y envases inteligentes.

En primer lugar, cabe destacar que la garantía de calidad y seguridad alimentaria no es posible sin un buen sistema de control de calidad. Se dice que un producto alimentario es seguro y de calidad cuando no representa un riesgo para la salud del consumidor final. En la Tabla 1.2, se muestran algunos ejemplos de dispositivos comerciales para la garantía de calidad y seguridad alimentaria.

Tabla 1.2. Biosensores comerciales para la garantía de calidad y seguridad alimentaria [213].

	Empresa	País	Analito diana
Garantía de Calidad Alimentaria	GeneScan Europe AG/Scil Diagnostic GmbH	Alemania	NutriChip, detección de ADN
	Chemel AB	Suecia	Glucosa, sacarosa, lactato, etanol y metanol
	Oriental Electric Co.	Japón	Frescura de los alimentos: productos de degradación del ATP
	Yellow Springs Instruments Inc.	EE. UU.	Glucosa, sacarosa, lactato, lactosa, etanol, metanol y glutamato
	Pegasus Biotechnology	Canadá	Productos de degradación del ATP
Garantía de Seguridad Alimentaria	Molecular Circuitry, Inc.	EE. UU.	<i>Escherichia coli</i> O157, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> y <i>Campylobacter</i>
	Ambri Ltd	EE. UU.	<i>Salmonella</i> y <i>Enterococcus</i>
	Biosensores S.L.	España	Concentración total de microorganismos en aguas
	Motorola	Japón	Microorganismos y organismos modificados genéticamente
	Biacore GE	Mundial	Ácido fólico, biotina y antibióticos en cereales, carne, leche, miel y productos infantiles

Como se muestra en la Tabla 1.2, la determinación de azúcares es una de las más realizadas, debido a su alta incidencia en una gran cantidad de productos alimentarios y a todos los problemas de salud con los que se asocia un consumo excesivo de azúcar (diabetes, obesidad, problemas cardiovasculares, etc.) [13]. Otras de las principales preocupaciones relacionadas con la garantía de seguridad alimentaria es determinar la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos. Los productos del sector agroalimentario pueden contener bacterias y microbios que provocan enfermedades al ser humano. Existe un gran número de agentes biológicos patógenos que pueden estar presentes en los alimentos, que no varían las propiedades organolépticas del alimento. Los patógenos incluyen virus, bacterias, protozoos, trematodos, cestodos y nematodos. Algunos de los patógenos más comunes en alimentos son la *Salmonella* spp., la *Escherichia coli* y la *Listeria monocytogenes*, entre muchos otros [214]. Los métodos clásicos para la detección de patógenos son económicos y sencillos, se basan en el recuento de colonias de microorganismos que se hacen crecer en un cultivo de agar [215]. Sin embargo, estos métodos requieren varios días para poder revelar la presencia de patógenos en los alimentos. En cambio, con el uso de biosensores la determinación es mucho más rápida. De esta forma, es mucho más sencillo prevenir infecciones y epidemias. En la Figura 1.36, se muestra un ejemplo de biosensor para la determinación simultánea de *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* [216].

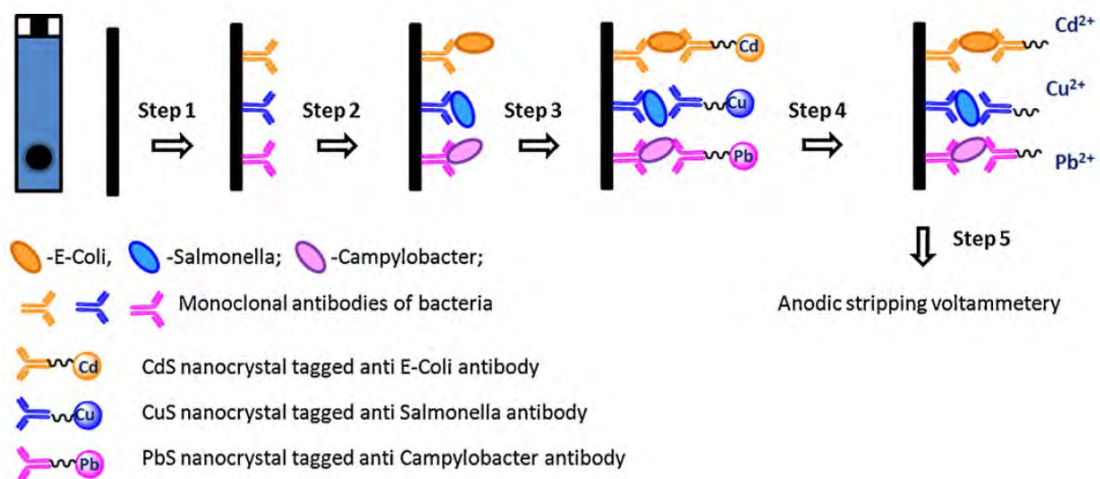
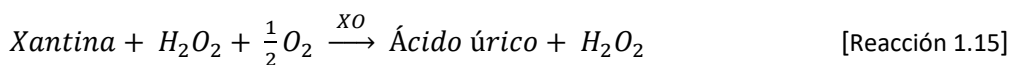
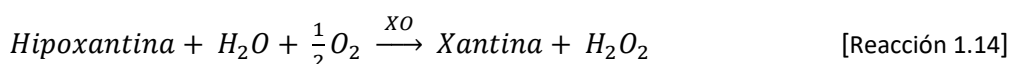
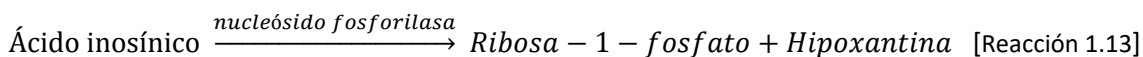


Figura 1.36. Representación esquemática de un inmunosensor electroquímico para la determinación simultánea de varios agentes patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* [216].

Por otro lado, también se han diseñado biosensores comerciales para la determinación de la frescura de los alimentos perecederos (ver Tabla 1.2). Uno de los métodos para determinar la frescura de la carne o el pescado, es medir la concentración de algunos productos de degradación del trifosfato de adenosina (ATP) como la xantina [217]. Después de la muerte del animal, el ATP se degrada rápidamente a ácido inosínico que descompone enzimáticamente produciendo hipoxantina (Reacción 1.13), que se acumula en el cuerpo del animal. Entonces, es posible cuantificar la cantidad de hipoxantina mediante la inmovilización de xantina oxidasa (XO), que cataliza la oxidación de las xantinas liberando peróxido de hidrógeno y consumiendo oxígeno (Reacción 1.14 y Reacción 1.15).



De este modo funciona el biosensor desarrollado por la empresa Pegasus Biotechnology (Canadá). Se trata de un sistema amperométrico en el que se inmovilizan los enzimas nucleósido fosforilasa y xantina oxidasa con la finalidad de transformar los productos de degradación del ATP en ácido úrico y peróxido de hidrógeno [218]. A continuación, se cuantifica el peróxido de hidrógeno producido por amperometría y se relaciona directamente con la cantidad de productos de degradación del ATP. A mayor concentración de H_2O_2 , menor frescura presenta el alimento. El biosensor desarrollado permite una determinación rápida y sencilla de la frescura del producto, permitiendo al fabricante la retirada del alimento antes de que llegue a los comercios. Así pues, se minimiza el impacto negativo que puede causar la retirada del producto fresco una vez distribuido en los establecimientos de venta. Además, se garantiza la seguridad del consumidor, evitando que sufra una intoxicación alimentaria por el consumo de productos en mal estado.

Por otro lado, la adulteración de alimentos es un tema que preocupa en el sector agroalimentario (ver Tabla 1.2). La adulteración de los alimentos es un intento deliberado de sustituir algunos ingredientes por compuestos más económicos, que imitan los atributos sensoriales y fisicoquímicos de los componentes originales [212]. Esta práctica con motivaciones económicas representa un serio problema para la garantía de la calidad y autenticidad de los productos alimentarios. Además, también representa un problema para la salud humana, ya que algunos de los productos utilizados para abaratar costes pueden desencadenar enfermedades o intoxicaciones.

Debido a la problemática que representa la adulteración de alimentos, existen algunos biosensores específicos para determinar algún tipo de adulteración. Uno de estos sistemas se basa en la detección de melamina en productos lácteos [219,220]. La presencia de melamina en productos lácteos se convirtió en una preocupación a nivel mundial a raíz del escándalo producido en China en 2008, cuando se descubrió que la empresa Sanlu adulteraba con esta sustancias sus productos para bebés, enfermando a un gran número de niños en todo el país [221]. La melamina es un compuesto rico en nitrógeno, que se añade de forma ilegal a la leche con la finalidad de aumentar el nivel aparente de proteínas, que habitualmente se determina mediante el método Kjeldahl como concentración de nitrógeno total. El consumo de leche contaminada con melamina puede causar indigestión, acidez, úlceras y cálculos renales, por lo que es necesario realizar controles de calidad para determinar la presencia de este adulterante antes de que los productos lleguen al consumidor final. Por este motivo, se propone el uso de un inmunosensor, basado en la inmovilización del anticuerpo anti-melamina sobre un transductor de resonancia de plasmones superficiales (SPR) miniaturizado [219] (ver Figura 1.37). De este modo, es posible determinar de forma rápida y efectiva la melamina presente en muestras de leche.

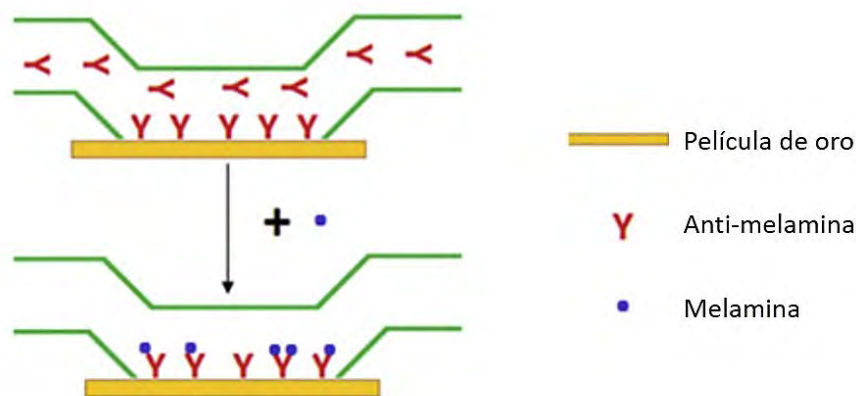


Figura 1.37. Biosensor para la determinación de melamina en productos lácteos [219].

Además de los controles de calidad establecidos para materias primas, productos intermedios o productos finales, es muy interesante tener herramientas que permitan el control en tiempo real de los procesos de producción. Por este motivo, otro de los enfoques del mercado de los biosensores alimentarios es en el control de procesos. En el control de procesos, se aplican diferentes metodologías analíticas con la finalidad de determinar y cuantificar en línea compuestos de gran importancia para controlar la productividad y la calidad del proceso. El desarrollo de dispositivos que permitan realizar análisis en continuo en las líneas de producción es imprescindible para detectar posibles errores y poder tomar decisiones antes de finalizar el producto. De este modo, se disminuyen las pérdidas económicas y los desperdicios de alimentos que provocan los errores de producción. En la Tabla 1.3, se muestran algunos biosensores comerciales diseñados para el control de procesos.

Tabla 1.3. Biosensores comerciales para el control de procesos de productos alimentarios [213].

Empresa	País	Analito diana
Universal Sensors	EE. UU.	Etanol, metanol, glucosa, sacarosa, lactosa, aminoácidos, glutamina, ácido ascórbico y oxalato
BioFuture Srl	Italia	Glucosa, fructosa, ácido málico y ácido láctico
Analox Instruments	Reino Unido, EE. UU.	Etanol, metanol, glucosa, lactato y glicerol
Nova Biomedical	EE. UU.	Glucosa, lactato, glutamato, glutamina, alcohol, sacarosa, metanol y amoníaco
NEC	Japón	Glucosa, alcohol, lactato y glicerina

Como se muestra en la Tabla 1.3, los biosensores que se están comercializando actualmente para el control de procesos se centran en la determinación de compuestos mayoritarios como azúcares, alcoholes y aminoácidos. Uno de los procesos más utilizados en la industria alimentaria es la fermentación, que implica la adición de microorganismos comestibles para realizar un proceso de oxidación anaeróbica incompleta. Se considera una técnica esencial de producción de alimentos diversos, tales como bebidas alcohólicas (como vino, cerveza o sidra), derivados lácteos (como kéfir, queso o yogur), salsas (como salsas de soja o vinagre) o pan [222]. Por este motivo, los biosensores comerciales desarrollados hasta el momento se centran en el control de parámetros importantes en procesos de fermentación, como la concentración de azúcares,

alcohol o aminoácidos. Por ejemplo, el proceso de obtención del vino incluye una primera etapa de fermentación alcohólica en la que una levadura convierte la glucosa y otros azúcares presentes en el zumo de uvas en etanol y dióxido de carbono. A continuación, se produce una segunda fermentación maloláctica que consiste en la transformación del ácido málico en ácido láctico por acción bacteriana. El ácido málico, presente en el vino recién fermentado, es el responsable de la acidez y el frescor habituales de los vinos blancos, pero no suele estar presente en vinos tintos. Por tanto, controlar los principales productos de ambas fermentaciones es imprescindible para obtener las propiedades organolépticas deseadas en el producto final. Así pues, para controlar el proceso de fermentación es imprescindible poder determinar la concentración de glucosa y de etanol en tiempo real [35].

Además de los biosensores comerciales para la garantía de calidad y seguridad alimentaria y de los dispositivos para el control de procesos, está surgiendo una nueva aplicación para los biosensores dentro del sector alimentario: el desarrollo de envases inteligentes. Se trata de biosensores integrados en el envase del alimento, que permiten determinar parámetros como la frescura o descomposición o la presencia de agentes patógenos, durante el transporte, el almacenamiento y la exposición en el mercado [223]. Mientras que los biosensores descritos hasta el momento en este capítulo están pensados para ayudar al fabricante, los envases inteligentes se centran en generar información útil para el consumidor. La idea principal es que quede constancia de que el producto que está adquiriendo el consumidor es seguro y apto para el consumo.

Actualmente, los envases inteligentes comerciales que existen son pocos. Estos se centran, principalmente, en la determinación de aminas volátiles o diferentes compuestos aromáticos como indicador de frescura. Además, también existen dispositivos que permiten la determinación de agentes patógenos [213]. Un ejemplo es el Food Sentinel System (SIRA Technologies, California, EE. UU.) que se muestra en la Figura 1.38.



Figura 1.38. Ejemplo de sistema de envase inteligente Food Sentinel System desarrollado por la empresa SIRA Technologies para la determinación de bacterias patógenas en alimentos [213].

En la Figura 1.38, se muestra un ejemplo de envase inteligente. Se trata de un sistema de inmuno-biosensor patentado en el año 2000 (EP 1018013 A1), que permite detectar de forma

continúa la presencia de bacterias contaminantes en alimentos. Se trata de una etiqueta que lleva una tinta invisible en condiciones salubres que se hace visible ante la presencia de bacterias patógenas, transformando la palabra "SAFE" en la palabra "UNSAFE". Además, el código de barras queda parcialmente oculto, imposibilitando su lectura mediante un lector de códigos de barras. El dispositivo está formado por un soporte impermeable, una segunda capa que permite el paso de sustancias por capilaridad y una tercera película impermeable que actúa de cobertura. La segunda capa es el biosensor. Ésta incluye un material absorbente que permite el flujo de jugos desde el alimento hasta la zona de medida; además también incluye una inmunodisolución que contiene el elemento de reconocimiento biológico y una zona de detección (transductor). De este modo, si el alimento está contaminado con la presencia de microorganismos, la tinta se activa y el consumidor queda advertido del riesgo de intoxicación.

A pesar de los grandes avances realizados en el desarrollo de biosensores para la industria agroalimentaria, los dispositivos obtenidos y comercializados hasta el momento siguen presentando algunas limitaciones técnicas que les impiden alcanzar la madurez comercial. Uno de los principales problemas reside en encontrar la técnica de inmovilización más adecuada para cada bioreceptor y que éste se encuentre en las condiciones óptimas de pH y temperatura necesarias para conservar su actividad biológica. Además, en muchas ocasiones las muestras a analizar son matrices complejas en las que la presencia de interferentes es muy elevada por lo que sigue siendo necesario realizar una preparativa de muestra previa a la determinación analítica [213]. Por tanto, es necesario seguir realizando investigaciones con la finalidad de mejorar algunos parámetros operacionales como la especificidad, la sensibilidad, el tiempo de respuesta, la estabilidad a largo plazo o la miniaturización e integración de los biosensores.

1.5. Nuevas oportunidades en el desarrollo de biosensores

Actualmente existen distintos biosensores comerciales con aplicación en la industria alimentaria, sin embargo, estos todavía presentan una serie de limitaciones técnicas que hay que superar. Por este motivo, hay un elevado número de investigaciones centradas en el desarrollo y en la optimización de biosensores para el sector agroalimentario [224–227]. El objetivo es lograr desarrollar dispositivos de análisis que ofrezcan respuestas rápidas, sensibles y económicamente rentables. Sin embargo, los requisitos que debe cumplir el dispositivo son diferentes en función de la naturaleza del bioreceptor y del transductor, así como de la aplicación a la que se destine el biosensor. Por ejemplo, en algunos casos puede interesar especialmente una mejora de la selectividad y sensibilidad, mientras que en otros interesa disminuir el tiempo de respuesta. Así pues, las líneas de investigación actuales con relación al desarrollo y mejora de los biosensores con aplicaciones en el sector agroalimentario presentan distintos objetivos, entre los que cabe destacar los siguientes puntos [228,229]:

- La miniaturización e integración de los dispositivos para obtener micro- y nanobiosensores. El objetivo es conseguir dispositivos compactos y portátiles que puedan ser utilizados de forma sencilla en el día a día.

- El desarrollo de sistemas multianalito. Es decir, dispositivos con capacidad para detectar diversos analitos simultáneamente en una misma muestra.
- La mejora de las estrategias de inmovilización. Si se consiguen desarrollar metodologías de inmovilización que eviten o minimicen las posibles alteraciones en la estructura del elemento de reconocimiento biológico, éste conservará su actividad biológica. Por tanto, se obtendrán biosensores más sensibles y más estables a corto y largo plazo.
- El desarrollo de nuevos biosensores para la determinación de analitos de elevado interés en matrices alimentarias.

En los últimos años, la miniaturización de los dispositivos es uno de los temas que más ha llamado la atención de la comunidad científica. La miniaturización permite obtener dispositivos más compactos y fáciles de transportar, más sencillos y fáciles de utilizar. Además, la miniaturización permite reducir el volumen de muestra y el tiempo total de ensayo y es posible integrar varios biosensores miniaturizados en un único dispositivo de medida para obtener sensores multianalito [213]. Una de las principales propuestas, se basa en unir los biosensores miniaturizados con sistemas de uso cotidiano que permitan la lectura de las medidas, como *smartphones* o tabletas electrónicas, como si fueran un solo dispositivo integrado. De esta forma, la determinación analítica puede ser realizada por cualquier persona y en cualquier lugar, sin necesidad de personal ni instrumentación altamente especializados. Un ejemplo, es el prototipo de dispositivo integrado desarrollado por Arnold Chen en 2014 [230]. Se trata de un biosensor inmunoenzimático tipo ELISA para la determinación de 2,2',4,4'-tetrabromodifeniléter (BDE-47). El BDE-47 es un agente retardante de llama muy utilizado en dispositivos electrónicos que además es un contaminante orgánico persistente. El BDE-47 se acumula en los ecosistemas y entra en la cadena alimentaria, produciendo efectos adversos para la salud humana. El dispositivo está compuesto por una serie de micro-bombas y dispositivos de microfluídica integrados en un chip e interconectados por un *smartphone* que controlar el flujo de la muestra y el proceso de reacción (ver Figura 1.39). Cabe destacar que en este diseño el *smartphone* no es solamente una interfaz pasiva para recibir información de detección, sino que también actúa como una parte activa para controlar la determinación analítica.

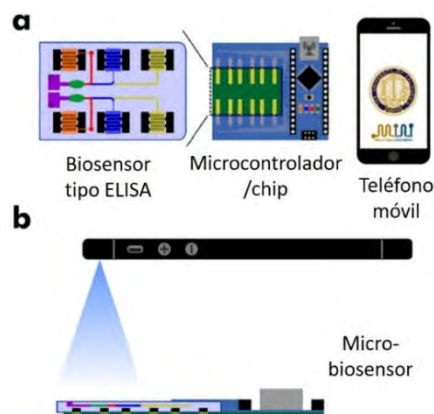


Figura 1.39. (a) Sistema integrado para la determinación del contaminante BDE-47 en muestras del sector alimentario, basado en un sistema tipo ELISA microfluídico integrado en un chip y acoplado a un teléfono móvil. (b) Representación del método de lectura mediante la cámara integrada en el smartphone acoplado al sistema de medida [230].

Una de las ventajas de la miniaturización de los biosensores es que estos son más fáciles de transportar. Dentro de la industria alimentaria, los dispositivos de medida portátiles son muy atractivos porque permiten realizar determinaciones en cualquier punto de la cadena de fabricación; desde los campos de cosecha de las materias primas hasta llegar al producto final, pasando por todas las etapas de manipulación intermedias. De esta forma, es posible realizar un control de procesos que se ajusta más a la realidad, permitiendo reducir el desperdicio de alimentos, las pérdidas económicas y los problemas asociados con los clientes.

Por otro lado, el desarrollo de biosensores portátiles y acoplados a sistemas de lectura como los teléfonos móviles no sólo son útiles para los fabricantes de alimentos, sino que también interesan al consumidor final. Actualmente, las alergias e intolerancias alimentarias se consideran un problema de salud pública de elevada relevancia en todo el mundo [152], en Estados Unidos, aproximadamente el 8% de los niños y el 3-4% de los adultos presentan algún tipo de alergia alimentaria [231]. En este contexto, una de las principales preocupaciones es la exposición involuntaria de los consumidores a aquellas sustancias que provocan la reacción alérgica, ya que normalmente pequeñas cantidades del alérgeno son suficientes para desencadenar reacciones inmunológicas que pueden ser más o menos graves. La Comunidad Europea ha fijado regulaciones de etiquetado para 14 ingredientes alimentarios alergénicos [232]. Sin embargo, estos requisitos solamente afectan a aquellos componentes utilizados como ingredientes principales, por lo que el consumidor nunca está completamente seguro de la ausencia de posibles alérgenos. Lo mismo sucede con las sustancias que provocan intolerancias alimentarias, como la lactosa o el gluten. Por este motivo, el desarrollo de biosensores capaces de determinar de forma rápida y precisa la presencia de este tipo de sustancias en un producto antes de que el consumidor lo ingiera, incluso antes de que lo llegue a comprar, es un tema que ha despertado un gran interés en la comunidad científica.

Existe un total de 160 alérgenos alimentarios identificados y el 90% de ellos están presentes en los huevos, la leche, los crustáceos, el pescado, los frutos secos y el trigo [231]. Los alérgenos de huevo, particularmente la ovoalbúmina presente en las claras de huevo, son una de las principales preocupaciones juntamente con la lactosa y el gluten. Por este motivo, existen distintos prototipos de biosensores para la determinación de estos compuestos [44,233]. Por ejemplo, se ha diseñado un prototipo de inmuno-biosensor electroquímico para la determinación de ovoalbúmina que utiliza como transductor un electrodo serigrafado de grafeno [234] (ver Figura 1.40).

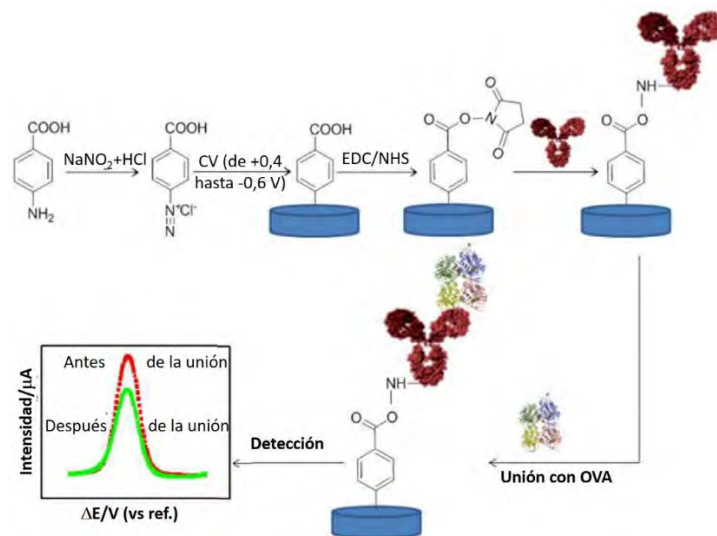


Figura 1.40. Representación esquemática del proceso de fabricación de un inmuno-biosensor amperométrico para la determinación de ovoalbúmina en muestras alimentarias [234].

Como se muestra en la Figura 1.40, sobre los electrodos serigrafados de grafito se forma un film con grupos carboxílicos reactivos expuestos que reaccionan ante la presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS). Entonces, se enlazan anticuerpos específicos para la ovoalbúmina (OVA) de forma covalente, mediante la formación de un enlace amida. En primer lugar, se realiza un blanco en ausencia de OVA, registrando la intensidad de pico al realizar una voltametría lineal sobre una disolución que contiene ferricianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$). A continuación, se adiciona la muestra que contiene la OVA. Al producirse el enlace, la intensidad de pico registrada sobre la disolución de ferricianuro de igual concentración disminuye. La disminución es proporcional a la concentración de OVA en la muestra. Este dispositivo permite realizar determinaciones suficientemente sensibles, ya que es capaz de trabajar en un rango de concentraciones comprendidos entre $1 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un límite de detección de $0,83 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ovoalbúmina. De este modo, el consumidor hipersensible a la ovoalbúmina está informado de forma instantánea de la presencia de este alérgeno y puede evitar sufrir una reacción inmunológica.

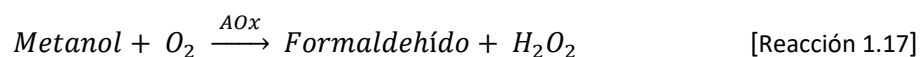
Por otro lado, las investigaciones recientes en el desarrollo de biosensores se centran en la obtención de nuevas metodologías de inmovilización que permitan mantener la estabilidad de las biomoléculas a corto y largo plazo. Existen distintas técnicas de inmovilización que pueden aplicarse en el desarrollo de un biosensor y todas ellas presentan una serie de ventajas e inconvenientes (ver capítulo 1.2.2). Por este motivo, existe mucha divergencia en los métodos de inmovilización aplicados en las investigaciones más recientes. A pesar de ello, la mayoría de los autores se inclinan o bien por la captura polimérica o bien por la formación de enlaces covalentes [220,231,235,236]. La captura polimérica se elige por la simplicidad del método, mientras que la formación de enlaces covalentes permite una unión más permanente que se suele asociar a una mayor estabilidad y sensibilidad del dispositivo desarrollado.

Además de las mejoras en la estabilidad, la sensibilidad y el rango lineal de los biosensores desarrollados, las investigaciones recientes también se centran en la obtención de dispositivos para la determinación de nuevos analitos de interés en el sector alimentario. En este entorno,

la determinación de sustancias edulcorantes es uno de los temas que más llaman la atención [237]. Debido a la preocupación generalizada por el consumo excesivo de azúcares, muchos fabricantes se han declinado por las versiones “light” o “sin azúcares”. En los productos bajos en calorías se quiere disminuir la cantidad de azúcares, pero sin renunciar al sabor que estos proporcionan. Por este motivo, la presencia de edulcorantes es habitual en un gran número de productos con la finalidad de reducir los problemas asociados a la ingesta excesiva de azúcares. Sin embargo, el abuso de edulcorantes también puede acarrear problemas de salud.

De entre todos los edulcorantes artificiales, el aspartamo es uno de los que mayor interés ha despertado en los últimos años. El aspartamo o N-(L- α -aspartil)-L-fenilalanina-1-metil éster, es un edulcorante sintético no nutritivo muy utilizado debido a su poder edulcorante; el aspartamo es 200 veces más dulce que la sacarosa [225]. Aunque el aspartamo produce la misma ingesta calórica que el azúcar (4 kcal/g) [238], se puede agregar a niveles muy bajos para lograr el mismo dulzor, por este motivo es uno de los edulcorantes artificiales más utilizados en el sector alimentario a nivel mundial. Sin embargo, hay estudios que indican que el consumo excesivo de aspartamo podría causar daños cerebrales [238]. Aunque los estudios sobre los efectos neurológicos adversos del aspartamo no son concluyentes, se cree que el consumo excesivo de este edulcorante puede causar dolor de cabeza, insomnio y convulsiones.

Por todos estos motivos, el control de los niveles de aspartamo en los productos del sector alimentario es primordial. Actualmente, la determinación de edulcorantes se lleva a cabo mediante HPLC y suele ser necesario realizar varias etapas de preparativa de muestra antes de realizar la cuantificación [239]. El uso de biosensores permite disminuir las etapas de preparativa de muestra. Una de las estrategias propuestas para la obtención de biosensores de aspartamo es la de utilizar un sistema bienzimático, en el que se inmovilizan conjuntamente carboxilesterasa (CaE) y alcohol oxidasa (AOx) [139,240]. En este sistema, la carboxilesterasa cataliza la hidrólisis del aspartamo en la que se libera metanol (Reacción 1.16). A continuación, el metanol es oxidado a formaldehído por acción del alcohol oxidasa (Reacción 1.17). En esta reacción, libera H_2O_2 que es seguido electroquímicamente.



Aunque los biosensores muestran claras ventajas sobre los métodos tradicionales de análisis, hay muchos obstáculos en su desarrollo que deben superarse para poder implementarlos completamente en el mercado actual, como se ha explicado en este capítulo. Sin embargo, de forma casi inevitable, el futuro de las técnicas de control y garantía de calidad en el sector alimentario son los biosensores [241]. Por este motivo, es muy necesario seguir realizando investigaciones para mejorar las capacidades operativas de los dispositivos desarrollados hasta el momento y acercarlos a las aplicaciones industriales reales.

2. Objetivos

2. Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis es desarrollar un dispositivo electroquímico para la construcción de biosensores amperométricos, que conste de una interfase electroquímica y de un sistema de inmovilización de enzimas. De esta manera, se dispondrá de alternativas a los métodos de análisis para determinar parámetros de control de calidad en el sector industrial. Para cumplir con este objetivo, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar una interfase electroquímica basada en una matriz de nanotubos de óxido de titanio (IV) altamente ordenados, optimizando los parámetros de síntesis y caracterizando los electrodos obtenidos.
2. Evaluar estrategias de inmovilización enzimática, tanto físicas como químicas, con el fin de optimizar la estabilidad de los enzimas, la sensibilidad de los biosensores desarrollados y el tiempo de vida útil de los mismos.
3. Determinar parámetros analíticos fundamentales como sensibilidad, límite de cuantificación, rango lineal, precisión, exactitud y tiempo de vida útil de los biosensores desarrollados.
4. Realizar determinaciones analíticas de glucosa y glutamato con muestras alimentarias para evaluar la calidad de los resultados obtenidos.

3. Resultados y discusión

3. Resultados y discusión

En la presente tesis, se han desarrollado biosensores amperométricos mediante la inmovilización de enzimas sobre la superficie de un transductor electroquímico. Para el desarrollo de estos dispositivos de análisis, se han estudiado diferentes componentes de un biosensor: la interfase electroquímica, el enzima inmovilizado y la estrategia de inmovilización. Así pues, los resultados obtenidos en esta tesis se dividen en diferentes apartados.

En primer lugar, se ha sintetizado la interfase electroquímica de nanotubos de óxido de titanio (IV) mediante un método de anodizado. Para corroborar que la síntesis ha sido satisfactoria, se estudia la morfología de los nanotubos obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido de efecto campo y se evalúa su respuesta electroquímica frente a la reducción de peróxido de hidrógeno.

Una vez obtenida la interfase electroquímica, se han desarrollado diferentes biosensores mediante la inmovilización de enzimas. Concretamente, se han desarrollado biosensores de glucosa y glutamato. Para ello, se han evaluado diferentes estrategias de inmovilización enzimática; el uso de matrices de encapsulamiento polimérico utilizando diferentes hidrogeles y la funcionalización de la interfase electroquímica con grupos reactivos que permiten la formación de enlaces covalentes con las moléculas de enzima. Las diferentes estrategias de inmovilización se han evaluado en primer lugar utilizando el enzima glucosa oxidasa (GOx). Además, se ha evaluado la conformación espacial que adoptan las moléculas de GOx una vez ancladas covalentemente sobre una superficie rígida utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación (QCM-D). Seguidamente, se han aplicado las técnicas de inmovilización más prometedoras al enzima glutamato oxidasa (GmOx) para el desarrollo de un biosensor de glutamato.

Por último, se han determinado los siguientes parámetros analíticos, para cada uno de los distintos biosensores desarrollados: la sensibilidad, el rango lineal, el límite de cuantificación y el tiempo de vida útil, entre otros. También, se han utilizado los biosensores para cuantificar la cantidad de analito presente en muestras reales y los valores obtenidos se han comparado con los valores obtenidos por HPLC.

En los siguientes apartados se detallan los resultados obtenidos al desarrollar la interfase electroquímica de los biosensores diseñados. También se detallan los diferentes métodos de inmovilización enzimática propuestos, así como los resultados obtenidos en cada caso. Por último, se muestran los parámetros analíticos determinados para cada biosensor desarrollado, así como su capacidad analítica al realizar determinaciones en muestras reales del sector alimentario.

Debido a su variedad, los métodos empleados a lo largo de esta Tesis se detallan en los apartados comprendidos entre el 3.1 y el 3.4. De esta manera, se pretende conseguir una mayor claridad en la explicación de cada uno de dichos apartados.

3.1. Interfase electroquímica

3.1.1. Síntesis electroquímica de TiO_2NTAs

Con el objetivo de desarrollar biosensores amperométricos para la determinación de distintos analitos en el sector alimentario, se lleva a cabo la preparación de una interfase electroquímica basada en una matriz de nanotubos de óxido de titanio (IV) ordenados (TiO_2NTAs). Para ello, se corta un cilindro de titanio (Alfa Aesar, ref. 010393) de 5 mm de diámetro y 50 mm de altura, con una pureza del 99,7% que se introduce en un soporte de Teflón para electrodos de disco rotatorio (RDE) como el que se muestra en la Figura 3.1.

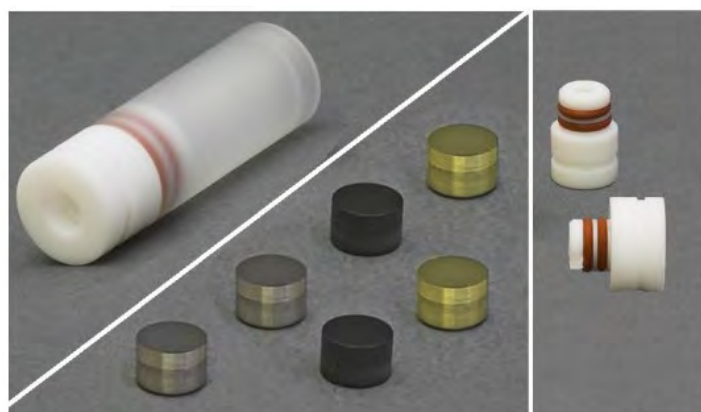


Figura 3.1. Soporte de Teflón para RDE Princeton Applied Research 616A.

Con la intención de obtener una superficie uniforme, los electrodos de titanio se pulen utilizando papel de pulir de carburo de silicio con diferentes tamaños de partícula (Grit 800, Grit 1200 y Grit 2000, Struers). Después del pulido, se desengrasa el electrodo de titanio en un baño de ultrasonidos en etanol durante 3 min.

Sobre las piezas de titanio previamente preparadas, se hacen crecer electroquímicamente matrices ordenadas de nanotubos de TiO_2 . Para ello, se lleva a cabo un proceso de anodizado utilizando un potencioestato/galvanoestato Autolab PGSTAT 302N. El proceso electroquímico se realiza un montaje de dos electrodos, utilizando como ánodo un electrodo de Ti y como contraelectrodo una lámina de Pt (20 x 7 mm). En este caso, el ánodo es un electrodo de disco rotatorio (RDE) Princeton Applied Research 616A, que permite un crecimiento homogéneo de los nanotubos ya que se genera un flujo continuo y laminar que favorece el transporte de materia desde la disolución hasta la superficie del electrodo. Para que el crecimiento electroquímico de las matrices de nanotubos sea reproducible, el polo positivo (ánodo) y el polo negativo (cátodo) se sitúan a 1,5 cm el uno del otro y se mantiene el ánodo en agitación continua de 2000 rpm (ver Figura 3.2).

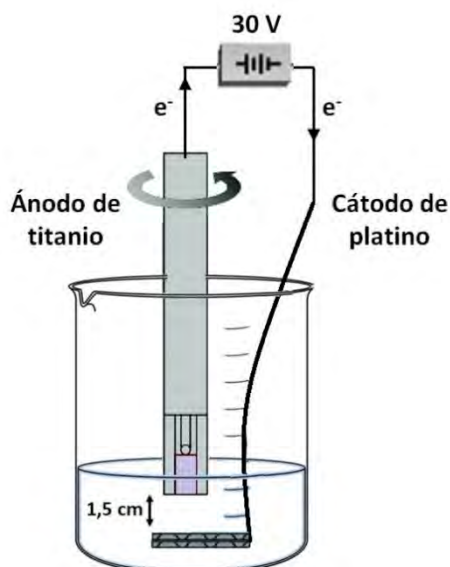


Figura 3.2. Representación esquemática de la celda electroquímica utilizada en el proceso de síntesis anódica de matrices de nanotubos de TiO_2 .

El proceso de anodizado se lleva a cabo al aplicar una diferencia de potencial de 30 V utilizando como electrolito una disolución de base etilenglicol, que contiene un 0,3% (p/p) de NH_4F y un 2% (p/p) de H_2O desionizada [193,242]. Este proceso se lleva a cabo aplicando distintos tiempos de anodizado (4 h, 8 h, 17 h y 24 h), con la finalidad de observar en qué condiciones se obtienen electrodos con mayor sensibilidad. A continuación, se lava el electrodo $\text{Ti}/\text{TiO}_2\text{NTAs}$ con agua desionizada y se introduce en un baño de ultrasonidos en agua desionizada durante 30 s para eliminar los posibles productos que se hayan podido formar sobre los nanotubos obstruyéndolos [193]. Los nanotubos de dióxido de titanio obtenidos por vía electroquímica son inicialmente amorfos, pero aplicando un tratamiento térmico es posible convertirlos a la forma cristalina: anatasa o rutilo [243,244]. Con la finalidad de obtener la fase cristalina semiconductor anatasa, se realiza un tratamiento térmico a 500 °C durante 3 h [171].

Cabe mencionar que en un trabajo previo se optimizaron algunos de los parámetros influyentes en la síntesis anódica de nanotubos de TiO_2 . Se evaluaron por ejemplo la composición del electrolito o el potencial aplicado, para obtener matrices más ordenadas y recubrimientos más homogéneos a lo largo de la superficie de los electrodos [245]. De este modo, se decidió trabajar aplicando una diferencia de potencial de 30 V durante 17 h, utilizando como electrolito para el proceso de anodizado una disolución al 0,3 % (p/p) en NH_4F y al 2,0 % (p/p) en H_2O en etilenglicol. La morfología de los nanotubos obtenidos se estudia mediante microscopía electrónica de barrido, utilizando un SEM (JEOL JSM-5310). En la Figura 3.3, se muestra una micrografía de la superficie obtenida después de aplicar el procedimiento electroquímico.

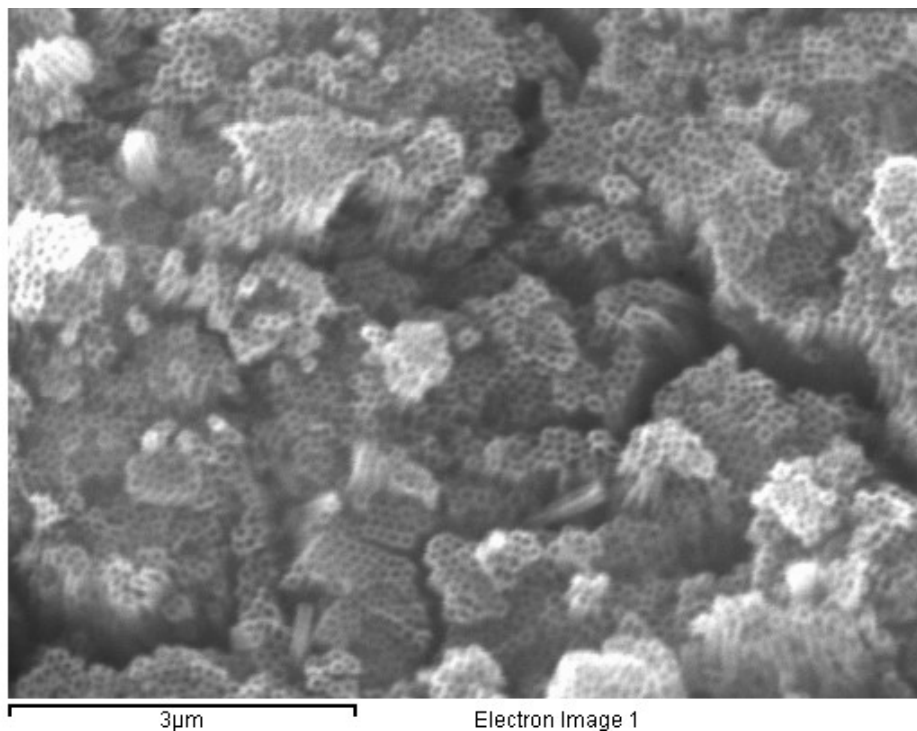


Figura 3.3. Micrografía SEM de una lámina de Ti anodizada aplicando 30 V durante 17 h usando como electrolito una disolución al 0,3% (v/v) de NH_4F y al 2,0% (v/v) de H_2O en etilenglicol.

Como puede verse en la Figura 3.3, después del proceso de anodizado se ha generado un recubrimiento sobre la superficie del electrodo de nanoestructuras tubulares, tal como cabía esperar. Los nanotubos obtenidos presentan unas dimensiones similares entre sí y se distribuyen de forma ordenada formando diferentes planos en altura. Para determinar las dimensiones que presentan los nanotubos con mayor exactitud, se ha estudiado la morfología de la superficie anodizada mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo utilizando un FE-SEM (JEOL JSM-7001F), tal como se muestra en la Figura 3.4.

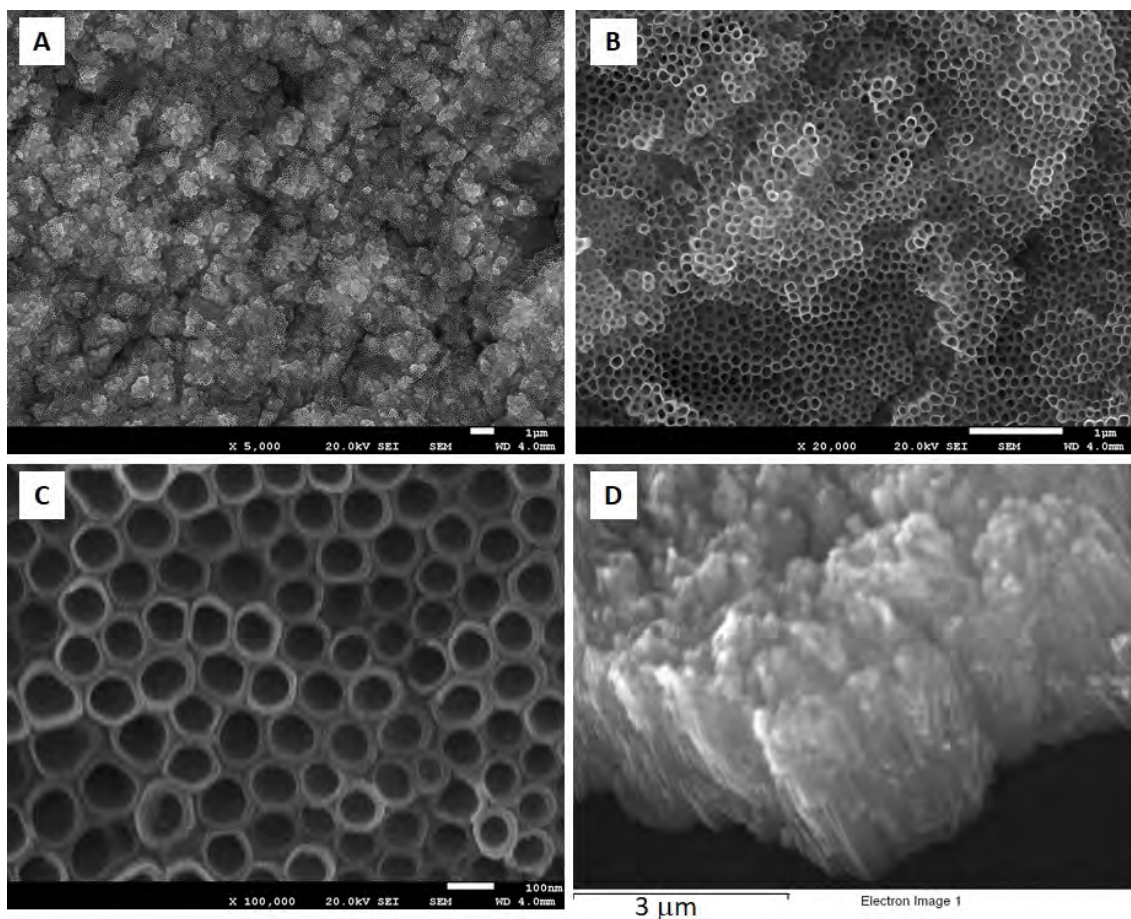


Figura 3.4. Micrografías FE-SEM a diferentes aumentos (A, B y C) y micrografía SEM (D) de las matrices de nanotubos de TiO_2 obtenidas mediante un proceso de anodizado.

Como se muestra en la Figura 3.4, las nanoestructuras obtenidas presentan una estructura cilíndrica vertical que se distribuyen en diferentes planos (longitud estimada de unos 2-3 μm), con una cara abierta en la parte superior de la capa de óxido. Los nanotubos formados presentan unas dimensiones promedio estimadas de unos 80 nm de diámetro interno y 10 nm de espesor de pared. Estas dimensiones son similares a las obtenidas por otros autores que aplican condiciones de síntesis anódica parecidas a las aplicadas en la presente tesis [164].

Una vez estudiada la morfología de la superficie de los electrodos obtenidos, es necesario caracterizar la respuesta electroquímica que estos presentan frente a la reducción del peróxido de hidrógeno. Cabe mencionar que los electrodos $\text{Ti}/\text{TiO}_2\text{NTAs}$ sintetizados se utilizarán como interfase electroquímica en el desarrollo de biosensores enzimáticos en los que se inmovilizarán oxidasas. Las oxidasas catalizan reacciones redox en las que el oxígeno es el aceptor de electrones, por tanto, el O_2 se reduce liberando H_2O_2 . A continuación, se aplica un potencial catódico para transformar el peróxido de hidrógeno generado a agua. Por tanto, los biosensores amperométricos planteados en el presente trabajo se basan en seguir esta reacción de reducción y es necesario que la interfase electroquímica sea sensible a la presencia de H_2O_2 .

Cabe destacar que la interfase electroquímica obtenida se caracteriza por ser biocompatible y semiconductora eléctrica [246]. Además, al presentar nanoestructuras la superficie específica del electrodo aumenta considerablemente, por lo que se espera una elevada sensibilidad [171].

Para caracterizar electroquímicamente la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs, se utiliza un montaje de tres electrodos en el que el electrodo de trabajo es la interfase electroquímica estudiada montada en un electrodo de disco rotatorio (RDE), como contraelectrodo se utiliza un hilo de platino y como referencia un electrodo de Ag/AgCl/KCl (3M). A continuación, se aplica una diferencia de potencial constante de -0,4 V vs referencia y se registra la intensidad a lo largo del tiempo al realizar incrementos de concentración consecutivos correspondientes a 0,2 mM de H₂O₂ cada 2 min sobre 100 mL de 0,1 M PBS (pH 7). Se mantiene el sistema en agitación constante a 2000 rpm. En la Figura 3.5, se muestra un ejemplo de las curvas cronoamperométricas obtenidas.

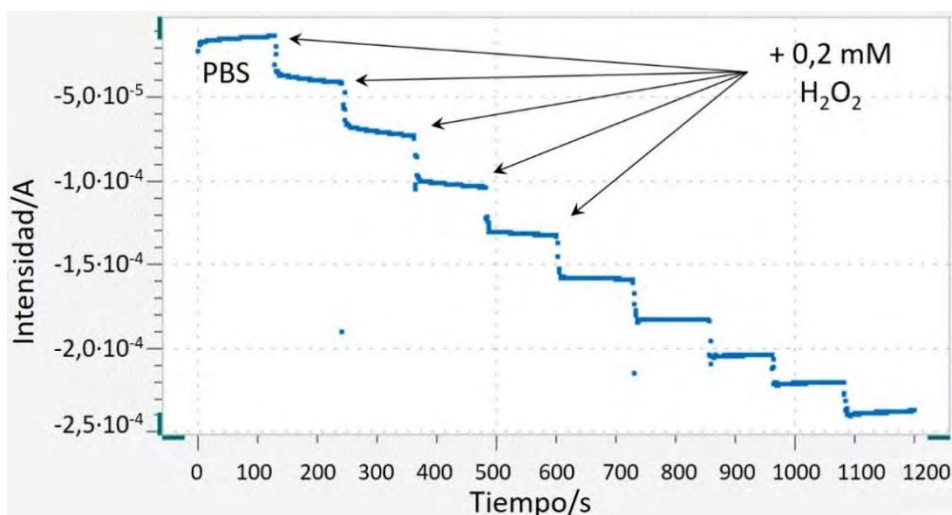


Figura 3.5. Respuesta amperométrica de un electrodo Ti/TiO₂NTAs al aplicar una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl sobre 100 mL de disolución 0,1 M PBS (pH 7,0) sobre el que se realizan incrementos consecutivos de 0,2 mM H₂O₂ cada 2 min.

Como se muestra en la Figura 3.5, tras cada adición de 0,2 mM de peróxido de hidrógeno se produce un incremento en la intensidad medida de unos 30 μA. Para cuantificar estos incrementos de intensidad, se construyen rectas de calibrado; se calcula la intensidad corregida (I_c) como la intensidad medida (I_M) menos la intensidad del blanco (I_B): $I_c = I_M - I_B$. En la Figura 4.6, se muestra la recta de calibrado obtenida.

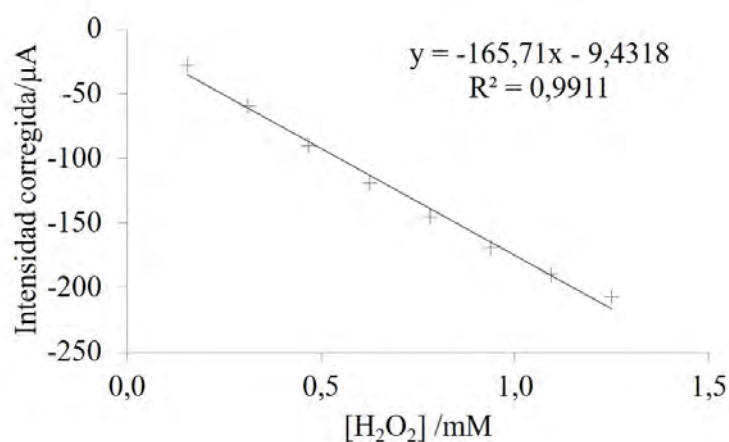


Figura 3.6. Recta de calibrado obtenida a partir de la curva intensidad vs tiempo obtenida con un electrodo Ti/TiO₂NTAs al seguir la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno a agua.

Como se muestra en la Figura 3.6, se obtiene una recta de calibrado lineal en un rango de concentraciones comprendido entre 0,2 mM y 1,2 mM H₂O₂ con un coeficiente de correlación superior a 0,99 y una pendiente de 165,71 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. Cabe destacar que la obtención de esta interfase electroquímica es un proceso complejo que presenta muchas etapas, por lo que fácilmente se observan variaciones entre los electrodos obtenidos. Por ejemplo, es habitual que durante la etapa de pulido se generen varios planos imperceptibles a simple vista. Durante el proceso de anodizado, esto se traduce en la formación de nanotubos a diferentes alturas. Así pues, es posible que el crecimiento de los nanotubos no sea completamente homogéneo entre diferentes sensores. Por tanto, se requiere medir la sensibilidad de los electrodos Ti/TiO₂NTAs obtenidos anódicamente para garantizar que estos presentan morfologías similares y verificar que su síntesis es reproducible. Por ello, se fijará un rango de sensibilidad frente a la reducción del peróxido de hidrógeno que los electrodos Ti/TiO₂NTAs sintetizados deberán cumplir. Como se muestra en la Figura 3.6, la pendiente de la recta de calibrado, asociada a la sensibilidad del sensor, obtenida en este caso es de 165,71 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. Con la finalidad de comprobar la reproducibilidad del proceso de síntesis anódica de nanotubos de TiO₂, se determina la sensibilidad de 10 sensores diferentes frente a la reducción de H₂O₂. En la Tabla 3.1, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.1. Sensibilidades obtenidas en el estudio amperométrico de los electrodos Ti/TiO₂NTAs al aplicar una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl sobre una disolución 0,1 M PBS a pH 7,0 a la que se adiciona de forma consecutiva 0,2 mM de H₂O₂ cada 2 min.

Electrodo Ti/TiO ₂ NTAs	Sensibilidad/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	R ²
1	218,88	0,9905
2	190,94	0,9907
3	196,37	0,9917
4	188,32	0,9927
5	177,59	0,9911
6	178,43	0,9918
7	165,71	0,9911
8	156,98	0,9997
9	221,81	0,9902
10	191,03	0,9920
Promedio/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	188,61	-
s/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	20,66	-
CV %	11,0	-

Como puede verse en la Tabla 3.1, los valores de sensibilidad obtenidos con los diferentes electrodos Ti/TiO₂NTAs se encuentran dentro del rango 160-220 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. Las variaciones en los valores obtenidos se deben principalmente a la etapa de pulido de los electrodos de titanio previa al proceso de anodizado. El pulido aplicado es un proceso manual que conlleva la formación de diferentes planos en cada una de las piezas tratadas, por tanto, en cada ocasión se obtienen electrodos con diferente superficie específica. A pesar de ello, la variación entre la sensibilidad de las piezas seleccionadas es relativamente baja, presentando un coeficiente de variación inferior al 15%. Por tanto, las diferencias morfológicas entre los electrodos desarrollados no son significativas. Así pues, el proceso de síntesis anódico aplicado, así como

los posteriores tratamientos de limpieza para eliminar posibles impurezas y térmico para obtener la fase anatasa, permiten la obtención suficientemente reproducible de TiO₂NTAs. Por tanto, se pueden utilizar como interfase electroquímica para el desarrollo de biosensores enzimáticos en los que el H₂O₂ sea el analito de interés.

3.1.2. Modificación del tiempo de anodizado

Existen distintos factores que pueden influir en el proceso de obtención anódico de la interfase electroquímica de nanotubos de TiO₂, uno de ellos es el tiempo de síntesis aplicado. Cabe destacar que el tiempo de anodizado influye sobre la longitud de los nanotubos obtenidos y, por tanto, sobre la superficie específica del electrodo final. Se requiere un tiempo mínimo para que se complete el proceso electroquímico de síntesis, que está directamente relacionado con la composición del electrolito. Pero un tiempo de anodizado demasiado elevado puede tener efectos adversos, ya que los nanotubos formados pueden empezar a acortarse. Este hecho se debe a que el proceso de disolución electroquímica del óxido de titanio (IV) es más rápido que el proceso de formación del mismo [171,190]. Por tanto, hallar el tiempo de anodizado óptimo para el electrolito y para el potencial aplicado es crucial para obtener una respuesta electroquímica sensible.

En la presente tesis, se han aplicado diferentes tiempos de anodizado (4, 8, 17 y 24 horas) manteniendo constantes el resto de los factores influyentes en el proceso de síntesis electroquímica de nanotubos de TiO₂. Es decir, se aplica una diferencia de potencial de 30 V en un sistema de dos electrodos, utilizando como electrolito una disolución en base a etilenglicol que contiene un 0,3% de NH₄F y un 2,0% de H₂O. El sistema se mantiene en agitación constante a 2000 rpm y se realiza el proceso de anodizado a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo determinado.

Para conocer la influencia del tiempo de anodizado sobre la formación de matrices ordenadas de nanotubos de TiO₂, se mide la respuesta amperométrica de los electrodos Ti/TiO₂NTAs obtenidos frente a la reducción de peróxido de hidrógeno. Para ello, se llevan a cabo adiciones consecutivas de H₂O₂ de concentración conocida cada dos minutos sobre el medio de medida, manteniendo la agitación del sistema y una diferencia de potencial constantes. Bajo estas condiciones, es posible aplicar la ecuación de Levich (Ecuación 3.1) para correlacionar la intensidad en el estacionario con la concentración de analito adicionada.

$$I = 0,620 n \cdot F \cdot A \cdot D^{2/3} \cdot \omega^{1/2} \cdot \nu^{1/6} \cdot C \quad \text{[Ecuación 3.1]}$$

Donde I es la intensidad de corriente (A), n es el número de moles de electrones transferidos en la semirreacción, F es la constante de Faraday (96.485 C·mol⁻¹), A es el área activa del electrodo de trabajo (cm²), D es el coeficiente de difusión del analito (cm²·s⁻¹), ω es la velocidad angular del electrodo rotatorio (rad·s⁻¹), ν es la viscosidad cinemática del medio (cm²·s⁻¹) y C es la concentración del analito (mol·cm⁻³). Al representar la intensidad de corriente frente a la

concentración de analito, manteniendo la ω constante, la pendiente de la recta obtenida es función de $0,620 \cdot n \cdot F \cdot A \cdot D^{2/3} \cdot v^{1/6}$. De este modo, al realizar determinaciones utilizando el mismo medio de medida, pero cambiando el electrodo de trabajo, todos los valores son constantes excepto el área activa del electrodo (A). Por lo tanto, cuanto mayor sea el área activa del electrodo, mayor será la pendiente de la recta intensidad vs concentración. Además, la pendiente de la recta se asocia a la sensibilidad del sensor, por tanto, a mayor pendiente de la recta de calibrado, mayor sensibilidad. De este modo, es posible comparar las áreas activas de distintos electrodos de trabajo mediante la realización de cronoamperometrías, aplicando las mismas condiciones de medida para cada sensor.

Así pues, se caracterizan electroquímicamente las interfaces sintetizadas estudiando la respuesta electroquímica de los electrodos Ti/TiO₂NTAs obtenidos al aplicar el proceso de anodizado durante 4 h, 8 h, 17 h y 24 h. Todas las medidas electroquímicas se llevan a cabo utilizando un montaje de tres electrodos; se registra la intensidad a lo largo del tiempo al realizar incrementos consecutivos de concentración correspondientes a 0,2 mM H₂O₂ sobre 100 mL 0,1 M PBS (pH 7,0) al aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl y manteniendo el sistema en agitación constante a 2000 rpm. En la Figura 3.7, se muestran las cronoamperometrías obtenidas en cada caso.

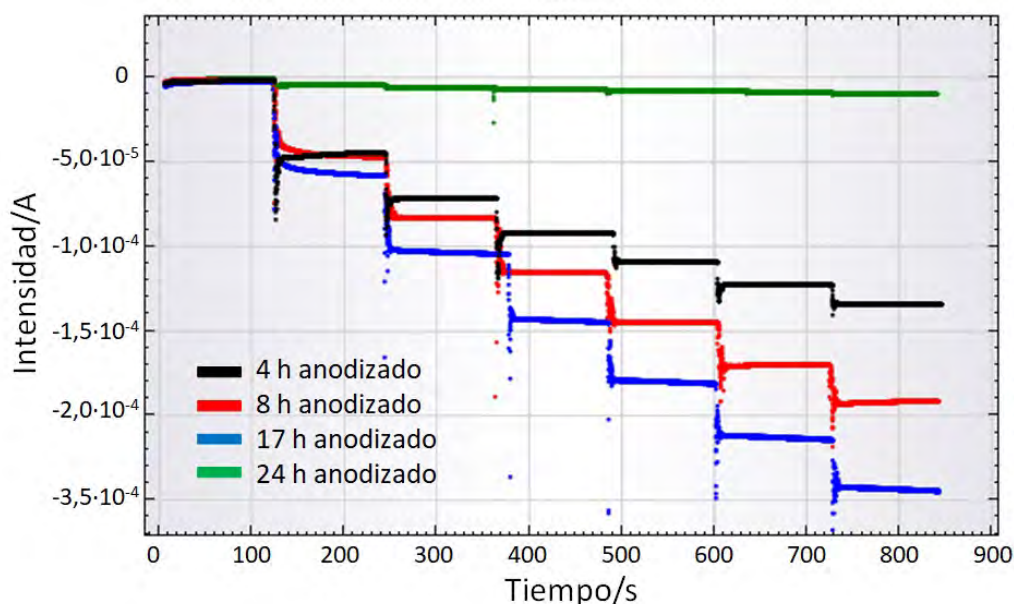


Figura 3.7. Respuesta amperométrica de los electrodos Ti/TiO₂NTAs al aplicar un potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl sobre una disolución 0,1 M PBS sobre la que se realizan incrementos consecutivos de 0,2 mM H₂O₂. Los electrodos Ti/TiO₂NTAs se obtienen después de 4 h (negro), 8 h (rojo), 17 h (azul) y 24 h (verde) de anodizado.

