



Universidad de Burgos

**Departamento de Química
Área de Química Analítica**

TESIS DE MÁSTER

**ELECTRODOS SERIGRÁFICOS MODIFICADOS CON
EL ENZIMA CYP450 PARA LA DETERMINACIÓN
SELECTIVA DE COCAÍNA**

**MÁSTER EN QUÍMICA AVANZADA
ESPECIALIDAD EN NUEVOS MATERIALES**

Autora: Laura Asturias Arribas

Tutoras: M^a Julia Arcos Martínez / M^a Asunción Alonso Lomillo

Línea de investigación: Sensores electroquímicos

Burgos, Julio de 2010



Universidad de Burgos
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Memoria de la Tesis de Máster “*Electrodos serigráficos modificados con el enzima CYP450 para la determinación selectiva de cocaína*”
realizada por **LAURA ASTURIAS ARRIBAS.**

VºBº DE LAS TUTORAS DEL TRABAJO

DRA. M. JULIA ARCOS MARTÍNEZ
Profesora Titular de Universidad
Departamento de Química
Universidad de Burgos

DRA. M. ASUNCIÓN ALONSO LOMILLO
Invest Contrat. Ramón y Cajal
Departamento de Química
Universidad de Burgos



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	2
1.1.- Biosensores electroquímicos.....	2
1.1.1.- Elementos biológicamente sensibles.....	2
1.1.2.- Métodos de inmovilización.....	3
1.1.3.- Biosensores amperométricos enzimáticos miniaturizados.....	4
1.2.- Biosensores para la determinación de cocaína.....	5
2.- EXPERIMENTAL.....	8
2.1.- Materiales, equipos y software.....	8
2.2.- Fabricación de los electrodos serigrafiados.....	9
2.3.- Modificación de los electrodos serigrafiados con el enzima CYP450.....	9
3.- DETERMINACIÓN DE COCAÍNA UTILIZANDO LOS BIOSENSORES CONSTRUIDOS.....	12
3.1.- Caracterización de los electrodos serigrafiados.....	12
3.2.- Optimización de las variables experimentales en la determinación cronoamperométrica de cocaína utilizando electrodos serigrafiados modificados con CYP450.....	14
3.3.- Caracterización de los electrodos serigrafiados modificados con CYP450 construidos para la determinación de cocaína en estándares puros.....	17
3.4.- Determinación de cocaína en matrices complejas.....	20
4.- CONCLUSIONES.....	22
5.- REFERENCIAS.....	23

INTRODUCCIÓN

La cocaína fue utilizada en los años ochenta como anestésico local, pero se dejó de utilizar con ese fin debido a la dependencia que genera. A pesar de su bien conocido efecto adictivo, ha llegado a convertirse en una droga de abuso, por lo que su detección, e incluso discriminación frente a otros tipos de sustancias o drogas, precisa de métodos rápidos y sensibles.

En los últimos años, el desarrollo de este tipo de métodos se ha centrado en la fabricación de biosensores para la determinación de distintos analitos en los campos clínico, medioambiental y agroalimentario. La selectividad es inherente a este tipo de dispositivos ya que su componente biológico, en muchos casos enzimas o anticuerpos, reacciona específicamente con el sustrato a analizar.

Siendo un conocido sustrato del Citocromo P450 (CYP450), en el presente trabajo se ha puesto a punto un biosensor basado en este enzima para el análisis selectivo y sensible de cocaína. Así, electrodos serigrafiados de carbono modificados covalentemente con el enzima CYP450 se han utilizado para la determinación cronoamperométrica de cocaína en diferentes tipos de muestras.

Las variables que más influyen en la respuesta cronoamperométrica del biosensor, pH de la disolución tampón y potencial aplicado, se han optimizado a través de la metodología del diseño de experimentos. La selectividad conferida por el enzima, unida a la selectividad alcanzada por el hecho de medir en las condiciones que maximizan la respuesta cronoamperométrica de esta droga, dan lugar a biosensores altamente reproducibles y con una capacidad de detección del orden de nM.

1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1.- Biosensores electroquímicos

Un biosensor es un dispositivo analítico que combina un material biológicamente sensible, lo que le confiere especificidad, con un sistema transductor apropiado, que transforma la respuesta bioquímica en una señal eléctrica u óptica (Figura 1) [1].