Como se observa en la Figura 3.7, tras cada adición de H₂O₂ se registra un salto de intensidad con los electrodos Ti/TiO₂NTAs que varía en función del tiempo de anodizado aplicado. Para cuantificar esta diferencia, se construyen rectas de calibrado representando la intensidad corregida frente a la concentración de peróxido de hidrógeno. Como se ha mencionado anteriormente, la pendiente de la recta de calibrado se asocia a la sensibilidad del sensor. En la Tabla 3.2 y en la Figura 3.8, se muestran las rectas de calibrado obtenidas con cada uno de los sensores Ti/TiO₂NTAs en un rango lineal de concentraciones comprendido entre 0,37 mM y 1,84 mM en H₂O₂.

Tabla 3.2. Rectas de calibrado correspondientes a las cronoamperometrías obtenidas al seguir la reducción del peróxido de hidrógeno con los electrodos Ti/TiO₂NTAs obtenidos al aplicar distintos tiempos de anodizado.

Tiempo de anodizado/h	Recta de calibrado		
	Pendiente/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Ordenada en el Origen/ μA	R ²
4	52,49	27,11	0,9904
8	83,34	17,96	0,9954
17	130,01	42,45	0,9985
24	5,47	2,78	0,9923

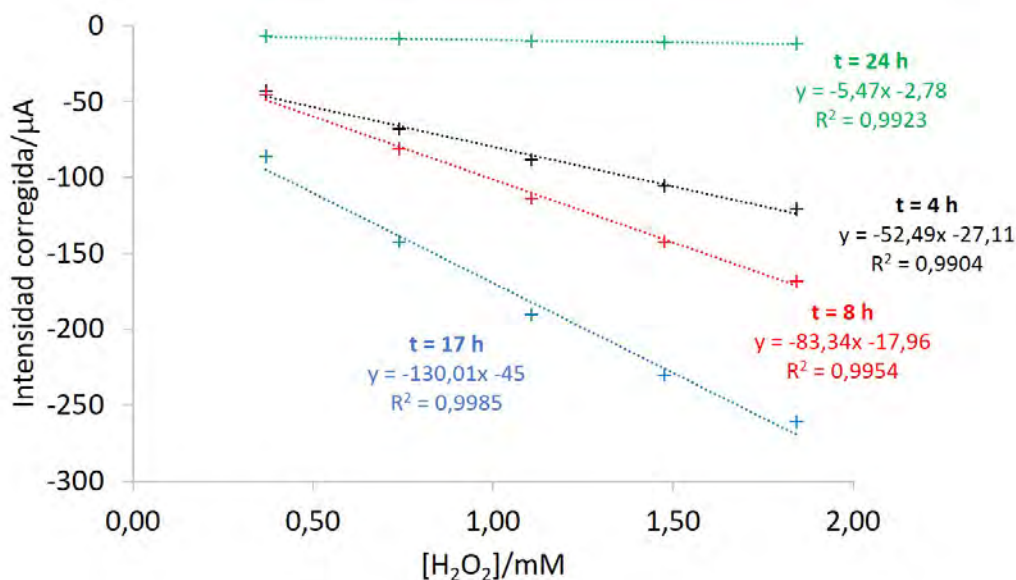


Figura 3.8. Rectas de calibrado correspondientes a las cronoamperometrías obtenidas al seguir la reducción del peróxido de hidrógeno con los electrodos Ti/TiO₂NTAs obtenidos al aplicar distintos tiempos de anodizado.

Se conoce que en la síntesis anódica de nanotubos de TiO₂, la longitud de estos aumenta con el tiempo de anodizado hasta llegar a un máximo a partir del cual empiezan a decrecer, presuntamente como consecuencia de una redisolución o del fraccionamiento de los mismos [247]. Este efecto tiene una consecuencia directa sobre la sensibilidad de los electrodos obtenidos, ya que, a mayor longitud, mayor superficie específica, lo que conlleva un aumento en la sensibilidad. Este efecto puede observarse en las pendientes de las rectas de calibrado que se muestran en la Tabla 3.2. La sensibilidad de los electrodos estudiados frente a la reducción del H₂O₂ aumenta con el tiempo de anodizado, obteniéndose un valor máximo al aplicar 17 h de síntesis electroquímica (130,01 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). Esto indica que, al aumentar el tiempo de anodizado, también aumenta la longitud de los nanotubos obtenidos. Sin embargo, al aumentar el tiempo de anodizado hasta 24 h, se registra el valor de sensibilidad menor (5,47 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). Menor sensibilidad indica menor área específica, por tanto, se puede afirmar que al aplicar tiempos de anodizado demasiado elevados los nanotubos obtenidos presentan menor longitud.

A partir de los resultados obtenidos, se decide seguir realizando el proceso de anodizado durante un periodo de tiempo de 17 h, ya que de esta forma se obtiene el mayor valor de sensibilidad. Así pues, se mantienen las condiciones de síntesis iniciales para el desarrollo de la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs.

3.2. Estrategias de inmovilización

El proceso de inmovilización es una de las etapas más críticas en el desarrollo de biosensores. Es importante que durante este proceso las moléculas de enzima no sufran cambios estructurales que afecten a su actividad enzimática. Además, el método debe permitir la retención del enzima y ofrecer unas condiciones de pH, temperatura, hidrofobicidad y fuerza iónica adecuadas para el mismo. En esta tesis, se proponen diferentes estrategias de inmovilización para generar biosensores enzimáticos. Se plantea la inmovilización por métodos físicos de anclaje, en los que se retienen las moléculas de enzima en una matriz polimérica de un hidrogel. También se propone la inmovilización por métodos químicos, concretamente mediante la formación de enlaces covalentes utilizando como anclaje pentafluorofenilmetacrilato (PFM).

Como interfase electroquímica se utilizan los electrodos de titanio sobre los que se han hecho crecer matrices altamente ordenadas de nanotubos de dióxido de titanio (Ti/TiO₂NT), como se explica en el apartado 3.1. Sobre estas interfases electroquímicas, se inmovilizan las moléculas de enzima. Para ello, se prepara una disolución del enzima glucosa oxidasa (GOx) utilizando una disolución 0,1 M de tampón fosfato (PBS) (24,4 g K₂HPO₄ y 10,2 g KH₂PO₄/2,5 L) a pH 7,0 como disolvente. Concretamente, se prepara una disolución de GOx (Sigma Aldrich, ref. 101404648) proveniente de *Aspergillus niger* del tipo VII con una actividad mayor o igual a 100 U/mg. Se pesan 15 mg de GOx [7, 8] y se disuelven en 500 µL de PBS. En todos los casos, se toman 20 µL de dicha disolución y se depositan sobre la interfase electroquímica, aplicando distintos métodos de inmovilización para retener las moléculas de enzima (ver Figura 3.9).

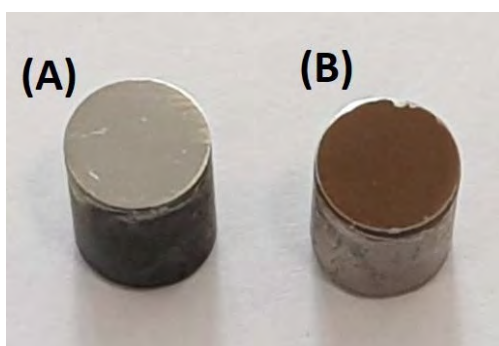


Figura 3.9. Comparación entre un electrodo de titanio recién pulido (A) y un biosensor compuesto por una matriz de nanotubos de TiO₂ sobre los que se ha depositado glucosa oxidasa (B).

En este punto, es importante mencionar que se desarrollan distintos biosensores de glucosa, aplicando métodos de inmovilización enzimática físicos y químicos y que, posteriormente, los resultados obtenidos se aplican también en el desarrollo de biosensores de glutamato.

La glucosa oxidasa cataliza la conversión de la glucosa a ácido glucónico, consumiendo oxígeno y liberando agua oxigenada (ver Figura 3.10). La respuesta electroquímica de los biosensores diseñados en la presente tesis se debe a la reducción a agua del peróxido de hidrógeno generado mediante la reacción enzimática. La señal medida como consecuencia de la reducción de H₂O₂ es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

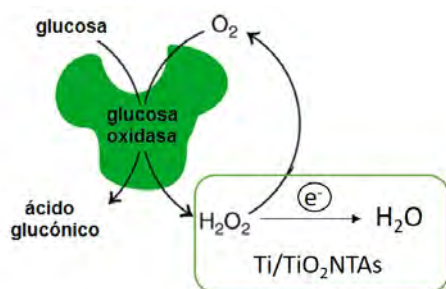


Figura 3.10. Reacción enzimática de conversión de glucosa a ácido glucónico por acción del enzima glucosa oxidasa [210].

Una vez construidos los diferentes biosensores de glucosa al aplicar cada una de las matrices de inmovilización seleccionadas, se comprueba su respuesta amperométrica. Para ello, se aplica una diferencia de potencial constante ($\Delta E = -0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}$) en el que la interfase electroquímica Ti/TiO_2NTAs es capaz de detectar la reducción del H_2O_2 a H_2O . A continuación, se presentan los resultados obtenidos al aplicar los diferentes métodos de inmovilización.

3.2.1. Inmovilización en matrices poliméricas

En primer lugar, se desarrollan biosensores amperométricos de glucosa basados en la inmovilización de glucosa oxidasa sobre la superficie del electrodo (Ti/TiO_2NTAs) en una matriz polimérica de un hidrogel. El principal motivo de la elección de esta configuración es la elevada simplicidad del procedimiento de inmovilización. Cuanto más simple sea el método de inmovilización y menos etapas se requieran más reproducible será el proceso de fabricación del biosensor.

Para la construcción de biosensores de glucosa, se depositan $20 \mu\text{L}$ de disolución de GOx ($15 \text{ mg}/500 \mu\text{L}$) sobre el electrodo Ti/TiO_2NTAs y se deja difundir durante 24 h a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de GOx presente en la superficie de los nanotubos utilizando PBS. A continuación, se utiliza un hidrogel como matriz de inmovilización para evitar perder las moléculas de GOx retenidas en el interior de los nanotubos. En este caso, se han utilizado tres hidrogeles, la *kappa*-carragenina, el 2-hidroetilmacrilato (HEMA) y el quitosano:

- ***Kappa*-carragenina:** se preparan disoluciones de *kappa*-carragenina (Sigma Aldrich, ref. 101893381) al 1,25, al 0,5, al 0,4 y al 0,3 % (p/v). Se toman $20 \mu\text{L}$ de la disolución de recién preparada y se depositan sobre el electrodo $Ti/TiO_2NTAs/GOx$. A continuación, se fija la matriz de inmovilización bajo una corriente suave de aire (ver Tabla 3.3).
- **HEMA:** se deposita 2-hidroetilmacrilato (HEMA) (Sigma Aldrich, ref. 477028) que se polimeriza utilizando técnicas de plasma sobre la superficie del electrodo $Ti/TiO_2NTAs/GOx$. Además, en este caso se utilizan agentes reticulantes y otros hidrogeles para obtener diferentes propiedades mecánicas del HEMA. Como agente reticulante se utiliza etilenglicoldiacrilato (EGDA) (Polysciences, ref. 02302), que se polimeriza juntamente con el HEMA. Además, sobre el electrodo

Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA también se depositan 20 µL de disolución de quitosano (ver Tabla 3.3).

- **Quitosano:** Se prepara una disolución de quitosano (Sigma Aldrich, ref. 1001654970) de bajo peso molecular al 0,5% (p/p) en una disolución al 1% (v/v) de ácido acético (53 mg quitosano/9900 µL H₂O y 100 µL ácido acético glacial). Se depositan 20 µL de la disolución de quitosano sobre el electrodo Ti/TiO₂NTAs/GOx y se dejan secar bajo una corriente suave de aire. Además, también se utilizan agentes reticulantes para modificar las propiedades de la matriz de inmovilización: glutaraldehído y ácido hipocloroso (ver Tabla 3.3).

Se prepara una disolución de glutaraldehído al 0,25% (v/v) a partir de una disolución comercial de glutaraldehído al 25% (v/v) en agua (Sigma Aldrich, ref. 101411002). De la disolución recién preparada de glutaraldehído se toman 2 mL y se mezclan con 8 mL de disolución de quitosano. También se prepara una disolución al 0,20% (v/v) de hipoclorito sódico en agua a partir de una disolución comercial al 5% (v/v) NaClO. De esta disolución, se toma 1 mL y se mezcla con 9 mL de disolución de quitosano. A continuación, se depositan 20 µL de la disolución de quitosano con el agente reticulante sobre el electrodo Ti/TiO₂NTAs/GOx y se dejan secar bajo una corriente suave de aire.

En la Tabla 3.3, se detallan las matrices de inmovilización utilizadas para la obtención de diferentes biosensores de glucosa.

Tabla 3.3. Biosensores de glucosa obtenidos mediante encapsulamiento de los enzimas en una matriz polimérica. También se muestra la composición de las diferentes matrices de inmovilización utilizadas.

Biosensor	Matriz de inmovilización
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina-1,25%	Disolución de <i>kappa</i> -carragenina 1,25% (p/v) en agua.
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina-0,5%	Disolución de <i>kappa</i> -carragenina 0,5% (p/v) en agua.
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina-0,4%	Disolución de <i>kappa</i> -carragenina 0,4% (p/v) en agua.
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina-0,3%	Disolución de <i>kappa</i> -carragenina 0,3% (p/v) en agua.
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA	Película de poli-HEMA co-polimerizado con EGDA.
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano	Película de poli-HEMA co-polimerizado con EGDA y disolución de quitosano 0,5% (p/p) en ácido acético 1% (v/v).
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano	Disolución de quitosano 0,5% (p/p) en ácido acético 1% (v/v).
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano-HClO	Disolución de quitosano 0,5% (p/p) en ácido acético 1% (v/v) que contenía un 0,02% (v/v) de ácido hipocloroso.
Ti/TiO ₂ NTAs/Gox/Quitosano-GA	Disolución de quitosano 0,5% (p/p) en ácido acético 1% (v/v) que contenía un 0,05% (v/v) de glutaraldehído.

Una vez obtenidos los biosensores de glucosa, estos se sumergen en PBS durante unos 30 min con la finalidad de rehidratar las moléculas de enzima. Cuando no se utilizan los biosensores, se conservan sumergidos en disolución tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 a una temperatura de 4 °C.

Los tres hidrogeles seleccionados para el desarrollo de biosensores mediante inmovilización física de enzimas forman redes tridimensionales hidrófilas, biocompatibles y biodegradables, ideales para la inmovilización de enzimas porque previenen la degradación y la pérdida de estas. A continuación, se detallan los resultados obtenidos en el desarrollo de estos biosensores.

3.2.1.1. Matrices de inmovilización en base carragenina

En primer lugar, se desarrollan biosensores amperométricos utilizando como matriz de inmovilización el hidrogel carragenina. La carragenina es un polisacárido de origen natural, biocompatible y biodegradable. Existen diversas especies de carragenina que difieren en su composición i conformación molecular. En esta tesis, se ha trabajado con *kappa*-carragenina. La *kappa*-carragenina es soluble en agua caliente y gelifica al enfriarse. Además, en presencia de aniones calcio y potasio, la *kappa*-carragenina forma hidrogeles con diferentes grados de cohesión. A diferencia de otros hidrogeles, como el quitosano que solamente es soluble en medio acético, la carragenina ofrece un microentorno con condiciones más suaves que favorecen la conservación de la actividad enzimática de las moléculas de enzima. Por este motivo, se escogió este hidrogel como matriz de inmovilización en la construcción de biosensores de glucosa.

Para la construcción de los biosensores se utilizan hidrogeles de *kappa*-carragenina al 1,25% y al 0,3% en agua, tal como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.2.1. A continuación, se estudia la respuesta amperométrica de los biosensores a lo largo del tiempo al realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa sobre 100 mL de PBS y aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M). En la Figura 3.11, se muestra una cronoamperometría obtenida con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-1,25%.

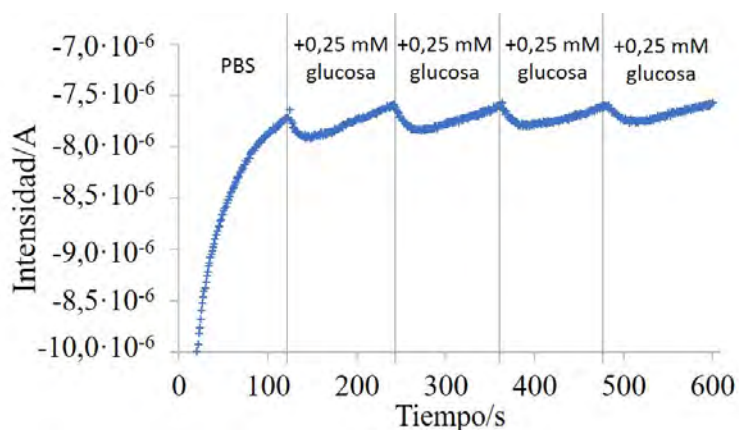


Figura 3.11. Curva intensidad-tiempo obtenida con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-1,25% al aplicar un potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl sobre 100 mL PBS 0,1 M a pH 7,0 sobre el que se realizan incrementos consecutivos de 0,25 mM glucosa cada 2 min.

Como se observa en la Figura 3.11, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-1,25% no presenta una respuesta estable frente a la presencia de glucosa. Es posible que esto se deba a que la concentración de *kappa*-carragenina es demasiado elevada, formando una matriz demasiado cohesionada y densa que dificulta la difusión de reactivos y productos entre la superficie del electrodo y la disolución de medida. Como consecuencia, no es posible ajustar una recta de calibrado. Por tanto, se construye un nuevo sensor disminuyendo la concentración de *kappa*-carragenina hasta 0,3%. En este caso, no es posible realizar medidas cronoamperométricas, la consistencia de la matriz de inmovilización es demasiado baja para resistir el esfuerzo mecánico generado por la agitación a 2000 rpm y se desprende de la interfase electroquímica.

Ante estos resultados, se decide mantener la concentración de *kappa*-carragenina por debajo del 1,25% para minimizar los problemas de difusión y por encima de 0,3% para solventar los problemas de adherencia. Así pues, se preparan hidrogeles con distintas concentraciones de *kappa*-carragenina comprendidas entre 1,25 y 0,3%. En este punto, cabe destacar que de las distintas concentraciones de *kappa*-carragenina evaluadas, solamente fue posible realizar medidas electroquímicas con dos de ellas: 0,4% y 0,5%. En la Figura 3.12, se muestran los registros cronoamperométricos obtenidos con ambos biosensores.

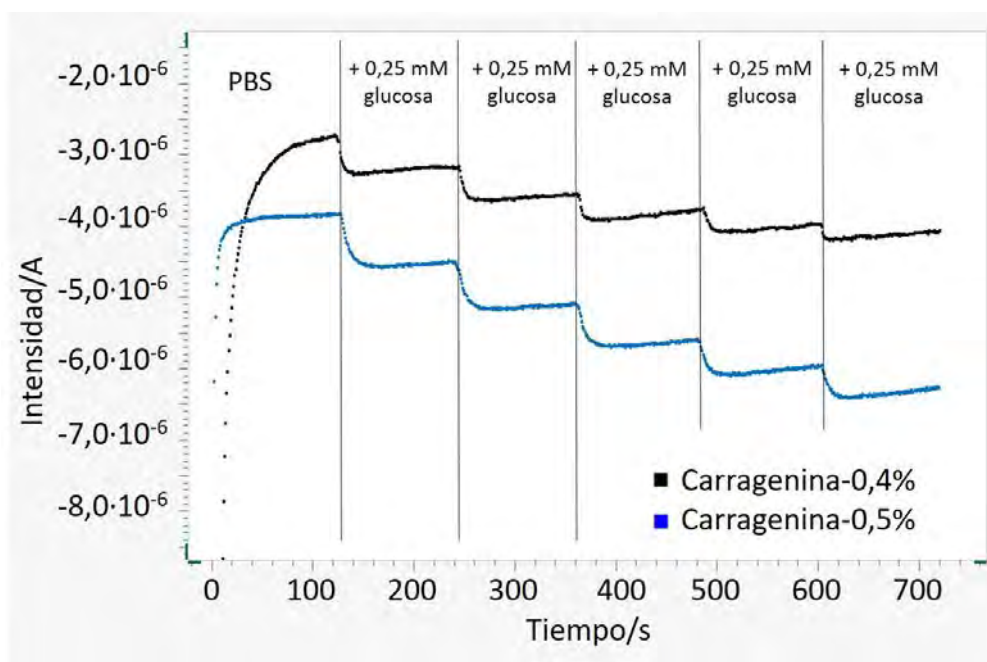


Figura 3.12. Curvas intensidad-tiempo obtenidas con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,4% (negro) y Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,5% (azul) al aplicar un potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl sobre 100 mL PBS 0,1 M a pH 7,0 sobre el que se realizan incrementos consecutivos de 0,25 mM glucosa cada 2 min.

Como se muestra en la Figura 3.12, al aumentar la concentración de *kappa*-carragenina por encima del 0,3% se consigue mayor cohesión en la matriz inmovilizadora que aguanta los esfuerzos mecánicos derivados de la agitación y, por tanto, es posible realizar medidas cronoamperométricas. Además, puede observarse que los problemas difusionales que presentaba el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-1,25% se han solventado, ya que la intensidad registrada tras cada adición de glucosa llega a un estacionario. A partir de las curvas

intensidad/tiempo obtenidas, se construyen rectas de calibrado para conocer la sensibilidad de los biosensores desarrollados. Para ello, se representa la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa. En la Tabla 3.4 y en la Figura 3.13, se muestran los valores obtenidos de las rectas de calibrado con cada biosensor.

Tabla 3.4. Rectas de calibrado obtenidas con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,4% y Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,5%.

Biosensor	Pendiente / $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Ordenada en el origen/ μA	R ²
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina-0,4%	-0,89	-0,31	0,962
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina-0,5%	-1,77	-0,33	0,977

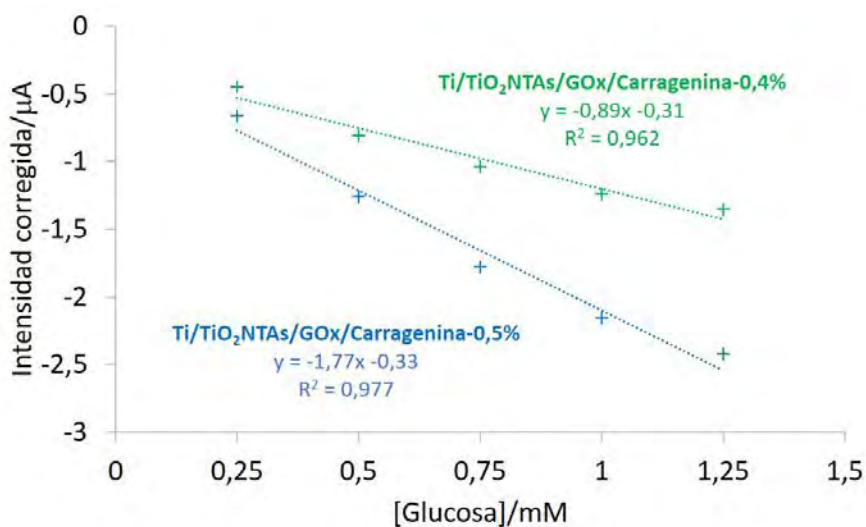


Figura 3.13. Rectas de calibrado obtenidas con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,4% y Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,5%.

Como se muestra en la Tabla 3.4, a pesar de la mejora en los problemas difusionales respecto al biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-1,25%, las rectas de calibrado obtenidas no son lineales en el rango de concentraciones estudiado (0,25 – 1,25 mM glucosa) ya que el coeficiente de correlación es inferior a 0,99 en ambos casos. Además, los valores de las pendientes de las rectas de calibrado son relativamente pequeños, inferiores a 2 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ en ambos casos. Este hecho puede asociarse a los mismos problemas difusionales. Es posible que parte de la glucosa adicionada no llegue al centro activo del enzima inmovilizado, provocando una disminución en la señal medida.

Por otro lado, se decide realizar el seguimiento de la estabilidad a lo largo del tiempo de los biosensores desarrollados. En el caso del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,4%, el segundo día desde su construcción no es posible realizar medidas porque la matriz de encapsulamiento se desprende de la interfase electroquímica y el biosensor pierde la actividad catalítica. En el caso del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,5% sucede lo mismo después de 4 días desde su construcción.

Ante los resultados obtenidos, se decide construir distintos biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,5%, ya que es el que presenta una matriz de inmovilización más prometedora. Se mide la respuesta amperométrica de los diferentes biosensores y se construyen rectas de calibrado representando la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa. En la Tabla 3.5, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.5. Valores de sensibilidad y coeficientes de regresión (R²) obtenidos con 5 biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,5%.

Biosensor	Sensibilidad/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	R ²
1	1,77	0,977
2	0,37	0,958
3	0,24	0,989
4	1,71	0,964
5	0,52	0,964

Como se muestra en la Tabla 3.5, en ningún caso se consigue ajustar una recta ya que los coeficientes de correlación registrados son inferiores a 0,99 en un rango de concentraciones comprendido entre 0,25 y 1,25 mM de glucosa. Este hecho se relaciona con el grado de cohesión de la matriz de inmovilización; ésta sigue siendo demasiado compacta y no se han solucionado los problemas difusionales. Además, el valor de sensibilidad promedio obtenido con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Carragenina-0,5% es de 0,92 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ con un coeficiente de variación del 82%. Por tanto, los valores de sensibilidad obtenidos no son reproducibles.

Por tanto, los resultados obtenidos indican que los hidrogeles de *kappa*-carragenina estudiados en esta tesis no son la mejor opción para el desarrollo de biosensores enzimáticos.

3.2.1.2. Matrices de inmovilización en base 2-hidroxietilmetacrilato

Se construyen biosensores utilizando como matriz de inmovilización hidrogeles en base 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA). Los hidrogeles basados en poli-HEMA se han investigado y utilizado para aplicaciones biomédicas debido a su no toxicidad y a su biocompatibilidad [134]. El HEMA es un polímero muy hidrófilo y que fácilmente se disuelve en medios acuosos, por este motivo muchas veces se requiere la presencia de agentes reticulantes para controlar las propiedades mecánicas del hidrogel [134].

En la presente tesis, se ha utilizado etilenglicoldiacrilato (EGDA) como agente reticulante. Así pues, se genera una matriz tridimensional en la que se co-polimeriza el EGDA juntamente con el HEMA (ver Figura 3.14).

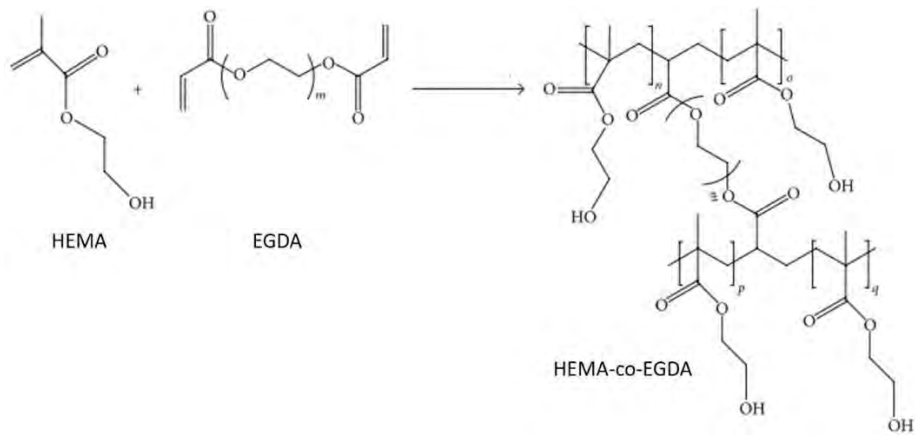


Figura 3.14. Reacción de polimerización entre el HEMA y el EGDA [249].

La reacción de copolimerización de HEMA y EGDA se lleva a cabo en un reactor vertical de plasma de acero inoxidable (ver Figura 3.15). Estos ensayos se han realizado juntamente con el equipo de investigación del Grup d'Enginyeria de Materials (GEMAT) en el Institut Químic de Sarrià.

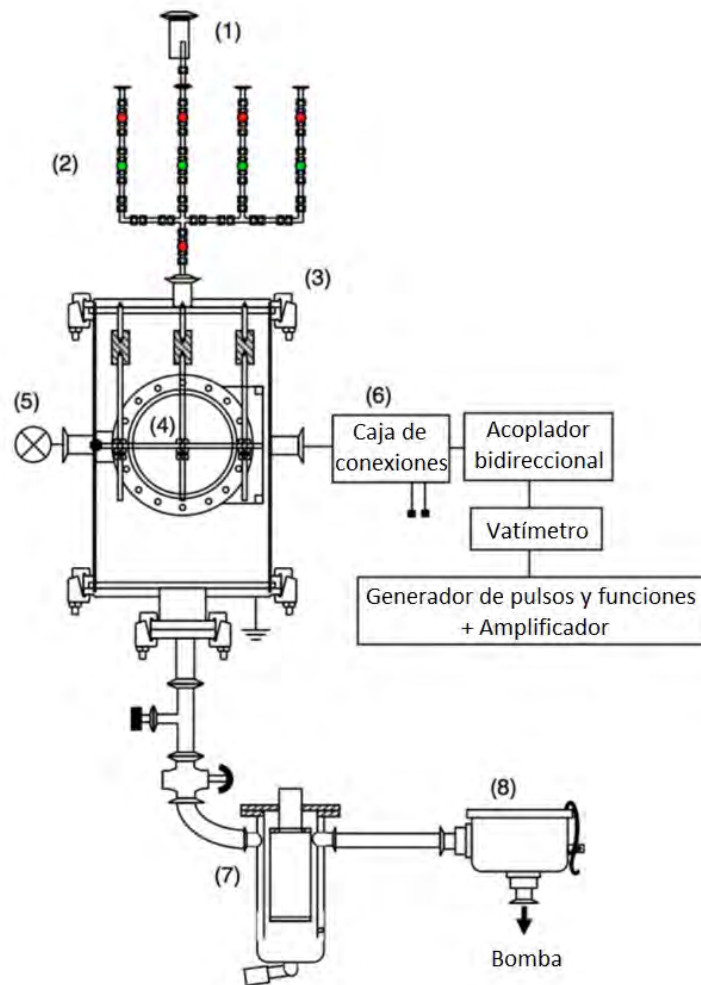


Figura 3.15. Representación esquemática del reactor de plasma vertical de acero inoxidable y sus diferentes componentes: (1) alimentación de monómero, (2) alimentación de gases, (3) cámara cilíndrica, (4) soporte para muestras, (5) manómetro Pirani, (6) caja de conexiones y circuito eléctrico, (7) trampa fría y (8) trampa química [250].

El reactor que se muestra en la Figura 3.15, consiste en una cámara vertical de acero inoxidable con un diámetro de 25,5 cm y una altura de 41,6 cm. La toma de tierra es la carcasa del reactor y el electrodo de radiofrecuencia encargado de generar el plasma es una placa de aluminio, que se utiliza como soporte para depositar las muestras durante la polimerización. El electrodo de radiofrecuencia se conecta a un generador de impulsos de radiofrecuencia (13,56 MHz) a través de una caja de conexiones. Por otro lado, los gases y los monómeros necesarios para la generación del plasma se suministran a través del árbol de válvulas de aguja que permite ajustar los flujos de gas o monómero. La presión del sistema se controla utilizando un medidor de vacío (MKS PDR900) conectado con un transductor de vacío de cátodo frío/micropirani (MKS 972 DualMag) ubicado en el centro del reactor. El sistema tiene una trampa fría que contiene una mezcla de CO₂ sólido con acetona y una trampa química de carbón activo conectadas para evitar que el monómero que no ha reaccionado llegue a la bomba (Trivac D 16BCS/PFPE Leybold). Durante todos los experimentos, se mantiene la presión inicial de base alrededor de $9 \cdot 10^{-4}$ mbar.

La matriz de inmovilización de HEMA-co-EGDA se obtiene mediante polimerización por plasma, manteniendo la proporción 2:1 de HEMA/EGDA. Cabe mencionar que, para obtener recubrimientos reproducibles, es importante mantener constante la relación de presiones parciales que se introducen en la cámara del reactor de plasma. Así pues, se deposita el monómero (HEMA) y el agente reticulante (EGDA) en dos balones que se calientan hasta 75 °C. A continuación, se abre el balón que contiene el agente reticulante hasta que la presión se estabiliza en $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar. A continuación, se abre el balón que contiene el HEMA hasta alcanzar una presión de $3,6 \cdot 10^{-2}$ mbar. Cuando la presión es estable, se fija la potencia de radiofrecuencia continua en 20 W y se lleva a cabo la polimerización por plasma pulsado (ciclo de trabajo 2/22) durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se apaga el plasma y se mantiene constante el flujo de vapor de HEMA/EGDA durante 10 minutos más. De este modo, se obtienen biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA.

Una vez obtenidos los biosensores, se estudia su respuesta cronoamperométrica al realizar incrementos consecutivos de concentración equivalentes a 0,13 mM de glucosa sobre 100 mL de PBS y aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M). En la Figura 3.16, se muestra una de las curvas intensidad/tiempo obtenida con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA.

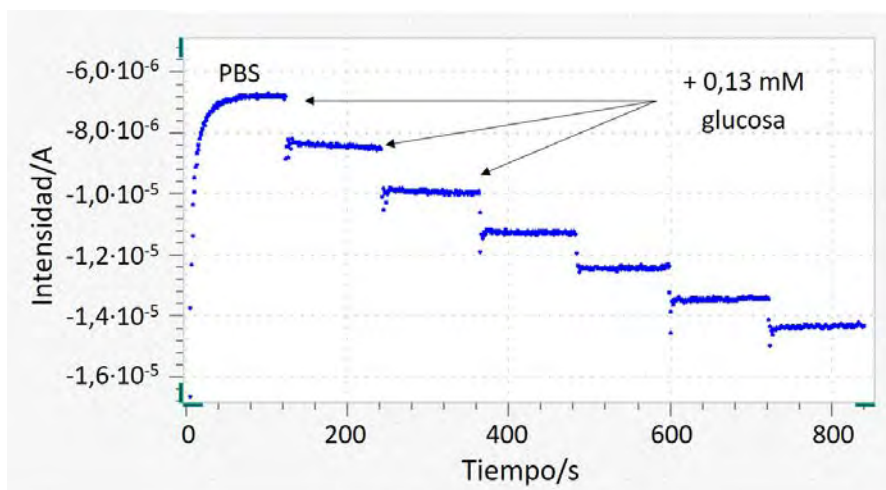


Figura 3.16. Cronoamperograma obtenido con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA al realizar incrementos consecutivos de 0,13 mM glucosa cada 2 min sobre 100 mL PBS 0,1 M (pH 7,0), aplicando $\Delta E = -0,4$ V vs Ag/AgCl.

Como se muestra en la Figura 3.16, tras cada adición de glucosa se registra un incremento en la intensidad medida de aproximadamente 15 $\mu\text{A}/\text{mM}$. A continuación, se construyen rectas de calibrado representando la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa y la pendiente de la recta se asocia a la sensibilidad del biosensor. En la Tabla 3.6 y en la Figura 3.17, se muestran las rectas de calibrado obtenidas con varios biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA.

Tabla 3.6. Rectas de calibrado obtenidas con 4 biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA.

Biosensor	Pendiente/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Ordenada en el origen/ μA	R ²
1	-13,26	-1,09	0,9916
2	-11,33	-0,87	0,9908
3	-14,76	-1,52	0,9912
4	-8,43	-0,64	0,9957
Promedio/$\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	-11,95		
s/$\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	2,73		
CV %	23		

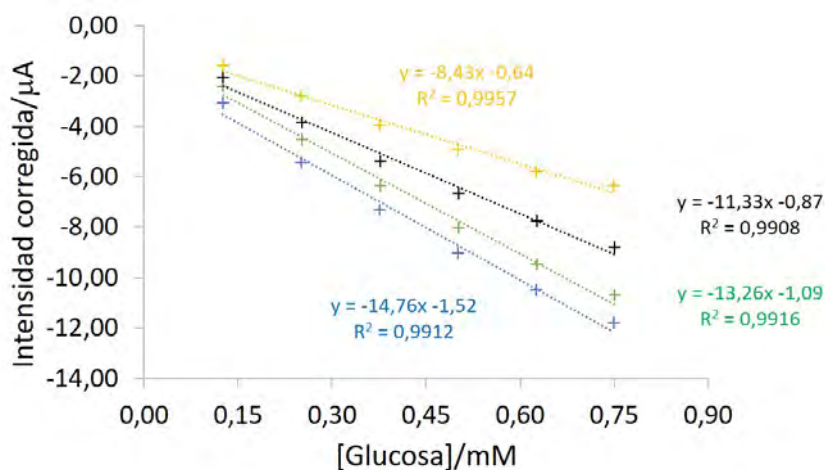


Figura 3.17. Rectas de calibrado obtenidas con 4 biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA.

Como se muestra en la Tabla 3.6, en todos los casos es posible ajustar una recta en un rango de concentraciones comprendido entre 0,13 mM y 0,75 mM de glucosa, ya que el coeficiente de correlación es superior a 0,99. Además, los valores de sensibilidad obtenidos con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA son relativamente elevados. Se obtiene un valor de sensibilidad promedio de 11,95 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ con un coeficiente de variación del 23%. Estos resultados indican que, el hidrogel en base HEMA genera un entorno favorable para las moléculas de enzima inmovilizadas. Por tanto, al utilizar HEMA-co-EGDA como matriz de inmovilización la mayor parte de las moléculas de GOx conservan su conformación biológicamente activa y los biosensores desarrollados presentan una elevada sensibilidad. Los hidrogeles en base a poli-HEMA son muy utilizados en aplicaciones biológicas y biomédicas, debido a su elevada biocompatibilidad y a su capacidad de prevenir la adhesión de proteínas y células en su superficie [251,252]. Además, las membranas de poli-HEMA reticuladas con algún agente reticulante como el EGDA, presentan una estructura tipo red con poros de pequeño tamaño que previenen la permeación de macromoléculas [127]. El agente reticulante provoca un entrecruzamiento de las cadenas poliméricas del poli-HEMA, disminuyendo en espacio libre que queda entre éstas. De este modo, el tamaño de los poros generados en la estructura polimérica serán función del grado de reticulación; a mayor concentración del agente reticulante menor espacio quedará entre las cadenas poliméricas [253]. Por este motivo, el uso de hidrogeles en base HEMA como matrices de inmovilización enzimática, puede disminuir el paso de interferentes desde la disolución de medida hasta la superficie del biosensor, aumentando la especificidad del dispositivo de medida.

Por otro lado, se estudia la estabilidad en el tiempo de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA construidos. Para ello, se aplican las mismas condiciones de medida del primer día de la construcción de los biosensores con la intención de replicar las rectas de calibrado obtenidas el primer día de medida. En este caso, se realizan incrementos consecutivos de 0,13 mM de glucosa cada 2 min sobre 100 mL de PBS y aplicando -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) para construir las rectas de calibrado a distintos días. A continuación, se representa el valor absoluto de la pendiente de la recta de calibrado obtenida en función del tiempo en días, para evaluar el progreso de la sensibilidad de los biosensores obtenidos, tal como se muestra en la Figura 3.18.

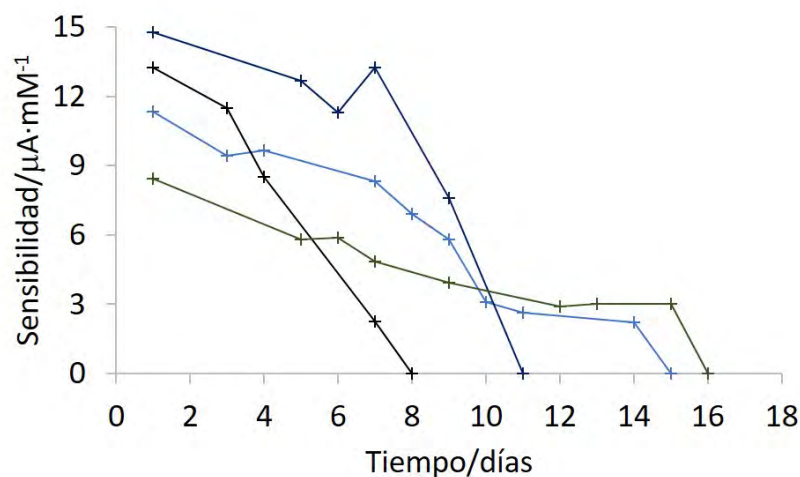


Figura 3.18. Evolución de la sensibilidad (en valor absoluto) a lo largo del tiempo de distintos biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA.

Como se muestra en la Figura 3.18, los valores de sensibilidad a lo largo del tiempo registrados con los diferentes biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA siguen la misma tendencia. La sensibilidad inicial es elevada y disminuye con el tiempo, sin llegar a estabilizarse. En este caso, se establece que los biosensores alcanzan el tiempo de vida útil máximos, cuando su sensibilidad es inferior a los 3 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. De este modo, el tiempo de vida útil de los distintos biosensores varía ligeramente, siendo 15 días el mayor periodo de tiempo en el que se pueden realizar medidas amperométricas. Esta disminución continua de la sensibilidad se puede relacionar con distintos factores. Hay que tener en cuenta que el poli-HEMA es un material muy hidrófilo que fácilmente se disuelve en medios acuosos, por tanto, la matriz inmovilizadora generada tiende a degradarse y a desprenderse del biosensor, dejando de cumplir su función. Es posible que durante el periodo de conservación y/o durante los procesos de medida, la matriz inmovilizadora se degrade parcialmente. Esta degradación favorece la pérdida de una parte de las moléculas de GOx inmovilizadas inicialmente, provocando una disminución en la sensibilidad.

A pesar de que los biosensores en base poli-HEMA obtenidos presentan una estabilidad a largo plazo relativamente corta (aproximadamente 2 semanas), la sensibilidad inicial que estos presentan es de 11,95 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, en promedio. Este hecho indica que los hidrogeles en base poli-HEMA generan un entorno biocompatible favorable para la inmovilización de enzimas en su conformación biológicamente activa. Sin embargo, es necesario mejorar las propiedades mecánicas de la matriz inmovilizadora con la finalidad de aumentar la vida útil de los biosensores desarrollados.

Con la finalidad de mejorar la estabilidad a largo plazo de los biosensores en base a poli-HEMA, se construyen nuevos biosensores añadiendo quitosano a la matriz de inmovilización. Para el desarrollo de estos biosensores, se utiliza la deposición química iniciada de vapor (iCVD) para la polimerización del HEMA-co-EGDA. Este proceso se lleva a cabo en un reactor cilíndrico de acero inoxidable con un radio de 12 cm. El reactor se divide en dos zonas: la zona superior y la zona inferior o fría. En la zona superior, se localiza una matriz de filamentos de nicromo (80% Ni/20% Cr), encargados de mantener la temperatura de reacción (en este caso 220 °C). En esta zona, también se sitúa la entrada de los monómeros en fase vapor. En la zona fría, se encuentra un

plato de acero inoxidable en el que se sitúan las muestras. Esta zona se mantiene a 45 °C gracias a un sistema de refrigeración con agua. De este modo, en la zona alta del reactor se genera el polímero que se deposita sobre las muestras en la zona fría del reactor. Además, la cubierta del reactor es un plato de cuarzo de unos 15 cm de radio y 2,5 cm de grosor. Ésta cubierta permite visualizar el interior del reactor mientras tiene lugar la polimerización y realizar un seguimiento del proceso mediante interferometría láser. En la Figura 3.19, se muestra una fotografía del tipo de reactor utilizado.

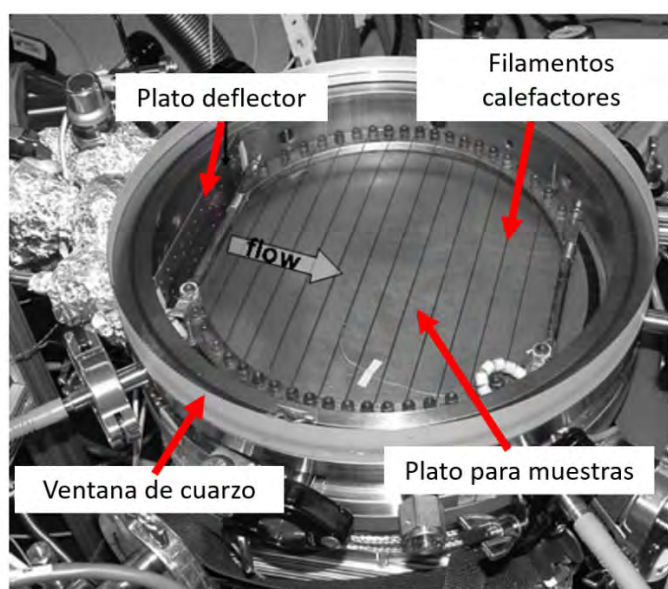


Figura 3.19. Reactor de plasma iCVD [254].

En primer lugar, sobre sensores Ti/TiO₂NTAs se depositan 20 μL de disolución de GOx (15 mg/500 μL PBS) y se dejan difundir durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de GOx limpiando con PBS. Los electrodos Ti/TiO₂NTAs/GOx obtenidos, se colocan en el plato para muestras situado en la zona fría del reactor. Para realizar la polimerización, es necesario utilizar un agente iniciador que active las moléculas del monómero y del agente reticulante. En este caso, se utiliza peróxido de terc-butilo (TBPO) como agente iniciador de la reacción, que se mantiene a temperatura ambiente. El balón que contiene el monómero HEMA se calienta a 75 °C y el balón del agente reticulante EGDA se mantiene a 60 °C, para conseguir la fase vapor de cada uno de ellos. La entrada en el reactor de cada uno de los reactivos se controla mediante válvulas de aguja. El flujo del iniciador se fija entre 1 y 2 sccm, el flujo del HEMA se mantiene a 0,30 sccm y el flujo del EGDA a 0,16 sccm durante el proceso de polimerización [255]. De esta forma, se mantiene la proporción 2:1 entre el monómero (HEMA) y el agente reticulante (EGDA). La reacción de copolimerización del HEMA y el EGDA tiene lugar en la zona caliente del reactor (220 °C). A medida que se va formando el polímero, este condensa sobre la superficie de los electrodos a recubrir, situados en la zona fría del reactor (45 °C). El grosor del recubrimiento polimérico obtenido se controla mediante interferometría láser y se para la reacción al llegar a unos 100 nm de grosor, aproximadamente. De este modo, se obtienen los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA. A continuación, sobre estos biosensores se depositan 20 μL de disolución de quitosano 0,5% (p/v) al 1% (v/v) de ácido acético y se fijan bajo

una corriente suave de aire. Finalmente, se obtienen los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano.

Una vez obtenidos los biosensores, se estudia su respuesta cronoamperométrica al realizar incrementos consecutivos de 0,13 mM de glucosa sobre 100 mL de PBS y aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl. En la Figura 3.20, se muestra una de las curvas intensidad/tiempo obtenida con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano.

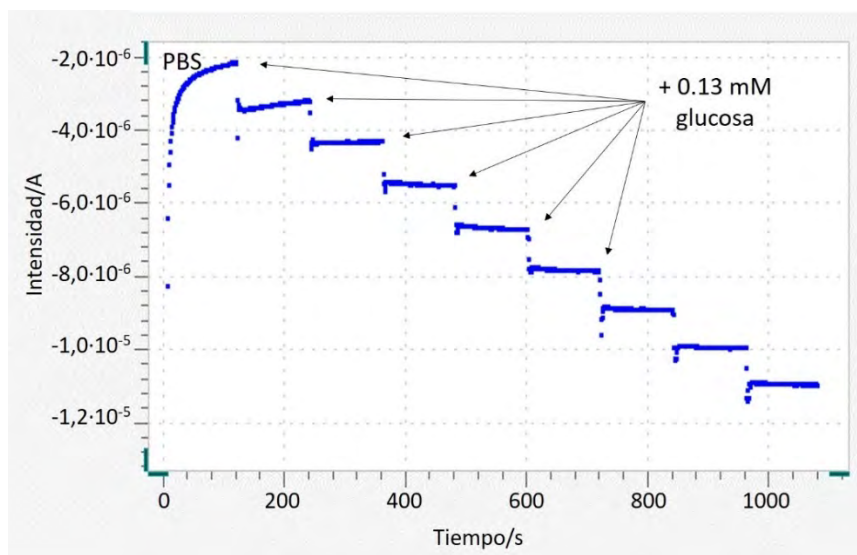


Figura 3.20. Cronoamperograma obtenido con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano al realizar incrementos consecutivos de 0,13 mM glucosa cada 2 min sobre 100 mL PBS 0,1 M (pH 7,0), aplicando una diferencia de potencial constante de -0,4 V vs Ag/AgCl.

Como se muestra en la Figura 3.20, tras cada adición de glucosa se registra un incremento en la intensidad medida de aproximadamente 8 $\mu\text{A}/\text{mM}$. A partir del cronoamperograma obtenido, se construye una recta de calibrado, representando la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa adicionada. De este modo, es posible conocer la sensibilidad del biosensor, que se asocia a la pendiente de la recta de calibrado obtenida. Se construyen tres biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano y se mide la respuesta amperométrica de todos ellos. En la Tabla 3.7 y en la Figura 3.21, se muestran las rectas de calibrado obtenidas con en cada caso.

Tabla 3.7. Rectas de calibrado obtenidas con 3 biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano.

Biosensor	Pendiente/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Ordenada en el origen/ μA	R ²	Rango lineal/mM
1	-8,98	-0,03	0,9991	0,13 - 1,00
2	-13,67	-0,80	0,9970	0,13 - 1,00
3	-8,79	-0,65	0,9936	0,13 - 0,75
Promedio/$\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	-10,48			
s/$\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	2,76			
CV %	26			

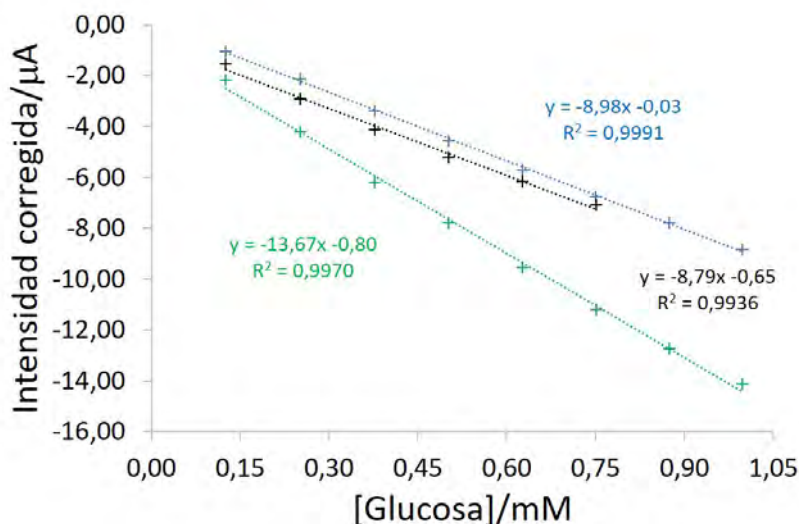


Figura 3.21. Rectas de calibrado obtenidas con 3 biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano.

Como se muestra en la Tabla 3.7, en todos los casos es posible ajustar una recta, ya que el coeficiente de correlación es superior a 0,99. Sin embargo, el rango lineal de concentraciones varía entre los diferentes biosensores desarrollados. Por otro lado, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano presentan valores de sensibilidad relativamente elevados. Se obtiene un valor promedio de sensibilidad de 10,48 µA·mM⁻¹ con un coeficiente de variación del 26%. Estos resultados son similares a los obtenidos con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA, que presentan un valor promedio de sensibilidad de 11,95 µA·mM⁻¹ con un coeficiente de variación del 23%.

En este punto, cabe mencionar que las variaciones en los valores de sensibilidad obtenidos se pueden asociar a las diferentes etapas del proceso de construcción de los biosensores, ya que se trata de un proceso manual en el que pueden influir muchos factores. Para conocer la desviación entre ambos resultados, se lleva a cabo un análisis de varianza de un factor (ANOVA 1-F) con un nivel de confianza del 95%. La prueba de hipótesis realizada muestra un valor de significación mayor a 0,05 (*p-value* = 0,52). Por tanto, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores de sensibilidad obtenidos con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA. Así pues, es posible afirmar que el hecho de añadir quitosano a la matriz de inmovilización HEMA-co-EGDA no afecta a la sensibilidad de los biosensores de glucosa desarrollados. Por tanto, en ambos casos las moléculas de enzima conservan su actividad catalítica.

Con la finalidad de conocer la influencia del quitosano sobre la estabilidad a largo plazo de los biosensores desarrollados, se mide su respuesta amperométrica durante distintos días. En la Figura 3.22, se muestra la evolución de la sensibilidad de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano a lo largo del tiempo.

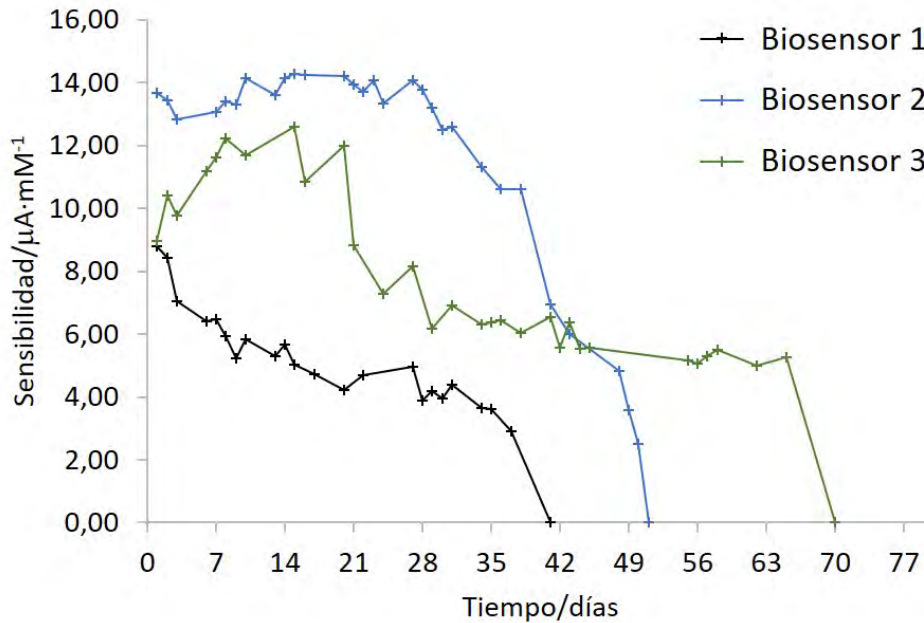


Figura 3.22. Evolución a lo largo del tiempo de la sensibilidad que presentan los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano.

Como se muestra en la Figura 3.22, la evolución de la sensibilidad a lo largo del tiempo de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano desarrollados, presenta diferentes perfiles para cada biosensor. El Biosensor 1 presenta una disminución de la sensibilidad inicial del 67% después de 37 días de su construcción, el Biosensor 2 registra una disminución del 82% después de 50 días y el Biosensor 3 registra una disminución del 44% después de 65 días.

Se establece que el tiempo de vida útil de los biosensores desarrollados acaba cuando estos pierden el 80% o más de su sensibilidad inicial. Así pues, el tiempo de vida útil de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano está comprendido entre los 37 y los 70 días en función del biosensor.

En cualquier caso, se ha conseguido aumentar la estabilidad a largo plazo en comparación con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA que pierden su respuesta amperométrica después de aproximadamente 14 días. Por tanto, el hecho de añadir quitosano a la matriz inmovilizadora favorece la conservación de la población activa de moléculas de enzima. Esto se puede deber a la sinergia entre el HEMA-co-EGDA y el Quitosano, que generan una matriz de inmovilización con mayor resistencia a la degradación que el HEMA-co-EGDA, favoreciendo la estabilidad a largo plazo de los biosensores. También es posible que, al añadir quitosano a la arquitectura del biosensor aumente el grado de cohesión de la matriz inmovilizadora. Por tanto, disminuye la probabilidad de que las moléculas de glucosa oxidasa difundan desde la superficie del electrodo hasta la disolución. De este modo, se conserva mejor la capacidad analítica del biosensor.

Así pues, el hecho de añadir quitosano a la matriz de inmovilización en base a poli-HEMA mantiene los valores de sensibilidad de los biosensores obtenidos y mejora notablemente su estabilidad a largo plazo. Sin embargo, el tiempo de vida útil de los biosensores

Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano varía para cada biosensor (41, 50 y 70 días respectivamente). Por este motivo, se decide estudiar el quitosano como matriz de inmovilización sin la influencia del HEMA-co-EGDA. En el siguiente apartado, se muestran los resultados obtenidos.

3.2.1.3. Matrices de inmovilización en base quitosano

Se desarrollan biosensores amperométricos utilizando como matriz de inmovilización el hidrogel quitosano. El quitosano es un poliaminosacárido de origen natural, que se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, un polisacárido con función estructural en exoesqueletos de crustáceos [81]. Por tanto, se trata de un polímero biocompatible que además presenta una gran afinidad por las proteínas. Estas dos propiedades permiten utilizarlo como matriz inmovilizadora de enzimas, ya que estos no se desnaturalizan y quedan retenidos por la membrana [81].

Estudio del grado de cohesión

Con el propósito de mejorar la estabilidad y la sensibilidad de los biosensores desarrollados, se puede modificar el grado de cohesión de la matriz de inmovilización. Esto es posible utilizando agentes reticulantes durante el proceso de síntesis del hidrogel, que forman enlaces entre las cadenas del polímero disminuyendo el tamaño de poro de la red tridimensional formada. En este caso, se sintetizan tres hidrogeles a partir de una disolución al 0,5% (p/v) de quitosano que difieren en el grado de reticulación. Para modificar el grado de cohesión, se utilizan dos reactivos adicionales en el proceso de síntesis, el glutaraldehído (GA) y el ácido hipocloroso (HClO).

El glutaraldehído es una molécula con dos grupos funcionales aldehído que es capaz de reaccionar con los grupos amino presentes en la estructura del quitosano, formando enlaces covalentes entre las cadenas y aumentando la cohesión del hidrogel formado (ver Figura 3.23) [256].

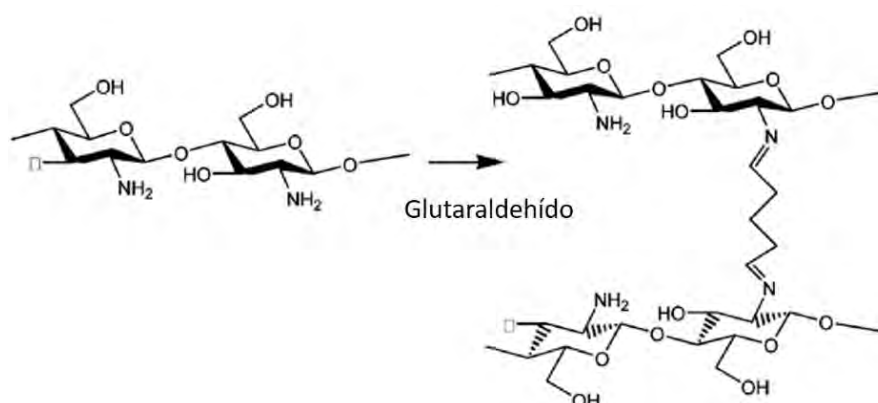


Figura 3.23. Formación de enlaces covalentes entre diferentes cadenas de quitosano al utilizar glutaraldehído como agente reticulante [256].

Como se muestra en la Figura 3.23, los grupos amino presentes en el quitosano reaccionan con los grupos aldehído del glutaraldehído para formar enlaces imina, obteniéndose una red polimérica más cohesionada. Cabe mencionar que el glutaraldehído ha sido utilizado como agente reticulante para diversas aplicaciones. Sin embargo, el mecanismo de reacción que este presenta es complejo; éste puede reaccionar por distintos puntos de las cadenas poliméricas con grupos amino, dando lugar a productos diversos [257]. Por este motivo, es complicado obtener polímeros reproducibles al utilizar glutaraldehído como agente de reticulación.

El ácido hipocloroso actúa oxidando parcialmente el grupo hidroxilo del quitosano a aldehído. Seguidamente, el aldehído formado reacciona con un grupo amino cercano de otra molécula de quitosano, dando lugar a la formación de enlaces imina entre las cadenas del hidrogel [258] (ver Figura 3.24).

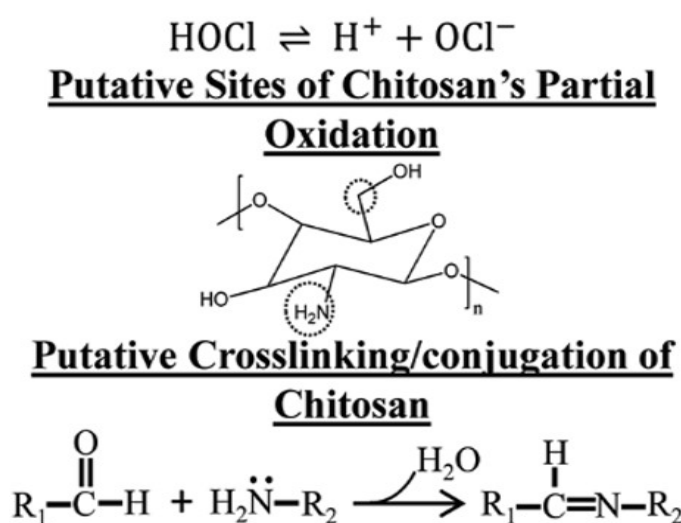


Figura 3.24. Formación de enlaces covalentes entre diferentes cadenas de quitosano al utilizar ácido hipocloroso como agente reticulante [258].

En primer lugar, se comprueba que los dos agentes reticulantes seleccionados interaccionan correctamente con el quitosano, dando lugar a hidrogeles con un mayor grado de cohesión en comparación con el quitosano sin reticular. Para ello, se someten las diferentes matrices de encapsulamiento a un estudio reológico, utilizando para ello un reómetro AR2000EX (TA Instruments) [259]. Mediante ensayos de esfuerzos oscilatorios, se determina el límite viscoelástico lineal de los tres hidrogeles: quitosano, quitosano-GA y quitosano-HClO. Los ensayos realizados consisten en un barrido de esfuerzos de 0,01 a 10 Pa, a temperatura ambiente y manteniendo la frecuencia de oscilación constante a 1 Hz. En la Figura 3.25, se muestran los resultados obtenidos.

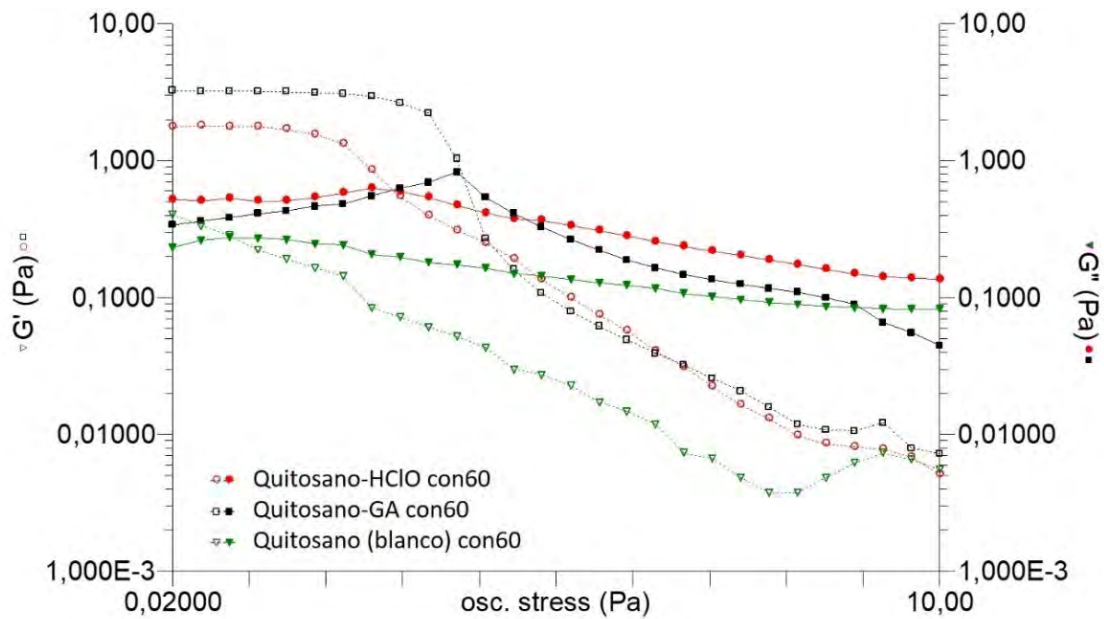


Figura 3.25. Resultados obtenidos en los ensayos reológicos realizados con los hidrogel 0,5% quitosano (verde), 0,5% quitosano-0,02% HClO (rojo) y 0,5% quitosano-0,05% GA (negro).

Como se muestra en la Figura 3.25, al alcanzar un valor de esfuerzo aplicado el módulo elástico (G') disminuye considerablemente. Este hecho indica que se ha superado el límite viscoelástico lineal. Es decir, que las interacciones que mantienen la estructura tridimensional de los hidrogel no resisten los esfuerzos aplicados y se rompen, provocando el colapso del hidrogel. Al comparar el registro obtenido con el hidrogel sin reticular (en verde) con los registros obtenidos para el Quitosano-HClO (en rojo) y para el Quitosano-GA (en negro), se observa un aumento en el límite viscoelástico lineal de estos dos últimos. Esto se debe a que los agentes reticulantes aumentan la cohesión entre las cadenas del hidrogel y ayudan a mantener la estructura de éste en un rango superior de esfuerzos. Además, los valores de G' obtenidos con los hidrogel reticulados son superiores a los obtenidos con el blanco (quitosano), indicando que se ha conseguido sintetizar dos matrices de encapsulamiento con un grado de cohesión superior respecto a la matriz formada únicamente por quitosano.

Respuesta amperométrica de los biosensores

Una vez comprobado que las propiedades mecánicas de los hidrogel sintetizados son diferentes, se utilizan estas matrices para la construcción de biosensores amperométricos de glucosa. Se construyen tres biosensores en base quitosano:

- *Biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.* La matriz de encapsulamiento es una disolución 0,5% (p/v) de quitosano en 1% (v/v) de ácido acético.
- *Biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-HClO.* La matriz de encapsulamiento es una disolución 0,5% (p/v) de quitosano en 1% (v/v) de ácido acético que contiene un 0,02% (v/v) de ácido hipocloroso.

- *Biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-GA*. La matriz de encapsulamiento es una disolución 0,5% (p/v) de quitosano en 1% (v/v) de ácido acético que contiene un 0,05% (v/v) de glutaraldehído.

Para cada biosensor se estudia la respuesta cronoamperométrica al realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa cada 2 min sobre 100 mL de 0,1 M PBS a pH 7, aplicando una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) y manteniendo el sistema en agitación constante a 2000 rpm. En la Figura 3.26, se muestra a modo de ejemplo las curvas intensidad/tiempo registradas con cada uno de los biosensores desarrollados.

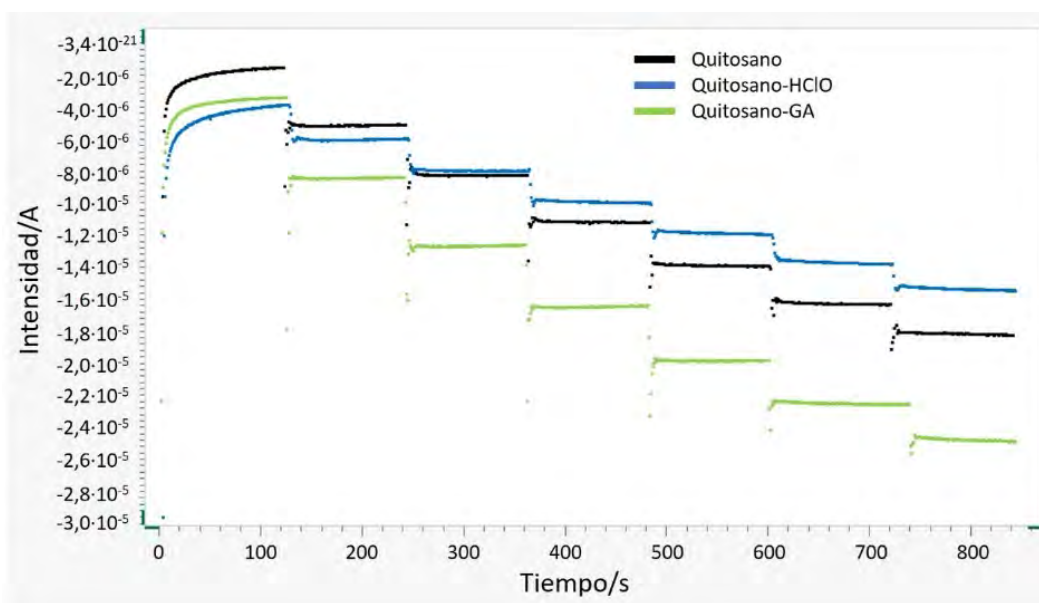


Figura 3.26. Curvas intensidad/tiempo obtenidas con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano (negro), Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-HClO (azul) y Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-GA (verde) al aplicar un potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl y realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa cada 2 min sobre 100 mL de PBS 0,1 M a pH 7,0.

Como se observa en la Figura 3.26, después de cada adición de 0,25 mM de glucosa se registra un incremento de intensidad diferente con cada biosensor. En el caso del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano se registra un salto de intensidad de unos 12 μ A/mM, con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-GA el incremento de intensidad corresponde a unos 16 μ A/mM y el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-HClO registra un salto de unos 8 μ A/mM. La señal registrada se debe a la reducción del H₂O₂ generado en la reacción enzimática y es directamente proporcional a la concentración de glucosa en el medio. Teniendo en cuenta que en todos los casos se adiciona la misma concentración de glucosa, es posible relacionar la diferencia de las señales registradas con cada biosensor con la actividad enzimática de las moléculas de GOx inmovilizadas. Cuanto mayor sea la población de moléculas de enzima en su conformación biológicamente activa, mayor será la respuesta amperométrica del biosensor. Por tanto, la matriz de inmovilización Quitosano-GA parece ser la que ofrece un entorno más favorable para que las moléculas de glucosa oxidasa inmovilizadas conserven su actividad catalítica.

A partir de las curvas cronoamperométricas registradas, se construyen rectas de calibrado; se representa la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa. La intensidad corregida

(I_c) se calcula como la intensidad medida (I_M) tras cada adición de glucosa menos la intensidad del blanco (I_B) correspondiente al PBS: $I_c = I_M - I_B$. La pendiente de las rectas de calibrado obtenidas, se asocia a la sensibilidad de cada biosensor. De este modo, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano presenta una sensibilidad de 10,58 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-HClO 7,85 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-GA 14,27 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. Por tanto, a igualdad de condiciones de trabajo los valores de sensibilidad obtenidos para cada biosensor son del mismo orden de magnitud.

Al seleccionar una matriz de inmovilización, hay que tener en cuenta el tiempo de vida útil que presentará el biosensor. Para analizar este factor, se ha determinado la evolución de la sensibilidad que presentan los biosensores a lo largo del tiempo. Para ello, se han llevado a cabo cronoamperometrías durante distintos días, al realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM glucosa sobre 100 mL PBS 0,1 M a pH 7,0 y aplicando un potencial constante de -0,4 V vs Ag/AgCl. Cabe mencionar que, cuando no se utilizan los biosensores, estos se conservan sumergidos en PBS a una temperatura de 4 °C. En la Figura 3.27, se muestra la tendencia de los resultados obtenidos con cada uno de los biosensores en base quitosano analizados.

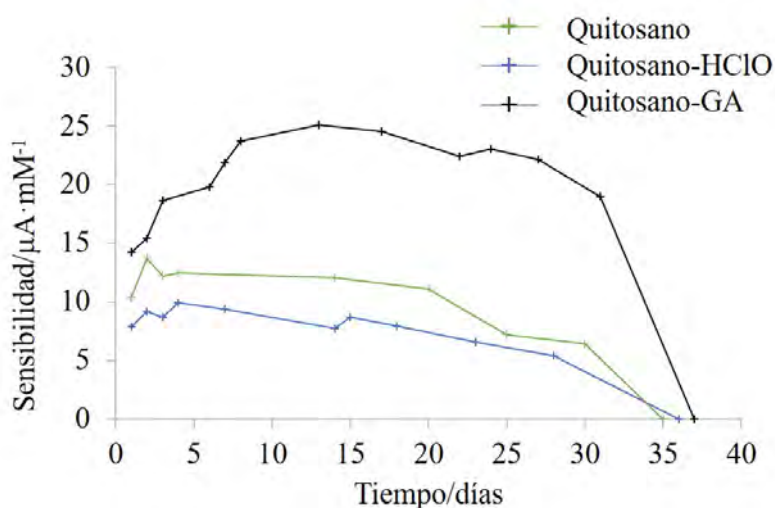


Figura 3.27. Estudio de la estabilidad a largo plazo de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano (línea verde), Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-HClO (línea azul) y Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-GA (línea negra).

Como se muestra en la Figura 3.27, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-GA es el que presenta valores de sensibilidad más elevados durante todos los días de ensayo. Este hecho probablemente se debe a que la presencia de glutaraldehído genera un entorno que estabiliza la estructura activa de las moléculas de glucosa oxidasa, además de mejorar la capacidad de retención y la comunicación electroquímica entre el enzima y el electrodo [35]. En cambio, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-HClO es el que registra los valores de sensibilidad más bajos durante todos los días de ensayo. Esto probablemente se debe al estrés oxidativo generado por la presencia de especies reactivas de cloro, que pueden atacar las cadenas laterales de algunos aminoácidos presentes en la glucosa oxidasa susceptibles de ser oxidados. Estas oxidaciones pueden desencadenar la pérdida de enlaces estructurales del enzima, haciendo que se pierda la estructura tridimensional del mismo. Como consecuencia, disminuye

la población de GOx en su conformación biológicamente activa y, por tanto, disminuye la sensibilidad del biosensor.

A pesar de las diferencias en los valores de sensibilidad, los tres biosensores estudiados siguen el mismo perfil de comportamiento. La sensibilidad de los biosensores aumenta durante los primeros días desde su construcción. Esta tendencia en el aumento de la sensibilidad puede indicar que el enzima necesita un cierto tiempo para acondicionarse al microentorno que lo rodea, durante el cual, la población activa de moléculas de enzima aumenta. Seguidamente, durante un periodo de tiempo comprendido entre los 5 y los 25 días aproximadamente, la sensibilidad se mantiene relativamente constante. En este periodo de tiempo, se registran pequeñas oscilaciones en los valores de sensibilidad que se asocian a la hidrodinámica del sistema de medida. Para minimizar este factor, todas las experiencias se llevan a cabo utilizando siempre las mismas condiciones experimentales y el mismo material de laboratorio. Después, entre los 25 y los 30 días, se observa una disminución en los valores de sensibilidad. Esta disminución puede deberse a distintos motivos. En primer lugar, se da la degradación de la matriz inmovilizadora de quitosano, que se despega de la superficie del electrodo. Como consecuencia, parte de las moléculas de GOx difunden desde la superficie del electrodo hasta la disolución electrolítica, es decir, escapan del sistema provocando la disminución en la sensibilidad. Además, al degradarse la matriz de encapsulamiento, las moléculas de enzima quedan desprotegidas, siendo más sencillo que se dé su desnaturalización. En segundo lugar, es posible que se acumulen oxidantes como el peróxido de hidrógeno generado durante la reacción enzimática y que no se reduce en la superficie del electrodo. En el caso de la matriz Quitosano-HClO, también se pueden acumular restos de especies oxidantes de cloro. Estas moléculas actúan sobre las cadenas de los aminoácidos que conforman la glucosa oxidasa, provocando su desnaturalización. Finalmente, es posible que se dé la degradación total de la matriz de inmovilización, provocando la pérdida casi todas las moléculas de enzima e imposibilitando la determinación amperométrica.

Por otro lado, el comportamiento a largo plazo de los biosensores en base a quitosano desarrollados en la presente tesis se compara con el de otros biosensores basados en estrategias de inmovilización similares que se encuentran descritas en bibliografía. En la Tabla 3.8, se muestran las condiciones de conservación en las que se mantienen los diferentes biosensores cuando no son utilizados y la estabilidad a largo plazo que presentan.

Tabla 3.8. Estabilidad a largo plazo de diferentes biosensores de glucosa que contienen quitosano en su arquitectura.

Biosensor	Condiciones de conservación	Estabilidad a largo plazo	Referencia bibliográfica
GC/dispersión de la mezcla (CNTs-Quitosano-GOx)	4 °C	Conserva casi toda la señal inicial después de 15 días.	[260]
GC/NiO/GOx/Quitosano	Sumergido en PBS a 4 °C	Conserva el 85% de la señal inicial después de 20 días.	[261]
Au/CGNC/Ni(OH) ₂ /GOx	-	Conserva el 85% de la señal inicial después de 20 días.	[262]
GC/dispersión de la mezcla (Pd@PtNC-Quitosano-GOx)	Sumergido en PBS a 4 °C	Conserva el 80% de la señal inicial después de 7 días.	[263]
Au/CSNPs/GOx	En la oscuridad a 4 °C	Conserva entre el 75% y el 80% de la señal inicial después de 10 días.	[264]
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano	Sumergido en PBS a 4 °C	Conserva el 93% de la señal inicial después de 20 días.	Esta tesis
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano-HClO	Sumergido en PBS a 4 °C	Conserva el 84% de la señal inicial después de 20 días.	Esta tesis
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano-GA	Sumergido en PBS a 4 °C	Aumenta un 57% sobre la señal inicial después de 20 días.	Esta tesis

CNTs, nanotubos de carbono; CSNPs, nanopartículas de quitosano; GC, electrodo de carbón vítreo; CGNC, nanocompuesto de quitosano y oro; Pd@PtNC, nanocristales de Pd y Pt.

Como se muestra en la Tabla 3.8, los biosensores de glucosa descritos en bibliografía conservan alrededor del 85% de su señal inicial transcurrido un cierto periodo de tiempo que varía entre los 7 y los 20 días, en función de la arquitectura del biosensor. Para poder comparar estos valores con los que ofrecen los biosensores en base a quitosano desarrollados en la presente tesis, se mide la variación de la señal amperométrica después de 20 días. En este transcurso de tiempo, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano retienen un 93% de la señal inicial, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-HClO conservan el 84% y el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-GA presentan un aumento del 57% respecto al valor inicial de sensibilidad. Por tanto, estos biosensores presentan una mayor estabilidad a largo plazo en comparación con otros biosensores basados en la inmovilización en matrices de quitosano. Cabe destacar que, a partir de los 20 días la sensibilidad de los biosensores en base quitosano empieza a disminuir como consecuencia de la degradación de la matriz inmovilizadora. A pesar de la disminución en la sensibilidad, es posible seguir realizando medidas amperométricas con los tres biosensores después de los 20 días. Solamente se pierde más del 80% de la sensibilidad inicial de los dispositivos desarrollados al alcanzar aproximadamente los 35 días desde su construcción.

Además, si se comparan los resultados obtenidos con los tres biosensores (Quitosano, Quitosano-HClO y Quitosano-GA), se puede afirmar que el tiempo de vida útil está fijado por el tiempo de biodegradación de los hidrogeles de quitosano. Tanto en presencia como en ausencia de agentes reticulantes, después de unos 35 días la matriz de encapsulamiento empieza a perder su integridad. Como consecuencia, la sensibilidad de los biosensores disminuye a medida que pasa el tiempo hasta llegar al punto de no poder realizar determinaciones. Por otro lado, cabe destacar que los valores de sensibilidad obtenidos con cada una de las matrices de inmovilización son del mismo orden de magnitud.

Estudio de reproducibilidad

Ante los resultados obtenidos, se decide descartar el uso de los agentes reticulantes estudiados (GA y HClO) en el desarrollo de matrices de inmovilización en base a quitosano y profundizar en el desarrollo de biosensores con la arquitectura Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano. Por ello, se decide determinar la reproducibilidad del proceso de construcción de estos biosensores; se construyen 10 biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano y se mide la respuesta amperométrica que ofrecen frente a incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa al aplicar una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M). A partir de las cronoamperometrías obtenidas, se construyen rectas de calibrado representando la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa. La pendiente de la recta de calibrado se asocia a la sensibilidad del biosensor (ver Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Sensibilidades obtenidas con distintos biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.

Biosensor Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano	Sensibilidad/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	R ²
1	10,58	0,9930
2	12,16	0,9998
3	12,71	0,9983
4	9,08	0,9988
5	8,66	0,9916
6	12,45	0,9992
7	8,55	0,9983
8	9,04	0,9901
9	12,19	0,9961
10	9,85	0,9993
Promedio/$\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	10,53	-
s/$\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	1,61	-
CV %	15	-

Como se muestra en la Tabla 3.9, los valores de sensibilidad obtenidos con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano se encuentran comprendidos entre 9 y 13 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, en un rango lineal de concentraciones entre 0,25 mM y 1,25 mM en glucosa. Las variaciones en los valores obtenidos se deben a las diferentes etapas del proceso de construcción del biosensor: el pulido del titanio, el proceso de anodizado, la deposición de enzima y el proceso de inmovilización. Todas estas etapas son procesos manuales que influyen en la reproducibilidad de la construcción de los biosensores. A pesar de ello, la variación entre la sensibilidad de los biosensores estudiados es relativamente baja, presentando un valor promedio de sensibilidad de 10,53 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y un coeficiente de variación del 15%. Por tanto, es posible afirmar que el proceso de fabricación de los biosensores en base a quitosano (Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano) es reproducible y que estos ofrecen respuestas amperométricas suficientemente sensibles frente a la glucosa.

Finalmente, se compara el rango lineal y la sensibilidad que ofrecen los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano con los valores bibliográficos que ofrecen otros biosensores

amperométricos de glucosa, con estructuras similares a los biosensores sometidos a estudio. En la Tabla 3.10, se muestran algunos ejemplos.

Tabla 3.10. Ejemplos de biosensores amperométricos de glucosa descritos en bibliografía con estructuras similares al biosensor desarrollado en esta tesis. Se muestra la aplicación final del biosensor, su rango lineal y su sensibilidad.

Esquema del biosensor	Tipo de muestra	Rango lineal/mM	Sensibilidad/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Referencia bibliográfica
GCE/PB/PDA-GOx	Muestras fisiológicas	0,2-3,4	1,59	[206]
Gr/PANI/AuNPs/GOx	Sangre completa	0,2-11,2	4,58	[204]
SPCE/PPy/CNC/GOx	-	1,0-2,0	0,73	[208]
GC/PMPD-PB/GOx	Suero fisiológico	0,025-0,65	2,54	[207]
SPCE-PB/GOx/Celulosa	Bebidas	0,25-2,00	2,14	[205]
RGO/PI/AuPd/GOx	Suero humano	0,024-4,6	2,82	[167]
Pt/GOx-GA	Control de bioprocesos	0,01-20	1,47	[54]
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano	Muestras alimentarias	0,25-1,25	10,53	Presente tesis

AuNPs, nanopartículas de oro; CNC, nanocristal de celulosa; GA, glutaraldehído; GCE, electrodo de carbón vítreo; Gr, grafeno; PANI, polianilina; PB, azul de Prusia; PDA, dopamina polimerizada; PI, poliimida; RGO, óxido de grafeno reducido; PMPD, poli(m-fenilenediamina); PPy, polipirrol; SPCE, electrodo serigrafiado de carbono.

Como puede verse en la Tabla 3.10, el biosensor desarrollado en la presente tesis presenta valores de sensibilidad ($10,53 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$) más elevados en comparación con otros biosensores similares descritos en bibliografía. Este hecho puede deberse a la estructura intrínseca del electrodo Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano, que permite la inmovilización de muchas moléculas de enzima y que ayuda a que estas conserven su estructura biológicamente activa. En primer lugar, los nanotubos de TiO₂ ofrecen un entorno biocompatible y una elevada superficie específica que permiten la correcta inmovilización de un elevado número de moléculas de GOx. En segundo lugar, el Quitosano es un hidrogel que siente afinidad por las proteínas y previene la desnaturalización de los enzimas, ofreciendo un entorno biocompatible óptimo para la GOx. Por tanto, la elevada actividad electroquímica registrada con el biosensor se debe a una interacción positiva entre todos los componentes de este; la interfase electroquímica (Ti/TiO₂NTAs) y la matriz de inmovilización (Quitosano). Cabe destacar que, cuando se optimiza un procedimiento analítico, uno de los objetivos es maximizar la sensibilidad para poder obtener límites de detección y cuantificación más bajos. Sin embargo, un aumento en la sensibilidad normalmente se traduce en una reducción del rango lineal dinámico [265]. Este fenómeno se observa en el biosensor desarrollado, ya que en comparación con el resto de los biosensores descritos en bibliografía (ver Tabla 3.10) presenta la mayor sensibilidad ($10,53 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$) y el menor rango lineal (0,25-1,25 mM).

3.2.1.4. Discusión de los resultados de la inmovilización por hidrogeles

Se han evaluado tres polímeros diferentes (carragenina, 2-hidroxietilmetacrilato y quitosano) para la obtención de matrices de inmovilización enzimática en el desarrollo de biosensores amperométricos.

En primer lugar, para los biosensores en base *kappa*-carragenina se han desarrollado hidrogeles a distintas concentraciones. Cabe destacar que las concentraciones más diluidas de *kappa*-carragenina (0,3%) generan un hidrogel con baja capacidad de adherencia sobre la interfase electroquímica. En cambio, las concentraciones más elevadas (1,25%) de *kappa*-carragenina presentan un grado de cohesión demasiado elevado para permitir la correcta difusión de los reactivos y productos entre la disolución y la superficie del electrodo. Las concentraciones intermedias de *kappa*-carragenina (0,4% y 0,5%) presentan una buena adhesión, pero siguen presentando problemas difusionales; la matriz de inmovilización dificulta el movimiento de especies entre la disolución de medida y la superficie del electrodo. Por este motivo, los biosensores desarrollados con *kappa*-carragenina presentan valores de sensibilidad relativamente bajos (entre 0,24 y 1,77 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$).

En segundo lugar, los biosensores en base poli-HEMA presentan valores de sensibilidad relativamente elevados. Los valores de sensibilidad obtenidos con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA están comprendidos entre 8,43 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y 14,76 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. La evolución de la sensibilidad a lo largo del tiempo sigue la misma tendencia para todos los biosensores realizados; disminuye constantemente hasta no ser posible realizar determinaciones amperométricas con los biosensores desarrollados. El tiempo de vida útil es de aproximadamente 14 días. Transcurrido este tiempo, los biosensores pierden toda su sensibilidad como consecuencia de la degradación de la matriz de inmovilización.

Con la intención de aumentar el tiempo de vida útil de estos biosensores, se decide añadir Quitosano a la matriz de inmovilización y se construyen los sensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano. Estos biosensores muestran una sensibilidad promedio de 10,48 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, un valor del mismo orden de magnitud que muestran los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA (11,95 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). Por tanto, en ambos casos la matriz de inmovilización es favorable para la conservación de la estructura biológicamente activa de las moléculas de enzima. Por otro lado, los diferentes biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano presentan distintos tiempos de vida útil, comprendidos entre los 37 y los 70 días respectivamente. Por tanto, al añadir quitosano sobre el poli-HEMA, se mantienen los valores de sensibilidad respecto a los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA y se consigue una mejora en la estabilidad a largo plazo.

En tercer lugar, las propiedades mecánicas de los hidrogeles en base quitosano se modifican añadiendo agentes reticulantes a la red tridimensional. Como agentes reticulantes se utilizan glutaraldehído y ácido hipocloroso. Mediante estudios reológicos, es posible observar en ambos casos un aumento de la cohesión de la red polimérica. Al utilizar estos hidrogeles como matriz de inmovilización para la glucosa oxidasa sobre la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs, se obtienen respuestas lineales de los diferentes biosensores en un rango de concentración de

glucosa comprendido entre 0,25 mM y 1,25 mM. Además, la sensibilidad de estos biosensores es relativamente elevada, indicando que el quitosano genera un entorno favorable para la conservación de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa. El biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano presenta una sensibilidad de 10,58 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-HClO se registra un valor de 7,85 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y de 14,27 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano-GA. Estos valores de sensibilidad son del mismo orden de magnitud, por tanto, en todos los casos es posible retener una fracción similar de enzima en su conformación activa. Cabe destacar que el glutaraldehído es uno de los agentes reticulantes más eficiente para la generación de enlaces cruzados entre cadenas poliméricas. Sin embargo, controlar el grado de reticulación del polímero no es sencillo, ya que el glutaraldehído tiende a sufrir autocondensación aldólica que da lugar a la formación de polímeros irregulares [257]. Por tanto, es difícil obtener resultados reproducibles al utilizar glutaraldehído como agente reticulante. Este hecho, juntamente con la elevada toxicidad del glutaraldehído, restringe su uso para aplicaciones biomédicas y alimentarias.

Por otro lado, se ha observado que la sensibilidad a lo largo del tiempo presenta la misma tendencia para todos los de los biosensores construidos con hidrogeles en base quitosano, independientemente del grado de cohesión de la matriz inmovilizadora. Durante los primeros días, la sensibilidad aumenta hasta alcanzar un máximo. Después, la sensibilidad disminuye ligeramente hasta que transcurridas unas 4 semanas los biosensores pierden por completo su respuesta amperométrica, como consecuencia de la degradación del hidrogel. Por tanto, el grado de reticulación no afecta a la estabilidad a largo plazo de los biosensores desarrollados en base quitosano. Es por este motivo, que se descarta el uso de agentes reticulantes en el desarrollo de matrices de inmovilización en base a quitosano.

Así pues, se selecciona la arquitectura Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano para el desarrollo de matrices de inmovilización en base a este hidrogel. Se lleva a cabo un estudio de reproducibilidad del proceso de construcción, midiendo la sensibilidad de 10 biosensores. De este modo, se obtiene que la sensibilidad promedio que ofrecen los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano es de 10,53 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ con un coeficiente de variación del 15%. Por tanto, la desviación provocada por el proceso de construcción en los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano es menor a la que presentan los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA (sensibilidad promedio 11,95 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, CV del 23%) y a la de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano (sensibilidad promedio 10,48 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, CV del 26%). Así pues, al eliminar una etapa del proceso de construcción aumenta la reproducibilidad de éste.

En resumen, se puede afirmar que los hidrogeles de *kappa*-carragenina estudiados no son favorables para el desarrollo de biosensores amperométricos. En cambio, tanto las matrices de inmovilización en base quitosano como los hidrogeles en base poli-HEMA generan un microentorno favorable para las moléculas de enzima. Al utilizar estos hidrogeles, se inmoviliza una elevada población de enzima en su conformación biológicamente activa. Por este motivo, se obtienen biosensores altamente sensibles ante la presencia de glucosa en el medio. Por otro lado, se ha visto que los biosensores que contienen quitosano en su arquitectura muestran una

mayor estabilidad a largo plazo que los biosensores en base poli-HEMA. Mientras que los primeros muestran un tiempo de vida útil de unas 4 semanas, los segundos solamente llegan a las 2 semanas. De entre todos los biosensores estudiados, los que presentan una mayor estabilidad a largo plazo son los Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano, ya que conservan su capacidad analítica entre los 41 y los 70 días. Los biosensores en base a quitosano (Quitosano, Quitosano-HClO y Quitosano-GA) también presentan tiempos de vida útil relativamente elevados (alrededor de los 35 días). Por tanto, es posible afirmar que la presencia de quitosano en la matriz de inmovilización favorece la conservación de la capacidad catalítica de las moléculas de enzima a lo largo del tiempo.

Ante los resultados obtenidos, se selecciona el quitosano como matriz de inmovilización física en el desarrollo de biosensores amperométricos. En concreto, se selecciona la arquitectura de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano. Esta elección se basa en la elevada sensibilidad de los biosensores obtenidos ($10,58 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$), a la elevada estabilidad a largo plazo (35 días) y a la simplicidad del proceso de construcción.

3.2.2. Inmovilización covalente

Una de las principales dificultades en el desarrollo de biosensores electroquímicos enzimáticos es conseguir inmovilizar correctamente las moléculas de enzima sobre la superficie del electrodo. La inmovilización debe hacerse de tal modo que las moléculas de enzima conserven su estructura activa y adopten una orientación espacial adecuada, de modo que el analito pueda llegar hasta el centro activo del enzima donde tendrá lugar la reacción enzimática de interés. Sin embargo, la accesibilidad al centro activo del enzima es complicada. En la mayoría de los casos, el centro activo donde tiene lugar la reacción de interés se encuentra situado en el centro de un envoltorio proteico de difícil acceso para el propio enzima [7,25]. Este es el caso particular de la glucosa oxidasa, una glicoproteína homodimérica con un grupo Dinucleótido de Flavina y Adenina (FAD) como cofactor fuertemente enlazado en el centro activo de cada subunidad enzimática [26], además de estar situado debajo de la superficie de la proteína [27] (ver Figura 3.28). El cofactor FAD es el responsable de las propiedades redox de la GOx, por lo que, al desarrollar un biosensor electroquímico de glucosa, es importante que el grupo FAD se sitúe cerca de la superficie del electrodo para obtener señales electroquímicas sensibles. Pero también es importante que en este proceso se conserve la conformación espacial activa de las moléculas de GOx.

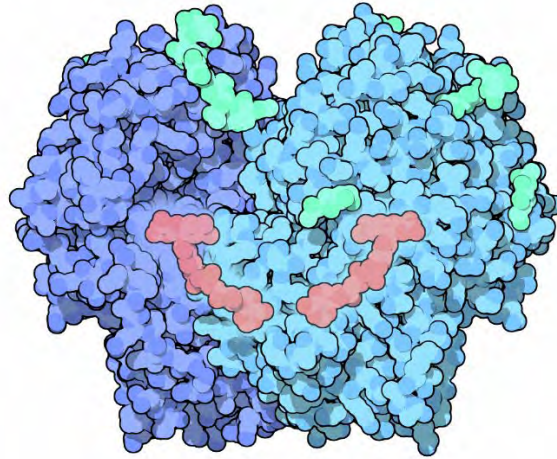


Figura 3.28. Estructura tridimensional de la glucosa oxidasa [266]. En tonos rojos se aprecian los dos grupos FAD.

Al aplicar la inmovilización por encapsulamiento en matrices de hidrogeles, se obtienen biosensores sensibles y selectivos a la presencia de glucosa de forma sencilla y rápida, como se ha discutido en el apartado 3.2.1. Sin embargo, en esta configuración es posible que la propia matriz de encapsulamiento desnaturalice al enzima o que parte de las moléculas de GOx inicialmente retenidas se escapen de la matriz de inmovilización, acortando el tiempo de vida útil de los biosensores desarrollados. En cambio, al aplicar un método de inmovilización covalente las moléculas de enzima quedan retenidas de forma permanente en la superficie del electrodo, por lo que no pueden escapar de la interfase electroquímica. Además, la unión covalente por más de un punto de la estructura del enzima favorece la conservación de una conformación espacial determinada sobre la superficie del electrodo. Bajo estas condiciones, el enzima tiende a conservar una estructura fija y es menos vulnerable a sufrir alteraciones como consecuencia de cambios locales de pH o temperatura [267]. Por tanto, al aplicar métodos de inmovilización covalente se favorece la estabilidad del enzima. Además, los enlaces covalentes tienen una longitud y una fuerza determinadas, que permiten garantizar que las moléculas de enzima inmovilizadas se encontraran en una zona cercana a la superficie del electrodo [116]. Por tanto, el acceso del H_2O_2 generado como consecuencia de la reacción enzimática hasta la superficie del electrodo, donde se transforma electroquímicamente, tiene mayor probabilidad de ocurrir. Este hecho se traduce en una mejora de la sensibilidad de los biosensores desarrollados. Por todos estos motivos, se ha propuesto un nuevo método de inmovilización enzimática basado en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima y la superficie del electrodo.

Para alcanzar este objetivo, se decide trabajar con pentafluorofenilmetacrilato (PFM). El PFM presenta un grupo éster reactivo con los grupos amino presentes en la estructura de la GOx, por lo que ésta queda retenida químicamente en la superficie del electrodo mediante la formación de un enlace amida [144] (ver Figura 3.29).

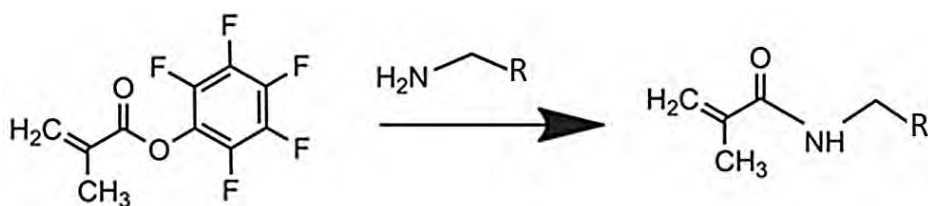


Figura 3.29. Esquema de la reacción entre el grupo éster reactivo del pentafluorofenilmetacrilato (PFM) y un grupo amino [268].

De este modo, al aplicar un método de inmovilización covalente, se espera observar una mejora en las propiedades de los biosensores de glucosa obtenidos. En los siguientes apartados, se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de biosensores amperométricos basados en la inmovilización covalente de las moléculas de glucosa oxidasa sobre la superficie del electrodo de trabajo Ti/TiO₂NTAs.

3.2.2.1. Procesos de modificación de superficie

Para la obtención de biosensores amperométricos de glucosa por inmovilización covalente, se propone utilizar como electrodo de trabajo la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs. Sobre esta interfase electroquímica se depositará el PFM que actúa como ancla para las moléculas de GOx. Para la deposición del PFM sobre el electrodo de trabajo, se han utilizado diferentes técnicas de modificación de superficie basadas en la polimerización por plasma. Gracias a estas técnicas, se obtiene una fina película polimérica que recubre la superficie del electrodo y deja un elevado número de grupos éster reactivos expuestos para la inmovilización del enzima. Concretamente, se han utilizado dos técnicas para la deposición de PFM: deposición química de vapor asistida por plasma (PECVD) y el *grafting* o sembrado por plasma.

La polimerización por plasma permite la obtención de un recubrimiento homogéneo e hidrofóbico de PFM (ppPFM) que recubre toda la superficie del electrodo. Mientras que, el sembrado por plasma de PFM (pgPFM) genera una superficie menos hidrofóbica en la que el PFM está distribuido como puntos aislados. En ambos casos, se obtiene una interfase electroquímica activa para la inmovilización covalente de enzimas.

El primer paso en el desarrollo de biosensores de glucosa mediante inmovilización covalente es determinar las condiciones más adecuadas de los procesos de modificación de superficie. Con este fin, se realizaron distintos procedimientos utilizando electrodos de Ti metálico (sin anodizar) pulidos hasta obtener una superficie homogénea.

Polimerización por plasma de PFM

En primer lugar, cabe destacar que el proceso de polimerización por plasma de PFM (ppPFM) aplicado se basa en las condiciones óptimas previamente establecidas en otros trabajos realizados por el Grup d'Enginyeria de Materials (GEMAT) en el Institut Químic de Sarrià [146]. Las modificaciones de superficie se llevan a cabo en un reactor vertical de plasma de acero

inoxidable (ver Figura 3.15). Durante todos los experimentos, se mantiene la presión inicial de base alrededor de $9 \cdot 10^{-4}$ mbar.

Sobre la superficie de los electrodos se deposita una película fina y homogénea de pentafluorofenilmetacrilato (Apollo Scientific, ref. 13642-97-2) mediante deposición química en fase vapor asistido por plasma (PECVD). Para ello, se depositan los electrodos en el centro del plato de aluminio dentro de la cámara del reactor de plasma que puede verse en la Figura 3.15. A continuación, se abre el balón que contiene el monómero (PFM), previamente calentado hasta $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta que la presión se estabiliza entre $3 \cdot 10^{-2}$ mbar y $5 \cdot 10^{-2}$ mbar. Seguidamente, se fija la potencia de radiofrecuencia continua en 15 W y se lleva a cabo la polimerización por plasma pulsado (ciclo de trabajo 10/20) durante 15 min [146]. Transcurrido este tiempo, se apaga el plasma y se mantiene constante el flujo de vapor PFM durante 10 minutos más. De esta manera se obtiene una capa homogénea de PFM polimerizado por plasma (ppPFM). Finalmente, los electrodos recubiertos con PFM se retiran del reactor y se conservan en un desecador de vacío hasta su uso.

En la presente tesis, se decidió modificar la variable tiempo del proceso de polimerización con la finalidad de comparar la respuesta amperométrica de las interfases electroquímicas modificadas con recubrimiento poliméricos de PFM de diferentes grosores. Concretamente, se probaron dos tiempos de polimerización: 15 min y 30 min. En ambos casos, se recubren electrodos de titanio sobre los que posteriormente se depositan 20 μL de disolución de GOx (15 mg/500 μL) que se deja difundir durante 24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo, se elimina utilizando PBS el exceso de GOx que no ha reaccionado con el PFM presente en la superficie de los electrodos.

Cabe destacar que la elección de la interfase electroquímica, Ti en lugar de Ti/TiO₂NTAs, se basó en la simplicidad de obtención de esta, ya que el proceso de fabricación de los nanotubos de TiO₂ consume mucho tiempo. Así pues, para comprobar cuál de los dos tiempos de polimerización es el más adecuado para la aplicación en el desarrollo de biosensores enzimáticos, se mide la respuesta amperométrica que ofrecen los biosensores Ti/PFM/GOx frente a la presencia de glucosa. De este modo, se registra la intensidad a lo largo del tiempo al adicionar glucosa sobre 100 mL PBS y aplicando una diferencia de potencial de $-0,4\text{ V}$ vs Ag/AgCl/KCl (3M). En la Figura 3.30, se muestran los resultados obtenidos.

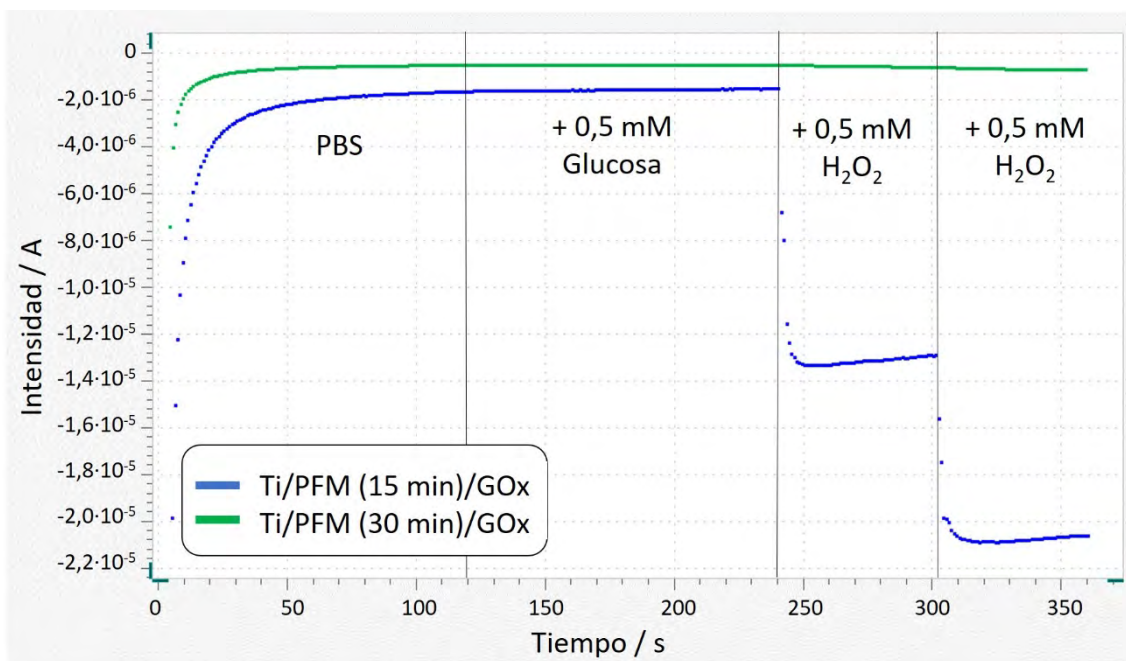


Figura 3.30. Respuesta amperométrica de dos biosensores Ti/PFM/GOx obtenidos mediante polimerización por plasma. El proceso de polimerización se llevó a cabo en distintos periodos de tiempo: 15 min (línea azul) y 30 min (línea verde).

Como puede verse en la Figura 3.30, ninguno de los biosensores Ti/ppPFM/GOx muestra una señal significativa ante la presencia de 0,5 mM de glucosa en el medio. Este hecho puede ser consecuencia del espesor del recubrimiento polimérico depositado sobre la superficie de los electrodos. Si la película polimérica de PFM depositada es demasiado gruesa, las moléculas de enzima quedan muy alejadas de la superficie del electrodo. Por tanto, es posible que el H_2O_2 generado de la reacción enzimática no pueda llegar a reducirse sobre el electrodo generando la respuesta amperométrica esperada. Por este motivo, se decidió realizar dos adiciones de 0,5 mM de H_2O_2 . Como puede verse en la Figura 3.30, el biosensor obtenido al realizar la polimerización del PFM durante 30 min no registra señal tras las adiciones de peróxido de hidrógeno, indicando que el recubrimiento polimérico actúa como aislante debido a su excesivo espesor de capa. Sin embargo, el biosensor obtenido al polimerizar el PFM durante 15 min es capaz de registrar incrementos de unos $10 \mu A$ tras cada adición de 0,5 mM de H_2O_2 . Por tanto, el espesor de la película depositada permite el paso del peróxido de hidrógeno hasta la superficie del electrodo, donde se dará su reducción.

Es posible que, los biosensores Ti/ppPFM/GOx no respondan a la presencia de glucosa en el medio como consecuencia de la baja área específica que estos presentan. Al disminuir el área específica, también disminuye la sensibilidad. Por tanto, probablemente estos biosensores no puedan detectar 0,5 mM de glucosa. Por este motivo, se realiza el recubrimiento de PFM (polimerizado durante 15 min) sobre electrodos Ti/TiO₂NTAs. Sobre el electrodo obtenido se deposita GOx y se mide la respuesta amperométrica del biosensor Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx al realizar incrementos consecutivos de 0,50 mM de glucosa sobre PBS. Se aplica una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) (ver Figura 3.31).

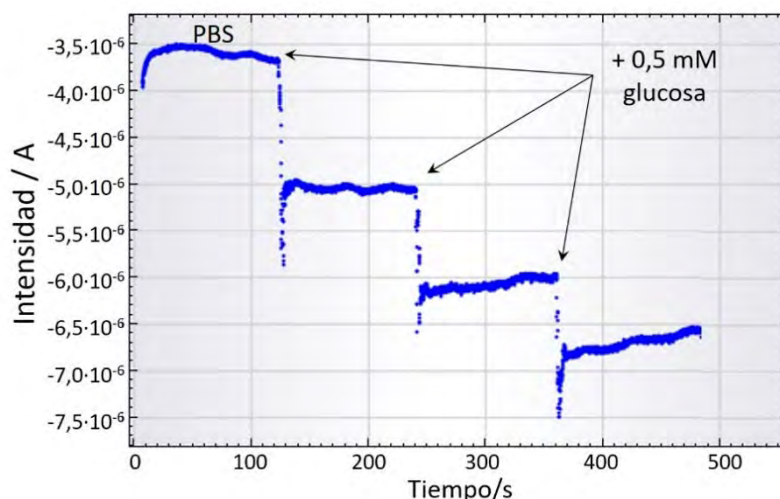


Figura 3.31. Respuesta amperométrica de un biosensor Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx al realizar adiciones de 0,25 mM de glucosa sobre 100 mL PBS, aplicando -0,4 V vs Ag/AgCl.

Como puede verse en la Figura 3.31, el biosensor obtenido tras aplicar la polimerización de plasma durante 15 min registra un incremento de aproximadamente 3 $\mu\text{A}/\text{mM}$ tras la primera adición de glucosa. Por tanto, las moléculas de enzima se han enlazado sobre el recubrimiento polimérico de PFM. Sin embargo, cabe destacar que el incremento de intensidad registrado con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx es inferior al que registra el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano (12 $\mu\text{A}/\text{mM}$ tras cada adición de glucosa, ver Figura 3.26). Este hecho indica que al aplicar la configuración covalente la población activa de enzima es menor que al utilizar quitosano como matriz de inmovilización. A pesar de ello, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx obtenido por polimerización de PFM durante 15 min muestra respuesta amperométrica frente a la glucosa. Por tanto, al aplicar estas condiciones se consigue realizar de forma satisfactoria la inmovilización covalente de las moléculas de enzima. Cabe destacar que el H₂O₂ generado en la reacción enzimática puede cruzar la película polimérica ppPFM (15 min polimerización) y llegar hasta la superficie del electrodo. Por tanto, se decide que el tiempo más adecuado para la polimerización por plasma de PFM es de 15 min.

Sembrado por plasma de PFM

En primer lugar, se modifican las condiciones para el sembrado (*grafting*) por plasma de PFM (pgPFM). Este proceso de modificación de superficie solamente se puede llevar a cabo sobre un lecho orgánico que permita la formación de radicales. El proceso consiste en la generación de un plasma de argón. Los electrones presentes en el plasma chocan con el lecho orgánico y forman radicales. De este modo se activa la superficie, ya que estos radicales son puntos activos en los que se enlazarán las moléculas del monómero a sembrar (PFM). En la Figura 3.32, se muestra una representación del proceso de activación de superficie descrito.

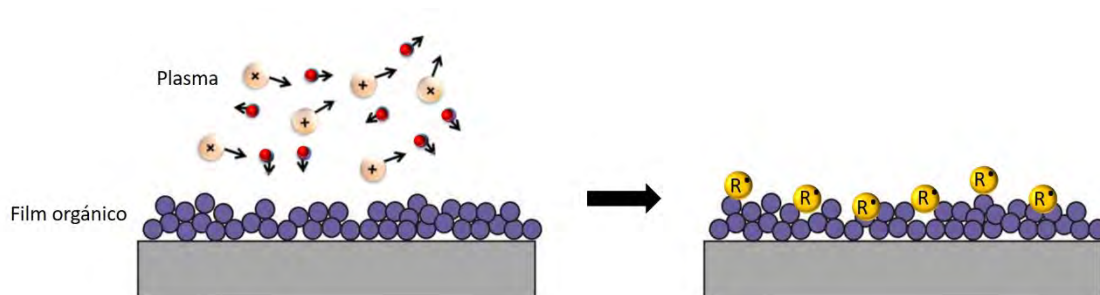


Figura 3.32. Representación esquemática del proceso de activación de superficie por generación de plasma.

Este proceso no se puede realizar sobre superficies metálicas, ya que los electrones que lleguen pasarán a través del metal sin formar los puntos activos requeridos para que el proceso tenga éxito. Por tanto, para realizar este proceso sobre electrodos de titanio es imprescindible realizar un recubrimiento previo con algún compuesto orgánico. En el caso de los electrodos Ti/TiO₂NTAs, este recubrimiento también actuará como una barrera física que impedirá que el plasma de argón erosione las nanoestructuras. Se decide trabajar con 2-hidroetilmetacrilato (HEMA). El HEMA es un hidrogel biodegradable y biocompatible que ofrecen un microentorno adecuado para las moléculas de enzima, en el que se favorece que estas presenten su conformación biológicamente activa [135,136]. Además, hay estudios que demuestran que la deposición de películas finas de poli-HEMA sobre la superficie de electrodos puede ser beneficiosa, en el sentido de que actúa como barrera protectora frente al medio de medida sin alterar la respuesta electroquímica del sensor [127,133]. Cabe mencionar que el HEMA es un compuesto muy hidrófilo que fácilmente se disuelve en medios acuosos. Por este motivo, es necesario añadir agentes reticulantes a su estructura que mejoren su resistencia a la disolución en medios acuosos. En este caso, se utiliza etilenglicoldiacrilato (EGDA), que se co-polimeriza juntamente con el HEMA. En el apartado 3.2.1.2. se detalla el proceso de copolimerización que se llevó a cabo en el mismo reactor de acero inoxidable descrito previamente (Figura 3.15).

De este modo, en el proceso de sembrado polimérico de PFM hay que modificar dos etapas: la polimerización de una película homogénea de HEMA-co-EGDA y el proceso de activación mediante plasma de Ar. A continuación, se detallan ambos procesos.

a) Polimerización por plasma de HEMA-co-EGDA

En primer lugar, se modifican las condiciones de la polimerización de HEMA-co-EGDA manteniendo constantes las condiciones del proceso de sembrado polimérico de PFM. Para ello, se utilizan electrodos de titanio para minimizar la preparación de superficie. Por tanto, se construyen biosensores y se mide la respuesta electroquímica que presentan frente a la presencia de glucosa en el medio de medida. Para ello, se siguen los siguientes pasos:

- 1) Se introducen los sensores de Ti a recubrir en la cámara del reactor de acero inoxidable (ver Figura 3.15). A continuación, se utiliza una bomba de vacío para mantener la presión del reactor alrededor de $9 \cdot 10^{-4}$ mbar.
- 2) Sobre los sensores de Ti, se realiza la polimerización conjunta de HEMA y EGDA. Para ello, se deposita el monómero (HEMA) y el agente reticulante (EGDA) en dos balones que se calientan hasta 75 °C. Entonces, se abre el balón que contiene el agente reticulante hasta que la presión se estabiliza en $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar. A continuación, se abre el balón que contiene el HEMA hasta alcanzar una presión de $3,6 \cdot 10^{-2}$ mbar. Cuando la presión es estable, se fija la potencia de radiofrecuencia continua en 20 W y se lleva a cabo la polimerización por plasma pulsado (ciclo de trabajo 2/22) durante un tiempo determinado (10 min y 20 min), que es la variable que se decide modificar. Para finalizar la reacción, se deja abierto el paso de monómeros durante 10 min más, sin generar plasma.
- 3) Para realizar el *grafting*, los electrodos recubiertos con una película orgánica se activan mediante la generación de un plasma de Argón premier (Carburos Metálicos, Ar 5.2 - pureza $\geq 99,9992\%$) en el mismo reactor. Se introduce un flujo de Ar continuo en la cámara del reactor a una presión comprendida entre $1 \cdot 10^{-1}$ mbar y $1,5 \cdot 10^{-1}$ mbar. A continuación, se fija la potencia de radiofrecuencia continua en 15 W y se genera un plasma continuo durante 15 min. Después, se apaga el plasma y se cierra el paso de argón. Finalmente, se abre el balón que contiene el monómero PFM a una temperatura de 75 °C hasta que la presión alcanza unos $7,7 \cdot 10^{-2}$ mbar durante 15 min. De esta manera, se obtiene una superficie sembrada con puntos activos de PFM (pgPFM) repartidos por toda la superficie.
- 4) Sobre los sensores Ti/HEMA-co-EGDA/gPFM obtenidos, se depositan 20 μ L de una disolución de glucosa oxidasa (GOx), durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de GOx no enlazada limpiando con PBS y se mide su respuesta amperométrica.

Una vez obtenidos los biosensores Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx, se mide su respuesta amperométrica mediante cronoamperometrías. Se mide la intensidad a lo largo del tiempo, al aplicar una diferencia de potencial de -0.4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) y al realizar incrementos consecutivos de glucosa 0.5 mM cada 2 min sobre 100 mL de PBS. A continuación, se representa la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa y se ajusta una recta de calibrado. La pendiente de la recta de calibrado se asocia a la sensibilidad del biosensor. En la Tabla 3.11, se presentan los valores de sensibilidad obtenidos con los biosensores en base a titanio al aplicar distintos tiempos de polimerización de HEMA-co-EGDA.

Tabla 3.11. Rectas de calibrado obtenidas con los biosensores Ti/HEMA-co-EGDA/gPFM/GOx, al aplicar distintos tiempos de polimerización en el plasma de HEMA/EGDA (10 min y 20 min).

Tiempo del proceso de polimerización del HEMA-co-EGDA	Tiempo del proceso de sembrado de PFM	Pendiente / $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Ordenada en el origen/ μA	R ²	Rango lineal /mM
10 min	15 min	-0,34	-0,08	0,9933	0,50 - 1,97
20 min	15 min	-0,10	-0,03	0,9892	0,50 - 1,97

Como puede verse en la Tabla 3.11, si se realiza la polimerización de HEMA-co-EGDA durante 10 min, se obtiene una mayor sensibilidad que al aplicar la polimerización durante 20 min. Al aplicar un tiempo de polimerización más grande, la película polimérica que se forma es más gruesa. Por tanto, es posible que la polimerización durante 20 min genere un recubrimiento que actúa a modo de barrera, bloqueando el acceso del H₂O₂ generado durante la reacción enzimática hasta la superficie del electrodo. En este caso, el peróxido de hidrógeno generado queda más alejado de la superficie del electrodo que al polimerizar durante 10 min, por lo que se registra una menor sensibilidad con el biosensor desarrollado. Por tanto, se decide que para la generación de biosensores Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx el tiempo de polimerización más adecuado es de 10 min.

Cabe mencionar que, los valores de sensibilidad obtenidos son muy inferiores a los que se obtienen con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano (10,53 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). Este hecho se debe principalmente a dos factores. En primer lugar, a la diferencia de áreas activas que presentan ambos electrodos; la presencia de nanotubos de TiO₂ aumenta considerablemente el área activa del sensor y, por tanto, su sensibilidad. En segundo lugar, cuando los enzimas entran en contacto con superficies metálicas, estos tienden a desnaturalizarse y a perder su capacidad catalítica, mientras que el TiO₂ favorece la estabilidad del enzima. Por tanto, es importante la presencia de TiO₂NTAs para aumentar la sensibilidad de los biosensores desarrollados.

b) Sembrado (grafting) por plasma de PFM

Una vez determinado el tiempo más adecuado para llevar a cabo el proceso de polimerización de HEMA-co-EGDA, se evalúan las condiciones del proceso de *grafting* polimérico de PFM. Para ello, se realizan varias experiencias, manteniendo constantes las condiciones de la polimerización de HEMA-co-EGDA. Los pasos llevados a cabo son los siguientes:

- 1) Se repite el paso 1 del proceso de *Polimerización por plasma de HEMA-co-EGDA*.
- 2) Se repite el paso 2 del proceso de *Polimerización por plasma de HEMA-co-EGDA*, manteniendo abierto el paso de monómeros durante 10 min.
- 3) Se repite el paso 3 del proceso de *Polimerización por plasma de HEMA-co-EGDA*, modificando el tiempo de aplicación del plasma de Ar. Se realizan experiencias aplicando 5 min, 15 min, 22 min y 30 min de polimerización.
- 4) Se repite el paso 4 del proceso de *Polimerización por plasma de HEMA-co-EGDA*.

A continuación, se mide la sensibilidad de los biosensores obtenidos (Ti/HEMA-co-EGDA/gPFM/GOx) mediante cronoamperometrías. Se mide la intensidad a lo largo del tiempo, al aplicar una diferencia de potencial de -0.4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) y al realizar incrementos consecutivos de glucosa 0.5 mM cada 2 min sobre 100 mL de PBS. En la Tabla 3.12, se muestra la sensibilidad de los biosensores construidos al variar el tiempo de aplicación del plasma de Ar.

Tabla 3.12. Rectas de calibrado obtenidas con los biosensores Ti/HEMA-co-EGDA/gPFM/GOx frente a la presencia de glucosa, al aplicar distintos tiempos de plasma de Ar (5 min, 15 min, 22 min y 30 min).

Tiempo del proceso de polimerización del HEMA-co-EGDA	Tiempo del proceso de sembrado de PFM	Pendiente / $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Ordenada en el origen/ μA	R ²	Rango lineal /mM
10 min	5 min	-	-	-	-
10 min	15 min	-0,34	-0,08	0,9933	0,50 - 1,97
10 min	22 min	-0,06	-0,01	0,9905	0,50 - 1,97
10 min	30 min	-0,07	-0,06	0,9814	0,50 - 1,97

Como puede verse en la Tabla 3.12, al aplicar 5 min de plasma de Ar no se obtiene respuesta electroquímica significativa frente a la presencia de glucosa en el medio. Esto puede deberse a que el tiempo de activación de superficie es demasiado corto y no permite generar suficientes puntos activos en los que se enlazarán el PFM. En cambio, al aplicar tiempos de activación mayores a 5 min los biosensores desarrollados presentan actividad frente a la presencia de glucosa. Cabe destacar que, la sensibilidad obtenida en todos los casos es inferior a la de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitano (10,53 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$), como consecuencia de la diferencia de áreas activas entre los electrodos Ti y Ti/TiO₂NTAs. Por otro lado, al aplicar tiempos de activación mayores a los 15 min, la sensibilidad de los biosensores disminuye. En estos casos, es posible que la elevada densidad de moléculas de PFM provoque un aumento de la hidrofobicidad del medio y parte de las moléculas de GOx enlazadas adopten una conformación inactiva. De este modo, la sensibilidad del biosensor disminuye porque hay una menor ratio de conversión de glucosa a ácido glucónico y H₂O₂. Por tanto, tras aplicar durante 15 min el plasma de argón, se obtienen los biosensores con mayor sensibilidad y se decide trabajar bajo estas condiciones para futuras experiencias.

Una vez conocidas las condiciones más adecuadas para las modificaciones de superficie por técnicas de plasma, se aplican estas condiciones a distintos sensores. De este modo, al aplicar la polimerización por plasma, se obtiene un recubrimiento homogéneo de PFM (ppPFM), mientras que al aplicar el sembrado por plasma de PFM (pgPFM), se obtiene una dispersión a lo largo de la superficie de pequeñas islas de PFM.