El elemento biológico constituye el elemento sensible o sensitivo del biosensor, es decir, es la especie que interacciona propiamente con el sustrato o analito. Finalmente, la señal analítica generada en el transductor es recogida y registrada en un procesador de señales para su posterior amplificación, derivación, etc.

Los biosensores electroquímicos son un tipo de sensores químicos que combinan el potencial analítico de las técnicas electroquímicas con la especificidad de los procesos de reconocimiento biológico. El agente bioespecífico se inmoviliza o se retiene en un electrodo apropiado, en este trabajo electrodos serigrafiados de carbono, que convierte la respuesta biológica en una respuesta amperométrica o potenciométrica fácilmente cuantificable.

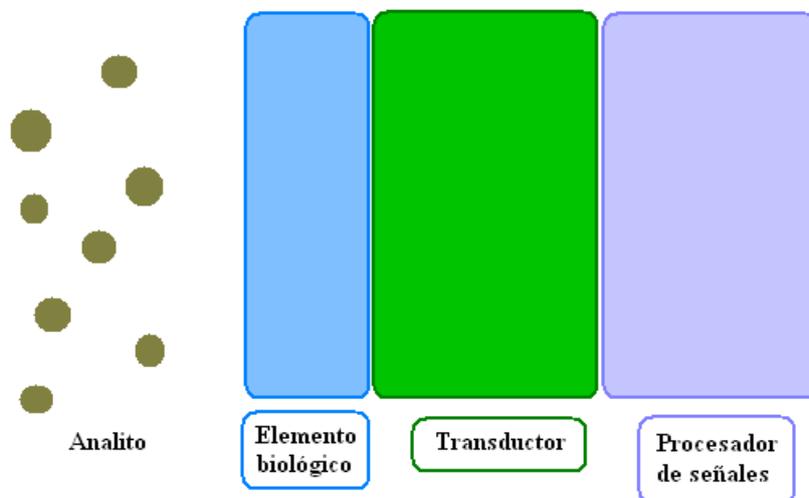


Figura 1.- Distribución esquemática de un biosensor

1.1.1.- Elementos biológicamente sensibles

El componente más importante del biosensor es el elemento biológico. La amplia variedad de bioelementos utilizados en biosensores, permite clasificarlos en dos grandes grupos [2]:

- Biosensores catalíticos: enzimas, tejidos o microorganismos y receptores biológicos.

- Biosensores de afinidad: ácidos nucleicos y anticuerpos.

Los biosensores catalíticos han sido los más desarrollados, y de ellos, los enzimáticos, debido a su bajo coste, disponibilidad en el mercado y fácil manipulación. Los enzimas son catalizadores de numerosas reacciones bioquímicas, muchas de ellas específicas de un solo sustrato.

Los tejidos orgánicos o microorganismos, que contienen varios enzimas en su composición, pueden utilizarse directamente como biosensores, pero no han mostrado tanta selectividad como los enzimas purificados [3].

Los receptores, proteínas que se encuentran atravesando la bicapa lipídica de la membrana celular, presentan propiedades de reconocimiento molecular, siendo su grado de afinidad y especificidad comparable con la de los anticuerpos.

Los anticuerpos, que se unen específicamente con su correspondiente antígeno, confieren una elevada sensibilidad a los biosensores. Sin embargo, han sido menos utilizados para la fabricación de biosensores.

1.1.2.- Métodos de inmovilización

Para que el biosensor sea efectivo debe haber un contacto íntimo entre el elemento biológico y el transductor. El método de inmovilización es, por tanto, una etapa decisiva en la fabricación de estos dispositivos, llegando a influir en parámetros característicos del mismo, como su tiempo de vida o su sensibilidad.

Se han descrito distintos tipos de inmovilización del componente biológico, como son adsorción, microencapsulación, atrapamiento, entrecruzamiento o unión covalente.

1.1.2.1.- Inmovilización por adsorción

La inmovilización se produce debido a un fenómeno superficial en el que el elemento biológico se deposita sobre la superficie del transductor, por lo que esta metodología se utiliza en el caso de sustancias que tienden a quedarse adheridas en la superficie del transductor. Siendo uno de los procedimientos más sencillos, tiene el inconveniente de que las uniones elemento biológico-electrodo son en general débiles, lo que da lugar a biosensores poco estables en el tiempo.