3.2.2.2. Estudio conformacional de las moléculas de GOx

Como se ha mencionado anteriormente, se aplican dos técnicas de modificación de superficie por plasma (polimerización y sembrado) para la deposición de PFM sobre la superficie de los electrodos en los que se inmoviliza glucosa oxidasa. En primer lugar, se estudia la morfología de las superficies obtenidas al aplicar ambas técnicas sobre superficies lisas de titanio. Para ello, se aplicó microscopía electrónica de barrido de emisión de campo utilizando un FE-SEM (MERLIN, Carl Zeiss). En la Figura 3.33, se muestran las micrografías obtenidas.

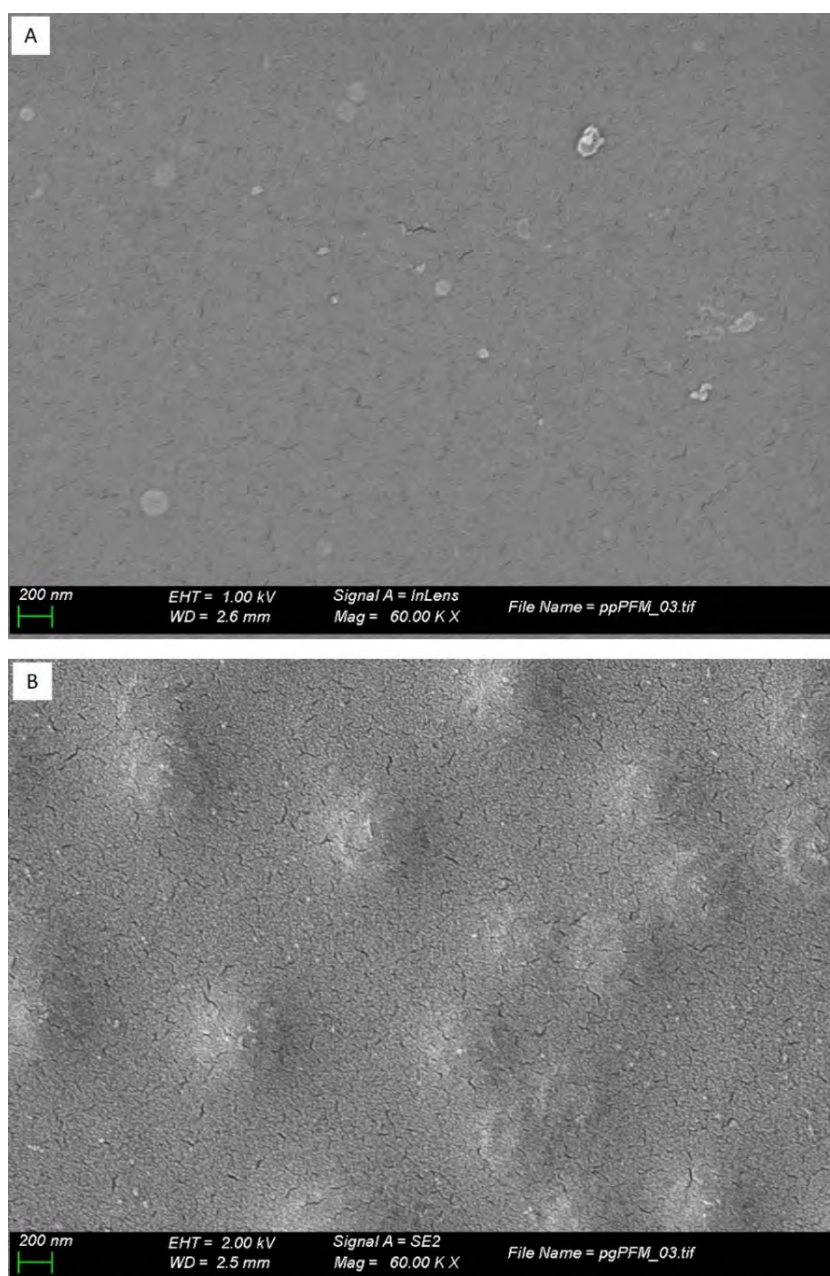


Figura 3.33. Micrografías FE-SEM de superficies de titanio modificadas mediante técnicas de plasma: (A) polimerización por plasma de PFM y (B) sembrado por plasma de PFM sobre un film polimérico de HEMA-co-EGDA.

Como se muestra en la Figura 3.33.A, al realizar la polimerización por plasma de PFM se obtiene un recubrimiento homogéneo a lo largo de toda la superficie del sensor. En cambio, al aplicar el sembrado por plasma (ver Figura 3.33.B) se obtienen islas de PFM distribuidas por la

superficie del sensor. En este caso, al realizar la activación mediante un plasma de Ar sobre el recubrimiento de HEMA-co-EGDA se generan radicales libre en zonas localizadas de la superficie donde se enlaza de forma preferente el PFM. De este modo, se generan las islas que se observan en la Figura 3.33.B. Estas islas corresponden a los sitios activos de la superficie en los que se enlazarán las moléculas de enzima.

Se espera que las superficies obtenidas al aplicar ambos métodos de inmovilización difieran en la hidrofobicidad del microentorno que se genera alrededor de las moléculas de enzima. El PFM es un polímero muy hidrofóbico, mientras que el HEMA es altamente hidrófilo. Por tanto, se espera que los sensores en los que se da la polimerización de una película homogénea de PFM sean más hidrofóbicos que los sensores en los que se ha realizado el proceso de grafting. Este cambio en la hidrofobicidad del microentorno que rodea el enzima puede provocar cambios conformacionales en las moléculas de GOx covalentemente inmovilizadas, que pueden llegar a perder su actividad catalítica.

Con la finalidad de estudiar cómo influye el proceso de inmovilización sobre la conformación espacial y la actividad catalítica de las moléculas de glucosa oxidasa inmovilizadas, se utiliza una microbalanza de cristal de cuarzo con registro de disipación (QCM-D). Concretamente, se utiliza una QCM-D Q-Sense E1 (Q-Sense AB) (ver Figura 3.34).

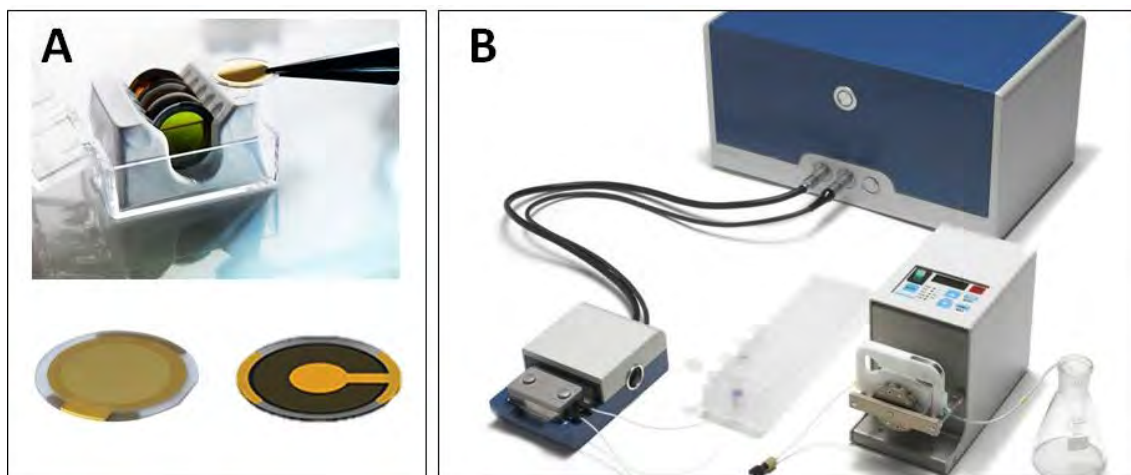


Figura 3.34. (A) Sensores piezoeléctricos de cristal de cuarzo de corte AT con una frecuencia natural de 4,95 MHz y (B) microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación (QCM-D).

La caracterización se lleva a cabo utilizando sensores piezoeléctricos de cristal de cuarzo de corte AT con una frecuencia natural de 4,95 MHz, con dos recubrimientos diferentes; sensores con una capa de oro sobre la que se ha depositado otra capa de poliestireno (QSX305, Q-Sense AB) y sensores con una capa de titanio (QSX310, Q-Sense AB). Cabe mencionar que, después de cada uso, se limpian los sensores piezoeléctricos y la cámara de la QCM-D siguiendo las indicaciones del fabricante.

- Los sensores de poliestireno se sumergen en una disolución 1% (v/v) de Deconex 11 (Panreac, ref. A3547) en agua durante 30 min a 30 °C. Seguidamente, se sumergen durante 2 h en agua ultrapura. Finalmente, se lavan con etanol 99% y se secan con nitrógeno.

- Los sensores de titanio se sumergen en una disolución 1% (v/v) de Hellmanex II (Hellma Analytics, ref. 320.001) en agua durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavan con agua ultrapura y se secan con nitrógeno gas. Finalmente, se someten a un baño de ultrasonidos en etano 99% durante 10 min, se lavan con agua ultrapura y se secan con nitrógeno.
- La cámara de la QCM-D se limpia bombeando una disolución al 2% (v/v) de Hellmanex II en agua ultrapura a un flujo constante de 1 mL·min⁻¹ durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se bombea agua ultrapura al mismo flujo durante 1,5 h. Finalmente, se seca la cámara con una corriente de nitrógeno.

Para realizar las medidas con las QCM-D, se utilizaron en primer lugar los sensores con un recubrimiento de poliestireno (PS), de este modo no es necesario realizar la polimerización de HEMA-co-EGDA porque el propio sensor ya presenta una película orgánica que permite realizar el sembrado por plasma de PFM. Así pues, es posible estudiar solamente la influencia de las dos técnicas de modificación de superficie aplicadas para inmovilizar las moléculas de enzima.

La polimerización por plasma permite la obtención de una película homogénea e hidrofóbica de PFM (ppPFM) que recubre toda la superficie del electrodo. Mientras que, el sembrado por plasma de PFM (pgPFM) genera una superficie menos hidrofóbica en la que el PFM está distribuido como puntos aislados por toda la superficie del sensor.

Las dos técnicas se comparan utilizando el enzima glucosa oxidasa. A continuación, mediante el uso de la QCM-D, es posible determinar la masa adsorbida en la superficie de cada sensor, así como las propiedades viscoelásticas de la película proteica inmovilizada. Para ello, se registran en continuo la frecuencia y la disipación de los sensores piezoeléctricos al hacer pasar diferentes disoluciones con la ayuda de una bomba peristáltica. En primer lugar, se colocan correctamente los sensores en la cámara de la QCM-D y se registra durante 5 min la señal de base, utilizando una disolución de PBS 0,1 M a pH 7. A continuación, se registra el proceso de adsorción de las moléculas de enzima sobre la superficie estudiada: se bombea durante 35 min una disolución 0,2 mg·mL⁻¹ de GOx en PBS. Seguidamente, se elimina el exceso de proteína que no se ha enlazado covalentemente a la superficie del sensor: durante 10 min se bombea PBS y durante 40 min se introduce en la cámara de medida una disolución 10 mM de dodecilsulfato sódico (SDS) a pH 5. Finalmente, se recuperan las condiciones iniciales bombeando durante 10 min PBS a pH 7. Todas las medidas se llevan a cabo a temperatura ambiente con una velocidad de flujo constante de 50 μL·min⁻¹ y en todos los casos se registran los armónicos 3^o, 5^o, 7^o, 9^o, 11^o y 13^o. Además, todas las disoluciones utilizadas se desgasifican antes de ser utilizadas, para evitar la formación de burbujas que podrían alterar los resultados obtenidos.

En la Figura 3.35, se muestran los perfiles de frecuencia (f) y disipación (D) obtenidos con un sensor de poliestireno sin tratar (utilizado como blanco), con un sensor de poliestireno recubierto de una película polimérica de PFM y con un sensor de poliestireno sobre el que se ha realizado un proceso de sembrado por plasma de PFM.

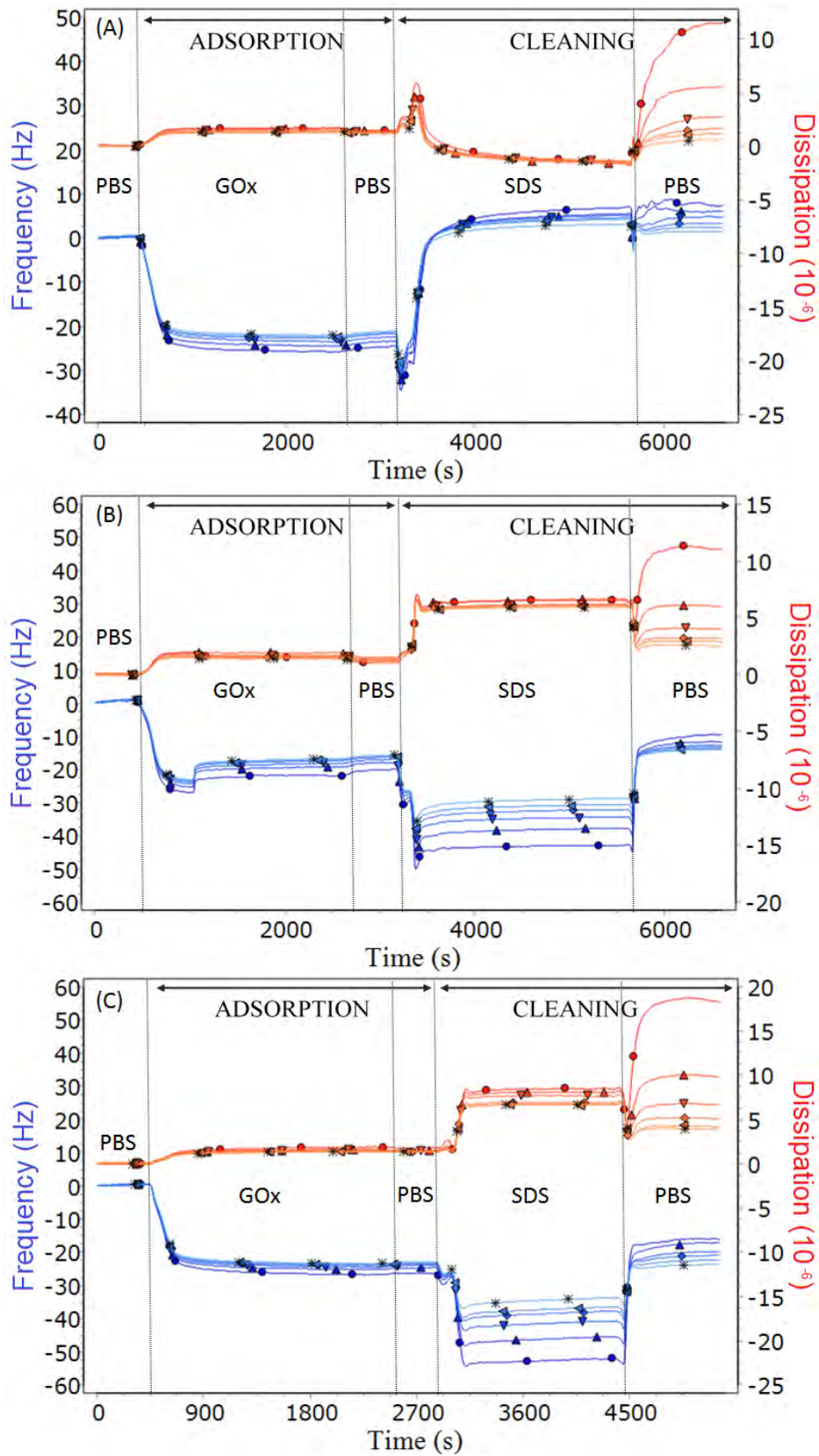


Figura 3.35. Perfiles de frecuencia (líneas azules) y disipación (líneas rojas) a lo largo del tiempo obtenidos con una QCM-D al inmovilizar GOx y limpiar con PBS y SDS sobre tres superficies diferentes: poliestireno (A), película polimérica de PFM (B) y sembrado por plasma de PFM (C). En todos los casos se registran el 3^{er} (●), 5^o (▲), 7^o (▼), 9^o (◆), 11^o (◀) y 13^o (◻) sobretono.

En la Figura 3.35, se muestran los perfiles de frecuencia (f) y disipación (D) registrados con cada uno de los sensores de poliestireno (PS) obtenidos.

En primer lugar, se registra durante 5 min una línea base al hacer circular por el sistema de medida una disolución 0,1 M de PBS a pH 7,0 con la intención de estabilizar el cristal de cuarzo. A continuación, se bombea una disolución de 0,2 mg·mL⁻¹ de GOx que hace variar las señales de frecuencia y disipación. En todos los casos, la frecuencia registrada disminuye rápidamente y se estabiliza entre -20 Hz y -25 Hz. Esta disminución en la frecuencia significa que la masa adsorbida en la superficie de los electrodos aumenta, es decir, que hay una interacción entre las moléculas de GOx y la superficie de los electrodos.

En segundo lugar, se realiza un proceso de limpieza para eliminar las moléculas que no se han retenido covalentemente. Para ello, se utiliza una disolución 0,1 M de PBS a pH 7,0 seguida de una disolución 10 mM de SDS a pH 5 [269]. El SDS es un detergente que actúa sobre las moléculas libres de enzima, forma micelas a su alrededor y provocando la disociación en subunidades, facilitando así la retirada de estas de la superficie del sensor. Cabe mencionar que la glucosa oxidasa es resistente a la desactivación y a la disociación en subunidades cuando la disolución de SDS presenta un pH superior a 6 [269], por tanto es necesario mantener el pH de la disolución más ácido que 6 para garantizar que las moléculas no enlazadas se eliminarán correctamente de la superficie del sensor.

Al realizar el proceso de limpieza, los perfiles de frecuencia varían en función del sensor (superficies modificadas y superficie sin modificar). Como se muestra en la Figura 3.35.A, el sensor sin modificar de poliestireno registra un incremento en la frecuencia al introducir SDS en la cámara de medida, lo que indica una disminución en la masa adsorbida. En cambio, las superficies ppPFM (Figura 3.35.B) y pgPFM (Figura 3.35.C) registran una disminución en la frecuencia indicando un incremento en la masa inmovilizada. Este cambio en la frecuencia se puede relacionar con la formación de un complejo debido a la interacción entre el SDS y la GOx [269]. Al utilizar PFM los grupos éster reaccionan con las aminas presentes en la proteína mediante sustitución nucleófila, generando un enlace permanente entre las moléculas de enzima y la superficie de los sensores. Por tanto, los complejos formados entre SDS y GOx no se pueden eliminar de la superficie del electrodo, generando una disminución en la frecuencia registrada.

Después de realizar la limpieza con SDS, se introduce en la cámara de medida PBS con la intención de recuperar las condiciones iniciales. Como se muestra en la Figura 3.35.A, la frecuencia se estabiliza en el nivel basal, indicando que no queda proteína retenida sobre la superficie del sensor. En cambio, para el sensor modificado ppPFM (Figura 3.35.B) la señal de frecuencia no recupera el nivel inicial, sino que se estabiliza alrededor de -11 Hz. Esto indica que parte de las moléculas de GOx quedan retenidas sobre la superficie del sensor debido a una interacción covalente entre ambos. Del mismo modo, el sensor modificado pgPFM (Figura 3.35.C) registra una variación de frecuencia que se estabiliza alrededor de -18 Hz, indicando de nuevo una interacción covalente entre las moléculas de enzima y la superficie del sensor. Cuanto mayor es el valor de frecuencia final, mayor es la masa retenida sobre la superficie del sensor.

Por tanto, considerando los resultados obtenidos, se puede afirmar que la superficie pgPFM es capaz de retener una mayor cantidad de moléculas de enzima que la superficie ppPFM.

Por otro lado, en la Figura 3.35 también se muestran los registros de disipación obtenidos con cada uno de los sensores estudiados. Los cambios en la disipación (D) están relacionados con las propiedades viscoelásticas del sistema, además de aportar información sobre el grosor y la profundidad de la superficie estudiada. Cada sobretono representa una profundidad determinada del recubrimiento estudiado [270]. Por tanto, cuanto menor sea la separación entre sobretonos, más similar será el comportamiento del recubrimiento a distintas profundidades. Como se muestra en la Figura 3.35, antes de introducir el SDS en el módulo de medida la separación entre sobretonos es relativamente pequeña para las tres superficies estudiadas. Esto indica que cuando la GOx interacciona con las diferentes superficies, se forma una monocapa rígida con las moléculas de proteína. En cambio, después de la interacción con el SDS, la separación entre los sobretonos aumenta y se vuelve más pronunciada al retornar a las condiciones iniciales con PBS. Esta información indica que, después del proceso de limpieza, la película proteica formada sobre los sensores sufre modificaciones. Este cambio se puede relacionar con los cambios de pH de los medios aplicados (la disolución de SDS se encuentra a pH 5 y la disolución de PBS se encuentra a pH 7). Se conoce que la glucosa oxidasa sigue un patrón de plegamiento/desplegamiento que afecta a su conformación estructural en función del pH [271]. La glucosa oxidasa presenta una conformación globular dimérica estable a pH 7,0 que es su conformación nativa (N), sin embargo, a pH más ácidos que 6,0 la proteína evoluciona hacia una conformación intermedia [102,103]. De hecho, existen dos conformaciones intermedias que se pueden formar durante este proceso de plegamiento/desplegamiento: el estado de glóbulo fundido (MG) y el estado de glóbulo pre-fundido (PMG) [272,273], ambos dependientes del pH. Por tanto, después de cada cambio en el pH del medio, las moléculas de GOx sufren cambios conformacionales que provocan modificaciones en el grosor de la película proteica que recubre los sensores. Por esta razón, la separación entre los sobretonos en la señal de disipación aumenta al realizar el proceso final de limpieza.

Caracterización de la película de enzima

Con la finalidad de caracterizar las películas de enzima inmovilizadas sobre cada sensor, se representa la variación de la disipación de energía (ΔD) frente al incremento de frecuencia (Δf) registrado en cada caso, eliminando la variable tiempo [274]. Esta relación proporciona información sobre las propiedades viscoelásticas de la película inmovilizadas y de la conformación espacial que adoptan las moléculas de enzima. En esta comparativa, los resultados obtenidos con el sensor de poliestireno sin modificar no se han tenido en cuenta, ya que las moléculas de GOx no se retienen de forma covalente sobre la superficie. De este modo, en la Figura 3.36 solamente se presentan los datos obtenidos con los sensores ppPFM y pgPFM.

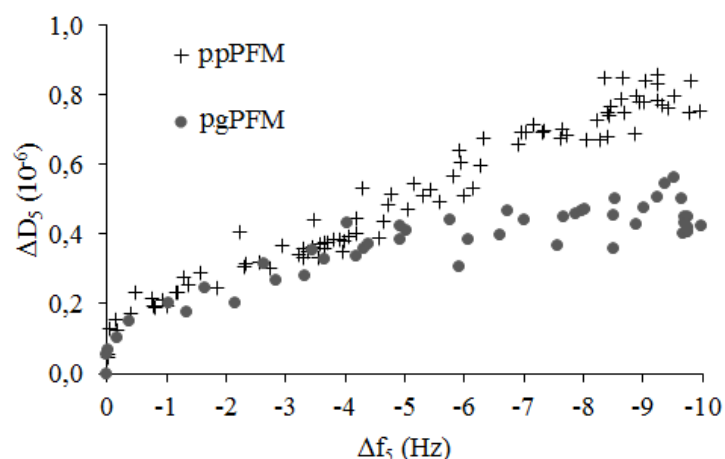


Figura 3.36. Representación del cambio en la disipación frente al cambio en la frecuencia (registrados con el 5º sobretono) obtenidos a partir de la película que se forma al inmovilizar GOx sobre las superficies ppPFM y pgPFM.

En la Figura 3.36, se muestra la relación $\Delta D/\Delta f$ obtenida a partir de la inmovilización de GOx sobre las superficies modificadas por plasma ppPFM y pgPFM. La pendiente de la correlación entre disipación y frecuencia es superior para la superficie polimerizada ppPFM (0.075 Hz^{-1}) que para la superficie en la que se ha realizado el sembrado pgPFM (0.035 Hz^{-1}). Este hecho indica que la película GOx/ppPFM es menos rígida que la película GOx/pgPFM. Las conformaciones más flexibles en las proteínas se asocian o bien a un elevado contenido de moléculas de agua en la película proteica, o bien a alteraciones estructurales de la proteína, como por ejemplo la pérdida de enlaces entre biomoléculas o en la propia molécula [275,276]. Por tanto, los resultados obtenidos pueden indicar que la película GOx/ppPFM presenta mayor capacidad de adsorber agua que la película GOx/pgPFM o bien que las moléculas de GOx sufren más cambios conformacionales durante el proceso de inmovilización sobre la superficie ppPFM que sobre la superficie pgPFM. De hecho, que las moléculas de GOx presenten dominios altamente flexibles es un indicativo de que la estructura se está desplegando o que ha adoptado la conformación totalmente desplegada (U), que es más inestable que la conformación nativa y no conserva actividad catalítica [277]. Como consecuencia, cuando las moléculas de GOx adoptan un estado desplegado o semi-desplegado se observa un incremento en la flexibilidad de la película depositada sobre los sensores. Este incremento en la flexibilidad se ve reflejado en el aumento de la pendiente del gráfico $\Delta D/\Delta f$ para la superficie ppPFM (ver Figura 3.36). Por tanto, en la superficie polimerizada ppPFM hay un mayor número de moléculas de GOx con la conformación desplegada o semi-desplegada que en la superficie pgPFM, en la que el film es más rígido.

Por otro lado, se determinan las propiedades viscoelásticas de las películas obtenidas al inmovilizar glucosa oxidasa sobre los sensores modificados (ppPFM y pgPFM). Se calculan el espesor, la viscosidad y el módulo de cizalla de las películas de GOx obtenidas en cada caso. Para realizar estas determinaciones se pueden utilizar diferentes modelos matemáticos, los más comunes son el de Sauerbrey, que se aplica a películas rígidas y el de Voigt para películas flexibles [278]. En este caso, los recubrimientos obtenidos en la etapa final no son recubrimientos rígidos ($D \geq 1$), por este motivo, se decidió realizar los cálculos mediante el modelo matemático de Voigt [279]. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13. Espesor, viscosidad y módulo de cizalla calculados mediante Voigt, antes y después de realizar el proceso de limpieza con SDS y PBS. Se muestran los valores obtenidos con las dos superficies modificadas, ppPFM y pgPFM. Estos valores se han obtenido al realizar dos cálculos independientes; se muestra el promedio de los dos cálculos y la desviación estándar entre los valores obtenidos.

	Superficie	Espesor $\pm s$ /nm	Viscosidad $\pm s$ / $10^3 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$	Módulo de cizalla $\pm s$ / 10^6 Pa
Antes del proceso de limpieza	ppPFM	19,6 \pm 0,3	1,29 \pm 0,04	619405,0 \pm 417,2
	pgPFM	16,5 \pm 0,3	1,54 \pm 0,01	25,3 \pm 1,6
Después del proceso de limpieza	ppPFM	47,1 \pm 0,1	1,06 \pm 0,01	97,3 \pm 0,2
	pgPFM	15,9 \pm 0,5	1,42 \pm 0,02	3,2 \pm 0,1

Como se muestra en la Tabla 3.13, la película GOx/pgPFM presenta valores de viscosidad y módulo de cizalla menores que la película GOx/ppPFM. Estos resultados indican que al aplicar la modificación de sembrado por plasma de PFM se obtiene una película con mayor viscoelasticidad que al aplicar la modificación de polimerización de PFM. Además, si se observa la Tabla 3.13 puede verse que el valor del módulo de cizalla obtenido para la superficie ppPFM antes de realizar el proceso de limpieza es mucho mayor que para el resto de las superficies. El módulo de cizalla se puede relacionar con el nivel de hidratación de la superficie, siendo mayor al disminuir el contenido acuoso [280]. Por tanto, este valor indica que la película obtenida al realizar el recubrimiento polimérico de PFM genera un ambiente altamente hidrofóbico. Estos resultados concuerdan con la naturaleza hidrofóbica del PFM [143,144]. De este modo, cuando se aplica la polimerización por plasma de PFM se obtiene un recubrimiento homogéneo en toda la superficie del sensor que le aporta propiedades hidrofóbicas. En cambio, al aplicar el sembrado por plasma de PFM, en lugar de obtener un recubrimiento homogéneo se generan pequeñas islas distribuidas por toda la superficie del sensor, por lo que la hidrofobicidad de la superficie disminuye. Así pues, la superficie pgPFM es más hidrófila que la superficie ppPFM. Por tanto, la superficie pgPFM genera un microentorno más favorable para las moléculas de enzima, disminuyendo la probabilidad de que se den cambios conformacionales que afecten a la actividad catalítica de la GOx. Esta afirmación concuerda con los resultados previos obtenidos a partir de la correlación $\Delta D/\Delta f$ (Figura 3.36), en los que se atribuye la mayor flexibilidad del film GOx/ppPFM a cambios estructurales de las moléculas de GOx durante el proceso de inmovilización.

Por otro lado, tal como se muestra en la Tabla 3.13 las propiedades viscoelásticas de la película GOx/ppPFM cambian drásticamente tras realizar el proceso de limpieza con SDS y PBS. El espesor de la película aumenta, mientras que la viscosidad y el módulo de cizalla disminuyen. Esto se debe a que la película de GOx inmovilizada se modifica con la interacción del SDS. Como se ha mencionado anteriormente, la interacción entre el SDS y la GOx provoca la formación de un complejo que queda retenido en la superficie de los sensores modificados. Por tanto, la GOx sufre cambios conformacionales durante el proceso de limpieza con SDS. En el caso de la superficie ppPFM, después de introducir PBS en la cámara de medida para retornar a las condiciones iniciales, las moléculas de enzima no recuperan su conformación inicial, porque las propiedades viscoelásticas son muy diferentes. En cambio, en el caso de la superficie pgPFM solamente se registra una pequeña disminución del módulo de cizalla, por lo que se deduce que la GOx recupera su conformación inicial con la etapa de limpieza final con PBS.

Estudio conformacional de las moléculas de GOx una vez inmovilizadas covalentemente

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de inmovilización de las moléculas de enzima sobre una superficie específica puede provocar cambios conformacionales sobre la estructura de la proteína [278]. La estructura de la glucosa oxidasa puede cambiar en función del microentorno que rodea la proteína; la temperatura, el pH y la hidrofobicidad del medio pueden alterar su conformación nativa. Para evaluar la conformación estructural que adoptan las moléculas de GOx una vez inmovilizadas sobre las superficies previamente modificadas (ppPFM y pgPFM), se calcula la masa por unidad de área que debería quedar adsorbida si se formara una película monocapa de moléculas de GOx, todas en la conformación nativa. Para ello, es necesario utilizar el valor bibliográfico del área o huella (footprint) que deja una molécula de glucosa oxidasa en su conformación nativa sobre una superficie rígida, que es igual a 58 nm^2 [281]. Para determinar la masa por unidad de área adsorbida se aplica la Ecuación 3.2 [282].

$$m_{\text{proteína}} = \frac{1}{\text{footprint}} \cdot \frac{MM}{N_A} \quad \text{[Ecuación 3.2]}$$

Donde $m_{\text{proteína}}$ es la masa adsorbida por unidad de área, MM es la masa molecular de la molécula y N_A es el número de Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$). El valor obtenido al aplicar esta ecuación para la conformación nativa de la GOx es $458 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$. Este valor se compara con los valores reales obtenidos para cada superficie (ver Figura 3.37).

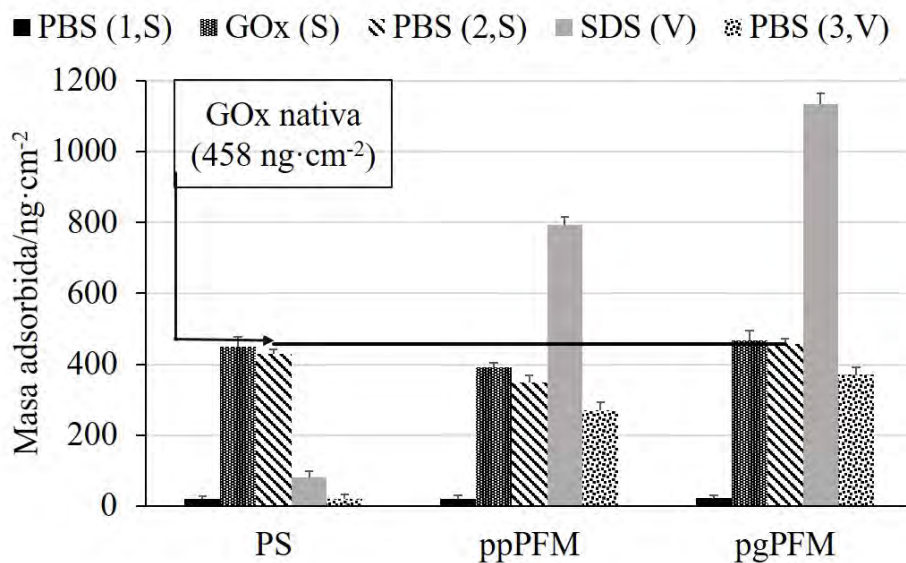


Figura 3.37. Masa inmovilizada por unidad de área calculada en cada paso del proceso de medida realizados con la QCM-D para tres superficies diferentes: poliestireno (PS), PFM polimerizado (ppPFM) y sembrado por plasma de PFM (pgPFM). Los valores mostrados se obtuvieron mediante dos modelos matemáticos: Sauerbrey (S) para recubrimientos rígidos y Voigt (V) para recubrimientos flexibles. Además, se realizaron dos cálculos independientes y se calculó el promedio y la desviación estándar, que se muestra como barra de error.

En la Figura 3.37, se muestra la masa adsorbida por unidad de área para cada paso individual de medida realizado con la QCM-D: la línea base con PBS (PBS 1), la inmovilización de GOx, la primera limpieza con PBS (PBS 2), la interacción de SDS con el enzima inmovilizado y el lavado final con PBS (PBS 3). Para realizar los cálculos se han aplicado dos modelos matemáticos diferentes; el modelo de Sauerbrey para recubrimientos rígidos (la película inicial de GOx

inmovilizada) y el modelo de Voigt para películas flexibles (la película final de proteína, después del proceso de limpieza). Así pues, la superficie ppPFM adsorbe unos $350 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ de proteína antes del proceso de lavado con SDS, mientras que la superficie pgPFM retiene unos $458 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ en la misma etapa (PBS 2, modelo de Sauerbrey). Sin embargo, aplicando el modelo de Voigt en la última etapa de medida (PBS 3), la superficie ppPFM retiene unos $271 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, mientras que la superficie pgPFM adsorbe $372 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. La disminución de la masa adsorbida después del proceso de limpieza con SDS indica que las moléculas no enlazadas covalentemente a la superficie se han eliminado satisfactoriamente en ambos casos.

Los valores de masa adsorbida se relacionan con el grosor de las películas GOx/ppPFM y GOx/pgPFM obtenidas (ver Tabla 3.14). El recubrimiento GOx/ppPFM presenta un grosor de $47,1 \text{ nm}$ y una masa adsorbida igual a $271 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. En cambio, el recubrimiento de la superficie pgPFM presenta un grosor de $15,9 \text{ nm}$ y una masa adsorbida de $372 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. Por tanto, la superficie que adsorbe más masa es la que presenta un menor grosor de película. Está descrito en bibliografía que una molécula de proteína con estructura MG presenta en promedio un radio 15% superior al radio promedio que presenta la misma proteína en estado nativo [101]. Este incremento en el radio se traduce en un aumento de aproximadamente el 50% en volumen [101]. Por tanto, a partir de los resultados obtenidos se propone la hipótesis de que en la superficie ppPFM las moléculas de GOx adoptan una estructura desplegada o semi-desplegada porque ocupan más volumen, mientras que en la superficie pgPFM la estructura globular, más compacta, se mantiene.

Para confirmar esta hipótesis, se comparan los valores de masa adsorbida experimentales con los valores calculados. Estos valores se calculan a partir del valor bibliográfico de *footprint* que presenta la conformación nativa (58 nm^2) [281] y teniendo en cuenta el volumen de las diferentes conformaciones que puede adoptar la glucosa oxidasa.

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas globulares pueden existir al menos en cuatro conformaciones diferentes: la estructura nativa (N), los intermedios de glóbulo fundido (MG) y de glóbulo pre-fundido (PMG) y la estructura desplegada (U) [101]. La estructura nativa es la más compacta, se trata de un dímero globular y es la estructura plegada. En contraposición, en la estructura desplegada se pierde la conformación globular y la actividad catalítica. Las estructuras MG y PMG son dos intermedios entre la conformación N y la conformación U. En el intermedio de glóbulo fundido, se mantiene la estructura globular, aun que ésta se encuentra ligeramente abierta respecto a la conformación nativa. En cambio, el intermedio PMG pierde aproximadamente el 50% de la estructura secundaria presente en la conformación nativa y también se pierde la conformación globular. Además, el estado PMG es menos compacto y menos rígido que las conformaciones MG y N. Cabe mencionar que el volumen hidrodinámico de las proteínas incrementa con el grado de desplegamiento de la estructura; en los estados MG, PMG y U este parámetro incrementa aproximadamente 1.5, 3 y 12 veces respectivamente en comparación con el volumen hidrodinámico del estado nativo [101]. Por tanto, conociendo que la huella que deja una molécula en la conformación nativa de GOx es igual a 58 nm^2 y suponiendo que la molécula es una esfera, es posible determinar su volumen hidrodinámico. A partir de este valor y utilizando los factores de incremento de volumen bibliográficos, es posible determinar el *footprint* de cada una de las diferentes conformaciones. Después, se utilizan estos

valores para conocer la masa adsorbida que quedaría si todas las moléculas de GOx presentaran una de las estructuras intermedias o la estructura desplegada. En la Tabla 3.14, se muestran los valores calculados de *footprint* y de masa adsorbida para cada conformación.

Tabla 3.14. Valores de *footprint* y masa adsorbida calculados para las conformaciones nativa, glóbulo fundido, glóbulo pre-fundido y desplegada de las moléculas de glucosa oxidasa.

Conformación	<i>Footprint</i> /nm ²	Masa adsorbida / ng·cm ⁻²
Nativa (N)	58	458
Glóbulo fundido (MG)	84	318
Glóbulo pre-fundido (PMG)	121	220
Desplegada (U)	304	87

Por un lado, mediante las determinaciones realizadas con QCM-D, se obtiene que el valor experimental de masa adsorbida en la superficie ppPFM es de 271 ng·cm⁻², aplicando el modelo matemático de Voigt. Este valor está comprendido entre los valores teóricos calculados para las conformaciones intermedias de MG (318 ng·cm⁻²) y de PMG (220 ng·cm⁻²). Este hecho indica que en la superficie ppPFM las moléculas de GOx inmovilizadas presentan ambas conformaciones (MG y PMG). De hecho, si se considera que el 50% de las moléculas inmovilizadas se encuentran en estado de glóbulo fundido y el 50% restante presentan la estructura de glóbulo pre-fundido, el valor teórico calculado de masa adsorbida es 269 ng·cm⁻². Este valor difiere tan sólo en un 1% del valor experimental (271 ng·cm⁻²). Por tanto, es posible afirmar que las moléculas de glucosa oxidasa inmovilizadas covalentemente en la superficie ppPFM presentan la conformación de glóbulo fundido y de glóbulo pre-fundido en una proporción similar. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que no se retienen moléculas de GOx en su conformación nativa al realizar la polimerización por plasma de PFM.

Por otro lado, el valor experimental de masa adsorbida obtenido para la superficie pgPFM es de 372 ng·cm⁻². Este valor está comprendido entre los valores teóricos calculados para la conformación nativa (458 ng·cm⁻²) y el intermedio de glóbulo fundido (318 ng·cm⁻²). Considerando que el 50% de las moléculas inmovilizadas presentan la conformación N y el 50% restante presentan la conformación MG, el valor teórico calculado de masa adsorbida es de 388 ng·cm⁻². La desviación entre este valor y el valor experimental (372 ng·cm⁻²) es del 4%. Por tanto, las moléculas de GOx inmovilizadas en la superficie pgPFM presentan la conformación nativa y la conformación de glóbulo fundido en una proporción similar.

Resumiendo, la superficie ppPFM permite la inmovilización covalente de moléculas de glucosa oxidasa, sin embargo, éstas presentan mayoritariamente conformaciones no activas catalíticamente. En cambio, en la superficie pgPFM las moléculas de GOx inmovilizadas covalentemente presentan mayoritariamente la conformación nativa y la de glóbulo fundido, ambas con actividad catalítica. Por tanto, al aplicar el sembrado por plasma de PFM se obtiene una superficie más adecuada para conservar la actividad enzimática de la GOx que al aplicar la polimerización por plasma de PFM. Por este motivo, se decide seleccionar la técnica de sembrado por plasma para modificar la interfase electroquímica y construir biosensores enzimáticos por inmovilización covalente.

3.2.2.3. Desarrollo de biosensores de glucosa

Para confirmar que el sembrado por plasma de PFM puede aplicarse para inmovilizar covalentemente moléculas de GOx sobre superficies rígidas, se repiten las experiencias realizadas previamente mediante QCM-D utilizando un sensor de titanio sin modificar (Ti) y utilizando un sensor de titanio modificado mediante sembrado por plasma. Antes de realizar el sembrado de PFM sobre los sensores de titanio, se deposita una película orgánica de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) co-polimerizado con etilenglicoldiacrilato (EGDA). De este modo, se obtiene el electrodo Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM. En la Figura 3.38, se muestran los cambios en la frecuencia (f) y en la disipación (D) registrados con cada uno de los sensores evaluados.

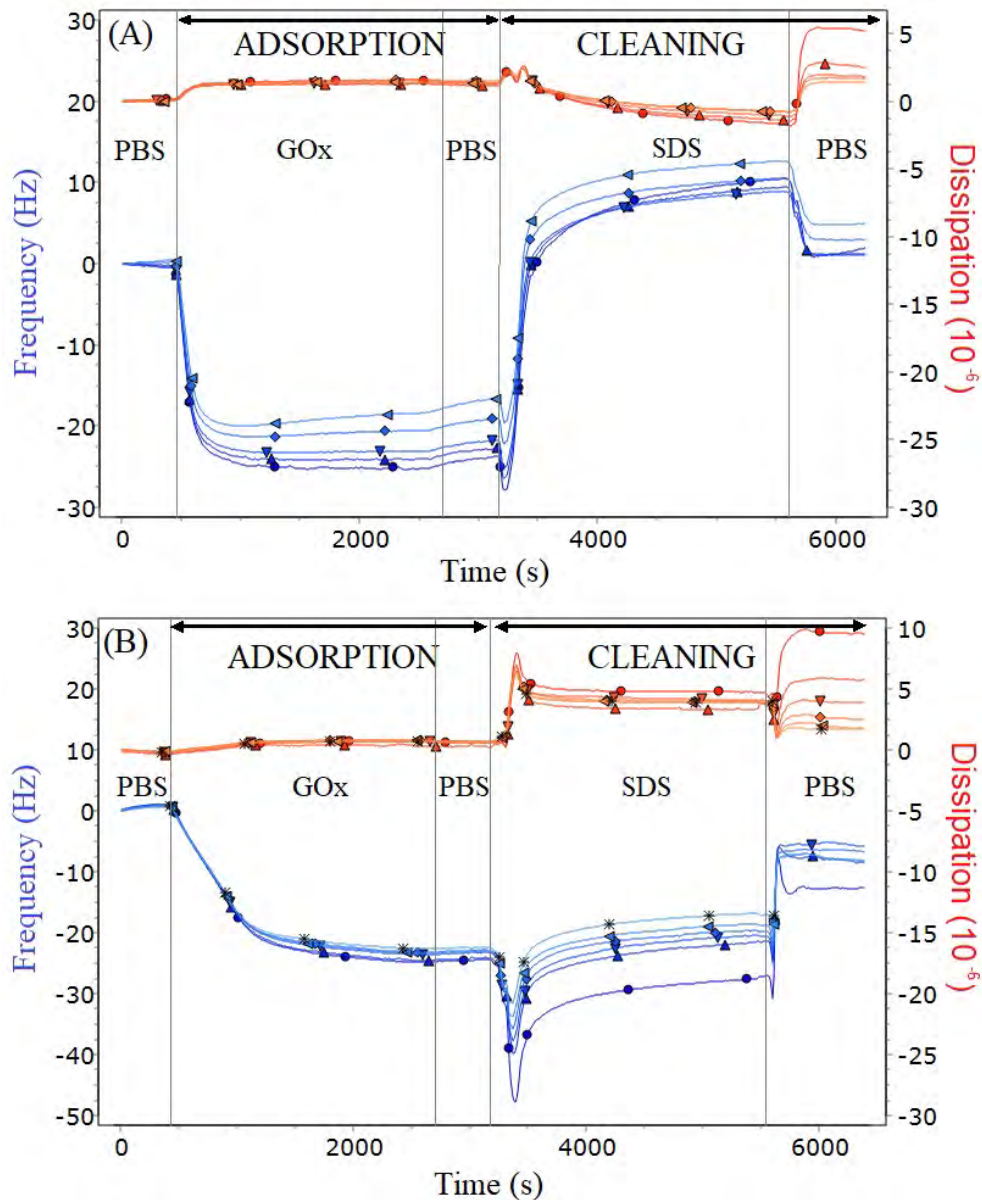


Figura 3.38. Perfiles de frecuencia (líneas azules) y disipación (líneas rojas) a lo largo del tiempo obtenidos con una QCM-D al inmovilizar GOx y limpiar con PBS y SDS sobre dos superficies diferentes: titanio (A) y sembrado por plasma de PFM (B). En todos los casos se registran el 3r (●), 5° (▲), 7° (▼), 9° (◆)

En la Figura 3.38.A, se muestran los perfiles de frecuencia y disipación registrados con un sensor de titanio sin modificar (Ti) y en la Figura 3.38.B, se presentan los perfiles obtenidos con el sensor Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM. Para obtener estos gráficos, se han realizado cinco procesos de medida en continuo: la estabilización del cristal de cuarzo de los sensores mediante PBS, la inmovilización de moléculas de GOx, una segunda estabilización con PBS, el proceso de limpieza con SDS y la etapa final para retornar a las condiciones iniciales utilizando PBS. Como se muestra en la Figura 3.38, cuando se introduce la disolución de GOx en la cámara de medida, la frecuencia decae rápidamente y se estabiliza entre -20 Hz y -25 Hz para los dos sensores estudiados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente con los sensores de poliestireno e indican que la GOx se adsorbe sobre las superficies estudiadas. Después, al realizar la etapa de limpieza con SDS la frecuencia registrada aumenta, indicando que se han eliminado las moléculas de enzima no enlazadas covalentemente. Finalmente, al introducir PBS para recuperar las condiciones iniciales, los perfiles de frecuencia cambian en función de la superficie. Para el sensor no modificado de titanio (Figura 3.38.A), la frecuencia recupera el valor de la línea base inicial, por tanto, no quedan moléculas de proteína retenidas sobre el sensor. En cambio, para el sensor Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM (Figura 3.38.B), la frecuencia se estabiliza alrededor de -10 Hz, indicando que se ha retenido de forma covalente GOx, tal como se esperaba.

En la Figura 3.38, también se muestran los perfiles de disipación obtenidos con cada sensor. Antes de introducir SDS en la cámara de medida, la separación entre los sobretonos registrada con ambos sensores es relativamente pequeña. Esto indica que, en ambos casos, se genera una película proteica rígida y homogénea sobre la superficie de los sensores. En cambio, después de realizar el proceso de limpieza con SDS, la separación entre los sobretonos se ve incrementada tanto para el Ti (Figura 3.38.A) como para el Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM (Figura 3.38.B). Esta variación indica que las películas de enzima depositadas sufren cambios durante las distintas etapas de medida y, por tanto, que la conformación espacial de las moléculas de GOx varía durante el proceso de inmovilización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente utilizando sensores de poliestireno.

Los perfiles de disipación y frecuencia registrados con los sensores Ti y Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM se utilizan para determinar la masa adsorbida por unidad de área tras cada una de las 5 etapas de medida realizadas. Para realizar los cálculos se aplica el modelo matemático de Sauerbrey (recubrimientos rígidos) y el modelo matemático de Voigt (recubrimientos flexibles). En la Figura 3.39, se muestran los resultados obtenidos.

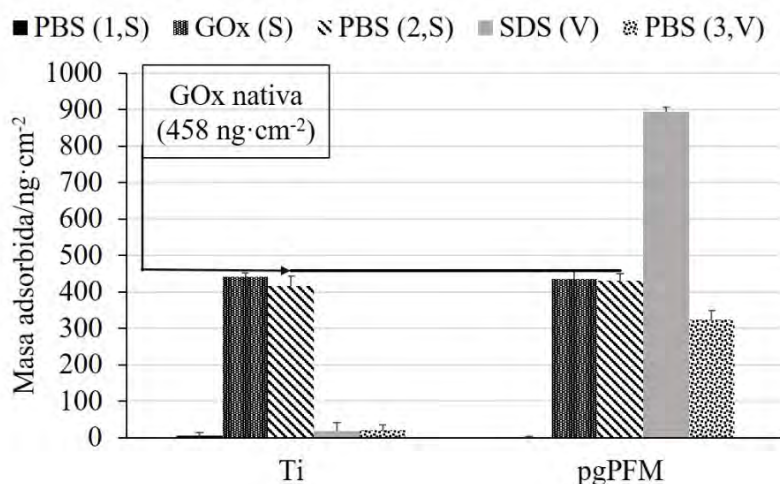


Figura 3.39. Masa inmovilizada por unidad de área calculada en cada paso del proceso de medida realizados con la QCM-D para dos superficies diferentes: titanio (Ti) y sembrado por plasma de PFM (pgPFM). Los valores mostrados se obtuvieron mediante dos modelos matemáticos: Sauerbrey (S) para recubrimientos rígidos y Voigt (V) para recubrimientos flexibles. Además, se realizaron dos cálculos independientes y se calculó el promedio y la desviación estándar, que se muestra como barra de error.

En la Figura 3.39, pueden verse los valores de masa adsorbida en las superficies Ti y Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM tras cada paso de medida. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente con sensores de poliestireno. Antes de realizar el proceso de limpieza con SDS y PBS las dos superficies estudiadas retienen una cantidad de enzima similar a la esperada para la conformación nativa ($458 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$). Sin embargo, después del proceso de limpieza con SDS, el sensor de Ti sin modificar no retiene masa adsorbida y el sensor de titanio modificado con pgPFM retiene $324 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (aplicando el modelo de Voigt). Este valor está comprendido entre los valores calculados para la conformación nativa ($458 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$) y el estado intermedio de glóbulo fundido ($318 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$). Además, el valor experimental solamente difiere en un 12% del valor obtenido con la superficie PS/pgPFM ($372 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$). Por tanto, al aplicar el sembrado por plasma de PFM sobre el sensor de Ti, las moléculas de glucosa oxidasa se inmovilizan covalentemente y adoptan mayoritariamente una conformación con actividad enzimática (N y MG), tal como se esperaba. Consecuentemente, se puede afirmar que la modificación de sembrado por plasma se puede aplicar de forma reproducible sobre diferentes sensores y que se puede utilizar para inmovilizar moléculas de GOx conservando su actividad enzimática.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decide comprobar electroquímicamente las hipótesis planteadas a partir de los resultados obtenidos mediante QCM-D. Para ello, se aplican las modificaciones de superficie de polimerización por plasma y sembrado por plasma de PFM sobre electrodos de titanio. A continuación, sobre los electrodos Ti/ppPFM y Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM se depositan $20 \mu\text{L}$ de disolución GOx ($15 \text{ mg}/500 \mu\text{L}$) durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de enzima que no se ha inmovilizado covalentemente limpiando con PBS. A continuación, se mide la respuesta amperométrica de los electrodos frente a la presencia de $0,5 \text{ mM}$ de glucosa sobre PBS al aplicar una diferencia de potencial de $-0,4 \text{ V}$ vs Ag/AgCl/KCl (3M) (ver Figura 3.40).

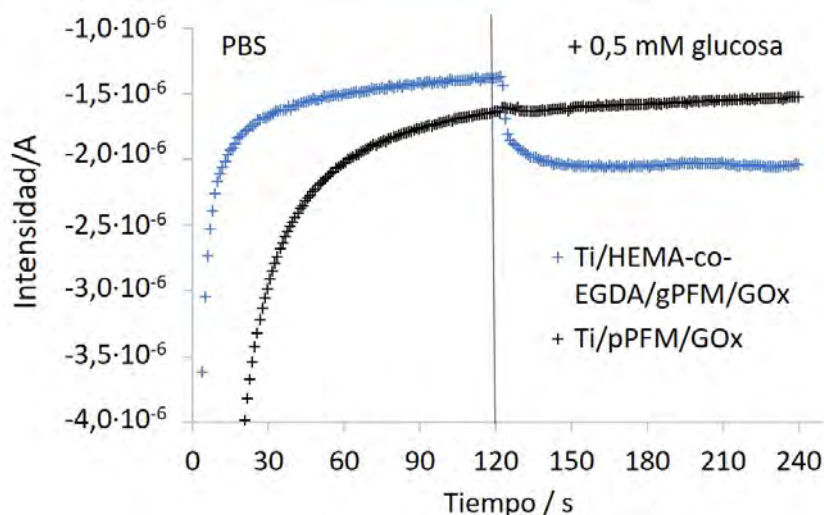


Figura 3.40. Respuesta amperométrica de los biosensores Ti/ppPFM/GOx y Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx frente a la presencia de 0,5 mM glucosa al aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl.

Como se muestra en la Figura 3.40, la señal registrada con el biosensor Ti/ppPFM/GOx permanece prácticamente constante al realizar la adición de 0,5 mM de glucosa. En cambio, el biosensor Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx registra un incremento en la señal medida de aproximadamente 0,5 μ A. Estos resultados confirman las hipótesis planteadas a partir de los ensayos realizados con QCM-D. Al realizar la polimerización por plasma, las moléculas de enzima inmovilizadas presentan mayoritariamente una conformación no activa. Además, los biosensores construidos al aplicar esta técnica no son suficientemente sensibles. Por otro lado, al aplicar el proceso de sembrado por plasma, los biosensores construidos son sensibles a la presencia de glucosa porque las moléculas de GOx presentan, mayoritariamente, una conformación activa.

Para comprobar la inviabilidad de la superficie ppPFM para el desarrollo de biosensores de glucosa, se aplica la polimerización por plasma de PFM sobre la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs y después de inmoviliza glucosa oxidasa. Para ello, se depositan 20 μ L de disolución GOx (15 mg/500 μ L PBS) durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de enzima no enlazada limpiando el sensor con PBS. La formación de los nanotubos sobre los electrodos de titanio incrementa drásticamente la superficie activa del sensor. Por tanto, es posible inmovilizar un mayor número de moléculas de enzima en comparación con los electrodos de titanio y se espera un aumento en la sensibilidad. La respuesta amperométrica de los biosensores obtenidos se evalúa cronoamperométricamente al realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa cada 2 min sobre 100 mL de PBS 0,1 M y aplicando una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) (ver Figura 3.41).

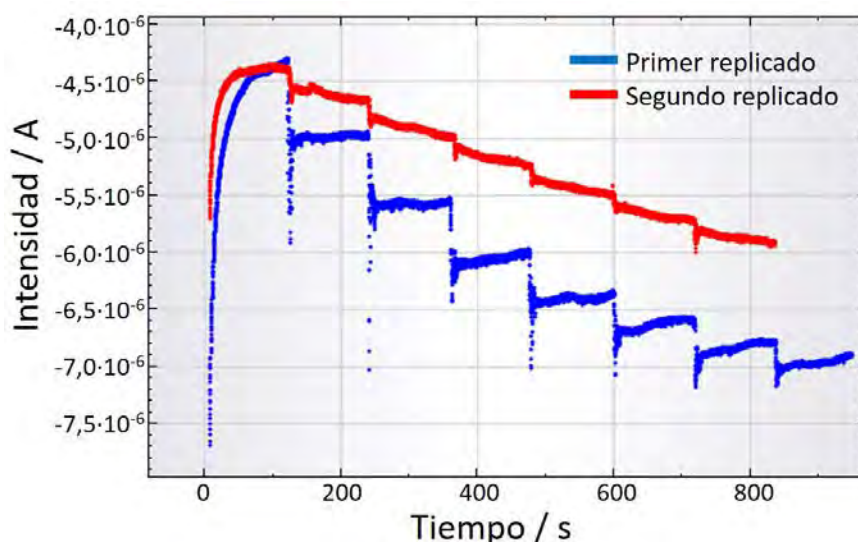


Figura 3.41. Cronoamperometría realizada con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx al realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa cada 2 min sobre 100 mL de PBS 0,1 M y aplicando -0,4 V vs Ag/AgCl. Se muestran dos replicados realizados con el mismo biosensor en el mismo día, en azul el primer replicado y en rojo el segundo replicado.

Como se muestra en la Figura 3.41, al realizar la primera determinación amperométrica con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx (línea azul), tras cada adición de 0,25 mM de glucosa se registra un salto de intensidad de aproximadamente 0,7 μA (unos 3 $\mu\text{A}/\text{mM}$). Al representar la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa, se obtiene una recta de calibrado con pendiente $-1,64 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, lineal en un margen de concentraciones de glucosa comprendido entre 0,25 mM y 1,24 mM de glucosa ($R^2 = 0,9910$). Por tanto, parece que al inmovilizar glucosa oxidasa sobre una superficie ppPFM, se conserva parte de la actividad enzimática de las moléculas inmovilizadas. Sin embargo, al realizar un segundo replicado de la determinación amperométrica con el mismo biosensor y durante el mismo día (línea roja), no es posible ajustar una recta de calibrado. Esto indica que, en un periodo de tiempo relativamente corto, se pierde rápidamente la actividad catalítica de las moléculas de GOx inmovilizadas. Para comprobar que no se trate de un hecho aislado, se construyen 10 biosensores Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx y se realiza el mismo ensayo (ver Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Valores de sensibilidad obtenidos con 10 biosensores de un biosensor Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx y el tiempo de vida útil que presentan.

Biosensor	Sensibilidad inicial/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	R^2	Tiempo de vida útil / días
1	1,64	0,991	1
2	1,86	0,998	1
3	1,81	0,989	1
4	-	-	-
5	-	-	-
6	1,10	0,909	1
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-

Como se muestra en la Tabla 3.15, en la mayoría de los casos, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx desarrollados no son capaces de detectar la glucosa presente en el medio de medida. Además, aquellos biosensores que presentan actividad frente a la glucosa muestran valores de sensibilidad de alrededor de 1 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. Estos valores de sensibilidad son inferiores a los que presentan los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano (10,53 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). Por tanto, la población de moléculas de GOx biológicamente activas es inferior al aplicar la polimerización por plasma de PFM que al utilizar el quitosano como matriz de inmovilización. Por otro lado, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/ppPFM/GOx que muestran respuesta analítica frente a la glucosa solamente pueden utilizarse una única vez; a partir del segundo replicado de la determinación amperométrica no es posible ajustar una recta de calibrado.

Ante los resultados obtenidos, se decide descartar la polimerización por plasma de PFM como técnica de inmovilización covalente. A continuación, se aplica la modificación de superficie de sembrado por plasma de PFM sobre una matriz altamente ordenada de nanotubos de TiO₂. Se registra la respuesta amperométrica de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx frente a la presencia de 0,5 mM de al aplicar -0,4 V vs referencia y se mantiene el sistema en agitación a 2000 rpm. La respuesta amperométrica obtenida se compara con la del biosensor Ti/HEMA-co-EGDA/GOx para comprobar el aumento de sensibilidad que ofrece la interfase electroquímica seleccionada (ver Figura 3.42).

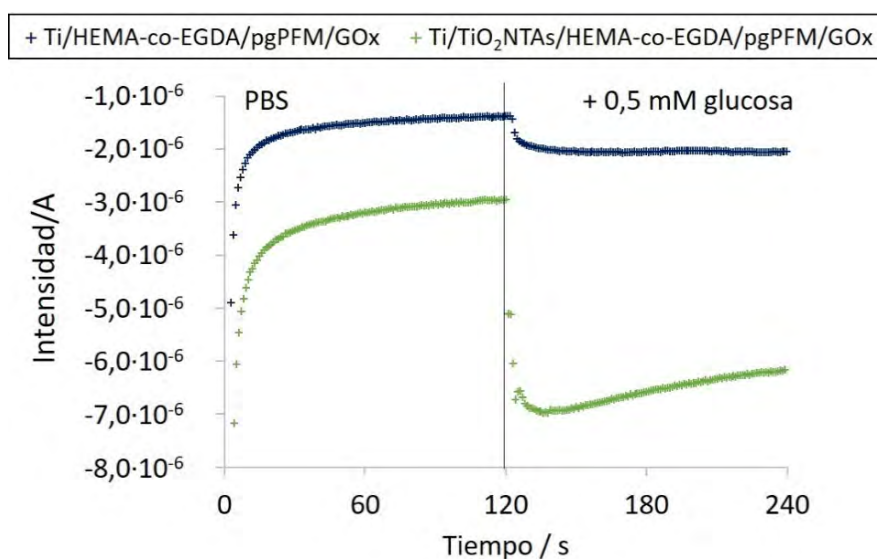


Figura 3.42. Curva intensidad vs tiempo obtenida con un biosensor Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx y con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx al aplicar una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl cuando se realiza una adición 0,5 mM de glucosa en el medio de medida.

Como se muestra en la Figura 3.42, al adicionar 0,5 mM de glucosa en el medio de medida, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx registra un incremento de intensidad de unos 3 μA aproximadamente (unos 6 $\mu\text{A}/\text{mM}$). Por tanto, se observa un incremento en la sensibilidad del biosensor en comparación con el biosensor Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx, que al adicionar 0,5 mM glucosa genera saltos de intensidad de unos 0,5 μA (1 $\mu\text{A}/\text{mM}$). Este incremento en la señal amperométrica registrada se asocia a la presencia de los nanotubos, que aumentan la superficie específica del sensor.

Por otro lado, se evalúa la estabilidad en el tiempo de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx. Para ello, se determina la sensibilidad de los biosensores al realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa cada 2 min sobre 100 mL de PBS, manteniendo el sistema en agitación constante a 2000 rpm y aplicando -0,4 V vs referencia. A continuación, se construyen rectas de calibrado al representar la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa adicionada. La pendiente de la recta de calibrado se asocia a la sensibilidad del biosensor. En la Tabla 3.16, se muestra la evolución de la sensibilidad de tres biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx a lo largo del tiempo.

Tabla 3.16. Valores de sensibilidad que presentan tres biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx al realizar medidas a diferentes días.

Biosensor	Sensibilidad inicial / $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Sensibilidad segundo día / $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Sensibilidad tercer día / $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$
1	2,09	1,64	-
2	1,29	0,26	-
3	1,61	-	-

Como se muestra en la Tabla 3.16, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx presentan valores de sensibilidad inferiores a los que muestran los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano ($10,53 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). Además, no es posible realizar determinaciones utilizando estos biosensores más allá del segundo día después de su construcción. La baja sensibilidad y la disminución de esta a lo largo del tiempo de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx se debe a una reducción de la actividad enzimática de las moléculas de enzima inmovilizadas [109]. En esta configuración, las moléculas de GOx inmovilizadas quedan directamente expuestas al medio de medida o de almacenaje. Por tanto, en estos biosensores las moléculas de enzima son más vulnerables a cambios locales de pH o del potencial redox y aumenta la probabilidad de que éstas se desnaturalicen y pierdan su capacidad catalítica. Por tanto, es necesario buscar una estrategia para proteger a las moléculas de enzima de las condiciones del medio de conservación y medida. A continuación, se propone depositar una película polimérica a modo de barrera protectora. Se decide trabajar con quitosano, ya que se trata de un hidrogel biocompatible que contribuye a la estabilización de las moléculas de enzima y previene su desnaturalización [81,283]. Así pues, se deposita una película de quitosano con la finalidad de obtener biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano.

Se evalúa la respuesta amperométrica de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano al realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa sobre 100 mL PBS. Se mantiene el sistema en agitación constante a 2000 rpm y se aplican -0,4 V vs referencia. En la Figura 3.43, se muestra el registro de la intensidad a lo largo del tiempo obtenido con uno de los biosensores desarrollados.

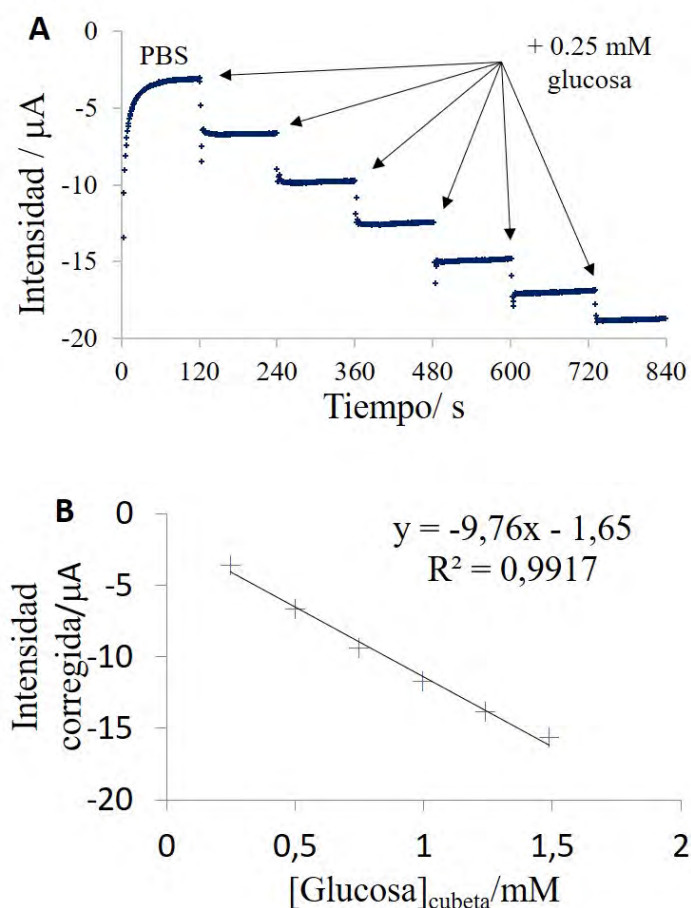


Figura 3.43. A) Registro de la intensidad a lo largo del tiempo realizado con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano al aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl y realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa. B) Recta de calibrado obtenida al representar la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa.

Como se muestra en la Figura 3.43.A, tras cada adición de glucosa (0,25 mM) la intensidad registrada incrementa aproximadamente 12 $\mu\text{A}/\text{mM}$. Al representar la intensidad corregida (la intensidad registrada tras cada adición de glucosa menos la intensidad del blanco) frente a la concentración de glucosa, se obtiene una recta de calibrado. Como se muestra en la Figura 3.43.B, la pendiente de la recta de calibrado es igual a 9,76 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y se asocia a la sensibilidad del biosensor. El rango lineal está comprendido entre 0,25 y 1,49 mM, con un coeficiente de correlación superior a 0,99. En comparación con los biosensores sin el recubrimiento de quitosano (en promedio 1,66 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$), se observa un aumento de la sensibilidad (ver Tabla 3.16). Estos resultados indican que, el proceso de sembrado por plasma de PFM permite la inmovilización covalente de un determinado número de moléculas de enzima pero que el quitosano es quien ayuda a estabilizar la conformación biológicamente activa de estas moléculas y/o a renaturalizarlas en el caso de que sufran una desactivación.

Por otro lado, la sensibilidad del biosensor se asocia al límite de cuantificación; cuanto mayor la sensibilidad, menor el límite de cuantificación. En el caso de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano, el límite de cuantificación, calculado como la concentración que puede detectarse a 10 veces el nivel del ruido, es igual a 0,20 mM de glucosa. Por tanto, la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM

combinada con la película protectora de quitosano proporciona excelentes propiedades analíticas a los biosensores desarrollados.

Por otro lado, el valor de sensibilidad obtenido con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano desarrollado (9,76 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$) se compara con otros biosensores de glucosa descritos en bibliografía. En la Tabla 3.17 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 3.17. Rango lineal y sensibilidad de diferentes biosensores amperométricos de glucosa descritos en bibliografía.

Estructura del biosensor	Rango lineal/mM	Sensibilidad/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Referencia
SPCE/Gr/PANI/AuNPs/GOx	0,2 – 11,2	0,38	[204]
SPCE/PB/GOx/Celulosa	0,25 – 2,00	2,14	[205]
SPCE/PPy-CNC/GOx	1,0 – 20	0,73	[208]
GCE/PDA/PB/GOx	0,2 – 3,4	1,59	[206]
RGO/PI/AuPd/GOx	0,024 – 4,6	2,93	[167]
CPE/Lig-SiO ₂ /GOx	0,5 - 9	0,78	[284]
Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano	0,25 – 1,49	9,76	Presente tesis

AuNPs, nanopartículas de oro; AuPd, compuesto de oro y paladio; CNC, nanocristales de polipirrol-celulosa; CPE, electrodo de pasta de carbono; GCE, electrodo de carbono vítreo; Gr, grafito; Lig-SiO₂, compuesto de sílice y lignina; PANI, polianilina; PB, azul de Prusia; PI, poliimida; PPy- PDA, dopamina polimerizada; RGO, óxido de grafeno reducido; SPCE, electrodo de carbono serigrafiado.

Como se puede ver en la Tabla 3.17, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano presenta valores de sensibilidad (9,76 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$) más elevados que el resto de los biosensores descritos en bibliografía. Este hecho puede deberse a la estructura intrínseca del propio biosensor, en la que se inmoviliza un elevado número de moléculas de enzima en su estructura biológicamente activa. Los nanotubos de TiO₂ ofrecen un entorno biocompatible y una elevada superficie específica. Además, el hidrogel HEMA-co-EGDA protege la superficie del electrodo y genera una matriz polimérica con un tamaño de poro pequeño que bloquea el paso de moléculas grandes que pueden provocar interferencias en la medida del biosensor [127]. La modificación de sembrado por plasma de PFM garantiza que las moléculas de enzima inmovilizadas conservarán su actividad catalítica y el Quitosano previene la desnaturalización de los enzimas y favorece la recuperación de la forma activa de aquellas enzimas desactivadas, ofreciendo un entorno biocompatible óptimo para la GOx. Por tanto, la elevada actividad electroquímica registrada con el biosensor se debe a una interacción positiva entre la interfase electroquímica, la presencia de HEMA-co-EGDA, la estrategia de inmovilización y la película protectora de quitosano. Todos estos factores generan un entorno favorable para las moléculas de enzima en el que se previene su desactivación.

Adicionalmente, se estudia la estabilidad a largo plazo de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano desarrollados. Para ello, se determina la variación en la respuesta amperométrica registrada por los biosensores al realizar incrementos consecutivos de concentración equivalentes a 0,25 mM de glucosa cada dos minutos en el medio de medida. Durante las experiencias se aplica un potencial constante de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) y se mantiene la velocidad de giro del electrodo constante a 2000 rpm. Se construyen rectas de calibrado y se evalúa la evolución de la pendiente obtenida (sensibilidad) a lo largo del tiempo.

En la Figura 3.44, se muestra la sensibilidad obtenida con distintos biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano después de varios días desde su construcción.

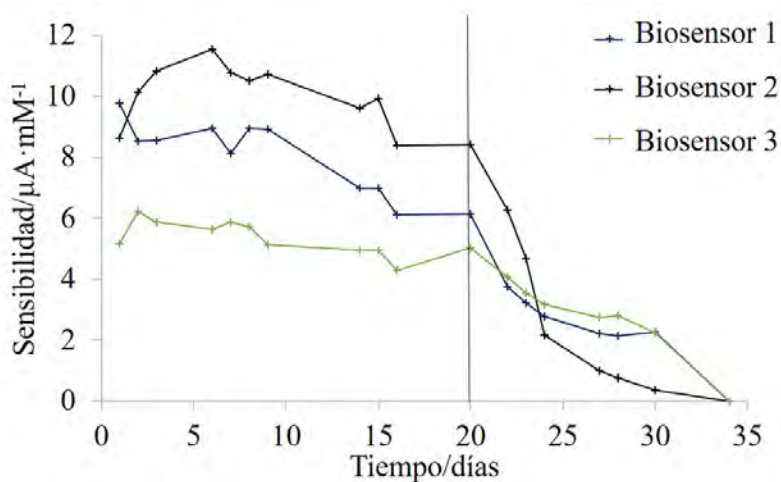


Figura 3.44. Evolución a lo largo del tiempo de la respuesta amperométrica de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano.

Como se muestra en la Figura 3.44, la sensibilidad de los biosensores desarrollados disminuye a lo largo del tiempo. Durante los primeros 20 días desde la construcción de los biosensores, la sensibilidad se mantiene prácticamente constante, disminuyendo entre un 2% y un 30% en función del biosensor. Pero a partir de los 20 días, la disminución de la sensibilidad se vuelve más pronunciada y después de 30 días se llega a registrar una disminución mayor al 80% respecto al valor inicial en todos los casos. La diferencia entre las sensibilidades que ofrecen los tres biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano se puede asociar al proceso de fabricación de estos; la construcción de la interfase electroquímica (proceso de anodizado y modificación de superficie mediante técnicas de plasma) implica diferentes etapas que pueden influir en el área activa final. Del mismo modo, es posible que la población de enzimas en su conformación biológicamente activa varíe ligeramente entre los diferentes biosensores. Así pues, se observa cierta variación entre los valores de sensibilidad que ofrecen los diferentes biosensores desarrollados. En la Tabla 3.18, se muestran los valores individuales de estabilidad a largo plazo obtenidos con cada biosensor.

Tabla 3.18. Estabilidad a largo plazo de los diferentes biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano.

Biosensor	Estabilidad después de 20 días	Estabilidad después de 30 días
Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano (1)	Conserva el 72% de la señal inicial.	Conserva el 23% de la señal inicial.
Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano (2)	Conserva el 98% de la señal inicial.	Conserva el 4% de la señal inicial.
Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano (3)	Conserva el 98% de la señal inicial.	Conserva el 44% de la señal inicial.
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano	Conserva el 93% de la señal inicial.	Conserva el 62% de la señal inicial.

Como se muestra en la Tabla 3.18, transcurridos 20 días los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano conservan aproximadamente la misma capacidad analítica que los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano. En cambio, transcurridos 30 días la estabilidad de todos los biosensores disminuye drásticamente. Esta disminución de la sensibilidad es consecuencia de la desactivación de las moléculas de enzima inmovilizadas que puede generarse por diversos factores. Es importante tener en cuenta que el peróxido de hidrógeno generado durante la reacción enzimática puede dañar las moléculas de enzima; el H₂O₂ es un compuesto muy oxidante que puede reaccionar con alguno de los aminoácidos presentes en la estructura de la glucosa oxidasa [285,286], provocando modificaciones en su estructura que afectan a su actividad catalítica. Otro factor que puede alterar la conformación estructural del enzima es el pH; incluso manteniendo el pH 7,0 utilizando una disolución 0,1 M de PBS, es posible que de forma local se den variaciones significativas de pH en el interior de los nanotubos como consecuencia de la reducción del H₂O₂ a H₂O. Estas alteraciones locales del pH pueden afectar a los enlaces intermoleculares e intramoleculares que aguantan la estructura activa del enzima, provocando su desactivación [103]. Finalmente, es posible que la pérdida de sensibilidad se deba también a la degradación de la película protectora de quitosano; a medida que se degrada la capa protectora, las moléculas de enzima quedan más expuestas al medio de medida y pueden perder más fácilmente su conformación biológicamente activa. Se conoce que la estabilidad del quitosano conservado a 4 °C (temperatura a la que se conservan los biosensores) es de aproximadamente cuatro semanas [287]. Este periodo de tiempo se ajusta al tiempo de vida útil que presentan los biosensores desarrollados.

3.2.2.4. *Discusión de los resultados obtenidos en la inmovilización covalente*

Se han estudiado dos modificaciones de superficie mediante técnicas de plasma para funcionalizar la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs, polimerización y sembrado por plasma de PFM. Los resultados obtenidos a partir de las determinaciones realizadas con QCM-D muestran que, en ambos casos se consigue realizar con éxito la inmovilización covalente de las moléculas de glucosa oxidas. Sin embargo, la conformación espacial que adoptan estas moléculas no siempre presenta actividad catalítica.

Al aplicar la polimerización por plasma del PFM las moléculas de GOx adoptan mayoritariamente la conformación desplegada y la conformación intermedia de glóbulo pre-fundido, ninguna de las cuales es biológicamente activa. Esto se debe a que la película formada de PFM genera un entorno hidrofóbico desfavorable para las moléculas de enzima, que tienden a desnaturalizarse. Como consecuencia de las estructuras tridimensionales que adoptan las moléculas de GOx en las superficies ppPFM, los biosensores desarrollados al aplicar esta técnica de inmovilización no son suficientemente sensibles para detectar la presencia de glucosa en el medio de medida. En cambio, al aplicar el sembrado por plasma de PFM sobre un lecho hidrófilo de HEMA-co-EGDA, las moléculas de GOx se encuentran en un entorno más favorable para la conservación de su estructura catalíticamente activa. En este caso, las moléculas de enzima adoptan mayoritariamente la conformación nativa o la estructura intermedia de glóbulo fundido. Estas dos conformaciones conservan la actividad catalítica de la glucosa oxidasa. Por tanto, se decide utilizar la técnica de sembrado polimérico de PFM para la construcción de biosensores amperométricos de glucosa.

Los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx desarrollados son sensibles a la presencia de glucosa en el medio de medida (aproximadamente 2 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). Sin embargo, la estabilidad a largo plazo de estos biosensores es relativamente corta. Después de tres días de su construcción, estos pierden completamente la capacidad para detectar la glucosa presente en la disolución de medida. Por tanto, es necesario aplicar una película protectora que ayude a conservar la actividad catalítica de las moléculas de enzima inmovilizadas. Por este motivo, se añade una fina película de quitosano a la estructura de los biosensores desarrollados. Los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano obtenidos presentan una elevada sensibilidad (9,76 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$) frente a la presencia de glucosa. El rango de trabajo lineal de estos biosensores está comprendido entre 0,25 y 1,49 mM glucosa, con un límite de cuantificación de 0,20 mM glucosa. Además, la estabilidad a largo plazo de estos biosensores mejora respecto a los biosensores sin la película protectora de quitosano. Los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano muestran una respuesta amperométrica relativamente estable hasta los 20 días, después la sensibilidad disminuye rápidamente hasta que no es posible realizar medidas con los sensores.

En este punto, cabe destacar que la arquitectura de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano desarrollados en la presente tesis es especialmente adecuada para aplicaciones biomédicas y dispositivos implantables:

- En primer lugar, la interfase electroquímica en base a titanio y a óxido de titanio (IV) favorece la biocompatibilidad del sistema; el titanio es un metal que no es rechazado por el cuerpo humano, es farmacológicamente inerte y no provoca reacciones alérgicas del sistema inmunitario. Además, se trata de un material con una elevada resistencia mecánica y a la corrosión, con una elevada dureza y muy ligero. Por todas estas razones, uno de los principales usos del titanio es el desarrollo de implantes y prótesis [288]. Así pues, al utilizar Ti/TiO₂NTAs como interfase electroquímica se favorece la posibilidad de desarrollar biosensores implantables para aplicaciones biomédicas.

- En segundo lugar, el uso de quitosano aporta estabilidad al dispositivo de media, actuando como barrera protectora para el enzima inmovilizado. El quitosano es un hidrogel biocompatible de origen natural que presenta una gran afinidad por las proteínas, evitando la desnaturalización de los enzimas inmovilizados [81]. Además, este hidrogel presenta una elevada estabilidad mecánica, por lo que conserva su estructura ante condiciones adversas. Por todas estas razones, el tiempo de vida útil de los biosensores desarrollados aumenta en comparación con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx. El hecho de utilizar quitosano como barrera protectora también favorece la sensibilidad de los biosensores desarrollados, ya que esta matriz polimérica bloquea el paso de posibles macromoléculas interferentes.
- En tercer lugar, el poli-HEMA protege a la interfase electroquímica de la adhesión de moléculas que pueden actuar como interferentes en la medida del biosensor y causar daños en el organismo del usuario y además es biocompatible [127]. Una de las principales preocupaciones en el desarrollo de dispositivos implantables con aplicaciones biomédicas es la capacidad que presentará el sensor para resistir la adhesión de proteínas inespecíficas [127]. Este hecho no solamente conlleva problemas de contaminación/interferencias en la medida del sensor, sino que además puede provocar posibles rechazos por parte del paciente generando inflamaciones de la zona próxima al implante e incluso trombosis [289]. Es conocido que el poli-HEMA además de ser biocompatible y altamente hidrófilo, presenta resistencia a la adhesión inespecífica de proteínas [252,290,291]. Por tanto, al utilizar este polímero en la arquitectura de biosensores implantables, disminuye el riesgo de rechazo. Además, al aplicar técnicas de plasma para la polimerización del HEMA se consiguen recubrimientos a medida que siguen el perfil de la interfase electroquímica [146]. Por tanto, el polímero depositado respalda la arquitectura de los nanotubos y se mantiene tanto el área específica que estos aportan como una elevada sensibilidad.
- Finalmente, la inmovilización covalente disminuye la probabilidad de que las moléculas de enzima puedan escapar de la arquitectura del biosensor. Además, garantiza que el enzima se sitúe en una zona suficientemente cercana al transductor como para evitar la pérdida de los electrones derivados de la reacción enzimática. Asimismo, la superficie obtenida al utilizar el sembrado por plasma de PFM muestra una elevada covalencia, que es la capacidad de retener las moléculas covalentemente inmovilizadas después de un lavado vigoroso (normalmente comprobado con el detergente SDS) [292]. Como se ha demostrado en la presente tesis mediante QCM-D, la superficie Ti/HEMA-co-EGDA/pgPFM muestra una buena covalencia ante un entorno agresivo, probado al lavar con SDS y sometiendo el sistema a un cambio de pH (de 7,0 a 5,0). Además, al aplicar esta técnica de inmovilización se consigue que la mayor parte de la población de moléculas de enzima conserven su actividad biológica. Por tanto, probablemente los biosensores desarrollados conservarán su sensibilidad frente al analito de interés en condiciones más suaves, como las que presenta el torrente sanguíneo humano.

Por todas estas características, se puede afirmar que los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano desarrollados en la presente tesis tienen un gran potencial para aplicaciones prácticas, principalmente en el desarrollo de dispositivos implantables con aplicaciones biomédicas.

3.2.3. Comparación de los métodos de inmovilización estudiados

Después de estudiar diferentes procedimientos para la inmovilización de enzimas sobre la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs, se puede afirmar que tanto los procedimientos físicos como los procedimientos químicos analizados permiten la obtención de biosensores amperométricos de glucosa.

Al analizar los métodos físicos aplicados, se observa que los diferentes hidrogeles utilizados (quitosano, carragenina e hidroxietilmetacrilato) generan un microentorno favorable para la conservación de la conformación activa de las moléculas de enzima. Este hecho se refleja en la capacidad de los biosensores de generar una respuesta amperométrica frente a la presencia de glucosa en el medio de medida. Sin embargo, algunas matrices de inmovilización parecen ser más favorables que otras, ya que los valores de sensibilidad varían entre biosensores. Se ha observado que el grado de cohesión de los hidrogeles influye en la sensibilidad que ofrecen los biosensores. También se ha analizado la estabilidad a largo plazo de los dispositivos desarrollados y se ha visto que ésta varía en función del hidrogel utilizado; la matriz de inmovilización basada en *kappa*-carragenina no parece ser favorable para la conservación de la actividad enzimática, mientras que las matrices en base a poli-HEMA y a Quitosano ofrecen tiempos de vida útil más elevados (ver Tabla 3.19). También se ha observado que el hecho de añadir quitosano a la matriz de inmovilización aporta estabilidad, aumentando el tiempo de vida útil de los biosensores desarrollados. De este modo, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano son los que presentan tiempos de vida útil más elevados en comparación con el resto de los biosensores basados en la inmovilización física del enzima.

Por otro lado, al analizar los métodos químicos de inmovilización aplicados en la presente tesis, se observa que la hidrofobicidad del medio que rodea al enzima influye en la capacidad catalítica del mismo. De este modo, los biosensores desarrollados mediante polimerización polimérica de PFM, en los que se genera un recubrimiento hidrofóbico y homogéneo a lo largo de toda la superficie del electrodo, no permiten la conservación de la conformación activa de la glucosa oxidasa. Por tanto, los biosensores ppPFM no ofrecen suficiente respuesta amperométrica frente a las adiciones de glucosa en el medio. En cambio, al aplicar el sembrado por plasma de PFM sobre un lecho de HEMA-co-EGDA, la hidrofobicidad del medio disminuye notablemente y la glucosa oxidasa encuentra un entorno más favorable para la conservación de su conformación activa. De este modo, se obtienen biosensores sensibles a la presencia de glucosa en el medio. En cuanto a la estabilidad de los biosensores a lo largo del tiempo, se ha observado que es necesaria la presencia de una película protectora que evite la desnaturalización de las moléculas de enzima.

En la Tabla 3.19, se muestra un resumen de los valores de sensibilidad iniciales obtenidos con cada biosensor desarrollado, así como los tiempos de vida útil que éstos presentan.

Tabla 3.19. Sensibilidad, rango lineal y valores de estabilidad a largo plazo de los diferentes biosensores desarrollados en la presente tesis.

Tipo de inmovilización	Biosensor	Sensibilidad*/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Rango lineal/mM	Disminución del 80% o más de la sensibilidad inicial/días
Inmovilización física en matrices de hidrogeles	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina -1,25%	-	-	-
	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina -0,3%	-	-	-
	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina -0,4%	0,89	0,25 - 1,24	1
	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Carragenina -0,5%	1,77	0,25 - 1,24	1
	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA	14,76	0,13 - 0,75	14
	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/HEMA-co-EGDA/Quitosano	13,67	0,13 - 1,00	50
	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano	10,58	0,25 - 1,24	34
	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano-HClO	7,85	0,25 - 1,24	35
	Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano-GA	14,24	0,25 - 1,24	37
Inmovilización química mediante enlaces amida	Ti/TiO ₂ NTAs/ppPFM/GOx	1,84	0,25 - 1,24	1
	Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx	2,09	0,25 - 1,49	2
	Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano	9,76	0,25 - 1,49	34

* Los valores de sensibilidad corresponden al valor más alto de los diferentes replicados de cada biosensor, tomados el primer día desde la construcción del biosensor correspondiente.

Como se muestra en la Tabla 3.19, los biosensores que presentan mayores valores de sensibilidad y estabilidades a largo plazo mayores son aquellos que presentan quitosano en su estructura. Esto se debe a la naturaleza biocompatible del quitosano, que genera un entorno en el que la glucosa oxidasa tiende a adoptar una conformación biológicamente activa. Además, la estructura tridimensional que forma el hidrogel quitosano previene la pérdida de moléculas de enzima a lo largo de los días y evita que moléculas de gran tamaño puedan llegar a la interfase electroquímica generando una interferencia en la medida del biosensor. Dentro de los biosensores obtenidos por métodos físicos de inmovilización en los que se utilizan hidrogeles en base quitosano, se ha observado que el uso de agentes reticulantes solamente afecta a la sensibilidad, pero no a la estabilidad a largo plazo. Cabe destacar que el uso de glutaraldehído como agente reticulante es un problema debido a su elevada toxicidad, que restringe su uso en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y médicas. Además, este compuesto tiende a sufrir autocondensación aldólica que da lugar a la formación de polímeros irregulares [257] difícilmente reproducibles. Por todas estas razones, se descarta la matriz de inmovilización Quitosano-GA para el desarrollo de biosensores enzimáticos.

Por otro lado, dentro de los biosensores basados en la inmovilización covalente del enzima, los que presentan una mayor sensibilidad y estabilidad a largo plazo son los Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. Si se comparan las propiedades analíticas de estos biosensores con las de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano, puede verse que en ambos casos se consiguen valores similares de sensibilidad y estabilidad a largo plazo. La diferencia entre las arquitecturas obtenidas para cada tipo de biosensor hace que las propiedades de éstos sean diferentes, por lo que la aplicabilidad de cada uno será distinta. Los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano presentan una configuración sencilla, fácilmente reproducible, por lo que son una buena opción para realizar control de calidad en el sector alimentario. En cambio, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano presentan una arquitectura más compleja que los anteriores, pero también una mayor resistencia a la adhesión inespecífica de proteínas, por lo que son más adecuados para el desarrollo de dispositivos implantables en aplicaciones biomédicas. En cualquier caso, las dos configuraciones muestran propiedades analíticas similares ante la presencia de glucosa.

Para conocer si la respuesta amperométrica de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano es la misma que la de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano, se realiza un análisis de varianza de un factor (ANOVA 1-F) tomando todos los valores de sensibilidad obtenidos el primer día de medida con un nivel de confianza del 95%. Al realizar esta prueba, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores de sensibilidad obtenidos (*p-value* = 0,10). Estos resultados indican que, tanto al aplicar el sembrado por plasma de PFM como al aplicar quitosano como matriz de inmovilización, se inmoviliza una población similar de GOx en su conformación activa. Por este motivo, se decide que los dos procedimientos pueden aplicarse para inmovilizar con éxito enzimas sobre la interfase electroquímica de nanotubos de óxido de titanio (IV), obteniéndose biosensores amperométricos sensibles a la presencia de analito y estables en un periodo de tiempo de aproximadamente un mes.

Con la intención de hallar diferencias significativas entre la inmovilización de glucosa oxidasa en una matriz de quitosano y mediante la formación de enlaces amida con PFM, se decide calcular la actividad enzimática que presenta la GOx inmovilizada en cada caso. Un indicador de la actividad enzimática que presentan las moléculas de enzima es la constante de Michaelis-Menten (K_M), que se define como la concentración de sustrato necesaria para que la velocidad de la reacción enzimática alcance un valor igual a la mitad de la velocidad máxima. Cuanto menor es el valor de K_M , mayor es la capacidad del sustrato de unirse al centro activo del enzima y, por tanto, mayor es la actividad catalítica que presenta el enzima [293]. Para conocer la actividad enzimática que presentan las moléculas de enzima inmovilizadas en cada electrodo, se calcula la constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{ap}). Este valor se puede estimar a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk (Ecuación 3.3) [293].

$$\frac{1}{i_{ss}} = \frac{1}{i_{max}} + \frac{K_M^{ap}}{i_{max}} \cdot \frac{1}{C_{sustrato}} \quad \text{[Ecuación 3.3]}$$

Donde i_{ss} es la intensidad de corriente medida con el biosensor en el estado estacionario después de la adición de sustrato, i_{max} es la intensidad de corriente máxima que circula en

condiciones de saturación de sustrato y $C_{sustrato}$ es la concentración de sustrato adicionada. Entonces, al representar el inverso de la concentración de sustrato frente al inverso de la intensidad corregida, se obtiene una recta con pendiente K_M^{app}/i_{max} y con ordenada en el origen igual a $1/i_{max}$. A partir de las rectas de calibrado obtenidas con cada biosensor, se calculan las constantes aparentes de Michaelis-Menten y se comparan con otros biosensores descritos en bibliografía (ver Tabla 3.20). Cuanto menor es el valor de K_M^{app} , mayor es la afinidad que siente el enzima por el sustrato. En función de la conformación espacial que adopten las moléculas de enzima, la afinidad que sientan por el sustrato variará, siendo mayor en para las conformaciones biológicamente activas. Por tanto, cuanto menor sea el valor de K_M^{app} , mayor será la sensibilidad del biosensor.

Tabla 3.20. Valores de la constante de Michaelis-Menten aparente de diferentes biosensores de glucosa descritos en bibliografía y de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano desarrollados en la presente tesis. En estos dos últimos casos se presenta el valor medio de K_M y la desviación estándar calculados a partir de tres replicados para cada biosensor.

Biosensor	K_M^{app}/mM	Referencia
GCE/CS/CNT/Au-PtNPs/GOx	5,20	[294]
CNT/Pt/GOx/Nafion	10,11	[109]
GCE-CNT/GOx	5,95 - 14,50	[293]
Ti/TiO ₂ NT/AuNPs/GOx	7,2	[142]
Ti/TiO ₂ NTAs/GOx/Quitosano	3,37 ± 0,46	Esta tesis
Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano	3,44 ± 0,67	Esta tesis

Au-PtNPs, nanopartículas de Au y Pt; CNT, nanotubos de carbono; CS, quitosano; GCE, electrodo de carbono vítreo.

Como se muestra en la Tabla 3.20, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano presentan valores similares para la constante de Michaelis-Menten aparente. Se realiza un análisis de varianza de un factor (ANOVA 1-F) tomando todos los valores individuales de K_M^{app} obtenidos y aplicando un nivel de confianza del 95% y la prueba realizada muestra un valor de significación mayor a 0,05 ($p-value = 0,87$). Por tanto, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos. Estos resultados indican que, en ambos casos se consigue obtener una población similar de glucosa oxidasa inmovilizada en la conformación biológicamente activa. Por este motivo, los valores de sensibilidad que se consiguen al aplicar ambas arquitecturas son del mismo orden de magnitud (alrededor de los 10 $\mu A \cdot mM^{-1}$). Además, las K_M^{app} que muestran los biosensores obtenidos en la presente tesis son menores a los valores descritos en bibliografía para otros biosensores de glucosa. Por tanto, los biosensores desarrollados en la presente tesis conservan mejor la actividad enzimática de la glucosa oxidasa y presentan una mayor afinidad por la glucosa. Esto se debe a que los procesos de inmovilización aplicados generan un microentorno biocompatible y poco hidrofóbico, que ofrece condiciones de pH adecuadas y permite la difusión de reactivos y productos hasta/desde el centro activo del enzima bloqueando el paso de interferentes.

Ante los resultados obtenidos, se puede afirmar que tanto la inmovilización mediante captura polimérica en una matriz de quitosano, como la formación de enlaces covalentes mediante sembrado por plasma de PFM sobre un lecho de HEMA-co-EGDA, permiten la obtención de biosensores de glucosa con sensibilidades y estabildades a largo plazo similares entre sí. Sin

embargo, la arquitectura obtenida en cada caso otorga diferentes características a los biosensores que los hacen diferir en su potencial aplicación.

Los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano presentan una arquitectura sencilla y fácilmente reproducible. Además, todos sus componentes son materiales biocompatibles y no-tóxicos, por lo que se genera un entorno favorable para las moléculas de enzima inmovilizadas, obteniéndose biosensores altamente sensibles ante la presencia de glucosa. Gracias a estas características, se propone el uso de estos biosensores por ejemplo para el control de calidad de productos del sector agroalimentario.

En comparación, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano presentan una arquitectura más compleja que los biosensores basados en quitosano. A pesar de ello, la configuración covalente obtenida permite inmovilizar un gran número de moléculas de enzima, mayormente en su conformación biológicamente activa, obteniéndose biosensores altamente sensibles a la presencia de glucosa. Además, la película protectora de quitosano previene la desnaturalización del enzima, logrando una alta estabilidad a largo plazo. Asimismo, la biocompatibilidad de sus componentes hace que la interfaz obtenida sea una plataforma adecuada para el desarrollo de dispositivos implantables en el entorno biomédico. En este sentido, la presencia de HEMA-co-EGDA aporta una ventaja extra, ya que este polímero evita la adhesión inespecífica de proteínas que pueden provocar una reacción inmune y el rechazo del implante [252,290,291].

Finalmente, en ambos casos la presencia de nanotubos de TiO₂ favorece al sistema. El TiO₂ presenta actividad catalítica frente a la reducción de H₂O₂ [295]. A diferencia de los biosensores amperométricos convencionales, el principio de funcionamiento de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano se basa en seguir la reducción del peróxido de hidrógeno utilizando un potencial catódico. En esta configuración de medida, se eliminan las especies reductoras interferentes más comunes, como el ácido ascórbico o el acetaminofén [211], consiguiéndose una elevada selectividad.

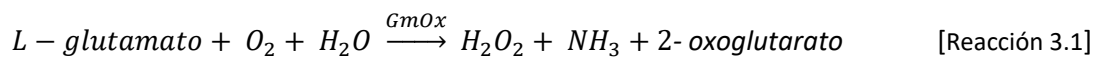
Por todos estos motivos, se decide utilizar ambas arquitecturas en el desarrollo de biosensores con aplicaciones analíticas específicas. En concreto, se han utilizado ambas arquitecturas para desarrollar biosensores de glucosa y glutamato. En el siguiente apartado se detallan los resultados obtenidos en el desarrollo de biosensores de glutamato basados en la inmovilización del enzima glutamato oxidasa (GmOx).

3.2.4. Desarrollo de biosensores de glutamato

Los aminoácidos son componentes nutricionales esenciales para una dieta equilibrada y deben estar presentes en los alimentos en la medida adecuada para garantizar el correcto crecimiento de los niños y la salud de niños y adultos [296]. Por tanto, es esencial determinar con precisión la composición de aminoácidos presentes en los alimentos. Uno de los aminoácidos que ha despertado mayor interés en los últimos años, por razones nutricionales, es el ácido L-glutámico, especialmente en forma de sal monosódica.

El L-glutamato monosódico es ampliamente utilizado en el sector alimentario como potenciador del sabor de los alimentos, ya que es el responsable del sabor *umami*. Por sí solo presenta un sabor algo desagradable, pero en combinación con los alimentos estos resultan mucho más sabrosos. Por este motivo, es un aditivo muy usado en la cocina china, donde sustituye a la sal común. El ácido L-glutámico se obtiene en la industria alimentaria por fermentación bacteriana de azúcares residuales de origen vegetal. Se cree que el consumo excesivo de L-glutamato puede provocar a corto plazo dolores de cabeza, náuseas, sudores y sensación de presión en el rostro, lo que se conoce como el síndrome del restaurante chino [297], nombre que surgió a raíz del aumento del consumo de comida china en Occidente. Por otro lado, el ácido L-glutámico actúa como neurotransmisor excitatorio en distintos procesos del sistema nervioso central. Por tanto, un desorden en los niveles de ácido L-glutámico en el líquido cefalorraquídeo, que es la sustancia que baña el encéfalo y la médula espinal, puede provocar enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la esclerosis múltiple o el Alzheimer [298]. Por todos estos motivos, es necesario controlar los niveles de L-glutamato presentes en los alimentos.

Actualmente, la determinación de aminoácidos en productos alimentarios se realiza por métodos cromatográficos e incluyen varias etapas de preparativa de muestra [296], por lo que no es posible aplicar esta determinación en continuo y en tiempo real sobre el proceso de producción. Una alternativa viable para solucionar este problema es el uso de biosensores basados en la inmovilización de L-glutamato oxidasa (GmOx) [298–300], que cataliza la reacción de oxidación del L-glutamato a 2-oxoglutarato (Reacción 3.1).



La determinación de la concentración de L-glutamato se lleva a cabo electroquímicamente, monitorizando la cantidad de peróxido de hidrógeno que se forma mediante la reacción enzimática descrita anteriormente (ver Figura 3.45).

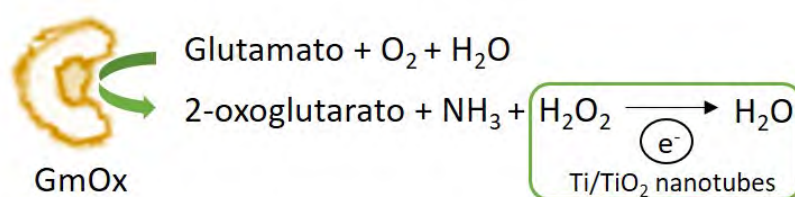


Figura 3.45. Reacción enzimática de conversión del glutamato en 2-oxoglutarato por acción de la GmOx.

En la presente tesis, se inmoviliza el enzima glutamato oxidasa sobre la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs con la finalidad de obtener biosensores amperométricos de glutamato. Estos biosensores se basan en seguir la reducción del peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática a agua, al aplicar una diferencia de potencial constante (ver Figura 3.45).

Para la construcción de un biosensor de glutamato, se inmoviliza L-glutamato oxidasa (GmOx) sobre un electrodo de disco rotatorio compuesto por la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs. Se prepara una disolución de GmOx (Sigma Aldrich, ref. 1001780510) proveniente de *Streptomyces sp.* con una actividad, expresada como *Escherichia coli*, mayor o igual a 5 U/mg. Se disuelven 10 mg de GmOx [301,302] en 500 µL de PBS. La inmovilización del enzima se lleva a cabo aplicando dos métodos distintos de anclaje:

- **Inmovilización física.** Se depositan 30 µL de disolución de GmOx (10 mg/500 µL) sobre el electrodo Ti/TiO₂NTAs y se deja difundir durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de GmOx presente en la superficie de los nanotubos utilizando PBS. A continuación, se depositan 20 µL de disolución de quitosano 0,5% (p/p) en ácido acético 1% (v/v) sobre el electrodo Ti/TiO₂NTAs/GmOx y se dejan secar bajo una corriente suave de aire. Finalmente, se sumerge el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano en PBS durante unos 30 min con la finalidad de rehidratar las moléculas de enzima.
- **Inmovilización covalente.** Se depositan 30 µL de disolución de GmOx (10 mg/500 µL) sobre los electrodos Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM modificados por plasma (ver apartado 3.2.2.1) y se deja difundir durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se elimina utilizando PBS el exceso de GmOx que no haya reaccionado con el PFM presente en la superficie de los electrodos. A continuación, se deposita una capa polimérica de un hidrogel (quitosano) para prevenir la desnaturalización de las moléculas de enzima y evitar el paso de interferentes. Se depositan 20 µL de disolución de quitosano y se fijan bajo una corriente de aire suave. Finalmente, los biosensores de glutamato obtenidos (Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano) se sumergen en PBS durante unos 30 min con la finalidad de rehidratar las moléculas de enzima.

Cuando no se utilizan, los biosensores se conservan sumergidos en disolución tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 a una temperatura de 4 °C.

Una vez contruidos los biosensores, se estudia su respuesta amperométrica frente a la adición de 0,02 mM de L-glutamato de forma consecutiva a lo largo del tiempo sobre 100 mL de una disolución tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0, aplicando un potencial constante de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) y manteniendo la agitación del sistema a 2000 rpm (ver Figura 3.46).

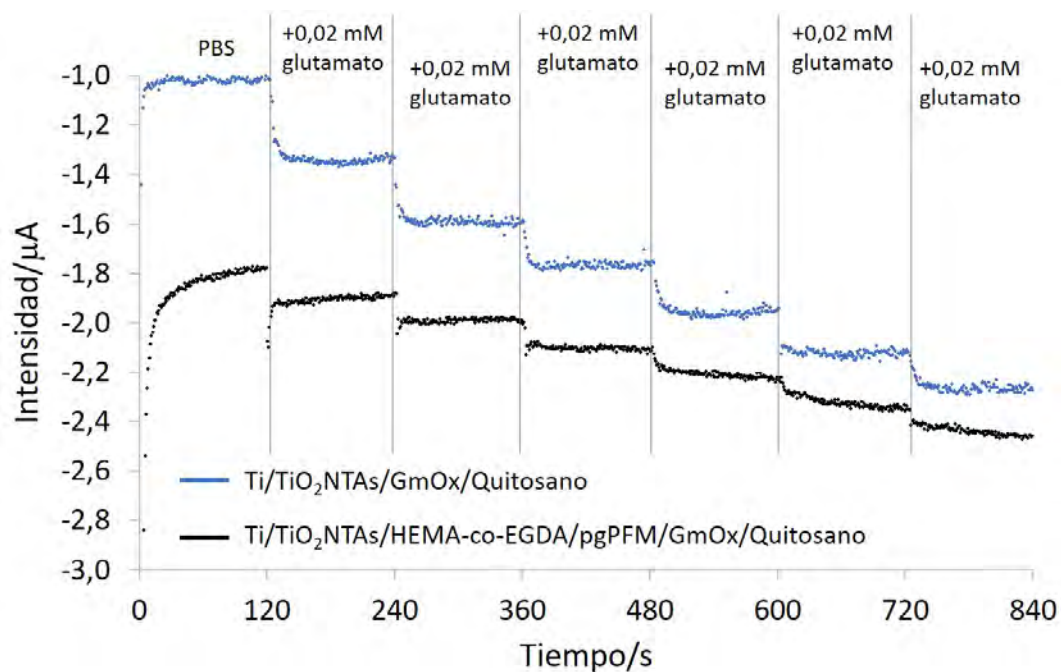


Figura 3.46. Curvas intensidad-tiempo registradas con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano (línea azul) y con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano (línea negra) al aplicar un potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl sobre una disolución tampón fosfato 0,1 M a la que se realizan incrementos consecutivos de 0,02 mM en L-glutamato.

Como se muestra en la Figura 3.46, tras cada adición de 0,02 mM de L-glutamato se registra un incremento de intensidad de aproximadamente 0,35 μA con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano (18 $\mu\text{A}/\text{mM}$) y de 0,10 μA con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano (5 $\mu\text{A}/\text{mM}$). Teniendo en cuenta que en ambos casos se adiciona la misma concentración de analito, es posible relacionar la diferencia de las señales registradas con la actividad enzimática del GmOx inmovilizado. Cuanto mayor sea la población de moléculas de enzima en su conformación biológicamente activa, mayor será la respuesta amperométrica del biosensor. Los resultados obtenidos indican que las moléculas de GmOx inmovilizadas encuentran un entorno más favorable en ausencia de pentafluorofenilmetacrilato (PFM).

A partir de la respuesta amperométrica de los biosensores Ti/TiO₂NT/GmOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano, se construyen rectas de calibrado representando la intensidad corregida frente a la concentración de L-glutamato. En ambos casos, se obtiene un rango lineal de concentraciones comprendido entre 0,02 mM y 0,12 mM en L-glutamato (ver Tabla 3.21 y Figura 3.47).

Tabla 3.21. Rectas de calibrado obtenidas con los biosensores Ti/TiO₂NT/GmOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano al representar la intensidad corregida frente a la concentración de L-glutamato en un margen de concentraciones comprendido entre 0,02 mM y 0,12 mM de L-glutamato.

Biosensor	Pendiente / $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Ordenada en el origen/ μA	R ²
Ti/TiO ₂ NT/GmOx/Quitosano	-8,54	-0,09	0,9927
Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano	-5,67	-0,02	0,9911

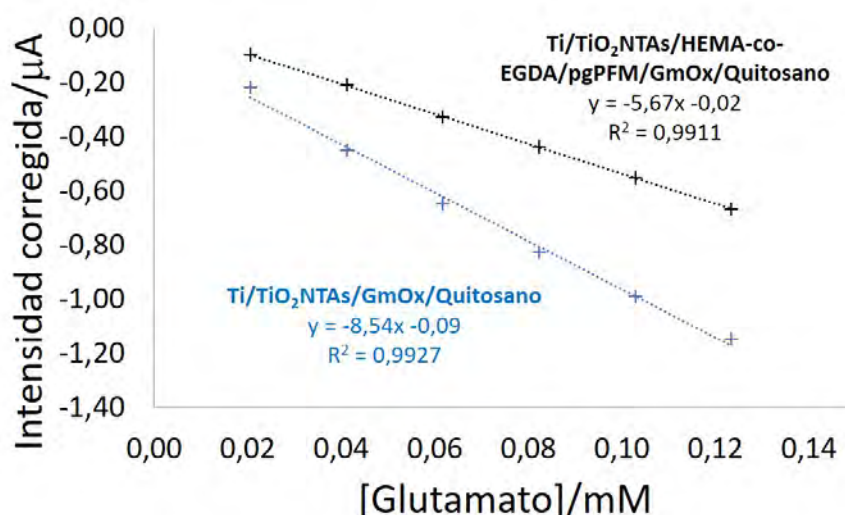


Figura 3.47. Rectas de calibrado obtenidas con los biosensores Ti/TiO₂NT/GmOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano al representar la intensidad corregida frente a la concentración de L-glutamato en un margen de concentraciones comprendido entre 0,02 mM y 0,12 mM de L-glutamato.

En la Tabla 3.21, se muestran las rectas de calibrado obtenidas con los biosensores de glutamato desarrollados. La sensibilidad (pendiente de la recta de calibrado) obtenida con el biosensor Ti/TiO₂NT/GmOx/Quitosano presenta un incremento del 51% respecto a la sensibilidad del biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano. Por otro lado, se utilizan las rectas de calibrado obtenidas para determinar los límites de cuantificación (LQ) que presentan los biosensores desarrollados. Este valor se asocia a la concentración que se puede determinar a 10 veces la señal del ruido. En la Tabla 3.22, se muestran los valores obtenidos para cada biosensor.

Tabla 3.22. Valores de límite de cuantificación obtenidos para los biosensores Ti/TiO₂NT/GmOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano.

Biosensor	Límite de cuantificación/mM
Ti/TiO ₂ NT/GmOx/Quitosano	0,010
Ti/TiO ₂ NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano	0,020

Como se muestra en la Tabla 3.22, el biosensor Ti/TiO₂NT/GmOx/Quitosano presenta un valor más bajo de LC que el biosensor basado en el sembrado polimérico de PFM (Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano). Este hecho concuerda con los resultados previos, en los que se atribuye mayor sensibilidad al biosensor Ti/TiO₂NT/GmOx/Quitosano.

Como se ha mencionado anteriormente, la sensibilidad de los biosensores se relaciona directamente con la población de enzimas en la conformación activa que se haya inmovilizado. Para conocer la actividad enzimática que presenta cada uno de los biosensores desarrollados, se aplica la ecuación de Lineweaver-Burk (Ecuación 3.3) y se calcula la constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{ap}). Para calcular este valor, se utiliza la ecuación de la recta obtenida al representar la inversa de la concentración de glucosa frente a la inversa de la intensidad

corregida obtenidas con cada biosensor. En la Figura 3.48, se muestran las correlaciones obtenidas con cada biosensor.

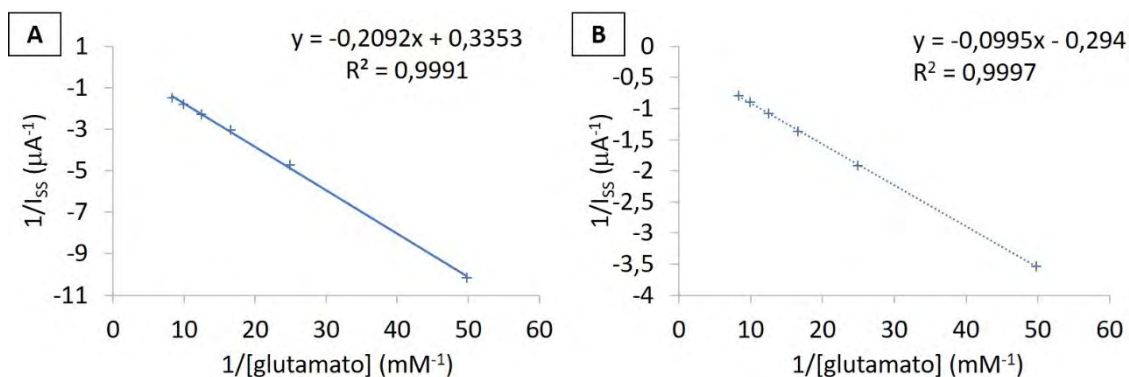


Figura 3.48. Representación del inverso de la concentración frente a la inversa de la intensidad corregida registrada con el biosensor (A) Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano y con el biosensor (B) Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano al aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl.

A partir de las ecuaciones de las rectas que se muestran en la Figura 3.48, se calculan los valores de las constantes de Michaelis-Menten aparentes para cada biosensor desarrollado. Mientras que el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano presenta una K_M^{ap} igual a 0,34 mM, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano presenta una K_M^{ap} de 0,62 mM en glutamato. Cuanto menor es el valor de K_M^{ap} , mayor es la actividad catalítica que presenta el enzima inmovilizado. Por tanto, el biosensor en el que se utiliza quitosano como matriz de inmovilización permite retener una mayor población de L-glutamato oxidasa en su conformación biológicamente activa, en comparación con el biosensor en el que se realiza el sembrado por plasma de PFM. La L-glutamato oxidasa procedente de *Streptomyces sp.* en su conformación nativa y en disolución presenta una K_M igual a 0,23 mM de L-glutamato [303]. Este valor es cercano al valor obtenido con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano. Este hecho indica que la mayor parte de las moléculas de GmOx inmovilizadas en este biosensor presentan la conformación espacial nativa.

Por otro lado, se evalúa la estabilidad a largo plazo de los biosensores desarrollados. Para ello, se realizan cronoamperometrías con los electrodos Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano durante distintos días. En todos los casos, se aplica una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3 M) y se mantiene el sistema en agitación constante a 2000 rpm. En la Figura 3.49, se muestra la evolución de la sensibilidad registrada con dos duplicados de cada biosensor a lo largo del tiempo.

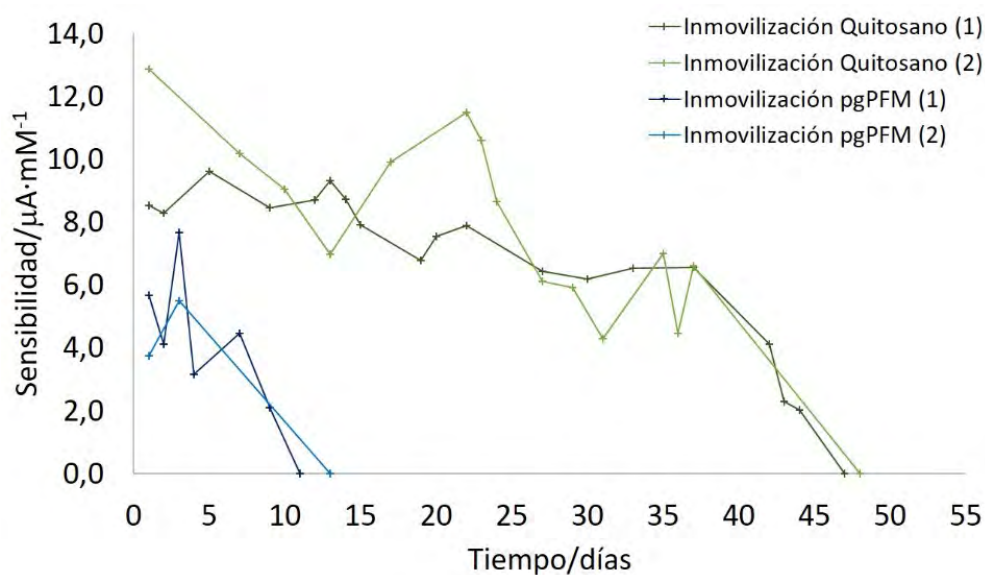


Figura 3.49. Evolución de la sensibilidad de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano (líneas verdes) y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano (líneas azules) a lo largo del tiempo.

Como se muestra en la Figura 3.49, los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano presentan valores de sensibilidad más elevados y una mayor estabilidad a largo plazo que los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano. Los biosensores obtenidos por inmovilización del enzima en quitosano presentan valores de sensibilidad relativamente estables hasta los 35 días (pierden un 73% de su sensibilidad inicial después de 37 días). En cambio, transcurridos unos 10 días los biosensores obtenidos al aplicar el sembrado polimérico de PFM dejan de mostrar respuesta electroquímica (pierden un 63% de su sensibilidad inicial después de 9 días). Por tanto, el uso de Quitosano como matriz de inmovilización por captura polimérica favorece la conservación de la actividad catalítica del enzima Glutamato Oxidasa a lo largo del tiempo.

Discusión de los resultados obtenidos

Se han construido biosensores basados en la inmovilización de glutamato oxidasa sobre la interfase electroquímica Ti/TiO₂NTAs. Para ello, se aplicaron dos métodos de inmovilización: el encapsulamiento polimérico en una matriz de quitosano y la formación de enlaces covalentes utilizando sembrado polimérico de PFM. Tanto los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano como los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano presentan respuesta electroquímica frente a la presencia de glutamato. Por tanto, en ambos casos la arquitectura de los biosensores permite la inmovilización satisfactoria de moléculas de GmOx en su conformación biológicamente activa. El biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano presenta una sensibilidad de 8,54 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, mientras que la sensibilidad del biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano es de 5,67 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. Estos resultados indican que, el biosensor basado en el encapsulamiento polimérico presenta una mayor población de enzima en su conformación biológicamente activa que el biosensor basado en la formación de enlaces covalentes. La L-glutamato oxidasa es una proteína hexamérica formada por tres subunidades α , β y γ de 44 kDa, 19 kDa y 9 kDa respectivamente [304]. En su

conformación nativa, presenta forma de dímero oligomérico compuesto por cuatro fragmentos asimétricos, dos N-terminales y dos C-terminales y con dos grupos FAD unidos covalentemente como cofactor [303]. Es posible que, durante el proceso de inmovilización covalente, algunas de las moléculas de GmOx se unan de forma asimétrica a la superficie, desplegándose parcialmente y perdiendo el grupo FAD. De este modo, parte de la GmOx adoptaría una conformación no activa que provocaría la pérdida de la capacidad catalítica, observándose una disminución de la sensibilidad del biosensor en base a pgPFM respecto al biosensor en base a quitosano.

Cabe mencionar que, los valores de sensibilidad obtenidos con los biosensores de glutamato desarrollados en la presente tesis ($8,54 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y $5,67 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$) son inferiores a los valores de sensibilidad que ofrecen los biosensores de glucosa Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano ($10,58 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). Este hecho se puede relacionar con la diferencia de actividades enzimáticas entre la GOx (100 U/mg de proteína) y la GmOx (5 U/mg de proteína) utilizadas en la presente tesis.

Por otro lado, se ha evaluado la estabilidad a largo plazo de los biosensores de glutamato desarrollados. El biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano retiene aproximadamente el 80% de su señal inicial después de 37 días. En cambio, transcurridos unos 10 días desde su construcción los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano dejan de mostrar respuesta electroquímica. Estos resultados indican de nuevo que las moléculas de glutamato oxidasa tienden a desnaturalizarse en presencia de pentafluorofenilmetacrilato, a pesar de disminuir la hidrofobicidad del medio con el lecho hidrófilo de HEMA-co-EGDA. Está descrito en bibliografía que los procesos de encapsulamiento polimérico son más favorables para la conservación de la actividad enzimática que la formación de enlaces covalentes, ya que durante este último proceso las proteínas tienden a desnaturalizarse [305]. Por tanto, se asocia la menor sensibilidad y estabilidad a largo plazo de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano a la formación de enlaces covalentes entre enzima y PFM.

Así pues, ante los resultados obtenidos, se decide aplicar el proceso de inmovilización físico en base al hidrogel quitosano para el desarrollo de biosensores de L-glutamato.

En el siguiente apartado, se detallan los diferentes procedimientos de análisis establecidos para cada uno de los biosensores desarrollados en la presente tesis (Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano, Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano).

3.3. Metodología analítica

Con la intención de utilizar los biosensores desarrollados para la cuantificación de glucosa y glutamato en muestras del sector alimentario, como bebidas refrescantes, salsas de soja, productos lácteos y salsas de tomate, se ha desarrollado un procedimiento de análisis adecuado para estos dispositivos. Con la finalidad de determinar los parámetros analíticos del método de análisis propuesto, se han utilizado todos los biosensores desarrollados en esta tesis: Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano, Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano. La determinación de dichos parámetros analíticos se ha realizado sobre una bebida refrescante. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cada caso.

3.3.1. Proceso de análisis utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano

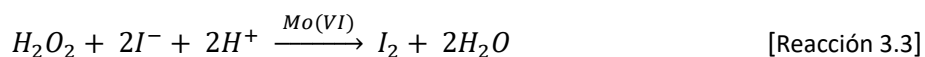
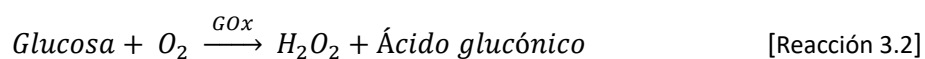
La evaluación de los parámetros analíticos de los biosensores desarrollados es esencial para garantizar que la determinación del analito de interés sea precisa, específica, reproducible y fiable dentro del rango de concentraciones especificado [306]. Por este motivo, se desarrolló un método de análisis para la determinación de glucosa en muestras del sector alimentario utilizando los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano desarrollados en la presente tesis. En este proceso se han evaluado los siguientes parámetros analíticos: el rango lineal, el límite de cuantificación, la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad, la exactitud, la selectividad y la estabilidad a largo plazo de los biosensores desarrollados.

Para realizar la determinación de los parámetros analíticos de los biosensores de glucosa Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano, se realizan determinaciones sobre muestra real en lugar de utilizar patrones. Por este motivo, en primer lugar, es necesario determinar el contenido de glucosa de una muestra comercial (una bebida refrescante), aplicando distintos métodos de análisis:

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La determinación por HPLC se llevó a cabo con un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series acoplado a un detector de índice de refracción (Agilent G1362A). El detector se mantiene a una temperatura de 35 °C. Para realizar la separación de los componentes presentes en la muestra, se utilizó una columna Kromasil® 100 NH₂ de 250 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno, cuyo relleno presenta un tamaño de partícula de 5 µm. La temperatura de la columna se mantiene a 30 °C para todas las determinaciones. Como eluyente se utilizó una disolución al 75% (v/v) de acetonitrilo en agua MilliQ, que se introduce en el sistema cromatográfico en una sola bomba a un flujo constante de 1 mL·min⁻¹. Se preparan patrones de 5000 mg/L, 2500 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L y 250 mg/L en glucosa. Se inyectan 5 µL de cada patrón y se obtienen los cromatogramas correspondientes. En estas condiciones de medida, el tiempo de retención de la glucosa es de 6 min. Se integran los picos obtenidos con cada patrón para obtener el área correspondiente. A continuación, se obtiene una recta de clibrado representando el área de pico obtenida con los distintos patrones frente a la concentración de glucosa correspondiente. La cuantificación de la glucosa presente en la muestra se

realiza por interpolación directa en la recta de calibrado. La muestra seleccionada, una bebida refrescante comercial, se diluye 1:10 en agua MilliQ y se filtra utilizando filtros de nilón de 0,45 μm . El volumen de inyección de muestra es de 5 μL . Se observa que el tiempo de retención de la glucosa en la muestra es de 6 min, igual que en los patrones. Se integra el pico correspondiente a dicho tiempo de retención para obtener el área. Finalmente, se interpola el valor del área obtenido en la recta de calibrado para conocer la concentración de glucosa presente en la muestra. La determinación por HPLC se lleva a cabo por duplicado.