La adsorción del elemento biológico puede verse influenciada por variaciones en la temperatura y evidentemente, por el tipo de material biológico y del material que constituye el electrodo.

1.1.2.2.- Inmovilización por microencapsulación

La microencapsulación es un método en el que el material biológico, puesto en contacto con el transductor a través de un sencillo proceso de adsorción, se protege con

una membrana que debe ser permeable al analito objeto de estudio. Entre los materiales más utilizados como membranas pueden citarse acetato de celulosa, colágeno, teflón y nafión.

En general, este tipo de inmovilización origina biosensores más estables en el tiempo que los biosensores modificados mediante simple adsorción, ya que el enzima se preserva al no estar en contacto directo con la disolución que contiene el analito. Esta separación física hace que la respuesta sea generalmente más lenta, aunque no menos sensible.

1.1.2.3.- Inmovilización por atrapamiento

En este tipo de inmovilización, el elemento biológico es atrapado en un compuesto polimérico formado a partir de la electropolimerización de su monómero. Esta polimerización se realiza en presencia del elemento biológico, por lo que queda atrapado en el entramado que formará el polímero.

Es una técnica de gran sencillez desde el punto de vista experimental, y que no requiere una gran cantidad de material biológico. Como ventaja adicional, el componente biológico no sufre ninguna alteración en su estructura. Uno de los inconvenientes es la gran barrera creada que dificulta la difusión del analito hasta el biocomponente, aumentando el tiempo de respuesta del sensor.

1.1.2.4.- Inmovilización por entrecruzamiento (crosslinking)

Este método de inmovilización implica la utilización de una especie química bifuncional que se une al transductor por uno de sus grupos funcionales y por el otro al elemento biológico, formando así una verdadera unión química entre los dos elementos del biosensor.

Uno de los agentes bifuncionales más utilizados es el glutaraldehído.

Estos biosensores son más duraderos en el tiempo, pero tienen como inconveniente la posible desnaturalización del componente biológico al interactuar con el agente de entrecruzamiento.

1.1.2.5.- Inmovilización por unión covalente

La unión covalente establecida entre el componente biológico y el transductor es un método de inmovilización más complejo que los anteriores, pero que origina biosensores más estables en el tiempo. Se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con los grupos nucleófilos del elemento biológico, lo que puede conducir a su inmovilización orientada y, por tanto, a biosensores más reproducibles. Este método de inmovilización es el utilizado en el presente trabajo, por lo que se describirá más detalladamente en apartados posteriores.

1.1.3.- Biosensores amperométricos enzimáticos miniaturizados

Entre los biosensores electroquímicos, uno de los más prometedores por su sensibilidad es el biosensor amperométrico enzimático que combina la elevada selectividad de los enzimas con la simplicidad de los transductores amperométricos. Estos biosensores monitorizan las corrientes faradaicas resultantes de intercambios electrónicos entre el sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante apropiado [2]. Así, el enzima interacciona con el analito produciendo especies que son oxidadas o reducidas en el electrodo de trabajo. En disoluciones con o sin agitación, la corriente producida es directamente proporcional a la concentración del analito [4].

Los biosensores electroquímicos han cobrado especial importancia en diversas aplicaciones industriales debido a la aplicación de tecnologías de miniaturización en la fabricación de electrodos, lo que facilita la producción en masa de biosensores, reduciendo así los costes en su fabricación, y asegurando una gran reproducibilidad.

En el presente trabajo la tecnología utilizada para la miniaturización de los electrodos ha sido la de capa gruesa o “thick film”, descrita previamente en el Practicum “DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE COCAÍNA MEDIANTE TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS” del Máster en Química Avanzada. En resumen, mediante la tecnología serigráfica es posible poner a punto dispositivos miniaturizados de distintas configuraciones electrónicas basados en la utilización de distintas tintas, lo que confiere versatilidad a los mismos, y la realización de una producción en masa, lo que reduce significativamente el coste pudiendo utilizarse como desechables [3].

1.2.- Biosensores para la determinación de cocaína.