- Valoración amperométrica/enzimática [307,308]. En este método analítico, la GOx cataliza la oxidación de la glucosa por acción del oxígeno disuelto en el medio, liberando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Reacción 3.2). A continuación, el peróxido de hidrógeno reacciona con aniones yoduro para generar yodo, en presencia de molibdeno que actúa como catalizador de la reacción (Reacción 3.3).



La formación del yodo se sigue amperométricamente utilizando un electrodo de dos puntas de platino y aplicando una diferencia de potencial de 100 mV. Se mantiene el sistema en agitación constante a 500 rpm. Bajo estas condiciones, la pendiente de la curva intensidad respecto tiempo es proporcional a la concentración de glucosa presente en el medio. A continuación, se construye una recta de calibrado representando las pendientes de las curvas intensidad vs tiempo frente a la concentración de glucosa de una serie de patrones. El contenido en glucosa de la muestra se determina por interpolación directa en la recta de calibrado.

Para llevar a cabo la determinación de glucosa por el método amperométrico/enzimático, se introducen en una celda electroquímica 25 mL de PBS en presencia de molibdato amónico [82 g KH_2PO_4 , 42 g K_2HPO_4 y 13 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en un litro de agua], 100 μL de disolución de GOx (15,5 mg/2 mL PBS) y 1 mL de disolución de yoduro potásico (83 g/L). En este momento se inicia la amperometría y transcurridos 60 s, se realiza una adición de 20 μL de patrón o de muestra que contienen glucosa. La presencia de glucosa provoca un aumento lineal en la intensidad registrada, como consecuencia de la formación de yodo. En la Figura 3.50, se muestran las curvas intensidad/tiempo obtenidas para los 4 patrones de glucosa utilizados para la construcción de la recta de calibrado.

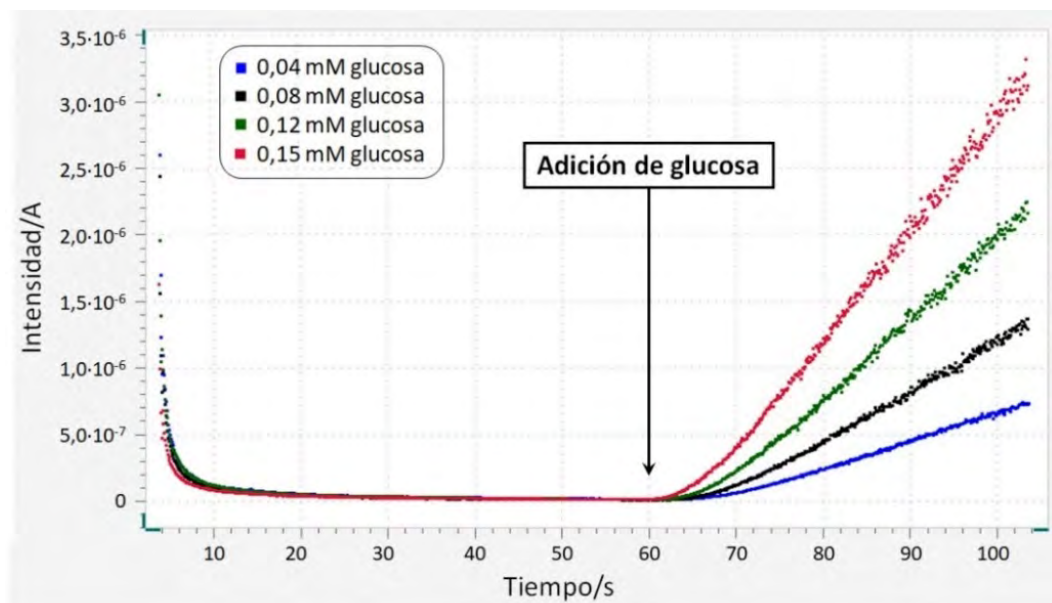


Figura 3.50. Curvas intensidad vs tiempo de la valoración enzimática/iodométrica realizada sobre 4 patrones de glucosa: 0,04 mM (azul), 0,08 mM (negro), 0,12 mM (verde) y 0,15 mM (rojo).

Como puede verse en la Figura 3.50, la adición de glucosa se realiza después de 60 s y se observa un aumento en la intensidad registrada 10 s más tarde. Por tanto, a partir de los 70 s se distingue la formación del I_2 . A partir de las pendientes de los registros intensidad/tiempo comprendidos entre los 70 s y los 100 s, se construye la recta de calibrado $[y(A \cdot s^{-1}) = 3 \cdot 10^{-7}x(mM) + 4 \cdot 10^{-9}]$ que presenta un coeficiente de correlación igual a 0,9936. Se llevan a cabo 5 replicados de la determinación.

- Biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano. Se cuantifica la glucosa presente en la muestra aplicando el método de las adiciones estándar. Se registra en continuo la intensidad a lo largo del tiempo al aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) sobre 100 mL PBS a pH 7. A continuación, se adiciona un volumen adecuado de muestra y seguidamente se realizan dos adiciones de concentración conocida de glucosa que generan un incremento de 0,25 mM en cubeta. Finalmente, se representa la intensidad frente a la concentración de glucosa adicionada en cubeta y se determina la concentración de la muestra por extrapolación en la recta. Se llevan a cabo 5 replicados de la determinación

En la Tabla 3.23, se muestran los resultados obtenidos con cada uno de los métodos aplicados.

Tabla 3.23. Determinación de glucosa en una bebida refrescante aplicando diferentes métodos de análisis.

Método de análisis	[Glucosa] muestra/M	[Glucosa] _{promedio} muestra/M	s/M	CV %
HPLC	0,142	0,141	$1,23 \cdot 10^{-3}$	0,9
	0,140			
Amperométrico/enzimático	0,156	0,152	$3,15 \cdot 10^{-3}$	2,1
	0,153			
	0,154			
	0,149			
	0,148			
Biosensor	0,153	0,151	$2,02 \cdot 10^{-3}$	1,3
	0,151			
	0,148			
	0,151			
	0,149			

Como puede verse en la Tabla 3.23, el resultado obtenido con el biosensor concuerda con los resultados obtenidos por HPLC y con el método amperométrico/enzimático. Para conocer si los valores son iguales, se realiza un análisis de varianza de un factor (ANOVA 1-F) tomando todos los valores individuales obtenidos con los tres métodos de análisis utilizados y aplicando un nivel de confianza del 95%. La prueba realizada muestra un valor de significación mayor a 0,05 ($p\text{-value} = 0,10$), por tanto, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos. Por otro lado, la desviación entre el valor obtenido al aplicar un método bioanalítico y el valor obtenido con un método de referencia debe ser menor al 15% [309]. La desviación entre los valores obtenidos con el biosensor y los métodos de referencia (HPLC y método amperométrico/enzimático) es inferior al 15% en ambos casos. La concentración de glucosa determinada con el biosensor (0,151 M) presenta una desviación del 6,4% respecto al valor obtenido con el método cromatográfico (0,141 M). Mientras que, la desviación entre el método amperométrico/enzimático y el biosensor es del 1,6%. Por tanto, se puede afirmar que existe concordancia entre las determinaciones realizadas usando el biosensor y los resultados obtenidos por HPLC y con el método amperométrico/enzimático. Así pues, se decide continuar con el desarrollo del método de análisis para la determinación de glucosa en muestras alimentarias mediante el uso del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.

Determinación del rango lineal y del límite de cuantificación

El siguiente paso en el procedimiento de desarrollo del método de análisis es la determinación del rango lineal en el que es aplicable el método de análisis. Para ello, se estudia la respuesta amperométrica del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano frente a la adición de 0,3 mM de glucosa de forma consecutiva a lo largo del tiempo sobre 100 mL de PBS 0,1 M (pH 7,0), aplicando un potencial constante de -0,4 V vs referencia y manteniendo la agitación constante a 2000 rpm. En la Figura 3.51, se muestra la curva intensidad/tiempo obtenida al realizar la cronoamperometría.

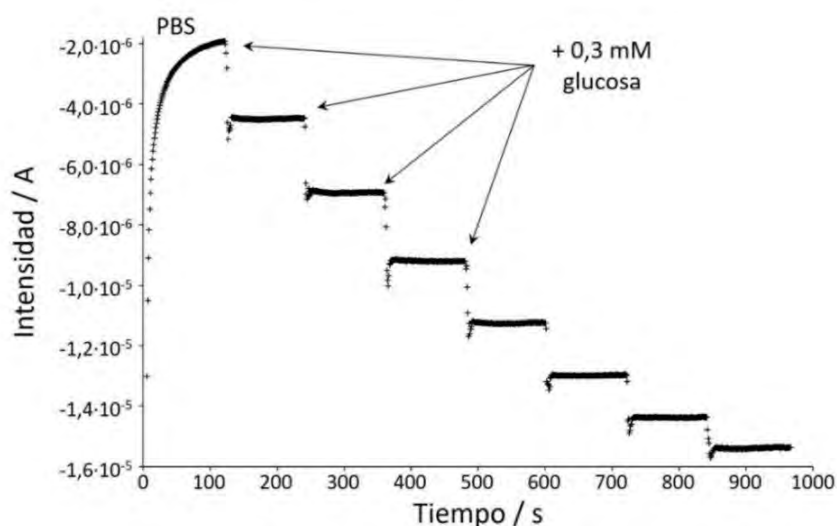


Figura 3.51. Curva intensidad/tiempo obtenida con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano al aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl sobre 100 mL de PBS y realizando adiciones de 0,3 mM de glucosa cada 2 min.

Como puede verse en la Figura 3.51, el biosensor construido responde ante la presencia de glucosa en el medio, tras cada adición de glucosa (0,3 mM) se registra un salto de intensidad de aproximadamente 2 μ A (unos 8 μ A/mM). Con la finalidad de conocer el rango lineal de trabajo, se construye una recta de calibrado representando la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa. La intensidad corregida (I_C) se calcula como la intensidad medida (I_M) tras cada adición de glucosa menos la intensidad del blanco (I_B) correspondiente al PBS: $I_C = I_M - I_B$. En la Figura 3.52, se muestra la recta de calibrado obtenida con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.

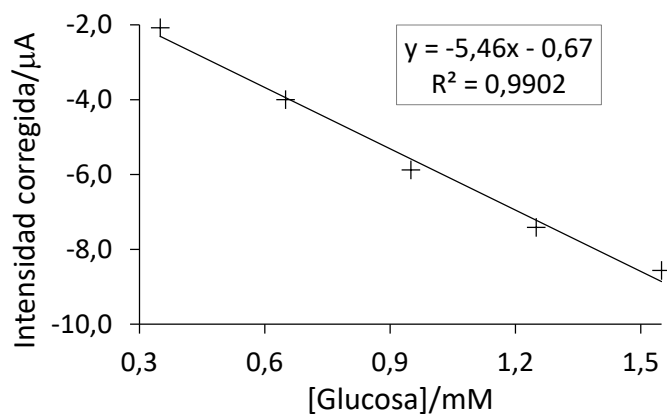


Figura 3.52. Recta de calibrado obtenida al representar la concentración de glucosa frente a la intensidad registrada con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.

La recta de calibrado obtenida presenta una pendiente igual a 5,46 μ A·mM⁻¹ y una ordenada en el origen de 0,67 μ A. Además, muestra una correlación lineal entre la concentración de glucosa y la intensidad corregida en un rango de concentraciones comprendido entre 0,3 mM y 1,5 mM de glucosa, con un coeficiente de correlación de 0,9902. Al aumentar la concentración de glucosa presente en el sistema de medida por encima de 1,5 mM, la señal registrada con el biosensor se satura y se pierde la linealidad del método.

Por otro lado, también se calcula en límite de cuantificación (LC) como la concentración de analito que puede ser detectada a 10 veces la señal del ruido. El LC es igual a 0,30 mM de glucosa y coincide con el valor del patrón más diluido.

Evaluación de la Precisión: Repetibilidad, Precisión Intermedia y Reproducibilidad

Uno de los parámetros analíticos más importantes en el desarrollo de nuevos métodos analíticos es la precisión, ya que indica la capacidad del método de ofrecer los mismos resultados al realizar diferentes medidas. Existen diferentes grados de precisión, en función de la cantidad de parámetros que se modifiquen entre las diferentes medidas realizadas: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (ver capítulo 1.3.). Para evaluar la precisión del método, es necesario realizar varias determinaciones de una misma muestra. En este caso, se utiliza el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano para determinar el contenido de glucosa de la bebida refrescante previamente analizada por HPLC. Estas determinaciones se llevan a cabo mediante el método de las adiciones estándar, como se ha explicado anteriormente en este mismo capítulo.

Con la finalidad de conocer la repetibilidad del método, se realizan 5 determinaciones de la concentración de glucosa presente en la muestra seleccionada utilizando el mismo biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano. Estas medidas se llevaron a cabo durante el mismo día y sobre alícuotas diferentes de la misma muestra. En la Tabla 3.24, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.24. Estudio de la repetibilidad del método de cuantificación de glucosa mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano. Medidas realizadas durante el mismo día.

Replicado	[Glucosa] /M	[Glucosa] promedio / M	s / M	CV / %
1	0,154	0,154	1,19·10 ⁻³	0,8
2	0,154			
3	0,155			
4	0,154			
5	0,152			

Como puede verse en la Tabla 3.24, la concentración de glucosa promedio determinada con el biosensor es igual a 0,154 M, presentando una desviación estándar de 1,19·10⁻³ M y un coeficiente de variación de 0,8%. Teniendo en cuenta que el coeficiente de variación obtenido es inferior al máximo de referencia (1,9%) sugerido por la *Association of Analytical Communities* (AOAC) [202], se puede afirmar que el método de análisis aplicado es repetible.

Una vez determinada la repetibilidad, se evalúa la precisión intermedia. Para ello, se utiliza el mismo biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano para determinar la concentración de glucosa presente en la muestra seleccionada en cinco días diferentes. Cada día se toma una muestra nueva, del mismo lote, de la bebida sometida a estudio. En la Tabla 3.25, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.25. Estudio de la precisión intermedia del método de cuantificación de glucosa mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano. Medidas realizadas en 5 días diferentes, sobre 5 muestras del mismo lote de la bebida de refrescante.

Muestra	[Glucosa] / M	[Glucosa] promedio / M	s / M	RSD / %
1	0,153	0,150	$3,75 \cdot 10^{-2}$	2,5
2	0,152			
3	0,145			
4	0,153			
5	0,148			

Como puede verse en la Tabla 3.25, se determina que la concentración de glucosa promedio de la muestra es igual a 0,150 M y los datos presentan un coeficiente de variación del 2,5%. Según la AOAC, un método analítico que presenta una buena precisión intermedia ofrece debe ofrecer un coeficiente de variación inferior al 4% [310]. Por tanto, en este caso se puede afirmar que se cumplen los estándares de calidad y que el método de análisis propuesto ofrece suficiente precisión intermedia.

Por último, para poder afirmar que el método de análisis propuesto es un método preciso, es necesario evaluar la reproducibilidad de las medidas realizadas. La reproducibilidad es la capacidad del método analítico de ofrecer los mismos resultados al aplicar circunstancias diferentes durante el proceso de medida. En este caso específico, para evaluar la reproducibilidad del método, se tiene también en cuenta el proceso de construcción del biosensor. La construcción del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano incluye un elevado número de etapas que pueden afectar a la respuesta final del biosensor. Por ejemplo, en la etapa del pulido inicial del electrodo que titanio se pueden generar más o menos planos, que se traducirá en la generación de un sensor con más o menos área específica (variación en la sensibilidad). Otro ejemplo, durante la inmovilización de las moléculas de enzima no es posible controlar la conformación espacial que estas adoptarán, si estas adoptan mayoritariamente una configuración biológicamente activa la respuesta del biosensor será más sensible que si adoptan una configuración no activa. Por este motivo, es importante poder garantizar que el proceso de fabricación del biosensor no afectará a la determinación final de glucosa en muestra.

Con la finalidad de evaluar la reproducibilidad del método, se construyen cinco biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano; para cada biosensor se aplica un proceso de anodizado que permite obtener cinco interfases electroquímicas nuevas, además, las disoluciones de glucosa oxidasa y de Quitosano se preparan al momento para cada biosensor. Por tanto, todos los factores que pueden afectar al proceso de construcción del biosensor se tienen en cuenta. Cabe mencionar que, cada biosensor individual se utiliza para cuantificar la glucosa presente en una lata diferente (del mismo lote) de la bebida refrescante seleccionada para realizar la comprobación del método de análisis. Además, las determinaciones se llevan a cabo en cinco días diferentes. En la Tabla 3.26, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.26. Evaluación de la reproducibilidad del método de cuantificación de glucosa mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitano. Medidas realizadas utilizando 5 biosensores diferentes, en 5 días diferentes, sobre 5 muestras del mismo lote de la bebida de refrescante seleccionada para realizar la comprobación del método de análisis.

Biosensor	[Glucosa] / M	[Glucosa] promedio / M	s / M	CV / %
1	0,137	0,145	$4,82 \cdot 10^{-3}$	3,3
2	0,146			
3	0,148			
4	0,145			
5	0,149			

Como se muestra en la Tabla 3.26, al utilizar biosensores diferentes para realizar el análisis se obtiene una concentración promedio de glucosa igual a 0,145 M con una desviación estándar de $4,82 \cdot 10^{-3}$ M y un coeficiente de variación del 3,3%. Del mismo modo que sucede con la precisión intermedia y siguiendo los estándares de calidad establecidos por la AOAC, se considera que un método es reproducible cuando el coeficiente de variación que ofrecen las medidas es inferior al 4% [310]. Por tanto, es posible afirmar que el método de análisis sometido a estudio es reproducible.

Evaluación de la Exactitud

La exactitud es la capacidad del método analítico de ofrecer valores cercanos a un valor de referencia dado. La evaluación de la exactitud de un método analítico se puede calcular como el porcentaje de recuperación al realizar la determinación analítica sobre una muestra a la que se ha adicionado una cantidad conocida de analito. Esta determinación de muestra adicionada debe realizarse al menos nueve veces, a tres niveles diferentes de concentración [311]. La exactitud del método de análisis propuesto utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitano, se ha evaluado adicionando el 80%, el 100% y el 120% de la concentración diana sobre un blanco. El blanco ideal sería una disolución que contenga todos los componentes presentes en la muestra excepto el analito de interés. Por ello, se ha seleccionado como blanco una muestra de la bebida refrescante sin azúcares de la misma marca comercial que la muestra seleccionada para realizar la comprobación del método analítico. De cada una de las muestras preparadas se realiza la cuantificación de glucosa por triplicado. En la Tabla 3.27, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.27. Evaluación de la recuperación de la concentración de glucosa en una muestra preparada.

Nivel	[Glucosa] nominal/M	[Glucosa] determinada/M	[Glucosa] promedio \pm s /M	Recuperación / %
80%	0,120	0,120	0,122 \pm 0,002	102
		0,123		
		0,123		
100%	0,150	0,156	0,154 \pm 0,002	103
		0,154		
		0,152		
120%	0,180	0,187	0,187 \pm 0,003	104
		0,185		
		0,190		

Como se muestra en la Tabla 3.27, los resultados obtenidos al realizar la determinación de glucosa sobre las muestras preparadas son cercanos a los valores nominales. Se obtienen recuperaciones comprendidas entre el 95% y el 105%, que son los estándares establecidos por la AOAC [312]. Por tanto, se puede afirmar que el método de análisis es un método exacto.

Además de estos resultados positivos obtenidos, se decide realizar una determinación adicional para garantizar la exactitud del método de análisis. Para ello, se realizan dos adiciones de glucosa de concentración conocida sobre la muestra para alcanzar niveles del 120% y el 140% de concentración de glucosa. A continuación, se cuantifica la glucosa y se calcula la recuperación (ver Tabla 3.28).

Tabla 3.28. Evaluación de la recuperación de la concentración de glucosa en una muestra adicionada.

Nivel	[Glucosa] adicionada/M	[Glucosa] nominal/M	[Glucosa] determinada/M	[Glucosa] promedio \pm s /M	Recuperación / %
120%	0,03	0,186	0,190	0,191 \pm 0,003	103
			0,194		
			0,190		
140%	0,06	0,216	0,229	0,227 \pm 0,002	105
			0,225		
			0,228		

Los resultados que se muestran en la Tabla 3.28, muestran que los valores de recuperación obtenidos al analizar las muestras adicionadas están comprendidos entre el 95% y el 105% [312], como en el caso anterior. Por tanto, la recuperación obtenida cumple con los estándares de calidad establecidos por la AOAC y se confirma que el método de análisis utilizado para la determinación de glucosa ofrece resultados exactos.

Evaluación de la Selectividad

La selectividad de un método analítico es la capacidad de discriminar entre el analito de interés y el resto de los compuestos presentes en la muestra. Con la finalidad de evaluar la selectividad del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano, se ha estudiado la influencia de diferentes sustancias interferentes en la determinación de glucosa. Las muestras alimentarias, especialmente los zumos de frutas y las bebidas refrescantes, contienen diferentes especies electroquímicamente activas que pueden influir en la cuantificación de glucosa. Algunas de las especies interferentes más comunes son el ácido ascórbico, el ácido cítrico y otros azúcares como la fructosa [43,313]. En la evaluación de la selectividad del método de análisis, se ha estudiado la influencia de estas tres especies interferentes sobre la respuesta del biosensor. Para ello, se ha registrado la intensidad a lo largo del tiempo al realizar incrementos consecutivos de 0,25 mM de glucosa y 0,25 mM de fructosa, 0,25 mM de ácido cítrico y 0,025 mM de ácido ascórbico sobre 100 mL de PBS, al aplicar una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) (ver Figura 3.53). La relación entre las concentraciones de glucosa y de cada uno de los interferentes se ha escogido en función de la posible concentración presente en la muestra para cada especie y teniendo en cuenta el factor de dilución correspondiente.

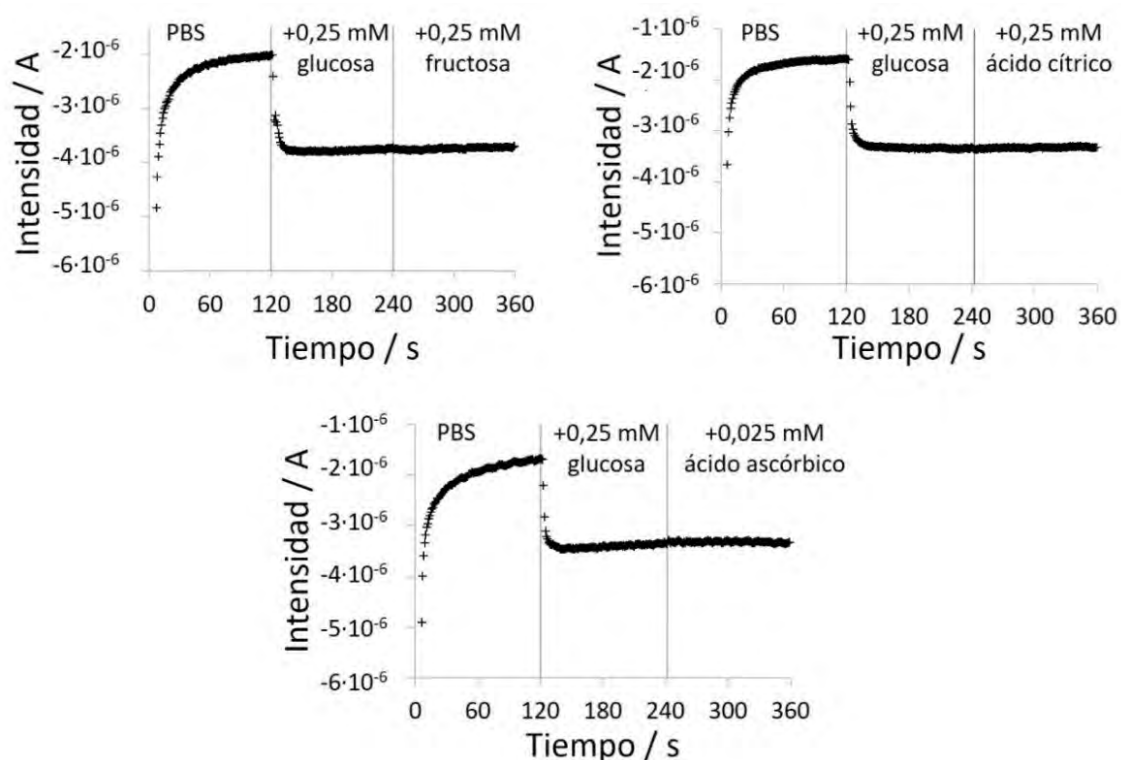


Figura 3.53. Respuesta amperométrica del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano frente a la adición de 0,25 mM de glucosa y (A) 0,25 mM de fructosa, (B) 0,25 mM de ácido cítrico y (C) 0,025 mM de ácido ascórbico respectivamente, sobre 100 mL de PBS 0,1 M a pH 7,0 aplicando una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl.

Como se observa en la Figura 3.53, tras realizar la primera adición de 0,25 mM de glucosa en la celda electroquímica el biosensor registra un incremento en la señal medida de aproximadamente 1,6 μ A. Sin embargo, tras realizar las adiciones de cada una de las especies interferentes (fructosa, ácido cítrico y ácido ascórbico) la señal registrada con el biosensor permanece prácticamente constante. Por tanto, las interferencias estudiadas no generan una señal significativa en las condiciones de trabajo aplicadas.

Normalmente, los biosensores convencionales de glucosa trabajan a potenciales anódicos que permiten seguir la oxidación del H₂O₂ generado en la reacción enzimática a oxígeno. De modo que la corriente anódica generada es proporcional a la concentración de glucosa. Bajo estas condiciones de trabajo, las especies reductoras presentes en la muestra, como el ácido ascórbico, se pueden oxidar sobre el electrodo de trabajo provocando un incremento en la señal medida que se traduce en una cuantificación por exceso del analito de interés. Por este motivo, en muchas ocasiones se utilizan barreras físicas selectivas para bloquear el paso de estas especies hasta la superficie del electrodo de trabajo, el Nafion es una de las más utilizadas a este efecto [314]. Sin embargo, el uso de esta clase de redes poliméricas no biocompatibles puede provocar una disminución de la sensibilidad del biosensor o acortar el tiempo de vida útil del mismo, ya que las moléculas de enzima inmovilizadas tienden a desnaturizarse rápidamente [211]. Es relevante destacar que las condiciones de trabajo aplicadas al utilizar el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano permiten vencer los inconvenientes de los biosensores convencionales de glucosa. En el diseño del método analítico sometido a análisis, el principio de funcionamiento del biosensor se basa en seguir la reducción del H₂O₂ a H₂O aplicando un potencial catódico. Bajo estas condiciones de trabajo, el efecto sobre la señal medida de las especies reductoras presentes en la muestra es insignificante, como se ha demostrado anteriormente (ver Figura 3.53). Además, cabe mencionar que el uso de Quitosano en la estructura del biosensor aporta una ventaja extra; maximiza la sensibilidad del biosensor. Y es que el Quitosano, además de actuar como barrera física bloqueando el paso de macromoléculas, ayuda a conservar la estructura activa de las moléculas de enzima, debido a la elevada biocompatibilidad y a la elevada afinidad por las proteínas que presenta [315].

Evaluación de la estabilidad a largo plazo

Otro de los factores importantes a tener en cuenta a en el desarrollo de un biosensor es el tiempo de vida útil del dispositivo de medida. Existen dos grandes complicaciones que afectan al tiempo de vida útil de los biosensores enzimáticos: la pérdida de las moléculas de enzima y la desnaturización de los enzimas inmovilizados [316]. Estos dos factores influyen sobre la sensibilidad del biosensor, que disminuye a lo largo del tiempo. Por tanto, para conocer la estabilidad a largo plazo del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano desarrollado en Esta tesis, se ha seguido la evolución de su sensibilidad durante un periodo de tiempo de 30 días. En la Tabla 3.29, se muestra la evolución de los valores obtenidos.

Tabla 3.29. Estudio de la variabilidad amperométrica que ofrece el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano a largo plazo.

Tiempo/días	Sensibilidad/ $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	R ²	% Disminución de señal
1	5,46	0,9902	-
10	5,28	0,9902	3
20	4,69	0,9904	14
30	4,56	0,9903	15

Como se muestra en la Tabla 3.29, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano retiene el 85% de su sensibilidad inicial transcurridos 30 días de su construcción. Este hecho se puede atribuir a la

excelente capacidad de retención y a la elevada biocompatibilidad que ofrece la matriz de inmovilización. El Quitosano forma un gel permeable al agua con una alta resistencia mecánica que, en combinación con una gran afinidad que siente por las proteínas, favorece la protección de las moléculas de la enzima [315]. Además, la estabilidad a largo plazo del biosensor construido es similar a la de otros biosensores de glucosa descritos en bibliografía que también utilizan Quitosano como matriz de inmovilización; después de un mes es habitual que el biosensor conserve entre el 80% y el 90% de su señal inicial [294,317,318].

Discusión de los resultados obtenidos

La *Association of Analytical Communities* (AOAC), define los requisitos mínimos que debe cumplir un procedimiento analítico para el control de calidad de productos alimentarios. Los criterios establecidos por esta organización son muy exigentes, ya que en última instancia garantizan que los productos alimentarios no suponen ningún riesgo para la salud humana. En este contexto, se suelen utilizar técnicas de análisis clásicas, como la cromatografía o la espectrofotometría, para evaluar y garantizar los estándares de calidad de los productos alimentarios. Sin embargo, estos métodos habitualmente son costosos y requieren de mucho tiempo y recursos. Por este motivo, se plantea el uso del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano como una alternativa a estas determinaciones clásicas. Para ello, ha sido necesario realizar un proceso de comprobación que demuestra que los parámetros analíticos analizados cumplen con los estándares de calidad propuestos por la AOAC.

Mediante la comprobación de los parámetros analíticos del método propuesto, se ha observado que el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano presenta un rango lineal de trabajo comprendido entre 0,3 mM y 1,5 mM de glucosa. El método aplicado presenta un límite de cuantificación bajo (0,30 mM) y una alta sensibilidad (5,46 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). La concentración de glucosa medida en la muestra utilizada para realizar la comprobación presenta valores bajos de desviación respecto a otras técnicas de referencia: del 6,4% respecto a HPLC y del 1,6% respecto al método amperométrico/enzimático. También se ha demostrado que el método analítico aplicado es preciso: las medidas realizadas con el biosensor presentan una elevada repetibilidad (CV 0,8%), una elevada precisión intermedia (CV 2,5%) y una elevada reproducibilidad (CV 3,3%). Además, el biosensor ofrece medidas exactas (los valores de recuperación están comprendidos entre el 95% y el 105%), en un tiempo de análisis relativamente corto (menos de 10 min). Por otro lado, se ha evaluado la influencia de las principales interferencias en la determinación de glucosa y se ha comprobado que estas no influyen significativamente. Finalmente, se ha estudiado la estabilidad a largo plazo del biosensor y se ha observado que después de 30 días éste conserva un 85% de su respuesta inicial.

Por tanto, los biosensores de glucosa Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano desarrollados en el presente trabajo se pueden considerar una alternativa sensible, fiable y rápida de las técnicas clásicas para la determinación de glucosa en muestras del sector alimentario.

3.3.2. Proceso de análisis utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano

Para poder afirmar que los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano pueden utilizarse para determinar glucosa en muestras reales de forma sensible, precisa y exacta, es necesario realizar un proceso de comprobación de una serie de parámetros analíticos. En este caso, se han analizado la sensibilidad, el rango lineal, el límite de cuantificación, la repetibilidad y la reproducibilidad, la exactitud y la estabilidad a largo plazo.

Exactitud

Existen distintas formas de determinar este parámetro, en este caso, se decidió determinar la exactitud comparando los valores de concentración de glucosa obtenidos al analizar una bebida refrescante comercial mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano y mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (ver apartado 3.3.1.). Los valores obtenidos por HPLC se tomaron como valores de referencia.

Por otro lado, se cuantifica la muestra utilizando un biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. En este caso, la determinación se realiza aplicando el método de las adiciones estándar; se registra en continuo la intensidad a lo largo del tiempo al aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl sobre 100 mL PBS a pH 7, entonces se adiciona un volumen adecuado de muestra y a continuación se realizan dos adiciones de concentración conocida (0,25 mM) de glucosa. A continuación, se representa la intensidad frente a la concentración de glucosa adicionada en cubeta y se determina la concentración de la muestra por extrapolación en la recta. Se llevan a cabo 3 replicados de la determinación. En la Tabla 3.30, se muestran los resultados obtenidos con cada uno de los métodos aplicados.

Tabla 3.30. Determinación de glucosa en una bebida refrescante aplicando diferentes métodos de análisis.

Método de análisis	[Glucosa] _{determinada muestra/M}	[Glucosa] _{promedio muestra ± s/M}	CV %	Desviación %
HPLC	0,250	0,251 ± 0,001	0,3	3,8
	0,252			
Biosensor	0,258	0,261 ± 0,005	1,8	
	0,257			
	0,266			

Como se muestra en la Tabla 3.30, la desviación entre los valores obtenidos mediante el biosensor y mediante HPLC es del 3,8%. Este valor, es inferior al 15% de desviación establecido para la validación de métodos analíticos basados en procesos biológicos [309]. Por tanto, se puede afirmar que existe concordancia entre las determinaciones realizadas usando el biosensor y los resultados obtenidos por HPLC. Es decir, los resultados obtenidos indican que el método de análisis basado en el uso de biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano para la determinación de glucosa es un método que presenta suficiente exactitud.

Determinación del rango lineal y el límite de cuantificación

En primer lugar, se determina el rango lineal en el que es aplicable el método de análisis basado en el uso del biosensor amperométrico Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. Para ello, se estudia la respuesta amperométrica del biosensor frente a la adición de 0,25 mM de glucosa de forma consecutiva sobre 100 mL de PBS 0,1 M a pH 7,0 y aplicando una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M). En la Figura 3.54, se muestra la curva intensidad/tiempo obtenida al realizar la cronoamperometría.

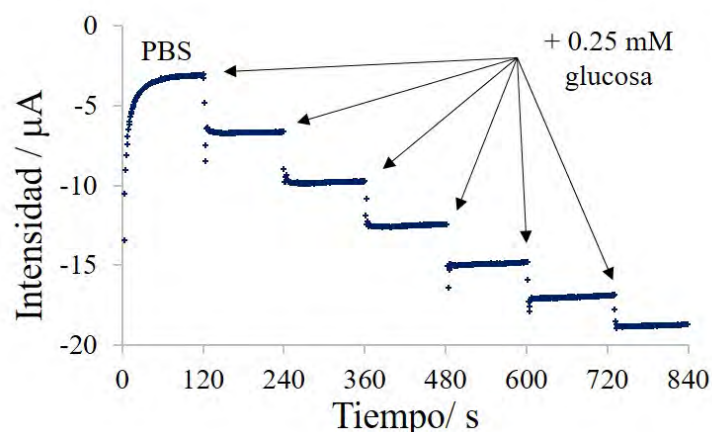


Figura 3.54. Curva intensidad/tiempo obtenida con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano al aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl sobre 100 mL de PBS y realizando adiciones de 0,25 mM de glucosa cada 2 min.

Como puede verse en la Figura 3.54, tras cada adición de 0,25 mM de glucosa el biosensor registra un salto de intensidad de aproximadamente 3 μA (unos 12 μA/mM). A partir de la curva intensidad tiempo registrada, se construye una recta de calibrado representando la intensidad corregida frente a la concentración de glucosa. De este modo, se obtiene una recta de calibrado con una pendiente igual a 8,63 μA·mM⁻¹ y una ordenada en el origen de 0,95 μA. Además, muestra una correlación lineal entre la concentración de glucosa y la intensidad corregida en un rango de concentraciones comprendido entre 0,25 mM y 1,49 mM de glucosa, con un coeficiente de correlación de 0,9972 (ver Figura 3.55). Al aumentar la concentración de glucosa en cubeta por encima de 1,49 mM, la respuesta del biosensor se satura y se pierde la linealidad del método.

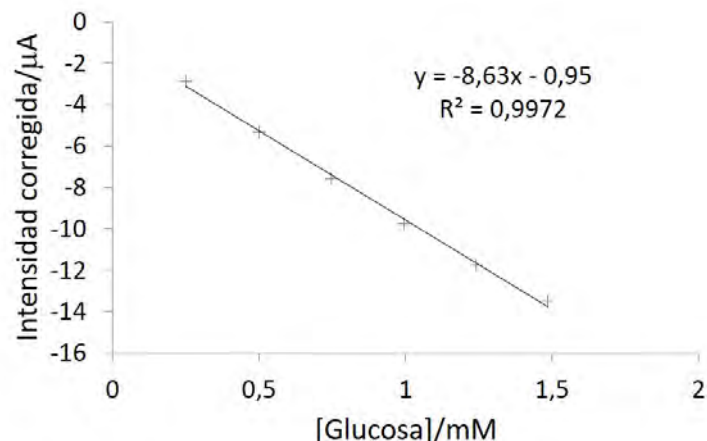


Figura 3.55. Recta de calibrado obtenida con un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.

Además, se calcula en límite de cuantificación (LC) como la concentración de analito que puede ser detectada a 10 veces la señal del ruido. El LC es igual a 0,20 mM de glucosa, un valor menor al límite de cuantificación obtenido con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano (0,30 mM). Estos resultados indican que el biosensor con configuración covalente Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano permite determinar concentraciones glucosa inferiores a las que se pueden determinar utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.

Evaluación de la Precisión: Repetibilidad y Reproducibilidad

La precisión indica la capacidad del método analítico de ofrecer los mismos resultados al realizar diferentes medidas. Para evaluar la precisión del método, se utiliza el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano para determinar el contenido de glucosa en una bebida refrescante previamente analizada por HPLC. Estas determinaciones se llevan a cabo mediante el método de las adiciones estándar, como se ha explicado anteriormente en este mismo capítulo.

Con la finalidad de conocer la repetibilidad del método, se realizan 3 determinaciones de la concentración de glucosa presente en la muestra seleccionada utilizando el mismo biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. Estas medidas se llevaron a cabo durante el mismo día y sobre alícuotas diferentes de la misma muestra (ver Tabla 3.31).

Tabla 3.31. Estudio de la repetibilidad del método de cuantificación de glucosa mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. Medidas realizadas durante el mismo día.

Replicado	[Glucosa] / M	[Glucosa] promedio / M	s / M	CV / %
1	0,258	0,261	4,84·10 ⁻³	1,8
2	0,257			
3	0,266			

Como se muestra en la Tabla 3.31, la concentración de glucosa promedio determinada al utilizar el biosensor con configuración covalente es igual a 0,261 M con una desviación estándar de $4,84 \cdot 10^{-3}$ M y un coeficiente de variación del 1,8%. Teniendo en cuenta que el coeficiente de variación obtenido es inferior al máximo de referencia (1,9%) sugerido por la *Association of Analytical Communities* (AOAC) [202], se puede afirmar que el método de análisis aplicado es repetible.

A continuación, se evaluó la reproducibilidad de las medidas realizadas. En este caso específico, para evaluar la reproducibilidad del método, se tiene también en cuenta el proceso de construcción del biosensor, ya que éste incluye un elevado número de etapas que pueden afectar a la respuesta final del mismo. Por ejemplo, el proceso de modificación de superficie con técnicas de plasma; la activación con plasma de argón del lecho HEMA-co-EGDA para el sembrado de PFM puede generar un número distinto de puntos activos cada vez que se lleve a cabo el proceso. Por tanto, esta etapa influye en la cantidad de moléculas de enzima que se inmovilizarán y consecuentemente, en la sensibilidad del biosensor. Por este motivo, es importante poder garantizar que el proceso de fabricación del biosensor no afectará a la determinación final de glucosa en muestra.

Con la finalidad de evaluar la reproducibilidad del método, se construyen dos biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano; para cada biosensor se aplica un proceso de anodizado que permite obtener dos interfases electroquímicas nuevas. Además, los procesos de modificación de superficie se llevan a cabo de forma independiente, para comprobar la influencia de esta etapa en el proceso de medida. Cabe mencionar que las disoluciones de glucosa oxidasa y de quitosano se preparan al momento para cada biosensor. Por tanto, todos los factores que pueden afectar al proceso de construcción del biosensor se tienen en cuenta. A continuación, estos biosensores se utilizan para determinar por triplicado la concentración de glucosa presente en la bebida refrescante seleccionada para realizar la comprobación del método de análisis. Además, las determinaciones se llevan a cabo en diferentes días. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.32.

Tabla 3.32. Evaluación de la reproducibilidad del método de cuantificación de glucosa mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. Medidas realizadas utilizando 2 biosensores diferentes, en días diferentes, sobre 3 muestras del mismo lote de la bebida de refrescante.

Biosensor	Días	[Glucosa]/M	[Glucosa] promedio/M	s/M	CV/%
1	1	0,258	0,263	$4,73 \cdot 10^{-3}$	1,8
		0,257			
		0,266			
2	1	0,260			
		0,268			
		0,261			
	2	0,270			
		0,260			
		0,267			

Como se muestra en la Tabla 3.32, al utilizar biosensores diferentes para realizar el análisis se obtiene una concentración promedio de glucosa igual a 0,263 M con una desviación estándar

de $4,73 \cdot 10^{-3}$ M y un coeficiente de variación del 1,8%. Siguiendo los estándares de calidad establecidos por la AOAC, se considera que un método es reproducible cuando el coeficiente de variación que ofrecen las medidas es inferior al 4% [310]. Por tanto, es posible afirmar que el método de análisis basado en el uso de biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano es reproducible.

Evaluación de la estabilidad a largo plazo

Se evaluó la evolución de la sensibilidad de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano a lo largo del tiempo. En la Tabla 3.33, se muestran los valores de sensibilidad obtenidos después de distintos días desde su construcción.

Tabla 3.33. Estudio de la variabilidad amperométrica que ofrece el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano a largo plazo.

Tiempo/días	Sensibilidad/ $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	R ²	variación de señal
1	8,63	0,9972	-
10	10,72	0,9909	+ 24%
20	8,42	0,9906	- 2%
30	0,38	0,9918	- 96%

Como se muestra en la Tabla 3.33, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano muestra un incremento de la sensibilidad del 24% después de 10 días de su construcción. Este hecho se asocia a un periodo de adaptación de la GOx inmovilizada. Durante este periodo, las moléculas de enzima se adaptan a su nuevo entorno, adoptando una conformación biológicamente activa. Como la población activa de enzima aumenta, también lo hace la sensibilidad del biosensor. Después, la sensibilidad se mantiene prácticamente constante; después de 20 días el biosensor retiene el 98% de su sensibilidad. Este hecho se puede atribuir a la excelente capacidad de retención del proceso de inmovilización, combinado con la elevada biocompatibilidad que ofrece la matriz protectora de quitosano. Después de este periodo, la sensibilidad del biosensor disminuye gradualmente hasta que, transcurridos 30 días, solamente se retiene el 4% de la sensibilidad inicial. La pérdida de sensibilidad a lo largo del tiempo se puede asociar con la degradación de la película protectora de quitosano. Estos resultados son similares a los obtenidos con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.

Discusión de los resultados obtenidos

Con la finalidad de demostrar que es posible utilizar los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano para cuantificar de forma sensible, precisa y fiable la glucosa presente en muestras del sector alimentario, se han estudiado distintos parámetros analíticos del biosensor. En este proceso de comprobación, se han tomado como estándares de calidad los valores sugeridos por la *Association of Analytical Communities* (AOAC), ya que este organismo define los requisitos mínimos que debe cumplir un procedimiento analítico para el control de calidad de productos alimentarios.

Mediante el proceso de comprobación realizado, se ha observado que el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano presenta un rango lineal de trabajo comprendido entre 0,25 mM y 1,49 mM de glucosa. El método aplicado presenta un límite de cuantificación bajo (0,20 mM) y una alta sensibilidad (8,63 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$). La concentración de glucosa medida en el refresco comercial presenta un 3,8% de desviación respecto al valor de referencia obtenido por HPLC. Teniendo en cuenta que este valor es inferior al estándar de calidad establecido (15 %) [309], es posible afirmar que el método de análisis aplicado es exacto. También se ha demostrado que el método analítico aplicado es preciso: las medidas realizadas con el biosensor presentan una elevada repetibilidad (CV 1,8%) y una elevada reproducibilidad (CV 1,8%). Además, el biosensor ofrece medidas rápidas, en un tiempo de análisis inferior a los 10 min. También se ha evaluado la estabilidad a largo plazo del biosensor desarrollado y se ha observado que después de 20 días éste conserva un 98% de su respuesta inicial.

Por tanto, los biosensores de glucosa Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano desarrollados en la presente tesis se pueden considerar una alternativa sensible, fiable y rápida de las técnicas clásicas para la determinación de glucosa en muestras del sector alimentario.

3.3.2. Proceso de análisis utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano

Con la finalidad de comprobar si los biosensores de glutamato Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano permiten determinar de forma precisa, específica, reproducible y fiable la concentración de glutamato presente en muestras del sector alimentario, es necesario evaluar sus parámetros analíticos. Así pues, siguiendo el mismo procedimiento que con los biosensores de glucosa (ver apartados 3.3.1. y 3.3.2.), se realiza la determinación de la concentración de glutamato en distintas muestras del sector alimentario aplicando distintos métodos: el uso de un biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano y un método cromatográfico de referencia. De este modo, es posible comprobar la aplicabilidad del dispositivo de medida desarrollado en muestras reales.

Para llevar a cabo esta determinación, se seleccionan diferentes muestras del sector alimentario que pertenecen a cuatro matrices diferentes en las que se suele utilizar el L-glutamato monosódico como potenciador del sabor: 3 salsas de tomate, 4 salsas de soja, 4 sopas de sobre y 4 bebidas. Estas muestras se seleccionan debido a la diversidad de posibles interferentes que pueden contener.

La cuantificación utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano, se lleva a cabo mediante el método de las adiciones estándar, por extrapolación en recta de adiciones. Sobre 100 mL de PBS se adiciona un volumen adecuado de muestra y después se realizan dos adiciones de patrón de L-glutamato correspondientes a incrementos de 0,05 mM en cubeta. Del mismo modo que para la construcción de las rectas de calibrado, se aplica una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) manteniendo la agitación constante a 2000 rpm. Las muestras no necesitan más preparativa que una dilución. Para las salsas de soja y para las bebidas se toma un volumen adecuado de muestra directa sin tratar (entre 50 y 1000 µL en función de la muestra) y se adiciona sobre la celda electroquímica. De las salsas de tomate, se toman unos 15 g de muestra y se disuelven en 50 mL de agua. A continuación, se toman 500 µL de la dilución obtenida y se adicionan sobre la celda de medida. Finalmente, las sopas de sobre se preparan siguiendo las instrucciones del fabricante; se disuelve el contenido de un sobre en un volumen adecuado de agua caliente. Una vez disuelto el sólido, se enrasa la disolución hasta 1 L con agua, se toman 1000 µL de la dilución resultante y se adicionan sobre la celda electroquímica. En la Figura 3.55, se muestra a modo de ejemplo una de las curvas intensidad-tiempo registradas con el biosensor para la cuantificación de L-glutamato en una muestra de caldo de sobre.

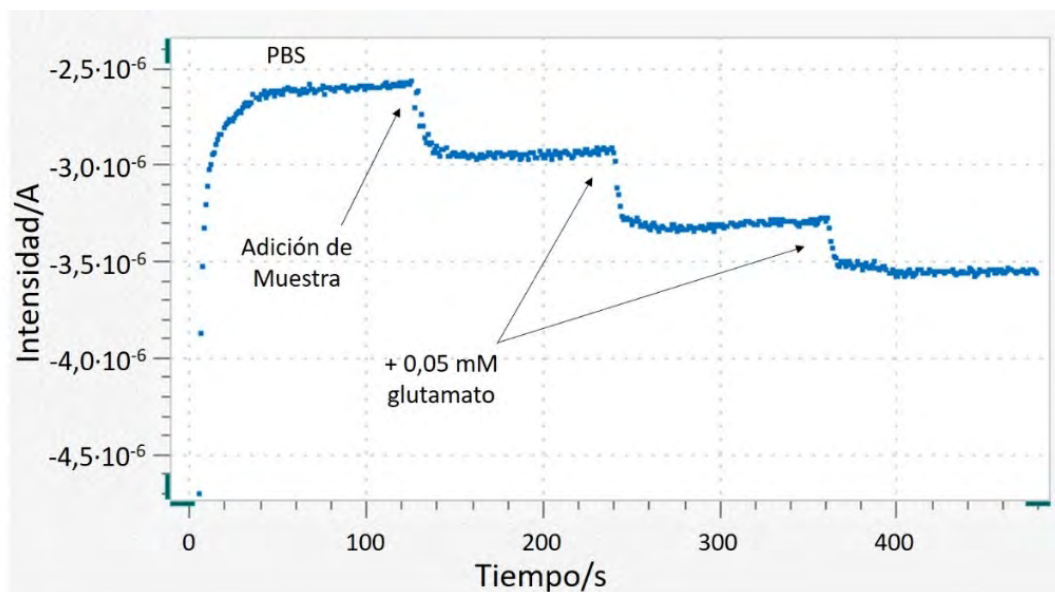


Figura 3.56. Curva intensidad-tiempo obtenida al realizar una adición de 500 μL de una muestra de sopa de sobre y dos adiciones de 0,05 mM de L-glutamato monosódico sobre 100 mL de PBS 0,1 M a pH 7,0 y aplicar -0,4 V vs Ag/AgCl.

Como se muestra en la Figura 3.55, la adición de muestra genera un salto de intensidad de aproximadamente el mismo valor que el salto de intensidad que genera la adición de patrón de 0,05 mM de L-glutamato, que corresponde a unos 0,4 μA (8 $\mu\text{A}/\text{mM}$). Al representar la intensidad corregida frente a la concentración de L-glutamato adicionada en cubeta se obtiene una recta de adiciones. La concentración de L-glutamato en la muestra se determina por extrapolación en dicha recta y teniendo en cuenta las diluciones realizadas sobre la muestra.

Se analiza la determinación de la concentración de glutamato en 15 muestras del sector alimentario, pertenecientes a 4 matrices alimentarias distintas: salsas de tomate, salsas de soja, sopas de sobre y bebidas refrescantes. Cada determinación se realiza por triplicado. Los resultados obtenidos se comparan con los valores obtenidos al aplicar un método cromatográfico de referencia, basado en marcar con un compuesto fluorescente los aminoácidos presentes en la muestra [319,320] (ver Tabla 3.34).

La determinación por HPLC se realiza utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia Waters Alliance 2695, una columna de fase inversa (Nova-Pak C18, 150 x 3,9 mm, 4 μm) y un detector de fluorescencia Waters 2475. Para la derivatización de los aminoácidos presentes en muestras y patrones, se utiliza un kit de derivatización WATERS AccQ-Fluor™. El reactivo derivatizante es 6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidil carbamato y reacciona con aminas primarias y secundarias de forma rápida para generar productos fluorescentes. La cuantificación se realiza mediante la adición de un patrón interno (L-norleucina) en muestras y patrones. Para realizar la determinación, se utiliza una columna de fase inversa Nova-Pak C18 de 150 mm de longitud, 3,9 mm de diámetro interno y 4 μm de tamaño de partícula, que se mantiene a una temperatura constante de 37 $^{\circ}\text{C}$. El volumen de inyección es de 5 μL y el flujo es de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Para la detección de los eluyentes, se utiliza un detector de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 250 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 395 \text{ nm}$). Para eluir los compuestos inyectados en el sistema cromatográfico, se utiliza un gradiente de eluyentes (acetonitrilo, tampón acetato a pH 5,05 y agua MilliQ).

Para realizar la determinación mediante el método cromatográfico es necesario aplicar etapas previas de preparativa de muestra. Para las salsas de soja, se realiza una dilución 1:10 en MilliQ. Las sopas de sobre se preparan siguiendo las instrucciones del fabricante y enrasando a 1 L con MilliQ. De las salsas de tomate, se toman 15 g y se enrasan a 50 mL MilliQ. Finalmente, las bebidas no necesitan dilución. Todas las disoluciones obtenidas en este punto se centrifugan a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se filtra utilizando un filtro de nylon de 0,45 μm de tamaño de poro. De la disolución filtrada, se toman 5 mL y se enrasan hasta 10 mL con HCl 0,1 M. Finalmente, se toman 5 mL de la disolución diluida de muestra y 5 mL de disolución de patrón interno y se enrasan hasta 100 mL con HCl 0,1 M. Cada determinación se realiza por duplicado. Los valores obtenidos se toman como valores de referencia y se comparan con los valores obtenidos al aplicar el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano. En la Tabla 3.34, se muestran los resultados obtenidos al aplicar ambas metodologías de análisis.

Tabla 3.34. Determinación del contenido en L-glutamato en diferentes muestras del sector alimentario utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano y aplicando el método de referencia de HPLC. También se muestra la desviación entre los valores obtenidos por ambos métodos.

Tipo de muestra	Muestra	[Glutamato] _{biosensor} \pm s / g·Kg ⁻¹	[Glutamato] _{HPLC} / g·Kg ⁻¹	Desviación / %
Salsas de tomate	M1 ketchup	3,07 \pm 0,04	2,61 \pm 0,02	42
	M2 tomate frito	3,09 \pm 0,06	2,20 \pm 0,01	40
	M3 tomate frito	4,26 \pm 0,01	2,42 \pm 0,01	76
Salsas de soja	M4 salsa de soja	9,61 \pm 0,08	7,07 \pm 0,01	36
	M5 salsa de soja	16,96 \pm 0,38	12,80 \pm 0,03	33
	M6 salsa de soja	22,15 \pm 0,36	13,49 \pm 0,04	64
	M7 salsa de soja	11,01 \pm 0,35	7,16 \pm 0,01	54
Sopas de sobre	M8 concentrado de caldo	186,23 \pm 4,95	155,87 \pm 0,60	19
	M9 sopa de sobre	3,71 \pm 0,13	1,52 \pm 0,01	145
	M10 sopa de fideos	40,91 \pm 1,80	29,18 \pm 0,20	40
	M11 crema de espárragos	3,92 \pm 0,16	1,82 \pm 0,02	115
Bebidas	M12 bebida en base a té	0,13 \pm 0,01	0,004 \pm 0,0001	3564
	M13 bebida en base a té	0,42 \pm 0,03	0,01 \pm 0,0001	3131
	M14 mosto de uva blanca	1,05 \pm 0,05	0,08 \pm 0,002	1227
	M15 mosto de uva tinta	1,10 \pm 0,02	0,05 \pm 0,001	1938

Como se muestra en la Tabla 3.34, los valores obtenidos al utilizar el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano para la cuantificación de glutamato en las muestras alimentarias son mayores a los valores obtenidos al aplicar el método de referencia de HPLC. De hecho, en todos los casos la desviación entre ambos métodos es superior 15% sugerido para la validación de métodos bioanalíticos [309]. Esta desviación es mucho más pronunciada para las bebidas en

base a té verde y los mostos, que son la que presentan un menor contenido en L-glutamato. Los valores de desviación que se obtienen muestran que el método de cuantificación basado en el biosensor amperométrico desarrollado en la presente tesis no es suficientemente fiable. Hay interferencias que afectan al biosensor, disminuyendo la selectividad del método de análisis.

Se conoce que la GmOx libre en disolución es selectiva de glutamato, sin embargo, puede ser que al inmovilizarla para el desarrollo de biosensores su estructura varía y es capaz de actuar sobre otros aminoácidos, principalmente sobre el aspartato (Asp) [302,321]. En la Tabla 3.35, se muestran algunos de los aminoácidos que han mostrado influencia sobre la señal registrada con biosensores de glutamato basados en la inmovilización de GmOx.

Tabla 3.35. Aminoácidos interferentes en la determinación de glutamato mediante biosensores basados en la inmovilización de GmOx.

Especie interferente	Referencia bibliográfica
Aspartato, Glutamina, Histidina, Asparagina	[321]
Aspartato, Glutamina, Cisteína	[302]
Glutamina, Histidina, Metionina, Fenilalanina, Tirosina	[322]
Aspartato, Glutamina, Histidina, Asparagina	[323]
Glutamina, Cisteína	[324]

Como se muestra en la Tabla 3.35, existen diferentes aminoácidos que pueden ser reconocidos por el enzima GmOx una vez inmovilizado, alterando la respuesta amperométrica de los biosensores de glutamato. Este hecho explica la elevada desviación que se observa entre los resultados obtenidos en la cuantificación de glutamato utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitano y mediante el método de HPLC (ver Tabla 3.34). Con la finalidad de identificar los principales interferentes en la medida del biosensor de glutamato desarrollado en la presente tesis, se analizó mediante HPLC el perfil de aminoácidos de las diferentes muestras analizadas.

En primer lugar, se identifican los diferentes aminoácidos presentes en cada una de las muestras. Para ello, se comparan los cromatogramas obtenidos en cada caso con un perfil cromatográfico de aminoácidos esenciales obtenido al aplicar el mismo método de medida descrito en este capítulo [319,320] (ver Figura 3.56).

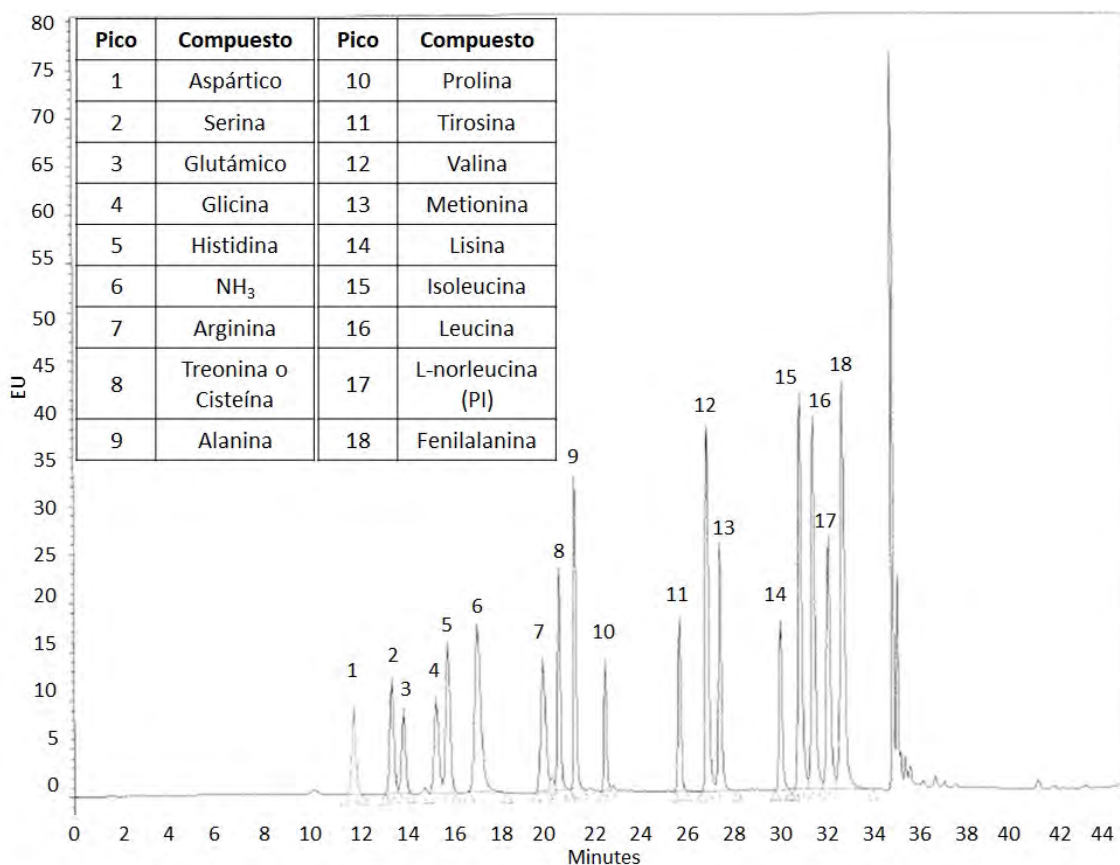


Figura 3.57. Perfil cromatográfico de aminoácidos esenciales, obtenido al aplicar el método de HPLC-FLU.

El perfil cromatográfico de aminoácidos esenciales que se muestra en la Figura 3.56, se obtuvo al aplicar el mismo método de análisis descrito anteriormente [319,320] sobre un patrón multielemento obtenido en un estudio previo la presente tesis. De modo que, solamente se utiliza para identificar los diferentes picos que se observan en las muestras analizadas, pero no para cuantificarlos. En este punto, cabe destacar que los tiempos de retención (t_R) están ligeramente desplazados respecto a los cromatogramas obtenidos para muestras y patrones en el presente estudio. A pesar de ello, se puede asumir que la posición relativa de los picos no varía, ya que el método aplicado es el mismo y en las mismas condiciones. Por tanto, siguiendo el mismo orden de elución, es posible identificar los aminoácidos presentes en las distintas muestras analizadas.