Como se describió en el Practicum del Máster “DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE COCAÍNA MEDIANTE TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS”, es de notable interés la puesta a punto de métodos rápidos y selectivos que permitan la detección y determinación de cocaína debido al extendido consumo de esta droga de abuso (Figura 2). Entre estos métodos cabe destacar los biosensores electroquímicos.

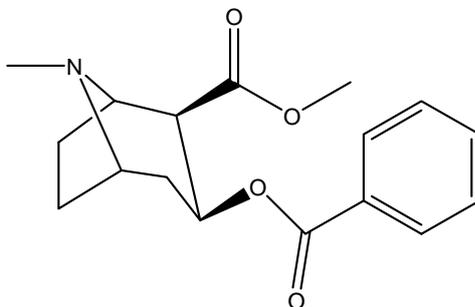


Figura 2.- Estructura de la cocaína

Entre los escasos procedimientos basados en el empleo de biosensores para la determinación de cocaína que se encuentran actualmente descritos en la bibliografía, cabe destacar:

- Inmunosensores amperométricos basados en la combinación de anticuerpos de anti-benzoilecgonina con un electrodo de oxígeno [5].
- Biosensores voltamperométricos basados en la inmovilización de aptámeros sobre electrodos de óxido de indio y estaño (ITO) recubiertos de capas de ferroceno y nanopartículas de oro alternadamente [6].
- Biosensores bifuncionales piezoeléctrico/amperométrico basados en la modificación de electrodo de oro con propidio y anticuerpos de anti-benzoilecgonina [7].

Si bien los anticuerpos, junto el ADN, son los agentes biológicos más selectivos que existen, el empleo de enzimas en la puesta a punto de biosensores para cocaína facilitaría la fabricación de los mismos.

El citocromo P450 (CYP450) es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos (Figura 3). Entre los sustratos preferidos de este enzima, más específicamente de la familia 2B, se encuentra la cocaína [8].

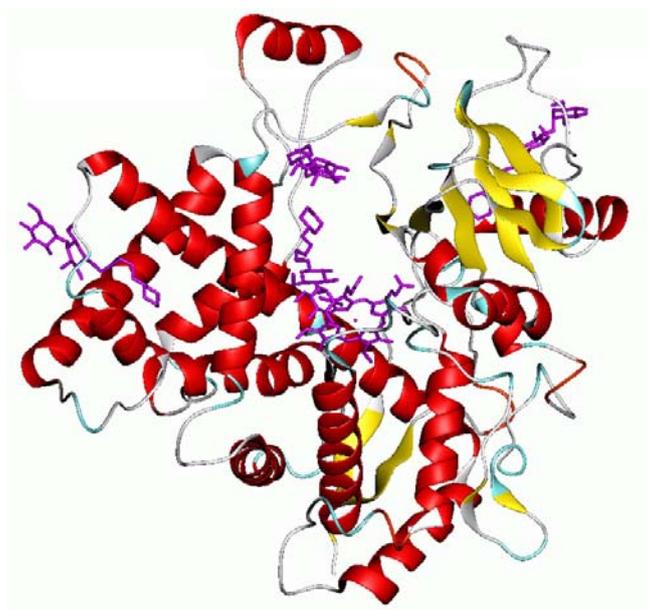


Figura 3.- Estructura cuaternaria del enzima citocromo P450

El sistema citocromo P450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar [9]. Entre las oxidaciones catalizadas por el CYP450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones.

En el caso de la cocaína, se produce concretamente una N-desmetilación que conduce a la formación del metabolito conocido como norcocaína (Figura 4) [10, 11]:

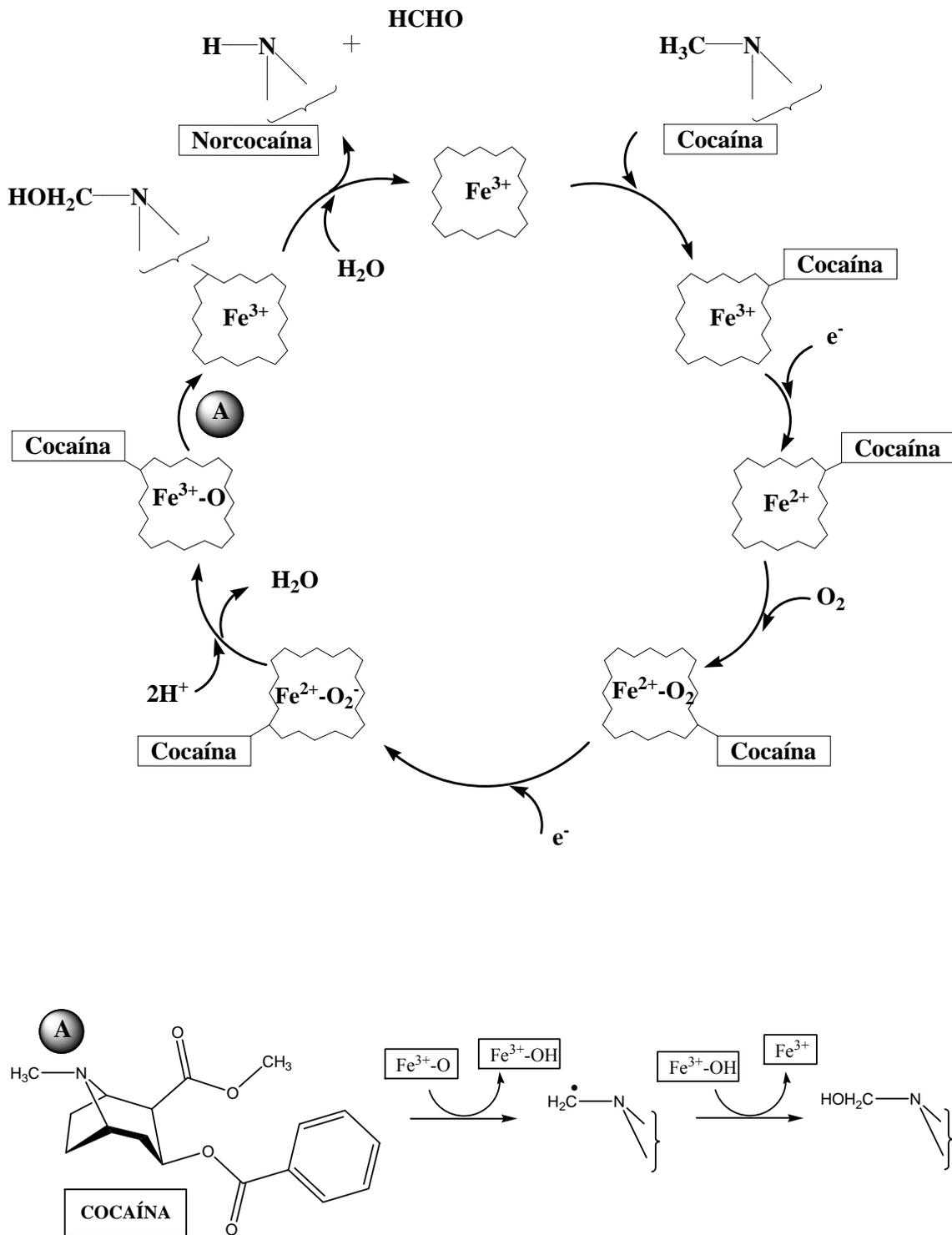


Figura 4.-: Esquema del metabolismo de la cocaína mediado por el citocromo P450

Cuando un sustrato (cocaína) se une a una molécula de CYP450, se produce un cambio conformacional de la estructura proteica alrededor del átomo de hierro:

- Para que tenga lugar la hidroxilación (monooxigenación), el hierro del grupo hemo debe ser reducido desde el estado férrico (Fe^{3+}) al ferroso (Fe^{2+}), de modo que pueda unirse el oxígeno.
- En esta reacción se requieren un total de 2 electrones que se transfieren a la molécula de CYP450 individualmente. El primer electrón permite la unión oxígeno/ Fe^{2+} , mientras que el segundo genera la especie de oxígeno activa que permite la inserción de un grupo hidroxilo en el sustrato [12].
- En los biosensores electroquímicos basados en el enzima CYP450 es el propio electrodo el que realiza el aporte electrónico necesario [13].

2.- EXPERIMENTAL

2.1.- Materiales, equipos y software

Los transductores amperométricos fueron fabricados con un equipo serigráfico DEK 248 (DEK, Weymouth, Reino Unido).