Cabe mencionar que en todas las muestras se adicionó el patrón interno (PI) L-norleucina. A continuación, tomando como referencia el área del patrón interno, se calculó el porcentaje de área correspondiente a cada uno de los aminoácidos presentes en las distintas muestras. En la Tabla 3.36, se muestran estos porcentajes agrupados en las distintas matrices analizadas.

Tabla 3.36. Porcentaje de áreas de los distintos aminoácidos presentes en muestras de cuatro matrices alimentarias distintas: salsas de tomate, salsas de soja, sopas de sobre y bebidas.

	Salsa de tomate	Salsas de soja	Sopas de sobre	Bebidas
Aminoácido	% área vs PI	% área vs PI	% área vs PI	% área vs PI
Asp	12	10	2	2
Ser	10	17	3	7
Glu	19	31	41	2
Gli	-	14	-	1
His	-	8	-	2
Arg	-	16	-	12
Cis	-	17	-	3
Ala	9	30	-	7
Pro	24	13	-	33
Tir	-	3	-	1
Val	2	35	-	3
Met	-	6	-	-
Lis	-	13	-	5
Ile	3	48	-	3
Leu	2	73	-	2
Phe	9	51	-	5

Como se muestra en la Tabla 3.36, las muestras analizadas presentan distintos aminoácidos en distintas proporciones en función del tipo de matriz al que pertenezcan. De este modo, las salsas de soja presentan todos los aminoácidos identificados gracias al método cromatográfico aplicado en una proporción de áreas en general superior al resto de matrices analizadas. Del mismo modo, las bebidas analizadas presentan todos los aminoácidos identificados, a excepción de la metionina, pero la proporción de áreas es siempre inferior en comparación con las salsas de soja. En cambio, las salsas de tomate contienen solamente algunos de los aminoácidos identificados, siendo la prolina el que presenta una mayor proporción de áreas. Finalmente, las sopas de sobre analizadas solamente contienen ácido aspártico, serina y ácido glutámico. Teniendo en cuenta que el ácido aspártico (Asp) se considera el principal interferente de la GmOx [302,321], y que en todas las muestras se han cuantificado por exceso el glutamato al utilizar el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitano, se piensa que los interferentes deben estar presentes en todas las muestras. Por este motivo, se decidió cuantificar el ácido aspártico y la serina en todas las muestras. Además, también se consideraron posibles interferentes en la medida del biosensor la arginina, la alanina y la prolina. Estos tres últimos compuestos no están presentes en todas las muestras, pero presentan una proporción de áreas superior al glutamato en las bebidas analizadas, muestras que presentan los mayores valores de desviación respecto a HPLC (ver Tabla 3.34).

Con la finalidad de cuantificar los aminoácidos potencialmente interferentes en la medida del biosensor, se preparó un patrón multielemento de 1000 mg·L⁻¹, compuesto por ácido L-aspártico (0,1082 g/100 mL HCl 0,1 M), serina (0,1022 g/100 mL HCl 0,1 M), glutamato (0,1068 g/100 mL HCl 0,1 M), arginina (0,1061 g/100 mL HCl 0,1 M), alanina (0,1053 g/100 mL HCl 0,1 M), prolina (0,1076 g/100 mL HCl 0,1 M) y el patrón interno L-norleucina (0,0174 g/50 mL HCl 0,1 M). A

partir de la relación entre las áreas y las concentraciones de cada aminoácido y el área y la concentración del patrón interno, se calculan los factores de respuesta para cada analito (ver Tabla 3.37).

Tabla 3.37. Factores de respuesta para cada uno de los aminoácidos a cuantificar en distintas muestras del sector alimentario. Los factores de respuesta se calcularon a partir del área del patrón interno L-norleucina.

Aminoácido	Factor de respuesta
Asp	4,86
Ser	2,83
Glu	5,48
Arg	3,59
Ala	2,06
Pro	4,05

Los factores de respuesta que se muestran en la Tabla 3.37, se utilizaron para determinar la concentración de cada uno de estos aminoácidos en las distintas muestras analizadas. Cada determinación se realizó por duplicado y los resultados pueden verse en la Tabla 3.38.

Tabla 3.38. Cuantificación mediante HPLC-Fluorescencia de los aminoácidos presentes en diferentes muestras del sector alimentario y que potencialmente pueden interferir en la medida del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano.

Muestra	[Asp] /g·Kg ⁻¹	[Ser] /g·Kg ⁻¹	[Glu] /g·Kg ⁻¹	[Arg] /g·Kg ⁻¹	[Ala] /g·Kg ⁻¹	[Pro] /g·Kg ⁻¹
M1 kétchup	1,52	0,64	2,61	-	0,47	2,51
M2 tomate frito	0,10	0,49	2,20	-	0,28	1,74
M3 tomate frito	1,25	0,72	2,42	-	0,51	2,39
M4 salsa de soja	1,28	2,55	7,07	2,91	3,55	2,38
M5 salsa de soja	1,83	3,99	12,80	4,93	6,37	4,17
M6 salsa de soja	6,09	3,72	13,49	2,18	3,26	4,21
M7 salsa de soja	1,62	0,83	7,16	-	0,64	1,03
M8 concentrado de caldo	-	-	155,87	-	-	-
M9 sopa de sobre	0,29	0,39	1,52	-	-	-
M10 sopa de fideos	0,76	-	29,18	-	-	-
M11 crema de espárragos	1,98	1,18	1,82	-	-	-
M12 bebida en base a té	0,004	0,003	0,004	0,01	0,01	0,16
M13 bebida en base a té	0,01	0,04	0,01	0,003	0,01	0,06
M14 mosto de uva blanca	0,03	0,06	0,08	0,53	0,13	0,78
M15 mosto de uva tinta	0,03	0,04	0,05	0,05	0,45	0,54

Como puede verse en la Tabla 3.38, las muestras analizadas presentan valores de concentración muy variados para cada uno de los aminoácidos estudiados. Por tanto, la influencia de estos interferentes sobre la medida del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano será diferente en cada muestra. Para conocer la influencia individual de estos aminoácidos sobre la medida del biosensor, es necesario realizar adiciones de cada aminoácido a igual concentración que en cada una de las muestras analizadas y registrar la señal amperométrica que se genera en cada caso. De este modo, es posible conocer la selectividad del biosensor. Teniendo en cuenta que las concentraciones de cada posible interferente son muy variadas en función de la muestra, se decidió realizar el ensayo de interferentes sobre dos muestras de nivel alto de concentración y dos muestras de nivel bajo. Concretamente, se escogieron dos salsas de

soja (M4 y M6) y dos bebidas (M12 y M13). En este punto cabe mencionar que las muestras seleccionadas presentan un elevado contenido en azúcares, por este motivo, se decide contemplar la glucosa como posible interferente en la medida del biosensor.

Así pues, para determinar la selectividad del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano, se realizaron incrementos consecutivos de cada uno de los posibles interferentes (al nivel de concentración correspondiente al de cada muestra) sobre 100 mL de PBS a pH 7,0. A continuación, se registró la intensidad al aplicar una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M) y manteniendo el sistema en agitación continua a 2000 rpm. En primer lugar, se analizaron las muestras a niveles bajos de concentración. En la Figura 3.57, se muestran los cronoamperogramas obtenidos al realizar adiciones de aminoácidos y glucosa al nivel de concentración equivalentes de las bebidas M12 y M13.

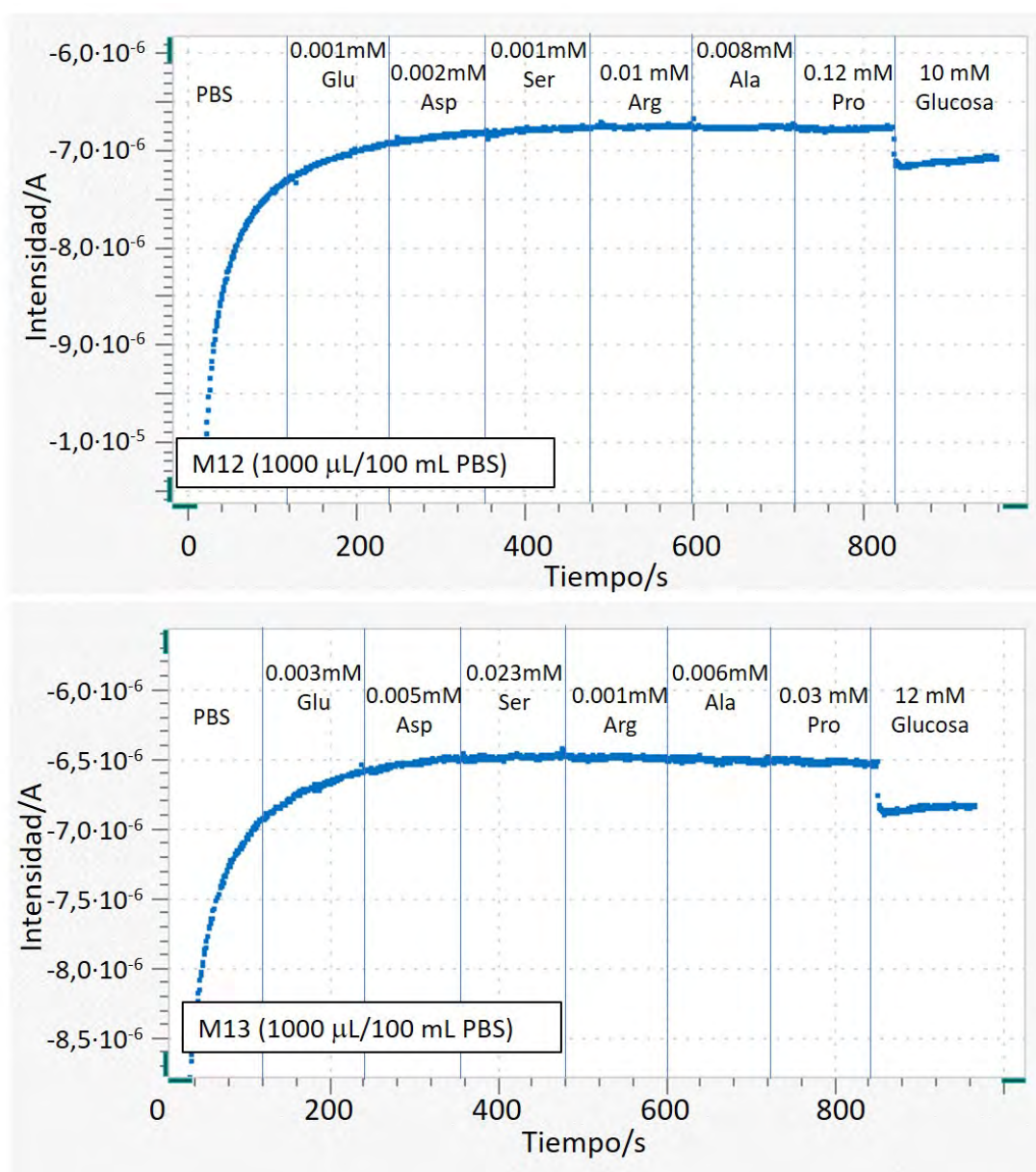


Figura 3.58. Curva intensidad-tiempo obtenida con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano al realizar adiciones de los interferentes potenciales en la medida del biosensor al nivel de concentraciones pertinentes de M12 y M13.

Como puede verse en la Figura 3.57, al realizar el análisis de interferentes a los niveles de concentración presentes en las muestras analizadas, el biosensor solamente registra un cambio en la intensidad medida frente a la presencia de glucosa. El resto de los compuestos analizados, incluido el glutamato, no generan ninguna respuesta amperométrica significativa. Por tanto, los valores de concentración presentados en la Tabla 3.34 para las bebidas analizadas son consecuencia de un falso positivo. La señal registrada con el biosensor al realizar dicha cuantificación provenía en parte de la glucosa presente en estas muestras y no del glutamato. Este hecho explica la desviación que se obtiene al comparar los resultados obtenidos con el biosensor y el método de HPLC.

Para explicar estos resultados, es necesario tener en cuenta dos factores. En primer lugar, la concentración de glutamato adicionada (a igual concentración que la muestra) es inferior al límite de cuantificación (0,010 mM de glutamato) del biosensor. Este hecho explica que, después de realizar la adición de patrón de glutamato, el biosensor no registre ningún cambio significativo en la intensidad. En segundo lugar, cabe destacar que la concentración de glucosa presente en la muestra es unas 5000 veces mayor que la de glutamato.

Los resultados obtenidos indican que la glucosa presente en la muestra puede llegar al centro activo del enzima glutamato oxidasa, donde se oxida a ácido glucónico liberando H_2O_2 , que a su vez se reduce en la superficie del electrodo generando la señal amperométrica que registra el biosensor. Con la finalidad de confirmar esta hipótesis, se construye un sensor Ti/TiO₂NTAs/Quitosano en ausencia de enzima. De este modo, es posible observar la interacción directa entre la glucosa y la estructura del biosensor, para poder descartar que la propia interfase electroquímica reconozca la glucosa en las condiciones de medida aplicadas. A continuación, sobre 100 mL de PBS 0,1 M a pH 7,0 se realiza una adición de glucosa a igual concentración que en la muestra M12 (10 mM). En la Figura 3.58, se muestra el registro de intensidad obtenido.

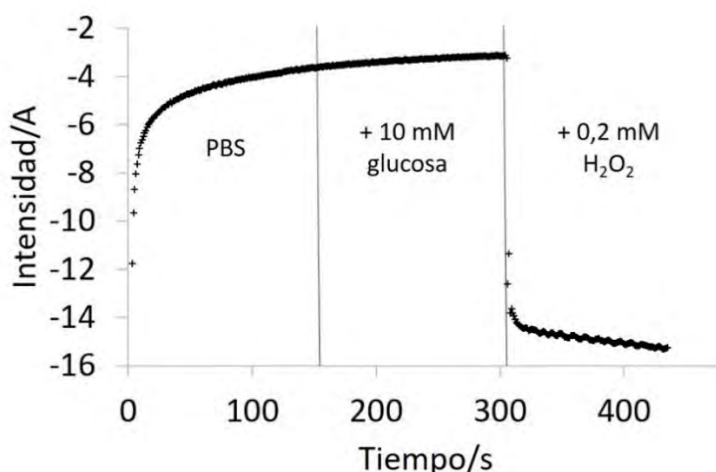


Figura 3.59. Estudio de la capacidad de un sensor Ti/TiO₂NTAs/Quitosano de detectar glucosa.

Como se muestra en la Figura 3.58, tras realizar una adición de 10 mM de glucosa el sensor Ti/TiO₂NTAs/Quitosano no muestra ningún cambio significativo en la intensidad registrada. Por tanto, la arquitectura del biosensor no influye en la determinación de glucosa. Esto significa que la interferencia que registra el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano proviene del enzima y

no de la interfase electroquímica (Ti/TiO₂NTAs/Quitosano). De este modo, se corrobora la hipótesis de que la GmOx es capaz de reconocer la glucosa como sustrato, catalizando su conversión a ácido glucónico. Por tanto, parece ser que el enzima glutamato oxidasa inmovilizado para el desarrollo de biosensores amperométricos presenta una baja especificidad para el glutamato. Por este motivo, los biosensores desarrollados en la presente tesis cuantifican por exceso el glutamato presente en las distintas muestras analizadas (ver Tabla 3.34).

Por otro lado, se analiza el comportamiento del biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano al adicionar distintos interferentes a niveles altos de concentración. Para ello, se realizaron incrementos consecutivos de cada uno de los posibles interferentes (al nivel de concentración correspondiente al de cada muestra) sobre 100 mL de PBS a pH 7,0. A continuación, se registró la intensidad al aplicar una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag/AgCl y manteniendo el sistema en agitación continua a 2000 rpm. En este caso, se analizaron las muestras a niveles altos de concentración. En la Figura 3.59, se muestran los cronoamperogramas obtenidos al realizar adiciones de Glu, Asp, Ser y Arg al nivel de concentración equivalentes de las salsas de soja M4 y M6.

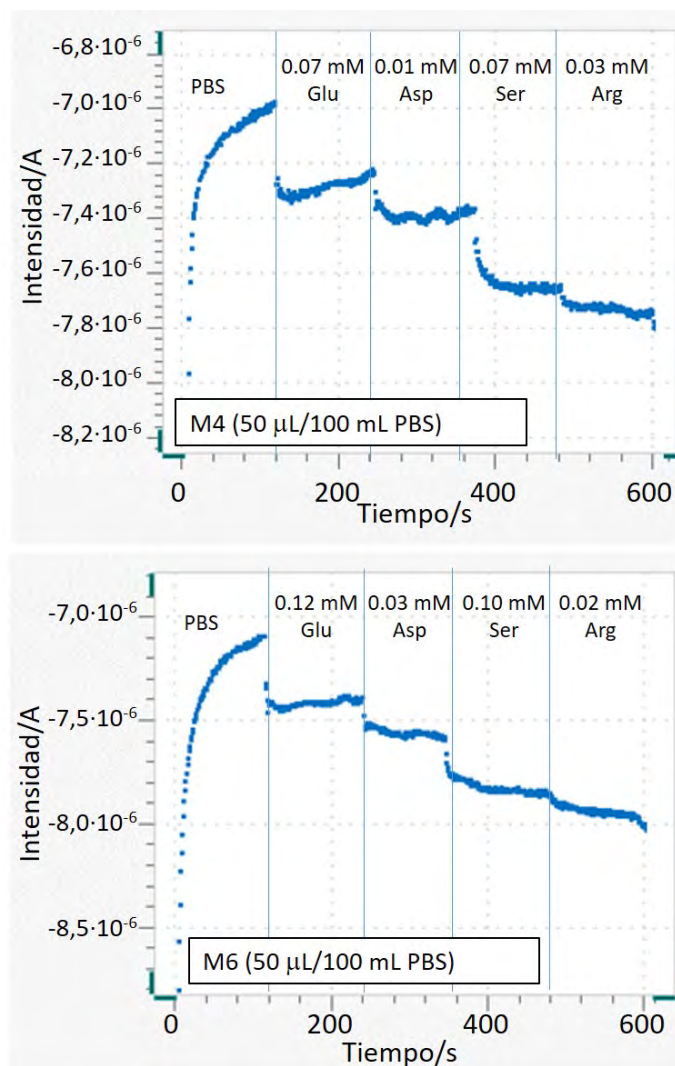


Figura 3.60. Curva intensidad-tiempo obtenida con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano al realizar adiciones de los interferentes potenciales en la medida del biosensor al nivel de concentraciones pertinentes de M4 y M6.

Como se muestra en la Figura 3.59, el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano es sensible a la presencia de varios aminoácidos en las concentraciones equivalentes a las de las salsas de soja. De este modo, al utilizar el biosensor para medir la concentración de glutamato presente en la muestra M4, el 36,9% de la señal media corresponde al aspártico, a la serina y a la arginina. Para la muestra M6, solamente el 47,2% de la señal amperométrica generada se debe al glutamato. El 52,8% restante deriva de la presencia de aspártico, serina, y arginina. Estos resultados demuestran que, en el caso particular del biosensor desarrollado, el glutamato oxidasa es poco específico para glutamato, ya que es capaz de oxidar otros aminoácidos. Los resultados obtenidos se utilizaron para recalculer la concentración de glutamato determinada con el biosensor. Para ello, se construyó de nuevo la recta de adiciones restando a los valores de intensidad el porcentaje de señal derivado de la suma de interferentes (ver Figura 3.60).

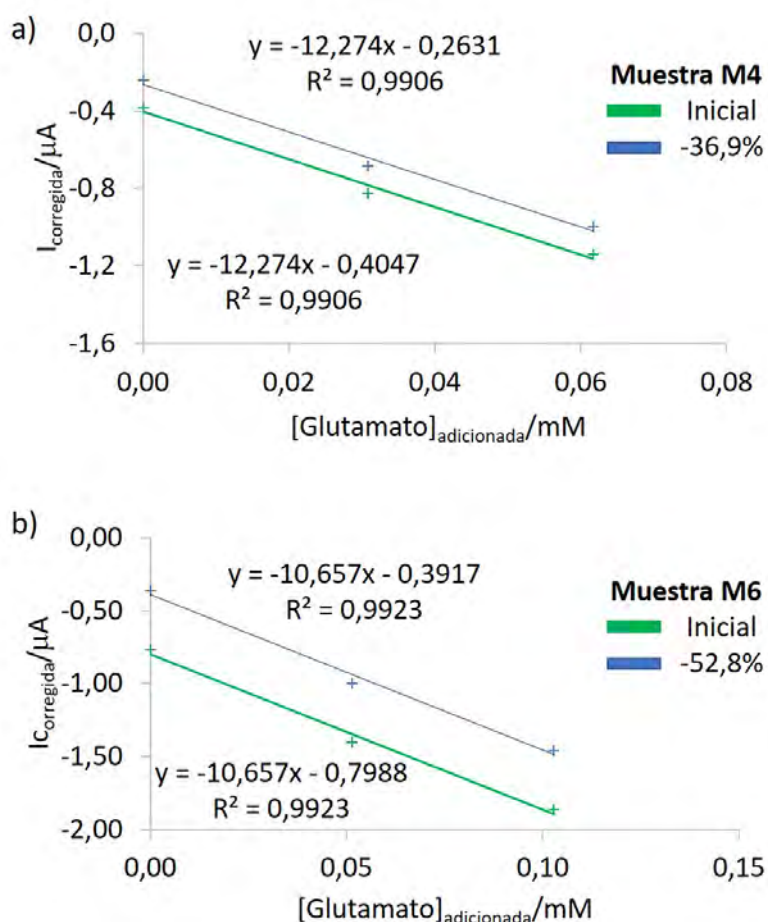


Figura 3.61. Corrección de la recta de adiciones después de restar el porcentaje de señal derivado de los interferentes a) para la muestra M4 y b) para la muestra M6.

A partir de la reconstrucción de la recta de adiciones, se recalculó la concentración de glutamato presente en la muestra M6. El mismo procedimiento se aplicó a la muestra M4, en la que el 63,1% de la señal amperométrica generada se debe al glutamato y el 36,9% restante lo componen el aspártico, la serina, y la arginina. Los resultados obtenidos en cada caso se compararon de nuevo con los valores de referencia obtenidos con el método cromatográfico (ver Tabla 3.39).

Tabla 3.39. Concentraciones corregidas de glutamato presentes en las salsas de soja M4 y M6.

Muestra	[Glutamato] _{correctada,} biosensor /g·Kg ⁻¹	[Glutamato] _{HPLC} /g·Kg ⁻¹	Desviación %
M4	6,22 ± 0,07	7,07 ± 0,01	-12
M6	10,89 ± 0,20	13,49 ± 0,04	-19

Como se muestra en la Tabla 3.39, al restar la influencia de las especies interferentes en la medida del biosensor, la desviación entre los valores obtenidos mediante HPLC y al utilizar el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano es inferior al 20%. La desviación inicial entre la medida del biosensor y el método de HPLC era del 36% (por exceso) para la muestra M4 y del 64% (por exceso) para la muestra M6. Por tanto, al restar la influencia de los interferentes sobre la señal registrada con el biosensor tras adicionar la muestra, se consigue disminuir notablemente la desviación entre los métodos de análisis aplicados. Este hecho indica que el enzima glutamato oxidasa no es suficientemente selectivo de glutamato. Para conocer si el proceso de inmovilización aplicado provoca cambios conformacionales sobre la GmOx suficientemente notables como para alterar su especificidad, se aplica un método de análisis alternativo en el que la GmOx se encuentra libre en disolución. De este modo, es posible determinar si el problema de especificidad se genera como consecuencia de la plataforma electroquímica utilizada o si es un problema intrínseco del enzima. Así pues, se determinó el contenido de glutamato de las muestras M4 y M6 mediante la valoración amperométrica/enzimática en presencia de iones yoduro [307,308] descrita en el apartado 3.3.1.

La determinación de glutamato se lleva a cabo en una celda electroquímica que contiene 25 mL de PBS en presencia de molibdato amónico, 100 µL de disolución de GmOx (10 mg/2 mL PBS) y 1 mL KI (83 g/L). En este momento se inicia la amperometría y transcurridos 60 s, se realiza una adición de 50 µL de patrón o de muestra que contienen glutamato. La presencia de glutamato provoca un aumento lineal en la intensidad registrada, como consecuencia de la formación de yodo. A partir de las pendientes de los registros intensidad/tiempo comprendidos entre los 70 s y los 100 s, se construye la recta de calibrado (ver Figura 3.61).

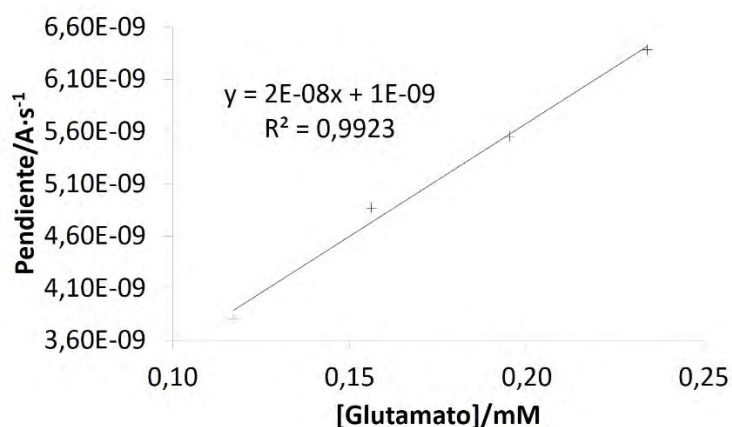


Figura 3.62. Recta de calibrado obtenida al aplicar el método amperométrico/enzimático.

La concentración de glutamato presente en las muestras M4 y M6, se determinó por duplicado utilizando el método amperométrico/enzimático. Para realizar la cuantificación, se interpolaron

los valores de las pendientes derivadas de la formación del yodo en la recta de calibrado que se presenta en la Figura 3.61. Los valores obtenidos se compararon con los obtenidos al realizar la cuantificación mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano (ver Tabla 3.40).

Tabla 3.40. Determinación del contenido en L-glutamato en las muestras M4 y M6 utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano y aplicando el método amperométrico/enzimático.

Muestra	[Glutamato] _{biosensor} (resultados sin corregir) /g·Kg ⁻¹	[Glutamato] _{amperométrico-enzimático} /g·Kg ⁻¹	Desviación %
M4	9,61 ± 0,08	10,29 ± 0,56	7,0
M6	22,15 ± 0,36	20,46 ± 0,07	-7,6

Como se muestra en la Tabla 3.40, los resultados obtenidos al cuantificar el glutamato presente en las salsas de soja mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano son relativamente cercanos a los obtenidos con el método amperométrico/enzimático. Para las dos muestras analizadas, la desviación entre los dos métodos enzimáticos de análisis es inferior al 10%. Además, en comparación con los resultados obtenidos por HPLC (7,07 ± 0,01 g·Kg⁻¹ para la muestra M4 y 13,49 ± 0,04 g·Kg⁻¹ para la muestra M6), el método amperométrico/enzimático presenta valores elevados de desviación; un 45,5% para la muestra M4 y un 51,7% para la muestra M6. Por tanto, al aplicar dos métodos de análisis independientes para la cuantificación de glutamato en los que es necesaria la presencia de glutamato oxidasa, se observa una cuantificación por exceso respecto al método de referencia de HPLC. Estos resultados confirman que el enzima GmOx presenta baja especificidad ante la presencia de glutamato y que este problema es independiente del proceso de inmovilización o de la plataforma electroquímica utilizados para el desarrollo de biosensores de glutamato.

Discusión de los resultados obtenidos

Se ha utilizado el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano para cuantificar el glutamato presente en distintas muestras del sector alimentario. Los valores de concentración obtenidos presentaron una elevada desviación respecto al valor de referencia de HPLC. La falta de selectividad del método de análisis se puede deber a dos factores. Por un lado, es posible que el proceso de inmovilización provoque cambios conformacionales sobre las moléculas de GmOx y que estos cambios alteren la capacidad del enzima para catalizar selectivamente la conversión del L-glutamato a 2-oxoglutarato. Por otro lado, es posible que el enzima presente baja especificidad para el sustrato L-glutamato. Con la finalidad de determinar la especificidad del enzima en disolución, se cuantificaron dos muestras utilizando un método enzimático en el que la GmOx se encuentra libre en disolución. Los resultados obtenidos se compararon con la cuantificación realizada mediante el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano y en ambos casos se obtuvo una desviación entre los dos métodos inferior al 10%. Es posible afirmar que el proceso de inmovilización del enzima en el biosensor no afecta a la configuración espacial del enzima (GmOx), el origen del problema reside en la baja especificidad de este. Este hecho concuerda con los datos bibliográficos, en los que se describe la capacidad de la GmOx para reconocer otros sustratos distintos al glutamato, principalmente aminoácidos [302,321].

Así pues, es posible afirmar que la interfase electroquímica y el encapsulamiento polimérico empleados son capaces de inmovilizar satisfactoriamente el enzima. Además, la respuesta registrada con el biosensor verifica que la población del enzima en éste se encuentra mayoritariamente en su conformación activa. Asimismo, los biosensores desarrollados son capaces de detectar la presencia de glutamato en muestras reales del sector alimentario. Sin embargo, las muestras seleccionadas para realizar las cuantificaciones analíticas presentan una serie de interferentes en la medida del biosensor que disminuyen la exactitud de las determinaciones realizadas, en comparación con el método de referencia. También se ha determinado que la falta de exactitud se debe a la baja especificidad del enzima utilizado en el desarrollo de estos biosensores, que es capaz de catalizar la conversión de otros aminoácidos diferentes al L-glutamato.

Una posible solución a la falta de especificidad que se ha observado es el uso de enzimas modificados genéticamente. Existen estudios en los que se ha demostrado que algunas mutaciones forzadas pueden mejorar las propiedades de los enzimas, como por ejemplo su selectividad, su actividad catalítica o su estabilidad térmica [325]. Para poder mejorar la especificidad de un enzima, es necesario combinar técnicas de ingeniería genética, bioquímica y bioinformática que permiten conocer y alterar la estructura y la secuencia de aminoácidos del enzima [326,327]. Cada vez más, se aplican estas técnicas de bioingeniería con la finalidad de mejorar las características operacionales de distintos enzimas para aplicaciones industriales. Por ejemplo, la hidrolasa organofosforada (OPH) es un enzima que hidroliza una gran variedad de compuestos organofosforados presentes en algunos pesticidas. Utilizando la ingeniería genética, se consiguió modificar la estructura de la OPH para generar variantes con actividades y especificidades más altas hacia algunos compuestos organofosforados concretos, como el Dementon S, un compuesto usado en la formulación de algunos insecticidas y con una elevada toxicidad para los humanos [328,329]. Del mismo modo, sería posible alterar genéticamente el enzima Glutamato Oxidasa para aumentar su especificidad para el sustrato Glutamato, mejorando las propiedades analíticas de los biosensores desarrollados.

Por tanto, se puede afirmar que los biosensores de glutamato desarrollados en esta tesis son capaces de detectar glutamato y permiten su cuantificación en ausencia de sustancias interferentes. Y se propone para futuras experiencias sustituir el enzima Glutamato Oxidasa por una versión modificada genéticamente que presente una mayor especificidad. Es posible que de este modo se disminuyan los problemas de cuantificación asociados a la presencia de especies interferentes en la medida del biosensor.

3.4. Cuantificación de muestras reales con el biosensor de glucosa

Gracias al estudio de los diferentes parámetros analíticos de los biosensores de glucosa desarrollados, se ha podido comprobar que tanto los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano como los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano, se pueden utilizar para cuantificar de forma precisa, exacta, selectiva y con suficiente sensibilidad la glucosa presente en una muestra del sector alimentario (ver capítulo 3.3). A partir de los resultados obtenidos, se decide comprobar la viabilidad de extrapolar el método de análisis para la cuantificación de glucosa a otras muestras de alimentos.

De este modo, se utiliza el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano para cuantificar la glucosa presente en cuatro matrices alimentarias diferentes: bebidas refrescantes, salsas de soja, salsas de tomate y productos lácteos. El criterio de selección para cada una de estas matrices se basa en que cada una de ellas presenta una serie de interferencias o problemáticas en la cuantificación de glucosa aplicando los métodos clásicos de análisis. Así pues, en las bebidas refrescantes es habitual encontrar elevadas cantidades de ácido ascórbico y/o ácido cítrico, ambos interferentes clásicos en las determinaciones enzimáticas de glucosa. En cuanto a las salsas de soja y las salsas de tomate, estas presentan matrices complejas con un elevado número de componentes diferentes que pueden influir en el proceso de cuantificación. Cabe mencionar que las salsas de soja presentan un elevado contenido proteico, mientras que las salsas de tomate son ricas en lípidos. Normalmente, para el análisis convencional de estas muestras es necesaria una etapa de preparativa de muestra, que puede ser más o menos compleja, para eliminar parte de los componentes y simplificar la matriz de análisis. Estas etapas de preparativa aumentan el coste del análisis porque consumen tiempo y recursos, además de aumentar la probabilidad de alterar la concentración del analito presente en la muestra. Finalmente, se seleccionan los productos lácteos por su elevado contenido en grasa y por la presencia de azúcares como la lactosa y galactosa, que representan una interferencia difícil de eliminar en la determinación de glucosa por HPLC. En este punto, hay que destacar que los productos lácteos analizados en este estudio son productos sin lactosa. En resumen, la selección de estos cuatro tipos de muestra implica un gran número de situaciones desfavorables para la determinación de glucosa, mediante métodos de análisis convencionales, en productos del sector alimentario. Todas las muestras seleccionadas se analizan mediante el método de HPLC para la cuantificación de glucosa descrito anteriormente en el apartado 3.3.1. Los resultados obtenidos se toman como valores de referencia al realizar la determinación de glucosa con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano.

Para analizar la concentración de glucosa presente en las muestras seleccionadas utilizando el biosensor amperométrico, no es necesario aplicar ningún tratamiento de muestra previo más que un paso de dilución. En el caso de las bebidas refrescantes y las salsas de soja, se toma un volumen adecuado de muestra y se adiciona directamente sobre la celda electroquímica que contiene 100 mL PBS 0,1 M (pH 7,0). En el caso de los productos lácteos y las salsas de tomate, se toma una cantidad de muestra adecuada y se diluye en 50 mL de agua. A continuación, se toma un volumen conocido de esta dilución y se adiciona a la celda electroquímica que contiene 100 mL PBS 0,1 M (pH 7,0). Todas las muestras se cuantifican por extrapolación en recta de

adiciones estándar, después de realizar una cronoamperometría en la que se mantiene el potencial de trabajo constante a -0,4 V vs Ag/AgCl/KCl (3M).

Por otro lado, para realizar la determinación de glucosa mediante HPLC es necesario primero realizar algunos tratamientos de muestra. Las bebidas refrescantes se desgasifican en un baño de ultrasonidos, diluyen 1:10 en agua MilliQ y se filtran con un filtro de nylon de 0,45 μm de tamaño de poro. Para los productos lácteos, las salsas de soja y las salsas de tomate, es necesario tomar un volumen adecuado de muestra y disolverlo en 50 mL de agua MilliQ. Seguidamente, se somete la mezcla a un baño de ultrasonidos durante 10 min para garantizar la homogenización. La mezcla resultante se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min. Finalmente, se toma el sobrenadante y se filtra utilizando un filtro de nylon de 0,22 μm de tamaño de poro. Las condiciones cromatográficas aplicadas se describen en el apartado 3.3.1.

En la Tabla 3.41, se muestran los resultados obtenidos para la cuantificación de glucosa en las muestras seleccionadas aplicando el método cromatográfico y mediante el uso del biosensor.

Tabla 3.41. Determinación del contenido en glucosa de diferentes muestras del sector alimentario utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano y aplicando el método de referencia HPLC. También se muestra la desviación entre los valores obtenidos por ambos métodos.

Tipo de muestra	Muestra	[Glucosa] _{biosensor} \pm s / M	[Glucosa] _{HPLC} / M	Desviación / %
Bebidas refrescantes	B1 Naranja	0,241 \pm 0,008	0,251 \pm 0,001	-4,1
	B2 Limón	0,151 \pm 0,002	0,141 \pm 0,001	6,3
	B3 Limón	0,176 \pm 0,006	0,189 \pm 0,001	-6,7
	B4 Naranja	0,215 \pm 0,019	0,224 \pm 0,001	-4,0
	B5 Limón	0,212 \pm 0,011	0,209 \pm 0,001	1,4
	B6 Naranja	0,221 \pm 0,010	0,232 \pm 0,001	-4,4
	B7 Cola	0,156 \pm 0,008	0,152 \pm 0,001	2,3
	B8 Cola	0,177 \pm 0,011	0,168 \pm 0,007	5,2
Salsas de soja	Soja 1	0,520 \pm 0,025	0,537 \pm 0,026	-3,1
	Soja 2	0,089 \pm 0,005	0,096 \pm 0,001	-7,3
	Soja 3	0,250 \pm 0,004	0,253 \pm 0,009	-1,5
	Soja 4	0,745 \pm 0,003	0,775 \pm 0,001	-3,8
	Soja 5	0,093 \pm 0,003	0,090 \pm 0,001	2,7
Productos lácteos	L1 Leche	0,125 \pm 0,005	0,134 \pm 0,001	-7,1
	L2 Batido	0,170 \pm 0,006	0,160 \pm 0,001	6,1
	L3 Yogurt	0,142 \pm 0,006	0,138 \pm 0,001	2,7
	L4 Yogurt	0,125 \pm 0,004	0,119 \pm 0,001	5,4
Salsas de tomate	T1 Tomate frito	0,120 \pm 0,001	0,111 \pm 0,003	7,6
	T2 Tomate frito	0,092 \pm 0,003	0,088 \pm 0,001	4,9
	T3 Kétchup	0,533 \pm 0,004	0,515 \pm 0,007	3,3

Como se muestra en la Tabla 3.41, se ha determinado la concentración de glucosa presente en 20 muestras diferentes del sector alimentario. Los resultados obtenidos con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano presentan suficiente exactitud en comparación con los valores de referencia obtenidos por HPLC, independientemente de la composición o el origen de la muestra

analizada. En todos los casos, se registra una desviación entre los dos métodos inferior al 10%. Este hecho indica, que el biosensor es capaz de superar todas las posibles interferencias presentes en las muestras seleccionadas y determinar de forma selectiva la glucosa. Cabe mencionar que los valores de desviación obtenidos son inferiores a la mayoría de los valores descritos en bibliografía, que normalmente son iguales o superiores al 10% [35,42–44]. Teniendo en consideración estos resultados y el corto tiempo de análisis (aproximadamente 8 min por muestra), se puede afirmar que el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano propuesto representa una buena alternativa a los métodos clásicos de análisis para el control de calidad en el sector alimentario.

Por otro lado, se repiten las determinaciones de glucosa realizadas sobre muestras del sector alimentario, utilizando para ello los biosensores con configuración covalente Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. Del mismo modo que en el caso anterior, se analiza el contenido en glucosa de cuatro matrices alimentarias diferentes: bebidas refrescantes, salsas de soja, salsas de tomate y productos lácteos. Las determinaciones se llevan a cabo por triplicado, aplicando el método de las adiciones estándar. Además, el método cromatográfico de HPLC detallado en el apartado 3.3.1. se aplica para conocer la concentración de glucosa en las mismas muestras y los valores obtenidos se toman como valores de referencia (ver Tabla 3.42).

Tabla 3.42. Determinación del contenido en glucosa de diferentes muestras del sector alimentario utilizando el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano y aplicando el método de referencia HPLC. También se muestra la desviación entre los valores obtenidos por ambos métodos.

Tipo de muestra	Muestra	[Glucosa] _{biosensor} ± s / M	[Glucosa] _{HPLC} / M	Desviación / %
Bebidas refrescantes	R1 Naranja	0,261 ± 0,005	0,251 ± 0,001	3,8
	R2 Naranja	0,226 ± 0,011	0,224 ± 0,002	1,1
	R3 Limón	0,210 ± 0,009	0,209 ± 0,001	0,5
	R4 Limón	0,207 ± 0,005	0,189 ± 0,001	9,6
	R5 Cola	0,156 ± 0,005	0,152 ± 0,001	2,5
Salsas de soja	Soja 1	0,095 ± 0,001	0,090 ± 0,001	5,2
	Soja 2	0,250 ± 0,003	0,253 ± 0,009	-1,4
Productos lácteos	PL1 Leche	0,144 ± 0,005	0,134 ± 0,001	7,4
	PL2 Yogurt	0,144 ± 0,001	0,138 ± 0,001	4,5
	PL3 Yogurt	0,129 ± 0,003	0,119 ± 0,001	8,6
	PL4 Batido	0,086 ± 0,002	0,079 ± 0,001	9,1
	PL5 Batido	0,162 ± 0,011	0,160 ± 0,001	1,3
	PL6 Mayonesa	0,084 ± 0,001	0,077 ± 0,001	9,4
	PL7 Salsa Caesar	0,040 ± 0,002	0,037 ± 0,003	7,9
Salsas de tomate	T1 Tomate frito	0,108 ± 0,005	0,111 ± 0,003	-3,1
	T2 Tomate frito	0,094 ± 0,003	0,088 ± 0,001	7,1

Como se muestra en la Tabla 3.42, se ha determinado el contenido de glucosa presente en 16 muestras diferentes del sector alimentario utilizando para ello el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. Al comparar los valores obtenidos con los valores de referencia, determinados por HPLC, se observa que en todos los casos la desviación es inferior al 10%. Del mismo modo que sucede con los biosensores en base quitosano, estos valores de desviación son inferiores a los descritos en bibliografía para otros biosensores de glucosa. Además, el biosensor puede trabajar a potenciales catódicos en los que el efecto de las principales interferencias de los biosensores convencionales, como el ácido ascórbico, se elimina.

Así pues, tanto al utilizar el biosensor Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano como con el biosensor Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano, los resultados obtenidos presentan desviaciones respecto al método de referencia inferiores al 15% establecido para métodos bioanalíticos [309]. Este hecho indica que los biosensores desarrollados permiten determinar la concentración de glucosa presente en matrices complejas de diferentes muestras del sector alimentario con suficiente exactitud. Por tanto, se puede afirmar que existe concordancia entre las determinaciones realizadas usando los biosensores desarrollados en esta tesis y al aplicar el método de referencia de HPLC.

También cabe destacar que, los resultados obtenidos con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano (ver Tabla 3.42) son similares a los que se muestran con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano (ver Tabla 3.41). Por tanto, se puede afirmar que los dos métodos de inmovilización aplicados para la obtención de estos biosensores son adecuados. En ambos casos, se obtienen biosensores con elevados valores de sensibilidad, que permiten determinar de forma precisa, exacta y selectiva la glucosa presente en muestras de matrices complejas y variadas. Así pues, tanto los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano como los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano, presentan un gran potencial para aplicaciones prácticas, como el control de calidad en el sector alimentario. Además, la estructura de los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano permite su aplicación en entornos biomédicos, ya que los componentes son biocompatibles y el poli-HEMA evita la adhesión inespecífica de proteínas.

4. Conclusiones

4. Conclusiones

De los resultados obtenidos en la presente Tesis se deducen las siguientes conclusiones:

1. Se han obtenido matrices de nanotubos de óxido de titanio (IV) altamente ordenados mediante oxidación electroquímica, aplicando una diferencia de potencial de 30 V durante un tiempo determinado (4, 8, 17 y 24 h). Los electrodos que ofrecen mayor sensibilidad frente a la reducción de peróxido de hidrógeno son los obtenidos después de 17 h de proceso anódico. Bajo estas condiciones de síntesis, los nanotubos presentan unas dimensiones promedio aproximadas de 80 nm de diámetro interno y 10 nm de espesor de pared y ofrecen valores de sensibilidad comprendidos entre los 160 y los 220 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$.
2. Se ha estudiado el uso de *kappa*-carragenina, 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y quitosano como matrices de inmovilización física en el desarrollo de biosensores enzimáticos. Tanto el HEMA como el quitosano generan un microentorno favorable para las moléculas de enzima, obteniéndose biosensores sensibles a la presencia de glucosa. Se ha observado que, los biosensores con matrices de inmovilización con quitosano son más sensibles y más estables a lo largo del tiempo que los biosensores con las otras matrices de inmovilización física.
3. Se ha estudiado la inmovilización covalente de enzimas mediante la polimerización y el sembrado de PFM utilizando técnicas de plasma. Los resultados obtenidos con QCM-D indican que ambas técnicas permiten la inmovilización de los enzimas sobre la interfase electroquímica. Se observa que la mayoría de las moléculas de enzima adoptan configuraciones inactivas al aplicar el ppPFM y conformaciones activas al aplicar el pgPFM. Las determinaciones amperométricas realizadas confirman este resultado, ya que los biosensores basados en pgPFM presentan mayor sensibilidad que los biosensores basados en ppPFM.
4. Se ha evaluado la correlación entre los valores de dispersión y de frecuencia registrados mediante QCM-D con las superficies ppPFM y pgPFM. Los valores obtenidos permiten afirmar que la película GOx/ppPFM es menos rígida que la película GOx/pgPFM. Por tanto, se concluye que las moléculas de GOx tienden a sufrir más cambios conformacionales durante el proceso de inmovilización sobre la superficie ppPFM que sobre la superficie pgPFM.
5. Se han determinado el espesor, la viscosidad y el módulo de cizalla de las películas obtenidas al inmovilizar GOx sobre ppPFM y pgPFM. El módulo de cizalla más elevado se obtiene para la superficie ppPFM antes de realizar el proceso de limpieza, indicando que esta película genera un ambiente hidrofóbico menos favorable para las moléculas de enzima que la película pgPFM.
6. Se ha evaluado la conformación estructural que adoptan las moléculas de GOx una vez inmovilizadas sobre las superficies ppPFM y pgPFM. Se han comparado los valores de masa adsorbida obtenidos mediante QCM-D con los valores calculados para cada una de las conformaciones que puede adoptar la GOx (nativa, glóbulo fundido, glóbulo pre-fundido y desplegada). La superficie ppPFM presenta un valor de masa adsorbida de 271 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, que está comprendido entre los valores teóricos calculados para las conformaciones

intermedias de MG ($318 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$) y de PMG ($220 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$). En cambio, la superficie pgPFM presenta un valor de masa adsorbida de $372 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, que está comprendido entre los valores teóricos calculados para la conformación nativa ($458 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$) y el intermedio de glóbulo fundido ($318 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$). Estos resultados indican que la actividad biológica de la GOx es mayor sobre la superficie pgPFM que sobre la superficie ppPFM.

7. Tanto la inmovilización por captura polimérica en base a quitosano, como la inmovilización covalente mediante sembrado por plasma de PFM sobre un lecho de HEMA-co-EGDA, permiten la obtención de biosensores de glucosa con sensibilidades del mismo orden y estabilidades a largo plazo similares entre sí.
8. Se han desarrollado biosensores de glutamato con las siguientes arquitecturas Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GmOx/Quitosano. En ambos casos, es posible inmovilizar una elevada población de enzima en su configuración biológicamente activa. Sin embargo, los biosensores basados en métodos físicos de inmovilización presentan valores de sensibilidad y de estabilidad a largo plazo más elevados que los biosensores basados en la formación de enlaces covalentes. De acuerdo con estos resultados, se decide emplear la arquitectura Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano para el desarrollo de dichos sensores.
9. Tanto los biosensores de glucosa Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano, como los biosensores Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano, se pueden considerar una alternativa sensible, fiable y rápida a otras técnicas de análisis para la determinación de glucosa. En ambos casos, los parámetros analíticos determinados satisfacen los estándares de calidad establecidos por la AOAC.
10. A partir de las determinaciones realizadas sobre muestras reales con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GmOx/Quitosano, se ha observado que el enzima GmOx presenta baja especificidad para el sustrato L-glutamato. Se ha realizado un estudio de posibles sustratos alternativos para el GmOx y se ha observado que éste presenta actividad biológica frente a diversos aminoácidos como el ácido aspártico, la serina y la arginina. A pesar de ello, los parámetros analíticos de los biosensores de glutamato desarrollados (sensibilidad, límite de cuantificación, rango lineal y estabilidad a largo plazo) cumplen con los estándares de calidad establecidos.
11. Se ha determinado la concentración de glucosa en muestras de bebidas refrescantes, salsas de soja, productos lácteos y salsas de tomate con los biosensores Ti/TiO₂NTAs/GOx/Quitosano y Ti/TiO₂NTAs/HEMA-co-EGDA/pgPFM/GOx/Quitosano. En todos los casos, la diferencia entre la concentración de glucosa medida por los biosensores y la determinada por HPLC no supera en ningún caso el $\pm 10\%$. Por lo tanto, estos resultados indican que dichos biosensores son una alternativa a otros métodos analíticos para la determinación de glucosa en muestras alimentarias.

5. Bibliografía

5. Bibliográfia

1. *The American Heritage Student Science Dictionary*; Editors of the American Heritage Dictionaries, Ed.; Second Edi.; Houghton Mifflin, 2014; ISBN 978-0-54-785731-2.
2. Fleming, W. J. New Automotive Sensors—A Review. *IEEE Sens. J.* **2008**, *8*, 1900–1921, doi:10.1109/JSEN.2008.2006452.
3. Fleming, W. J. Overview of automotive sensors. *IEEE Sens. J.* **2001**, *1*, 296–308, doi:10.1109/7361.983469.
4. Fabbrizzi, L.; Poggi, A. Sensors and switches from supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 197, doi:10.1039/cs9952400197.
5. Bard, A. J.; Inzelt, G.; Scholz, F. *Electrochemical Dictionary*; Springer: Verlag, Berlin, Heidelberg, 2008; ISBN 978-3-540-74597-6.
6. Nagel, B.; Dellweg, H.; Gierasch, L. M. International Union of Pure and Applied Chemistry. Glossary for Chemists of Terms Used in Biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 143–168.
7. Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8*, 1400–1458, doi:10.3390/s80314000.
8. Pohanka, M.; Skládal, P. Electrochemical biosensors - principles and applications. *J. Appl. Biomed.* **2008**, *6*, 57–64, doi:10.32725/jab.2008.008.
9. Clark, L. C.; Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45, doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
10. Turner, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *43*, 3184, doi:10.1039/c3cs35528d.
11. Vikas; Anjum; Pundir, C. S. Biosensors: Future Analytical Tools. *Sensors Transducers J.* **2007**, *76*, 935–936.
12. Grand View Research Biosensors Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Medical, Agriculture) By Technology (Thermal, Electrochemical, Optical) And Segment Forecasts, 2012 - 2020 Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosensors-market> (accessed on Jul 29, 2018).
13. Ventura, E. E.; Davis, J. N.; Goran, M. I. Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructose content. *Obesity (Silver Spring)*. **2011**, *19*, 868–74, doi:10.1038/oby.2010.255.
14. Flegal, K. M.; Carroll, M. D.; Kit, B. K.; Ogden, C. L. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010. *JAMA* **2012**, *307*, 491–7, doi:10.1001/jama.2012.39.
15. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) *Health at a Glance: Europe 2012*; Health at a Glance: Europe; OECD Publishing, 2012; ISBN 9789264183605.
16. European Commission; Directorate-General Joint Research Centre; Institute for

- Reference Materials and Measurements. *Method-specific certification of free sugars and starch / glucose in two artificial food materials BCR-644, BCR-645*; Belgium, 2004; ISBN 9289468718.
17. The International Organisation of Vine and Wine. Method OIV-MA-AS311-02: Glucose and fructose. In *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts. Vol 2*; 2009; pp. 1–5.
 18. AOAC Official Method 977.20: Separation of Sugars in Honey, Liquid Chromatographic Method. *JAOAC* **1977**, *60*, 838.
 19. AOAC Official Method 982.14: Glucose, fructose, sucrose, and maltose in presweetened cereals. **1990**.
 20. Wang, J. Electrochemical glucose biosensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 814–825, doi:10.1016/B978-012373738-0.50005-2.
 21. Guilbault, G. G.; Lubrano, G. J. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta* **1973**, *64*, 439–455, doi:10.1016/S0003-2670(01)82476-4.
 22. Putzbach, W.; Ronkainen, N. J. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors (Switzerland)* **2013**, *13*, 4811–4840, doi:10.3390/s130404811.
 23. Frew, J. E.; Hill, H. A. O. Electrochemical biosensors. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 933A-944A, doi:10.1021/ac00142a001.
 24. Cass, A. E. G.; Davis, G.; Francis, G. D.; Hill, H. A. O.; Aston, W. J.; Higgins, I. J.; Plotkin, E. V.; Scott, L. D. L.; Turner, A. P. F. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 667–671, doi:10.1021/ac00268a018.
 25. Fabry, P.; Fouletier, J. Amperometric Sensors. In *Chemical and Biological Microsensors: Applications in Fluid Media*; Wiley-ISTE, 2009; pp. 115–171 ISBN 978-1-84821-142-1.
 26. Ferri, S.; Kojima, K.; Sode, K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2011**, *5*, 1068–1076, doi:10.1177/193229681100500507.
 27. Mecheri, B.; De Porcellinis, D.; Campana, P. T.; Rainer, A.; Trombetta, M.; Marletta, A.; Oliveira, O. N.; Licocchia, S. Tuning Structural Changes in Glucose Oxidase for Enzyme Fuel Cell Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 28311–28318, doi:10.1021/acsami.5b08610.
 28. Newman, J. D.; Turner, A. P. F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2435–2453, doi:10.1016/j.bios.2004.11.012.
 29. Matthews, D.; Holman, R.; Bown, E.; Steemson, J.; Watson, A.; Hughes, S.; Scott, D. Pen-sized digital 30-second blood glucose meter. *Lancet* **1987**, *1*, 778–9.
 30. Wang, J. Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 983–988, doi:10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::AID-ELAN983>3.0.CO;2-#.
 31. Willner, I.; Heleg-Shabtai, V.; Blonder, R.; Katz, E.; Tao, G.; Bückmann, A. F.; Heller, A. Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers

- Assembled onto Au-Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10321–10322, doi:10.1021/ja9608611.
32. Henry, C. Getting under the skin: Implantable Glucose Sensors. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 594A–598A, doi:10.1021/ac981937+.
 33. Alva, S. FreeStyle Lite—A Blood Glucose Meter That Requires No Coding. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2008**, *2*, 546–551, doi:10.1177/193229680800200402.
 34. Lock, J. P.; Brazg, R.; Bernstein, R. M.; Taylor, E.; Patel, M.; Ward, J.; Alva, S.; Chen, T.; Welsh, Z.; Amor, W.; Bhogal, C.; Ng, R. Performance of a New Test Strip for FreeStyle Blood Glucose Monitoring Systems. *Diabetes Technol. Ther.* **2011**, *13*, 1–10, doi:10.1089/dia.2010.0116.
 35. Goriushkina, T. B.; Soldatkin, A. P.; Dzyadevych, S. V Application of amperometric biosensors for analysis of ethanol, glucose, and lactate in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6528–35, doi:10.1021/jf9009087.
 36. Velasco-Garcia, M. N.; Mottram, T. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosyst. Eng.* **2003**, *84*, 1–12, doi:10.1016/S1537-5110(02)00236-2.
 37. Baxter, G. A.; O'Connor, M. C.; Haughey, S. A.; Crooks, S. R. H.; Elliott, C. T. Evaluation of an immunobiosensor for the on-site testing of veterinary drug residues at an abattoir. Screening for sulfamethazine in pigs. *Analyst* **1999**, *124*, 1315–1318, doi:10.1039/a904122b.
 38. Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1405–23, doi:10.1016/j.bios.2005.07.012.
 39. Zhang, Y.; Liu, H.; Yang, Z.; Ji, S.; Wang, J.; Pang, P.; Feng, L.; Wang, H.; Wu, Z.; Yang, W. An acetylcholinesterase inhibition biosensor based on a reduced graphene oxide/silver nanocluster/chitosan nanocomposite for detection of organophosphorus pesticides. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 6213–6219, doi:10.1039/c5ay01439e.
 40. Ohara, T. J.; Rajagopalan, R.; Heller, A. “Wired” Enzyme Electrodes for Amperometric Determination of Glucose or Lactate in the Presence of Interfering Substances. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2451–2457, doi:10.1021/ac00087a008.
 41. Willner, B.; Katz, E.; Willner, I. Electrical contacting of redox proteins by nanotechnological means. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 589–596, doi:10.1016/j.copbio.2006.10.008.
 42. Campuzano, S.; Loaiza, O. A.; Pedrero, M.; de Villena, F. J. M.; Pingarrón, J. M. An integrated bienzyme glucose oxidase-fructose dehydrogenase-tetrathiafulvalene-3-mercaptopropionic acid-gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose. *Bioelectrochemistry* **2004**, *63*, 199–206, doi:10.1016/j.bioelechem.2003.10.019.
 43. Albanese, D.; Sannini, A.; Malvano, F.; Pilloton, R.; Di Matteo, M. Optimisation of Glucose Biosensors Based on Sol-Gel Entrapment and Prussian Blue-Modified Screen-Printed Electrodes for Real Food Analysis. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1002–1008, doi:10.1007/s12161-013-9705-6.
 44. Ammam, M.; Fransaer, J. Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. *Sensors Actuators, B Chem.* **2010**, *148*, 583–589,

doi:10.1016/j.snb.2010.05.027.

45. Alkire, R. C.; Kolb, D. M.; Lipkowsk, J. Amperometric Biosensors. In *Advances in Electrochemical Science and Engineering*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2011; p. 397 ISBN 9783527644117.
46. Bhardwaj, T. A review on immobilization techniques of biosensors. *Int. J. Eng. Res. Technol.* **2014**, *3*, 294–298.
47. Newman, J. D.; Setford, S. J. Enzymatic biosensors. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *32*, 249–68, doi:10.1385/MB:32:3:249.
48. Mulchandani, A. Principles of Enzyme Biosensors. In *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*; Mulchandani, A., Rogers, K. R., Eds.; Humana Press Inc: Totowa, New Jersey, 1998; pp. 3–14 ISBN 978-1-59259-484-9.
49. Perumal, V.; Hashim, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J. Appl. Biomed.* **2014**, *12*, 1–15, doi:10.1016/j.jab.2013.02.001.
50. Uddin Ahmed, M.; Zourob, M.; Tamiya, E. *Food Biosensors - Food Chemistry, Function and Analysis*; The Royal Society of Chemistry: Croydon, 2016; ISBN 9781782623908.
51. Vo-Dinh, T.; Cullum, D. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnosis. *J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 540–551.
52. Moina, C.; Ybarra, G. Fundamentals and Applications of Immunosensors. In *Advances in Immunoassay Technology*; Chiu, N. H. L., Ed.; InTech, 2012; pp. 65–80 ISBN 978-953-51-0440-7.
53. Sun, H.; Zhu, X.; Lu, P. Y.; Rosato, R. R.; Tan, W.; Zu, Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2014**, *3*, e182, doi:10.1038/mtna.2014.32.
54. Bäcker, M.; Rakowski, D.; Poghossian, A.; Biselli, M.; Wagner, P.; Schöning, M. J. Chip-based amperometric enzyme sensor system for monitoring of bioprocesses by flow-injection analysis. *J. Biotechnol.* **2013**, *163*, 371–376, doi:10.1016/j.jbiotec.2012.03.014.
55. Prodromidis, M. I.; Karayannis, M. I. Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 241–261, doi:10.1002/1521-4109(200202)14:4<241::AID-ELAN241>3.0.CO;2-P.
56. Monosik, R.; Stredansky, M.; Tkac, J.; Sturdik, E. Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. *Food Anal. Methods* **2012**, *5*, 40–53, doi:10.1007/s12161-011-9222-4.
57. Spahn, C.; Minteer, S. Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents Eng.* **2008**, *2*, 195–200, doi:10.2174/187221208786306333.
58. Saerens, D.; Huang, L.; Bonroy, K.; Muyldermans, S. Antibody fragments as probe in biosensor development. *Sensors* **2008**, *8*, 4669–4686, doi:10.3390/s8084669.
59. Warsinke, A.; Benkert, A.; Scheller, F. W. Electrochemical immunoassays. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 622–634, doi:10.1007/s002160051557.
60. Guide to protein purification. In *Methods in enzymology*; Burgess, R. R., Deutscher, M. P., Eds.; Academic Press Inc (Verlag), 2009; pp. 1–851 ISBN 978-0-12-374536-1.
61. Santos, A.; Davis, J. J.; Bueno, P. R. Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2014**, *S7*, doi:10.4172/2155-

9872.S7-016.

62. Zhao, Y.; Zheng, Y.; Kong, R.; Xia, L.; Qu, F. Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on horseradish peroxidase (HRP)-loaded silica-poly(acrylic acid) brushes for protein biomarker detection. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *75*, 383–388, doi:10.1016/j.bios.2015.08.065.
63. Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249–259, doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2003.10.022.
64. Denny-Brown The Light Histochemistry Side of Horseradish Peroxidase. *J. Histochem. Cytochem.* **1984**, *32*, 1554.
65. Gong, J.-L.; Gong, F.-C.; Zeng, G.-M.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. An Amperometric Immunosensor for the Newcastle Disease Antibody Assay. *Anal. Lett.* **2003**, *36*, 287–302, doi:10.1081/AL-120017691.
66. Gao, Z.-D.; Guan, F.-F.; Li, C.-Y.; Liu, H.-F.; Song, Y.-Y. Signal-amplified platform for electrochemical immunosensor based on TiO₂ nanotube arrays using a HRP tagged antibody-Au nanoparticles as probe. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 771–775, doi:10.1016/j.bios.2012.10.006.
67. Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 964–967, doi:10.1038/171964b0.
68. Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737–738, doi:10.1038/171737a0.
69. Kogan, S. C.; Doherty, M.; Gitschier, J. An Improved Method for Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases by Analysis of Amplified DNA Sequences. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *317*, 985–990, doi:10.1056/NEJM198710153171603.
70. Palecek, E.; Scheller, F.; Wang, J. *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*; Elsevier, 2005; ISBN 044452150X.
71. Fojta, M. Electrochemical Sensors for DNA Interactions and Damage. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1449–1463, doi:10.1002/1521-4109(200211)14:21<1449::AID-ELAN1449>3.0.CO;2-Z.
72. Liu, A.; Wang, K.; Weng, S.; Lei, Y.; Lin, L.; Chen, W.; Lin, X.; Chen, Y. Development of electrochemical DNA biosensors. *Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 101–111, doi:10.1016/j.trac.2012.03.008.
73. Odenthal, K. J.; Gooding, J. J. An introduction to electrochemical DNA biosensors. *Analyst* **2007**, *132*, 603–610, doi:10.1039/b701816a.
74. Millan, K. M.; Saraullo, A.; Mikkelsen, S. R. Voltammetric DNA Biosensor for Cystic Fibrosis Based on a Modified Carbon Paste Electrode. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2943–2948, doi:10.1021/ac00090a023.
75. Korri-Yousoufi, H.; Garnier, F.; Srivastava, P.; Godillot, P.; Yassar, A. Toward Bioelectronics: Specific DNA Recognition Based on an Oligonucleotide-Functionalized Polypyrrole. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7388–7389, doi:10.1021/ja964261d.
76. Ozsoz, M.; Erdem, A.; Kara, P.; Kerman, K.; Ozkan, D. Electrochemical Biosensor for the Detection of Interaction Between Arsenic Trioxide and DNA Based on Guanine Signal. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 613–619, doi:10.1002/elan.200390077.

77. Yang, M.; McGovern, M. E.; Thompson, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *346*, 259–275, doi:10.1016/S0003-2670(97)90055-6.
78. Koshland, D. E. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1994**, *33*, 2375–2378, doi:10.1002/anie.199423751.
79. James, L. C.; Tawfik, D. S. Conformational diversity and protein evolution - A 60-year-old hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 361–368, doi:10.1016/S0968-0004(03)00135-X.
80. Brunt, J. Van Oxidoreductase enzymes in biotechnology. *Nature* **1988**, *6*, 1151–1156.
81. Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 126–139, doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
82. Sirisha, V. L.; Jain, A.; Jain, A. *Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2016; Vol. 79; ISBN 978-3-319-41416-4.
83. Monosik, R.; Streansky, M.; Sturdik, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chim. Slovaca* **2012**, *5*, 109–120, doi:10.2478/v10188-012-0017-z.
84. May, S. W. Applications of oxidoreductases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 370–375, doi:10.1016/S0958-1669(99)80067-6.
85. Suelter, C. H.; Kricka, L.; Kauffmann, J.-M.; Guilbault, G. G. Enzyme Electrode Biosensors: Theory and Applications. In *Methods of Biochemical Analysis, Volume 36*; Suelter, C. H., Kricka, L., Eds.; Methods of Biochemical Analysis; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1992; Vol. 36, p. 113 ISBN 9780470110577.
86. Moser, I.; Jobst, G.; Urban, G. A. Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 297–302, doi:10.1016/S0956-5663(01)00298-6.
87. Paredes, P. A.; Parellada, J.; Fernández, V. M.; Katakis, I.; Domínguez, E. Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for the determination of fructose in food analysis. *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 1233–1243, doi:10.1016/S0956-5663(97)00090-0.
88. Umar, A.; Rahman, M. M.; Vaseem, M.; Hahn, Y.-B. Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles. *Electrochem. commun.* **2009**, *11*, 118–121, doi:10.1016/j.elecom.2008.10.046.
89. Kwan, R. C. H.; Chan, C.; Renneberg, R. An amperometric biosensor for determining amino acids using a bienzymatic system containing amino acid oxidase and protease. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1203–1207, doi:10.1023/A:1016163315804.
90. Costa Rama, E.; Biscay, J.; González García, M. B.; Reviejo, A. J.; Pingarrón Carrazón, J. M.; Costa García, A. Comparative study of different alcohol sensors based on Screen-Printed Carbon Electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *728*, 69–76, doi:10.1016/j.aca.2012.03.039.
91. Kirgöz, U. A.; Odacı, D.; Timur, S.; Merkoçi, A.; Alegret, S.; Beşün, N.; Telefoncu, A. A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 165–9, doi:10.1016/j.aca.2006.04.010.

92. Campbell, A. S.; Kim, J.; Wang, J. Wearable electrochemical alcohol biosensors. *Curr. Opin. Electrochem.* **2018**, *10*, 126–135, doi:10.1016/j.coelec.2018.05.014.
93. Dirección General de Tráfico (DGT). Ministerio del Interior Balance de Seguridad Vial Available online: http://www.dgt.es/Galerias/prensa/2015/01/bal_2014_dgt_mir.pdf.
94. Gamella, M.; Campuzano, S.; Manso, J.; Rivera, G. G. de; López-Colino, F.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. A novel non-invasive electrochemical biosensing device for in situ determination of the alcohol content in blood by monitoring ethanol in sweat. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *806*, 1–7, doi:10.1016/j.aca.2013.09.020.
95. Mieliauskiene, R.; Nistor, M.; Laurinavicius, V.; Csöregi, E. Amperometric determination of acetate with a tri-enzyme based sensor. *Sensors Actuators B Chem.* **2006**, *113*, 671–676, doi:10.1016/J.SNB.2005.07.016.
96. Soldatkin, O. O.; Peshkova, V. M.; Dzyadevych, S. V.; Soldatkin, A. P.; El'skaya, A. V. Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, *28*, 959–964, doi:10.1016/J.MSEC.2007.10.034.
97. Maines, A.; Prodromidis, M. I.; Tzouwara-Karayanni, S. M.; Karayannis, M. I.; Ashworth, D.; Vadgama, P. An Enzyme Electrode for Extended Linearity Citrate Measurements Based on Modified Polymeric Membranes. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1118–1123, doi:10.1002/1521-4109(200010)12:14<1118::AID-ELAN1118>3.0.CO;2-0.
98. Wang, Q.; Yang, L.; Yang, X.; Wang, K.; He, L.; Zhu, J. Electrochemical biosensors for detection of point mutation based on surface ligation reaction and oligonucleotides modified gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *688*, 163–167, doi:10.1016/J.ACA.2011.01.004.
99. Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
100. Ciaurriz, P.; Bravo, E.; Hamad-Schifferli, K. Effect of architecture on the activity of glucose oxidase/horseradish peroxidase/carbon nanoparticle conjugates. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *414*, 73–81, doi:10.1016/j.jcis.2013.09.039.
101. Uversky, V. N. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 739–756, doi:10.1110/ps.4210102.matic.
102. Ohgushi, M.; Wada, A. “Molten-globule state”: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Lett.* **1983**, *164*, 21–24, doi:10.1016/0014-5793(83)80010-6.
103. Dumitrașcu, L.; Stănciuc, N.; Bahrim, G. E.; Ciumac, A.; Aprodu, I. pH and heat-dependent behaviour of glucose oxidase down to single molecule level by combined fluorescence spectroscopy and molecular modelling. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1906–1914, doi:10.1002/jsfa.7296.
104. Sun, X.; T., W.; N., V. Applications of Bioinformatics and Experimental Methods to Intrinsic Disorder-Based Protein-Protein Interactions. In *Protein Engineering*; InTech, 2012; pp. 181–206 ISBN 978-953-51-0037-9.
105. Cass, T.; Ligler, F. S. *Immobilized biomolecules in analysis: a practical approach*; Oxford University Press, 1998; ISBN 9780199636365.
106. Wang, J. *Analytical electrochemistry*; Third.; John Wiley & Sons: New Jersey, 2006; ISBN

9780471678793.

107. Ambrózy, A.; Hlavatá, L.; Labuda, J. Protective membranes at electrochemical biosensors. *Acta Chim. Slovaca* **2013**, *6*, 35–41, doi:10.2478/acs-2013-0007.
108. Tsai, Y. C.; Li, S. C.; Chen, J. M. Cast thin film biosensor design based on a nafion backbone, a multiwalled carbon nanotube conduit, and a glucose oxidase function. *Langmuir* **2005**, *21*, 3653–3658, doi:10.1021/la0470535.
109. Tang, H.; Chen, J.; Yao, S.; Nie, L.; Deng, G.; Kuang, Y. Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode. *Anal. Biochem.* **2004**, *331*, 89–97, doi:10.1016/j.ab.2004.05.005.
110. Vaidya, R.; Wilkins, E. Effect of interference on amperometric glucose biosensors with cellulose acetate membranes. *Electroanalysis* **1994**, *6*, 677–682, doi:10.1002/elan.1140060811.
111. Emr, S. A.; Yacynych, A. M. Use of polymer films in amperometric biosensors. *Electroanalysis* **1995**, *7*, 913–923, doi:10.1002/elan.1140071002.
112. Madasamy, T.; Pandiaraj, M.; Balamurugan, M.; Bhargava, K.; Sethy, N. K.; Karunakaran, C. Copper, zinc superoxide dismutase and nitrate reductase coimmobilized bienzymatic biosensor for the simultaneous determination of nitrite and nitrate. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 209–15, doi:10.1016/j.bios.2013.08.036.
113. Fortier, G.; Brassard, E.; Bélanger, D. Optimization of a polypyrrole glucose oxidase biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **1990**, *5*, 473–90, doi:10.1016/0956-5663(90)80036-D.
114. Cosnier, S.; Senillou, A.; Grätzel, M.; Comte, P.; Vlachopoulos, N.; Jaffrezic Renault, N.; Martelet, C. A glucose biosensor based on enzyme entrapment within polypyrrole films electrodeposited on mesoporous titanium dioxide. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *469*, 176–181, doi:10.1016/S0022-0728(99)00223-5.
115. Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **2013**, *3*, 1–9, doi:10.1007/s13205-012-0071-7.
116. Banica, F.-G. *Chemical Sensors and Biosensors. Fundamentals and Applications*; Fogg, A. G., Ed.; Wiley, 2012; ISBN 9780470710661.
117. Bhakta, S. A.; Evans, E.; Benavidez, T. E.; Garcia, C. D. Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *872*, 7–25, doi:10.1016/j.aca.2014.10.031.
118. Cai, C.; Chen, J. Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 75–83, doi:10.1016/j.ab.2004.05.057.
119. Pang, X.; He, D.; Luo, S.; Cai, Q. An amperometric glucose biosensor fabricated with Pt nanoparticle-decorated carbon nanotubes/TiO₂ nanotube arrays composite. *Sensors Actuators B Chem.* **2009**, *137*, 134–138, doi:10.1016/j.snb.2008.09.051.
120. He, H.; Pham-Huy, L. A.; Dramou, P.; Xiao, D.; Zuo, P.; Pham-Huy, C. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–12, doi:10.1155/2013/578290.
121. Zhao, W.; Yang, R. J.; Qian, T. T.; Hua, X.; Zhang, W. Bin; Katiyo, W. Preparation of novel poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate)-grafted core-shell magnetic

- chitosan microspheres and immobilization of lactase. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 12073–12089, doi:10.3390/ijms140612073.
122. Younes, I.; Rinaudo, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1133–74, doi:10.3390/md13031133.
 123. López, A.; Lázaro, N.; Marqués, A. M. The interphase technique: A simple method of cell immobilization in gel-beads. *J. Microbiol. Methods* **1997**, *30*, 231–234, doi:10.1016/S0167-7012(97)00071-7.
 124. Pourjavadi, A.; Harzandi, A. M.; Hosseinzadeh, H. Modified carrageenan 3. Synthesis of a novel polysaccharide-based superabsorbent hydrogel via graft copolymerization of acrylic acid onto kappa-carrageenan in air. *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 1363–1370, doi:10.1016/j.eurpolymj.2004.02.016.
 125. Martinsen, a; Skjåk-Braek, G.; Smidsrød, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *33*, 79–89, doi:10.1002/bit.260330111.
 126. Coulet, P. R.; Julliard, J. H.; Gautheron, D. C. A mild method of general use for covalent coupling of enzymes to chemically activated collagen films. *Biotechnol. Bioeng.* **1974**, *16*, 1055–1068, doi:10.1002/bit.260160806.
 127. Baxamusa, S. H.; Montero, L.; Dubach, J. M.; Clark, H. A.; Borros, S.; Gleason, K. K. Protection of sensors for biological applications by photoinitiated chemical vapor deposition of hydrogel thin films. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2857–2862, doi:10.1021/bm800632d.
 128. Suginta, W.; Khunkaewla, P.; Schulte, A. Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5458–79, doi:10.1021/cr300325r.
 129. Zuber, M.; Barikani, M. *Advances in Natural Polymers*; Thomas, S., Visakh, P. M., Mathew, A. P., Eds.; Advanced Structured Materials; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; Vol. 18; ISBN 978-3-642-20939-0.
 130. Brychcy, E.; Malik, M.; Drozdowski, P.; Król, Z.; Jarmoluk, A. Physicochemical and antibacterial properties of carrageenan and gelatine hydrosols and hydrogels incorporated with acidic electrolyzedwater. *Polymers (Basel)*. **2015**, *7*, 2638–2649, doi:10.3390/polym7121534.
 131. Blakemore, W. R.; Harpell, A. R. Carrageenan. In *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*; Imeson, A., Ed.; Blackwell Publishing Ltd, 2010; pp. 73–94 ISBN 9781405132671.
 132. Cassidy, M. B.; Leung, K. T.; Lee, H.; Trevors, J. T. Survival of lac-lux marked *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr cells encapsulated in κ-carrageenan and alginate. *J. Microbiol. Methods* **1995**, *23*, 281–290, doi:10.1016/0167-7012(95)00038-M.
 133. Montero, L.; Gabriel, G.; Guimerà, A.; Villa, R.; Gleason, K. K. Increasing biosensor response through hydrogel thin film deposition : Influence of hydrogel thickness. *Vacuum* **2012**, *86*, 2102–2104, doi:10.1016/j.vacuum.2012.06.002.
 134. Chan, K.; Gleason, K. K. Initiated Chemical Vapor Deposition of Linear and Cross-linked Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for Use as Thin-Film Hydrogels. *Langmuir* **2005**, *21*, 8930–8939, doi:10.1021/la051004q.

135. Marí-Buyé, N.; O'Shaughnessy, S.; Colominas, C.; Semino, C. E.; Gleason, K. K.; Borrós, S. Functionalized, Swellable Hydrogel Layers as a Platform for Cell Studies. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 1–11, doi:10.1002/adfm.200801561.
136. Montero, L.; Baxamusa, S. H.; Borros, S.; Gleason, K. K. Thin hydrogel films with nanoconfined surface reactivity by photoinitiated chemical vapor deposition. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 399–403, doi:10.1021/cm802737m.
137. Zanardi, C.; Pigani, L.; Maccaferri, G.; Degli Esposti, M.; Fabbri, P.; Zannini, P.; Seeber, R. Development of a redox polymer based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for disposable amperometric sensors. *Electrochem. commun.* **2016**, *62*, 34–37, doi:10.1016/j.elecom.2015.10.024.
138. Ferrari, L.; Rovati, L.; Fabbri, P.; Pilati, F.; Ferrari, L.; Rovati, L.; Fabbri, P.; Pilati, F. Disposable Fluorescence Optical pH Sensor for Near Neutral Solutions. *Sensors* **2013**, *13*, 484–499, doi:10.3390/s130100484.
139. Radulescu, M. C.; Bucur, B.; Bucur, M. P.; Radu, G. L. Biezymatic biosensor for rapid detection of aspartame by flow injection analysis. *Sensors (Basel)*. **2014**, *14*, 1028–1038, doi:10.3390/s140101028.
140. Gashtasbi, F.; Ahmadian, G.; Noghabi, K. A. New insights into the effectiveness of alpha-amylase enzyme presentation on the Bacillus subtilis spore surface by adsorption and covalent immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* **2014**, *64–65*, 17–23, doi:10.1016/j.enzmictec.2014.05.006.
141. Dhar Malhotra, B.; Mouli Pandey, C. *Biosensors : fundamentals and applications*; First Edit.; Smithers Rapra Technology Ltd: Shawbury, 2017; ISBN 978-1-91024-278-0.
142. Zhang, Z.; Xie, Y.; Liu, Z.; Rong, F.; Wang, Y.; Fu, D. Covalently immobilized biosensor based on gold nanoparticles modified TiO₂ nanotube arrays. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *650*, 241–247, doi:10.1016/j.jelechem.2010.10.016.
143. Francesch, L.; Garreta, E.; Balcells, M.; Edelman, E. R.; Borrós, S. Fabrication of bioactive surfaces by plasma polymerization techniques using a novel acrylate-derived monomer. *Plasma Process. Polym.* **2005**, *2*, 605–611, doi:10.1002/ppap.200500042.
144. Duque, L.; Queralto, N.; Francesch, L.; Bumbu, G. G.; Borros, S.; Berger, R.; Förch, R. Reactions of plasma-polymerised pentafluorophenyl methacrylate with simple amines. *Plasma Process. Polym.* **2010**, *7*, 915–925, doi:10.1002/ppap.201000058.
145. Duque, L.; Menges, B.; Borros, S.; Förch, R. Immobilization of biomolecules to plasma polymerized pentafluorophenyl methacrylate. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2818–2823, doi:10.1021/bm100910q.
146. Cifuentes, A.; Borrós, S. Comparison of two different plasma surface-modification techniques for the covalent immobilization of protein monolayers. *Langmuir* **2013**, *29*, 6645–6651, doi:10.1021/la400597e.
147. Cifuentes-Rius, A.; de Pablo, A.; Ramos-Perez, V.; Borros, S. Tailoring carbon nanotubes surface for gene delivery applications. *Plasma Process. Polym.* **2014**, *11*, 704–713, doi:10.1002/ppap.201300167.
148. Mikhailov, S. N.; Zakharova, A. N.; Drenichev, M. S.; Ershov, A. V.; Kasatkina, M. A.; Vladimirov, L. V.; Novikov, V. V.; Kildeeva, N. R. Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Derivatives of Nucleosides and Nucleotides. Mechanism and Comparison with Glutaraldehyde. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2016**, *35*, 114–129,

doi:10.1080/15257770.2015.1114132.

149. Damborsky, P.; Svitel, J.; Katrlík, J. Optical biosensors. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 91–100, doi:10.1042/EBC20150010.
150. Cooper, M. A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 515–528, doi:10.1038/nrd838.
151. Deng, L.; Wang, Y.; Shang, L.; Wen, D.; Wang, F.; Dong, S. A sensitive NADH and glucose biosensor tuned by visible light based on thionine bridged carbon nanotubes and gold nanoparticles multilayer. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 951–957, doi:10.1016/J.BIOS.2008.07.066.
152. Pilolli, R.; Monaci, L.; Visconti, A. Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. *Trends Anal. Chem.* **2013**, *47*, 12–26, doi:10.1016/j.trac.2013.02.005.
153. Xie, B.; Ramanathan, K.; Danielsson, B. Principles of Enzyme Thermistor Systems: Applications to Biomedical and Other Measurements. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1999**, *64*, 1–33, doi:10.1007/3-540-49811-7_1.
154. Darsanaki, R. K.; Researchers, Y.; Club, E. Biosensors : Functions and Applications. *J. Biol. Today's World* **2013**, *2*, 20–23, doi:10.15412/J.JBTW.01020105.
155. Fogel, R.; Mashazi, P.; Nyokong, T.; Limson, J. Critical assessment of the Quartz Crystal Microbalance with Dissipation as an analytical tool for biosensor development and fundamental studies: Metallophthalocyanine-glucose oxidase biocomposite sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 95–101, doi:10.1016/j.bios.2007.03.012.
156. Wang, J. SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3011–3016, doi:10.1093/nar/28.16.3011.
157. Zhang, S.; Bai, H.; Luo, J.; Yang, P.; Cai, J. A recyclable chitosan-based QCM biosensor for sensitive and selective detection of breast cancer cells in real time. *Analyst* **2014**, *139*, 6259–6265, doi:10.1039/C4AN01532K.
158. Yuan, B.; Zhu, T.; Zhang, Z.; Jiang, Z.; Ma, Y. Self-assembly of multilayered functional films based on graphene oxide sheets for controlled release. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 3471, doi:10.1039/c0jm03643a.
159. Yin, Y.; Nosworthy, N. J.; Youssef, H.; Gong, B.; Bilek, M. M. M.; McKenzie, D. R. Acetylene plasma coated surfaces for covalent immobilization of proteins. *Thin Solid Films* **2009**, *517*, 5343–5346, doi:10.1016/j.tsf.2009.03.045.
160. Tang, Y.; Wang, Z.; Xiao, J.; Yang, S.; Wang, Y. J.; Tong, P. Studies of Phospholipid Vesicle Deposition/Transformation on a Polymer Surface by Dissipative Quartz Crystal Microbalance and Atomic Force Microscopy. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 14925–14933, doi:10.1021/jp9068224.
161. Walker, J. M. Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols. In *Methods in Biotechnology*; Mulchandani, A., Rogers, K. R., Eds.; New Jersey, 1998; p. 269 ISBN 978-1-59259-484-9.
162. Wang, X.; Dzyadevych, S. V.; Chovelon, J. M.; Renault, N. J.; Chen, L.; Xia, S.; Zhao, J. Development of a conductometric nitrate biosensor based on Methyl viologen/Nafion® composite film. *Electrochem. commun.* **2006**, *8*, 201–205, doi:10.1016/j.elecom.2005.11.006.

163. Lai, C. Y. (Kevin); Foot, P. J. S.; Brown, J. W.; Spearman, P. A urea potentiometric biosensor based on a thiophene copolymer. *Biosensors* **2017**, *7*, 1–13, doi:10.3390/bios7010013.
164. Feng, C.; Xu, G.; Liu, H.; Lv, J.; Zheng, Z.; Wu, Y. Glucose biosensors based on Ag nanoparticles modified TiO₂ nanotube arrays. *J. Solid State Electrochem.* **2013**, doi:10.1007/s10008-013-2257-2.
165. Mohammad, R.; Ahmad, M.; Heng, L.; Mohammad, R.; Ahmad, M.; Heng, L. Y. An Amperometric Biosensor Utilizing a Ferrocene-Mediated Horseradish Peroxidase Reaction for the Determination of Capsaicin (Chili Hotness). *Sensors* **2013**, *13*, 10014–10026, doi:10.3390/s130810014.
166. Wang, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst* **2005**, *130*, 421, doi:10.1039/b414248a.
167. Shen, X.; Xia, X.; Du, Y.; Ye, W.; Wang, C. Amperometric Glucose Biosensor Based on AuPd Modified Reduced Graphene Oxide/Polyimide Film with Glucose Oxidase. *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164*, B285–B291, doi:10.1149/2.1591706jes.
168. Fu, J.; Reinhold, J.; Woodbury, N. W. Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization. *PLoS One* **2011**, *6*, 2–7, doi:10.1371/journal.pone.0018692.
169. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58, doi:10.1038/354056a0.
170. Masuda, H.; Fukuda, K. Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina. *Science (80-)*. **1995**, *268*, 1466–1468, doi:10.1126/science.268.5216.1466.
171. Macak, J. M.; Tsuchiya, H.; Ghicov, A.; Yasuda, K.; Hahn, R.; Bauer, S.; Schmuki, P. TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2007**, *11*, 3–18, doi:10.1016/j.cossms.2007.08.004.
172. Yang, L.; Luo, S.; Cai, Q.; Yao, S. A review on TiO₂ nanotube arrays: Fabrication, properties, and sensing applications. *Chinese Sci. Bull.* **2010**, *55*, 331–338, doi:10.1007/s11434-009-0712-3.
173. Kaplan, R.; Erjavec, B.; Dražić, G.; Grdadolnik, J.; Pintar, A. Simple synthesis of anatase/rutile/brookite TiO₂ nanocomposite with superior mineralization potential for photocatalytic degradation of water pollutants. *Appl. Catal. B Environ.* **2016**, *181*, 465–474, doi:10.1016/j.apcatb.2015.08.027.
174. Dambournet, D.; Belharouak, I.; Amine, K. Tailored Preparation Methods of TiO₂ Anatase, Rutile, Brookite: Mechanism of Formation and Electrochemical Properties †. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 1173–1179, doi:10.1021/cm902613h.
175. Liao, Y.; Que, W. Preparation and photocatalytic activity of TiO₂ nanotube powders derived by a rapid anodization process. *J. Alloys Compd.* **2010**, *505*, 243–248, doi:10.1016/j.jallcom.2010.06.038.
176. Cheng, F.; Tao, Z.; Liang, J.; Chen, J. Template-Directed Materials for Rechargeable Lithium-Ion Batteries †. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 667–681, doi:10.1021/cm702091q.
177. Wang, M.; Guo, D.; Li, H. High activity of novel Pd/TiO₂ nanotube catalysts for methanol electro-oxidation. *J. Solid State Chem.* **2005**, *178*, 1996–2000, doi:10.1016/j.jssc.2005.04.006.

178. Sun, X.; Li, Y. Synthesis and characterization of ion-exchangeable titanate nanotubes. *Chemistry* **2003**, *9*, 2229–38, doi:10.1002/chem.200204394.
179. Tang, X.-P.; Ng, N. C.; Nguyen, H.; Mogilevsky, G.; Wu, Y. The molecular dynamics and melting transition of the confined ibuprofen in titania nanotube studied by NMR. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *452*, 289–295, doi:10.1016/j.cplett.2008.01.007.
180. Oh, S.-H.; Finões, R. R.; Daraio, C.; Chen, L.-H.; Jin, S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4938–43, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.048.
181. Park, J.; Bauer, S.; von der Mark, K.; Schmuki, P. Nanosize and vitality: TiO₂ nanotube diameter directs cell fate. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1686–91, doi:10.1021/nl070678d.
182. Li, W.; Wang, F.; Feng, S.; Wang, J.; Sun, Z.; Li, B.; Li, Y.; Yang, J.; Elzatahry, A. A.; Xia, Y.; Zhao, D. Sol-gel design strategy for ultradispersed TiO₂ nanoparticles on graphene for high-performance lithium ion batteries. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18300–3, doi:10.1021/ja4100723.
183. Bavykin, D. V.; Parmon, V. N.; Lapkin, A. A.; Walsh, F. C. The effect of hydrothermal conditions on the mesoporous structure of TiO₂ nanotubes. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 3370, doi:10.1039/b406378c.
184. Ruan, C.; Paulose, M.; Varghese, O. K.; Mor, G. K.; Grimes, C. a Fabrication of highly ordered TiO₂ nanotube arrays using an organic electrolyte. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15754–9, doi:10.1021/jp052736u.
185. Hulteen, J. C.; Martin, C. R. A general template-based method for the preparation of nanomaterials. *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1075–1087, doi:10.1039/a700027h.
186. Kasuga, T.; Hiramatsu, M.; Hoson, A.; Sekino, T.; Niihara, K. Formation of Titanium Oxide Nanotube. *Langmuir* **1998**, *14*, 3160–3163, doi:10.1021/la9713816.
187. Gong, D.; Grimes, C. a.; Varghese, O. K.; Hu, W.; Singh, R. S.; Chen, Z.; Dickey, E. C. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *J. Mater. Res.* **2001**, *16*, 3331–3334, doi:10.1557/JMR.2001.0457.
188. Grimes, C. A.; Mor, G. K. *TiO₂ Nanotube Arrays: Synthesis, Properties and Applications*; Springer: New York, 2009; ISBN 9781441900678.
189. Bavykin, D. V.; Walsh, F. C. *Titanate and Titania Nanotubes: Synthesis, Properties and Applications*; O'Brien, P., Kroto, S. H., Craighead, H., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2009; ISBN 978-1-84755-910-4.
190. Macak, J. M.; Hildebrand, H.; Marten-Jahns, U.; Schmuki, P. Mechanistic aspects and growth of large diameter self-organized TiO₂ nanotubes. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *621*, 254–266, doi:10.1016/j.jelechem.2008.01.005.
191. Schultze, J. W.; Lohrengel, M. M. Stability, reactivity and breakdown of passive films. Problems of recent and future research. *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2499–2513, doi:10.1016/S0013-4686(00)00347-9.
192. Grimes, C. a. Synthesis and application of highly ordered arrays of TiO₂ nanotubes. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1451–1457, doi:10.1039/b701168g.
193. Prakasam, H. E.; Shankar, K.; Paulose, M.; Varghese, O. K.; Grimes, C. A. A New Benchmark for TiO₂ Nanotube Array Growth by Anodization. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 7235–7241, doi:10.1021/jp070273h.

194. Benvenuto, P.; Kafi, a. K. M.; Chen, A. High performance glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto modified titania nanotube arrays. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *627*, 76–81, doi:10.1016/j.jelechem.2008.12.022.
195. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*; Second Edi.; John Wiley & Sons, Inc.: Austin, 2001; ISBN 0-471-04372-9.
196. Ermer, J.; Nethercote, P. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*; Ermer, J., Nethercote, P., Eds.; Second.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015; ISBN 9780470467091.
197. AOAC Official Method Analysis *AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*; 2005;
198. Unnikrishnan, B.; Palanisamy, S.; Chen, S.-M. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene-glucose oxidase biocomposite. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *39*, 70–75, doi:10.1016/j.bios.2012.06.045.
199. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. In *The Gold Book*; A. D. McNaught, Wilkinson, A., Eds.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1997 ISBN 0-9678550-9-8.
200. Huber, L. Validation of Analytical Methods and Procedures Available online: <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx> (accessed on Jan 6, 2019).
201. de Vries, P. Targeted selection of existing aquatic in vivo bioassay data in ecotoxicological hazard quantification. *Wageningen Wageningen Univ.* **2018**, doi:10.18174/430498.
202. AOAC *Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures*; 1998;
203. ISO; IUPAC; AOAC International HARMONISED GUIDELINES FOR THE IN-HOUSE VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS (TECHNICAL REPORT) ; 1999
204. Kong, F. Y.; Gu, S. X.; Li, W. W.; Chen, T. T.; Xu, Q.; Wang, W. A paper disk equipped with graphene/polyaniline/Au nanoparticles/glucose oxidase biocomposite modified screen-printed electrode: Toward whole blood glucose determination. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 77–82, doi:10.1016/j.bios.2013.12.067.
205. Chandra Sekar, N.; Mousavi Shaegh, S. A.; Ng, S. H.; Ge, L.; Tan, S. N. A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *204*, 414–420, doi:10.1016/j.snb.2014.07.103.
206. Lin, Y.; Hu, L.; Yin, L.; Guo, L. Electrochemical glucose biosensor with improved performance based on the use of glucose oxidase and Prussian Blue incorporated into a thin film of self-polymerized dopamine. *Sensors Actuators, B Chem.* **2015**, *210*, 513–518, doi:10.1016/j.snb.2014.12.107.
207. Tao, J. Z.; Xu, G. R.; Hao, H. L.; Yang, F. X.; Ahn, K. S.; Lee, W. Y. Poly(m-phenylenediamine)-Prussian blue hybrid film formed by one-step electrochemical deposition for glucose biosensor. *J. Electroanal. Chem.* **2013**, *689*, 96–102, doi:10.1016/j.jelechem.2012.09.043.
208. Esmaeili, C.; Abdi, M.; Mathew, A.; Jonoobi, M.; Oksman, K.; Rezayi, M. Synergy Effect of Nanocrystalline Cellulose for the Biosensing Detection of Glucose. *Sensors* **2015**, *15*, 24681–24697, doi:10.3390/s151024681.

209. Eggins, B. R. *Analytical Techniques in the Science - Chemical Sensor and Biosensor*; John Wiley & Sons: Jordanstown Northern Ireland, UK, 2002; ISBN 0 471 89914 3.
210. Hobbs, J. M.; Patel, N. N.; Kim, D. W.; Rugutt, J. K.; Wanekaya, A. K. Glucose Determination in Beverages Using Carbon Nanotube Modified Biosensor: An Experiment for the Undergraduate Laboratory. *J. Chem. Educ.* **2013**, *90*, 1222–1226, doi:10.1021/ed300429a.
211. Guo, X.; Liang, B.; Jian, J.; Zhang, Y.; Ye, X. Glucose biosensor based on a platinum electrode modified with rhodium nanoparticles and with glucose oxidase immobilized on gold nanoparticles. *Microchim. Acta* **2014**, *181*, 519–525, doi:10.1007/s00604-013-1143-z.
212. Neethirajan, S.; Ragavan, V.; Weng, X.; Chand, R. Biosensors for sustainable food engineering: Challenges and perspectives. *Biosensors* **2018**, *8*, doi:10.3390/bios8010023.
213. Barceló, D. *Biosensors for Sustainable Food - New Opportunities and Technical Challenges*; Scognamiglio, V., Rea, G., Arduini, F., Palleschi, G., Eds.; 1st Editio.; Elsevier, 2016; Vol. 74; ISBN 9780444635792.
214. Yasmin, J.; Ahmed, M. R.; Cho, B.-K. Biosensors and their applications in food safety: A review. *J. Biosyst. Eng.* **2016**, *41*, 240–254, doi:10.5307/JBE.2016.41.3.240.
215. Poltronieri, P.; Mezzolla, V.; Primiceri, E.; Maruccio, G. Biosensors for the Detection of Food Pathogens. *Foods* **2014**, *3*, 511–526, doi:10.3390/foods3030511.
216. Viswanathan, S.; Rani, C.; Ho, J. A. A. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode. *Talanta* **2012**, *94*, 315–319, doi:10.1016/j.talanta.2012.03.049.
217. Salinas-Castillo, A.; Pastor, I.; Mallavia, R.; Mateo, C. R. Immobilization of a trienzymatic system in a sol-gel matrix: A new fluorescent biosensor for xanthine. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 1053–1056, doi:10.1016/j.bios.2008.07.052.
218. Pizzariello, A.; Stredansky, M.; Miertus, S. Biosensors applications in food analysis. *RICHMAC Mag.* **2001**, 1–7.
219. Wu, H.; Li, H.; Chua, F. Z. H.; Li, S. F. Y. Rapid detection of melamine based on immunoassay using portable surface plasmon resonance biosensor. *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *178*, 541–546, doi:10.1016/j.snb.2012.12.089.
220. Ezhilan, M.; Gumpu, M. B.; Ramachandra, B. L.; Nesakumar, N.; Babu, K. J.; Krishnan, U. M.; Rayappan, J. B. B. Design and development of electrochemical biosensor for the simultaneous detection of melamine and urea in adulterated milk samples. *Sensors Actuators B Chem.* **2017**, *238*, 1283–1292, doi:10.1016/j.snb.2016.09.100.
221. Yang, R.; Huang, W.; Zhang, L.; Thomas, M.; Pei, X. Milk adulteration with melamine in China: crisis and response. *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods* **2009**, *1*, 111–116, doi:10.1111/j.1757-837X.2009.00018.x.
222. Borresen, E. C.; Henderson, A. J.; Kumar, A.; Weir, T. L.; Ryan, E. P. Fermented Foods: Patented Approaches and Formulations for Nutritional Supplementation and Health Promotion. *Recent Pat. Food. Nutr. Agric.* **2012**, *4*, 134–140, doi:10.2174/2212798411204020134.

223. Vanderroost, M.; Ragaert, P.; Devlieghere, F.; De Meulenaer, B. Intelligent food packaging: The next generation. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *39*, 47–62, doi:10.1016/j.tifs.2014.06.009.
224. Fan, Y.; Hu, G.; Zhang, T.; Dong, X.; Zhong, Y.; Li, X.; Miao, J.; Hua, S. Determination of Glucose in Food by the Ionic Liquid and Carbon Nanotubes Modified Dual-Enzymatic Sensors. *Food Anal. Methods* **2016**, *9*, 2491–2500, doi:10.1007/s12161-016-0439-0.
225. Balgobind, K.; Kanchi, S.; Sharma, D.; Bisetty, K.; Sabela, M. I. Hybrid of ZnONPs/MWCNTs for electrochemical detection of aspartame in food and beverage samples. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, *774*, 51–57, doi:10.1016/j.jelechem.2016.05.021.
226. Mansur, H. S.; Mansur, A. A. P.; Marques, M. E. Multi-enzymatic Systems with Designed 3D Architectures for Constructing Food Bioanalytical Sensors. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1166–1178, doi:10.1007/s12161-013-9730-5.
227. Kitikul, J.; Satienperakul, S.; Preechaworapun, A.; Pookmanee, P.; Tangkuaram, T. A Simple Flow Amperometric Electrochemical Biosensor Based on Chitosan Scaffolds and Gold Nanowires Modified on a Glassy Carbon Electrode for Detection of Glutamate in Food Products. *Electroanalysis* **2017**, *29*, 264–271, doi:10.1002/elan.201600263.
228. Patel, P. . (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 96–115, doi:10.1016/S0165-9936(01)00136-4.
229. Mello, L. D.; Kubota, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* **2002**, *77*, 237–256, doi:10.1016/S0308-8146(02)00104-8.
230. Chen, A.; Wang, R.; Bever, C. R. S.; Xing, S.; Hammock, B. D.; Pan, T. Smartphone-interfaced lab-on-a-chip devices for field-deployable enzyme-linked immunosorbent assay. *Biomicrofluidics* **2014**, *8*, 064101, doi:10.1063/1.4901348.
231. Neethirajan, S.; Weng, X.; Tah, A.; Cordero, J. O.; Ragavan, K. V. Nano-biosensor platforms for detecting food allergens – New trends. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2018**, *18*, 13–30, doi:10.1016/j.sbsr.2018.02.005.
232. European Parliament and Council Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex III to Directive 2000/13/EC as regards certain food ingredients. *Off. J. Eur. Union of Eur. Union* **2007**, L310.
233. Malvano, F.; Albanese, D.; Pilloton, R.; Di Matteo, M. A new label-free impedimetric aptasensor for gluten detection. *Food Control* **2017**, *79*, 200–206, doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.033.
234. Eissa, S.; L'Hocine, L.; Siaj, M.; Zourob, M. A graphene-based label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of the egg allergen ovalbumin. *Analyst* **2013**, *138*, 4378, doi:10.1039/c3an36883a.
235. Pilas, J.; Yazici, Y.; Selmer, T.; Keusgen, M.; Schöning, M. Application of a Portable Multi-Analyte Biosensor for Organic Acid Determination in Silage. *Sensors* **2018**, *18*, 1470, doi:10.3390/s18051470.
236. Li, H.; Hu, X.; Zhu, H.; Zang, Y.; Xue, H. Amperometric Phenol Biosensor Based on a New Immobilization Matrix: Polypyrrole Nanotubes Derived from Methyl Orange as Dopant. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2017**, *12*, 6714–6728, doi:10.20964/2017.07.80.
237. Serna Cock, L.; Zetty Arenas, A. M.; Ayala Aponte, A. Use of Enzymatic Biosensors as

- Quality Indices: A Synopsis of Present and Future Trends in The Food Industry. *Chil. J. Agric. Res.* **2009**, *69*, 270–280, doi:10.4067/S0718-58392009000200017.
238. Gimba, C. E.; Abechi, S. E.; Abbas, N. S.; Gerald, I. U. Evaluation of caffeine, aspartame and sugar contents in energy drinks. *J. Chem. Pharm. Res.* **2014**, *6*, 39–43.
 239. Croitoru, M.; Fülöp, I.; Ajtay, M.; Balogh, C.; Dogaru, M. Direct HPLC-UV determination of cyclamate, saccharine and aspartame from soft drinks. *Acta Aliment.* **2011**, *40*, 459–465, doi:10.1556/AAlim.40.2011.4.5.
 240. Odacu, D.; Timur, S.; Telefoncu, A. Carboxyl esterase-alcohol oxidase based biosensor for the aspartame determination. *Food Chem.* **2004**, *84*, 493–496, doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.032.
 241. Bunney, J.; Williamson, S.; Atkin, D.; Jeanneret, M.; Cozzolino, D.; Chapman, J.; Power, A.; Chandra, S. The Use of Electrochemical Biosensors in Food Analysis. *Curr. Res. Nutr. Food Sci. J.* **2017**, *5*, 183–195, doi:10.12944/CRNFSJ.5.3.02.
 242. Ghani, T.; Ali, Z.; Mujahid, M.; Mehmood, M. Synthesis of Titanium Oxide Nanotubes by Anodization Method. *Int. J. Energy Appl. Technol.* **2016**, *3*, 14–20.
 243. Dacheville, F.; I, P. Y. S.; Roy, R. Pressure-temperature studies of anatase, brookite, rutile and TiO₂-II. *Am. Mineral.* **1968**, *53*, 1929–1939.
 244. Satoh, N.; Nakashima, T.; Yamamoto, K. Metastability of anatase: size dependent and irreversible anatase-rutile phase transition in atomic-level precise titania. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1959, doi:10.1038/srep01959.
 245. Artigues Cladera, M. Trabajo Final de Máster: Desarrollo de biosensores enzimáticos de glucosa i de glutamato a partir de un sustrato de nanotubos de óxido de titanio (IV), Universitat Ramon Llull, Institut Químic de Sarrià, 2014.
 246. Bourikas, K.; Kordulis, C.; Lycourghiotis, A. Titanium dioxide (Anatase and Rutile): Surface chemistry, liquid-solid interface chemistry, and scientific synthesis of supported catalysts. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9754–9823, doi:10.1021/cr300230q.
 247. Liu, Z.; Zhang, X.; Nishimoto, S.; Jin, M.; Tryk, D. A.; Murakami, T.; Fujishima, A. Highly Ordered TiO₂ Nanotube Arrays with Controllable Length for Photoelectrocatalytic Degradation of Phenol. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 253–259, doi:10.1021/jp0772732.
 248. Kang, Q.; Yang, L.; Cai, Q. An electro-catalytic biosensor fabricated with Pt-Au nanoparticle-decorated titania nanotube array. *Bioelectrochemistry* **2008**, *74*, 62–5, doi:10.1016/j.bioelechem.2008.06.004.
 249. Figueiredo, A. G. P. R.; Figueiredo, A. R. P.; Alonso-Varona, A.; Fernandes, S. C. M.; Palomares, T.; Rubio-Azpeitia, E.; Barros-Timmons, A.; Silvestre, A. J. D.; Pascoal Neto, C.; Freire, C. S. R. Biocompatible Bacterial Cellulose-Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Nanocomposite Films. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–14, doi:10.1155/2013/698141.
 250. Gilabert-Porres, J.; Martí, S.; Calatayud, L.; Ramos, V.; Rosell, A.; Borrós, S. Design of a Nanostructured Active Surface against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria through Plasma Activation and in Situ Silver Reduction. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 64–73, doi:10.1021/acsami.5b07115.
 251. Bajpai, A. K.; Kankane, S. Evaluation of water sorption property and in vitro blood compatibility of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) based semi interpenetrating polymer networks (IPNs). *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 1921–

1933, doi:10.1007/s10856-007-3268-2.

252. Tanaka, M.; Mochizuki, A.; Ishii, N.; Motomura, T.; Hatakeyama, T. Study of blood compatibility with poly(2-methoxyethyl acrylate). Relationship between water structure and platelet compatibility in poly(2-methoxyethylacrylate-co-2-hydroxyethylmethacrylate). *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 36–41, doi:10.1021/bm010072y.
253. Peppas, N. A.; Moynihan, H. J.; Lucht, L. M. The structure of highly crosslinked poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **1985**, *19*, 397–411, doi:10.1002/jbm.820190405.
254. Ozaydin-Ince, G.; Gleason, K. K. Transition between kinetic and mass transfer regimes in the initiated chemical vapor deposition from ethylene glycol diacrylate. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **2009**, *27*, 1135–1143, doi:10.1116/1.3168553.
255. Yagüe, J. L.; Gleason, K. K. Systematic control of mesh size in hydrogels by initiated chemical vapor deposition. *Soft Matter* **2012**, *8*, 2890, doi:10.1039/c2sm07137a.
256. Macquarrie, D. J.; Bacheva, A. Efficient subtilisin immobilization in chitosan, and peptide synthesis using chitosan–subtilisin biocatalytic films. *Green Chem.* **2008**, *10*, 692, doi:10.1039/b800584b.
257. Kildeeva, N. R.; Perminov, P. A.; Vladimirov, L. V.; Novikov, V. V.; Mikhailov, S. N. About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2009**, *35*, 360–369, doi:10.1134/S106816200903011X.
258. Gray, K. M.; Liba, B. D.; Wang, Y.; Cheng, Y.; Rubloff, G. W.; Bentley, W. E.; Montembault, A.; Royaud, I.; David, L.; Payne, G. F. Electrodeposition of a biopolymeric hydrogel: Potential for one-step protein electroaddressing. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1181–1189, doi:10.1021/bm3001155.
259. Lujan Pallarès, E. Estudi de la captura polimèrica d'un sistema enzimàtic per a la detecció de glucosa, Institut Químic de Sarrià. Universitat Ramon Llull, 2018.
260. Liu, Y.; Wang, M.; Zhao, F.; Xu, Z.; Dong, S.; Ying Liu, Mingkui Wang, Feng Zhao, Zhiai Xu, S. D. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 984–988, doi:10.1016/j.bios.2005.03.003.
261. Li, C.; Liu, Y.; Li, L.; Du, Z.; Xu, S.; Zhang, M.; Yin, X.; Wang, T. A novel amperometric biosensor based on NiO hollow nanospheres for biosensing glucose. *Talanta* **2008**, *77*, 455–459, doi:10.1016/j.talanta.2008.06.048.
262. Mathew, M.; Sandhyarani, N. A highly sensitive electrochemical glucose sensor structuring with nickel hydroxide and enzyme glucose oxidase. *Electrochim. Acta* **2013**, *108*, 274–280, doi:10.1016/j.electacta.2013.07.010.
263. Krishnan, S. K.; Prokhorov, E.; Bahena, D.; Esparza, R.; Meyyappan, M. Chitosan-Covered Pd@Pt Core–Shell Nanocubes for Direct Electron Transfer in Electrochemical Enzymatic Glucose Biosensor. *ACS Omega* **2017**, *2*, 1896–1904, doi:10.1021/acsomega.7b00060.
264. Anusha, J. R.; Raj, C. J.; Cho, B.-B.; Fleming, A. T.; Yu, K.-H.; Kim, B. C. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized over chitosan nanoparticles from gladius of *Uroteuthis duvauceli*. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *215*, 536–543, doi:10.1016/j.snb.2015.03.110.

265. Geddes, C. D.; Lakowicz, J. R. *Glucose sensing*; Springer, 2006; ISBN 9780387330150.
266. Goodsell, D. Glucose Oxidase. *RCSB Protein Data Bank* **2006**, doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2006_5.
267. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463, doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
268. Horna, D.; Ramírez, J. C.; Cifuentes, A.; Bernad, A.; Borrós, S.; González, M. A. Efficient Cell Reprogramming Using Bioengineered Surfaces. *Adv. Healthc. Mater.* **2012**, *1*, 177–182, doi:10.1002/adhm.201200017.
269. Jones, M. N.; Manley, P.; Wilkinson, A. The dissociation of glucose oxidase by sodium n-dodecyl sulphate. *Biochem. J.* **1982**, *203*, 285–291, doi:10.1042/bj2030285.
270. Borrós, S.; Oh, S.; Wilcox, M.; Pearson, J. P. Optimal design for studying mucoadhesive polymers interaction with gastric mucin using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D): Comparison of two different mucin origins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *96*, 477–483, doi:10.1016/j.ejpb.2015.08.002.
271. Khatun Haq, S.; Faiz Ahmad, M.; Hasan Khan, R. The acid-induced state of glucose oxidase exists as a compact folded intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303*, 685–692, doi:10.1016/S0006-291X(03)00383-8.
272. Uversky, V. N.; Ptitsyn, O. B. Further Evidence on the Equilibrium “Pre-molten Globule State”: Four-state Guanidinium Chloride-induced Unfolding of Carbonic Anhydrase B at Low Temperature. *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 215–228, doi:10.1006/jmbi.1996.0018.
273. Chaffotte, A. F.; Guijarro, J. I.; Guillou, Y.; Delepierre, M.; Goldberg, M. E. The “pre-molten globule”, a new intermediate in protein folding. *J. Protein Chem.* **1997**, *16*, 433–9.
274. Feiler, A. A.; Sahlholm, A.; Sandberg, T.; Caldwell, K. D. Adsorption and viscoelastic properties of fractionated mucin (BSM) and bovine serum albumin (BSA) studied with quartz crystal microbalance (QCM-D). *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *315*, 475–481, doi:10.1016/j.jcis.2007.07.029.
275. Höök, F.; Rodahl, M.; Brezinski, P.; Kasemo, B. Energy Dissipation Kinetics for Protein and Antibody - Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir* **1998**, *14*, 729–734, doi:10.1021/la970815u.
276. Hak, F.; Rodahl, M.; Kasemo, B.; Brzezinski, P. Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effects of pH, ionic strength, and ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 12271–12276, doi:10.1073/pnas.95.21.12271.
277. Janati-Fard, F.; Housaindokht, M. R.; Monhemi, H. Investigation of structural stability and enzymatic activity of glucose oxidase and its subunits. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *134*, 16–24, doi:10.1016/j.molcatb.2016.09.008.
278. Jensen, U. B.; Ferapontova, E. E.; Sutherland, D. S. Quantifying protein adsorption and function at nanostructured materials: Enzymatic activity of glucose oxidase at GLAD structured electrodes. *Langmuir* **2012**, *28*, 11106–11114, doi:10.1021/la3017672.
279. Peh, W. Y. X.; Reimhult, E.; Teh, H. F.; Thomsen, J. S.; Su, X. Understanding ligand binding effects on the conformation of estrogen receptor alpha-DNA complexes: a combinational quartz crystal microbalance with dissipation and surface plasmon

- resonance study. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 4415–23, doi:10.1529/biophysj.106.099382.
280. Lubarsky, G. V.; Davidson, M. R.; Bradley, R. H. Hydration-dehydration of adsorbed protein films studied by AFM and QCM-D. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1275–1281, doi:10.1016/j.bios.2006.05.024.
 281. Gamella, M.; Guz, N.; Mailloux, S.; Pingarrón, J. M.; Katz, E. Activation of a biocatalytic electrode by removing glucose oxidase from the surface-application to signal triggered drug release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 13349–13354, doi:10.1021/am504561d.
 282. Horbett, T. A. Adsorbed Proteins on Biomaterials. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*; 2013; pp. 394–408 ISBN 9780123746269.
 283. Hughes, G.; Pemberton, R. M.; Fielden, P. R.; Hart, J. P. The design, development and application of electrochemical glutamate biosensors. *Trends Anal. Chem.* **2015**, *79*, 106–113, doi:10.1016/j.trac.2015.10.020.
 284. Jędrzak, A.; Rębiś, T.; Klapiszewski, Ł.; Zdarta, J.; Milczarek, G.; Jesionowski, T. Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, *256*, 176–185, doi:10.1016/j.snb.2017.10.079.
 285. Drozd, R.; Naskalski, J. W.; Sznajd, J. Oxidation of amino acids and peptides in reaction with myeloperoxidase, chloride and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *957*, 47–52, doi:10.1016/0167-4838(88)90155-0.
 286. Harris, J. M.; Reyes, C.; Lopez, G. P. Common Causes of Glucose Oxidase Instability in In Vivo Biosensing: A Brief Review. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2013**, *7*, 1030–1038, doi:10.1177/193229681300700428.
 287. Szymańska, E.; Winnicka, K. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1819–1846, doi:10.3390/md13041819.
 288. Niinomi, M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Mater. Sci. Eng. A* **1998**, *243*, 231–236, doi:10.1016/S0921-5093(97)00806-X.
 289. Gorbet, M. B.; Sefton, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomater. Silver Jubil. Compend.* **2004**, *25*, 219–241, doi:10.1016/B978-008045154-1.50025-3.
 290. Iwasaki, Y.; Ishihara, K. Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 534–546, doi:10.1007/s00216-004-2805-9.
 291. Morra, M.; Cassinelli, C. Surface field of forces and protein adsorption behavior of poly(hydroxyethylmethacrylate) films deposited from plasma. *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 39–45, doi:10.1002/jbm.820290107.
 292. Bilek, M. M.; McKenzie, D. R. Plasma modified surfaces for covalent immobilization of functional biomolecules in the absence of chemical linkers: towards better biosensors and a new generation of medical implants. *Biophys. Rev.* **2010**, *2*, 55–65, doi:10.1007/s12551-010-0028-1.
 293. Liu, Y.; Zhang, J.; Cheng, Y.; Jiang, S. P. Effect of Carbon Nanotubes on Direct Electron Transfer and Electrocatalytic Activity of Immobilized Glucose Oxidase. *ACS Omega* **2018**, *3*, 667–676, doi:10.1021/acsomega.7b01633.

294. Kang, X.; Mai, Z.; Zou, X.; Cai, P.; Mo, J. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold-platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes. *Anal. Biochem.* **2007**, *369*, 71–9, doi:10.1016/j.ab.2007.07.005.
295. Berger, T.; Monllor-Satoca, D.; Jankulovska, M.; Lana-Villarreal, T.; Gómez, R. The electrochemistry of nanostructured titanium dioxide electrodes. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 2824–2875, doi:10.1002/cphc.201200073.
296. E. Otter, D. Standardised methods for amino acid analysis of food. *Br. J. Nutr.* **2012**, *108*, S230–S237, doi:10.1017/S0007114512002486.
297. Kumar, S.; Ghadimi, H.; Abaci, F. Studies on Monosodium Glutamate Ingestion. *Biomed. Med.* **1971**, *5*, 447–456.
298. Jamal, M.; Xu, J.; Razeeb, K. M. Disposable biosensor based on immobilisation of glutamate oxidase on Pt nanoparticles modified Au nanowire array electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1420–4, doi:10.1016/j.bios.2010.07.071.
299. Özel, R. E.; Ispas, C.; Ganesana, M.; Leiter, J. C.; Andreescu, S. Glutamate oxidase biosensor based on mixed ceria and titania nanoparticles for the detection of glutamate in hypoxic environments. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 397–402, doi:10.1016/j.bios.2013.08.054.
300. Batra, B.; Pundir, C. S. An amperometric glutamate biosensor based on immobilization of glutamate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/gold nanoparticles/chitosan composite film modified Au electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *47*, 496–501, doi:10.1016/j.bios.2013.03.063.
301. Zhang, M.; Mullens, C.; Gorski, W. Amperometric glutamate biosensor based on chitosan enzyme film. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 4528–4532, doi:10.1016/j.electacta.2006.01.010.
302. Mikeladze, E.; Collins, A.; Sukhacheva, M.; Netrusov, A.; Csöregi, E. Characterization of a Glutamate Biosensor Based on a Novel Glutamate Oxidase Integrated into a Redox Hydrogel. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1052–1059, doi:10.1002/1521-4109(200208)14:15/16<1052::AID-ELAN1052>3.0.CO;2-0.
303. Arima, J.; Sasaki, C.; Sakaguchi, C.; Mizuno, H.; Tamura, T.; Kashima, A.; Kusakabe, H.; Sugio, S.; Inagaki, K. Structural characterization of l-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *FEBS J.* **2009**, *276*, 4318–4327, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07103.x.
304. Kusakabe, H.; Midorikawa, Y.; Fujishima, T.; Kuninaka, A.; Yoshino, H. Purification and Properties of a New Enzyme, l-Glutamate Oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 Grown on Wheat Bran. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 1323–1328, doi:10.1080/00021369.1983.10866079.
305. Park, B.-W.; Yoon, D.-Y.; Kim, D.-S. Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1–10, doi:10.1016/j.bios.2010.04.033.
306. Shabir, G. a Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. *J Chromatogr A* **2003**, *987*, 57–66, doi:10.1016/S0021-

9673(02)01536-4.

307. Pardue, H. L.; Burke, M. F.; Jones, D. O. Reaction rate analysis and instrumentation: An experiment for the analytical laboratory. *J. Chem. Educ.* **1967**, *44*, 684, doi:10.1021/ed044p684.
308. E. Clifford Toren, J. Determination of Glucose. A kinetics experiment for the analytical course. *J. Chem. Educ.* **1967**, *44*, 172–174.
309. Tiwari, G.; Tiwari, R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharm. Methods* **2010**, *1*, 25, doi:10.4103/2229-4708.72226.
310. AOAC *Definitions And Calculations Of Horrat Values From Intralaboratory Data.*; 2004;
311. Ashworth, M. R. F. Glycerol. In *Analytical Methods for Glycerol*; Elsevier, 1979; Vol. 44, pp. 1–94 ISBN 9780956152817.
312. AOAC Standard Format and Guidance for AOAC Standard Method Performance Requirement (SMPR) Documents 2011, 1–27.
313. Vasilarou, A.-M. G.; Georgiou, C. A. Enzymatic Spectrophotometric Reaction Rate Determination of Glucose in Fruit Drinks and Carbonated Beverages. An Analytical Chemistry Laboratory Experiment for Food Science-Oriented Students. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 1327, doi:10.1021/ed077p1327.
314. Yoo, E.-H.; Lee, S.-Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors* **2010**, *10*, 4558–76, doi:10.3390/s100504558.
315. Wang, H.-S.; Pan, Q.-X.; Wang, G.-X. A Biosensor Based on Immobilization of Horseradish Peroxidase in Chitosan Matrix Cross-linked with Glyoxal for Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide. *Sensors* **2005**, *5*, 266–276, doi:10.3390/s5040266.
316. Yakovleva, M.; Buzas, O.; Matsumura, H.; Samejima, M.; Igarashi, K.; Larsson, P. O.; Gorton, L.; Danielsson, B. A novel combined thermometric and amperometric biosensor for lactose determination based on immobilised cellobiose dehydrogenase. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 251–256, doi:10.1016/j.bios.2011.10.027.
317. Kang, X.; Mai, Z.; Zou, X.; Cai, P.; Mo, J. Glucose biosensors based on platinum nanoparticles-deposited carbon nanotubes in sol-gel chitosan/silica hybrid. *Talanta* **2008**, *74*, 879–886, doi:10.1016/j.talanta.2007.07.019.
318. Huang, Y.; Qin, X.; Li, Z.; Fu, Y.; Qin, C.; Wu, F.; Su, Z.; Ma, M.; Xie, Q.; Yao, S.; Hu, J. Fabrication of a chitosan/glucose oxidase-poly(anilineboronic acid)-Au(nano)/Au-plated Au electrode for biosensor and biofuel cell. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 357–62, doi:10.1016/j.bios.2011.10.045.
319. Waters AccQ Tag method for hydrolysate amino acid analysis Available online: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/930494.pdf> (accessed on Oct 16, 2018).
320. Waters Analyzing Feed Hydrolysate Samples Using the AccQ-Tag Method Available online: <http://www.waters.com/> (accessed on Oct 16, 2018).
321. Vasylieva, N.; Maucler, C.; Meiller, A.; Viscogliosi, H.; Lieutaud, T.; Barbier, D.; Marinesco, S. Immobilization Method to Preserve Enzyme Specificity in Biosensors: Consequences for Brain Glutamate Detection. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2507–2515, doi:10.1021/ac3035794.

322. Pauliukaite, R.; Zhylyak, G.; Citterio, D.; Spichiger-Keller, U. E. L-glutamate biosensor for estimation of the taste of tomato specimens. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 220–7, doi:10.1007/s00216-006-0656-2.
323. Kwong, A. W. K.; Gründig, B.; Hu, J.; Renneberg, R. Comparative study of hydrogel-immobilized l-glutamate oxidases for a novel thick-film biosensor and its application in food samples. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 267–272, doi:10.1023/A:1005694704872.
324. Zhang, M.; Mullens, C.; Gorski, W. Chitosan-Glutamate Oxidase Gels: Synthesis, Characterization, and Glutamate Determination. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 2114–2120, doi:10.1002/elan.200503348.
325. Morley, K. L.; Kazlauskas, R. J. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 231–237, doi:10.1016/j.tibtech.2005.03.005.
326. Jestin, J.-L.; Vichier-Guerre, S. How to broaden enzyme substrate specificity: Strategies, implications and applications. *Res. Microbiol.* **2005**, *156*, 961–966, doi:10.1016/j.resmic.2005.09.004.
327. Zhang, X.; Zhang, Y.; Yang, G.; Xie, Y.; Xu, L.; An, J.; Cui, L.; Feng, Y. Modulation of the thermostability and substrate specificity of *Candida rugosa* lipase1 by altering the acyl-binding residue Gly414 at the α -helix-connecting bend. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *82*, 34–41, doi:10.1016/j.enzmictec.2015.08.006.
328. Cho, C. M.-H.; Mulchandani, A.; Chen, W. Altering the Substrate Specificity of Organophosphorus Hydrolase for Enhanced Hydrolysis of Chlorpyrifos. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4681–4685, doi:10.1128/AEM.70.8.4681-4685.2004.
329. Antikainen, N. M.; Martin, S. F. Altering protein specificity: techniques and applications. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2701–2716, doi:10.1016/j.bmc.2005.01.059.