Las tintas o pastas utilizadas,

- Carbono C10903P14 (Gwent Group, Gran Bretaña)
- Plata Electrodag 418 (Acheson Colloiden, Países Bajos)
- Ag/AgCl Electrodag 6037 SS (Acheson Colloiden, Países Bajos)
- Material dieléctrico Electrodag 452 SS (Acheson Colloiden, Países Bajos)
- Material dieléctrico 242-SB (ELS, EEUU)
- Material dieléctrico D2071120D1 (Gwent Group, Gran Bretaña)

se depositaron sobre láminas de poliéster de 0.5 mm de espesor (HiFi Industrial Film, Dardilly, Francia).

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada ultrapura (18.2 M Ω cm).

Las disoluciones de ferricianuro potásico (Merck, Darmstadt, Alemania) se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de éste en una solución 0.1 M de KNO_3 (Merck, Darmstadt, Alemania).

Disoluciones 0.05 M de tampón fosfato (Panreac, Barcelona, España) y 0.1 M de KCl (Merck, Darmstadt, Alemania) se utilizaron como electrolito de soporte. Para ajustar el valor de pH se utilizó una disolución 1 M de NaOH (J.T. Baker, Deventer, Holanda).

El pH de las disoluciones se cuantificó utilizando un pHmetro Crisol Modelo 2002 (Barcelona, España).

Las disoluciones de cocaína se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de $C_{17}H_{21}NO_4 \cdot HCl$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en tampón fosfato pH 7.

La sal de diazonio utilizada para la modificación del electrodo ($N_2C_6H_4NO_2 BF_4$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) se disolvió en acetonitrilo (Merck, Darmstadt, Alemania) que contenía 0.1 M de NBu_4BF_4 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Las disoluciones de hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Fluka, Steinheim, Alemania) se prepararon en tampón fosfato 10 mM pH 4.

El enzima utilizado en el estudio fue CYP450 2B4 (C9095-15Y, US Biological, Swamscott, MA, EEUU).

Las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un potenciostato μ Autolab, controlado a través del software GPES (Eco CEIME, Utrecht, Países Bajos).

El análisis de los datos fue realizado con los programas STATGRAPHICS PLUS [14] para el diseño de experimentos, PROGRESS [15] para realizar la regresión robusta y DETARCHI [16] para determinar la capacidad de detección.

2.2.- Fabricación de los electrodos serigrafiados

Se diseñaron distintos tipos de transductores mediante tecnología serigráfica, de acuerdo al procedimiento descrito en el Practicum de Máster “DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE COCAÍNA MEDIANTE TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS”, que implica la deposición secuencial de las diferentes tintas y sus posteriores curados.

La tabla 1 resume las etapas de fabricación de cada tipo de dispositivo, incluyendo el tipo de tintas utilizado y los tiempos y temperaturas de curado de las mismas.

2.3.- Modificación de los electrodos serigrafiados con el enzima CYP450

La construcción de los CYP450-biosensores, implica la funcionalización del electrodo de trabajo previa a la inmovilización covalente del enzima.

Con este fin se sumergió un electrodo serigrafiado en una disolución 3 mM de $N_2C_6H_4NO_2 BF_4$, 0.1 M de NB_4BF_4 en acetonitrilo y se realizaron dos barridos de potencial, entre 0.8 y - 0.4 V, a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} (Figura 5) [17, 18], lo cual conduce a la formación de una capa de grupos nitro extendida por toda la superficie del electrodo (Figura 6).

Tabla 1.- Composición de los distintos electrodos serigrafiados fabricados.

	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
1.- Vías conductoras, contraelectrodo y electrodo de trabajo	-	Ag/C	C	C
$T_{\text{curado}} (^{\circ}\text{C})$	-	60	60	60
$t_{\text{curado}} (\text{min})$	-	30	30	30
2.- Vías conductoras	Ag	-	-	-
$T_{\text{curado}} (^{\circ}\text{C})$	120	-	-	-
$t_{\text{curado}} (\text{min})$	20	-	-	-
3.- Electrodo de referencia	Ag/AgCl	Ag/AgCl	Ag/AgCl	Ag/AgCl
$T_{\text{curado}} (^{\circ}\text{C})$	120	120	120	120
$t_{\text{curado}} (\text{min})$	20	20	20	20
4.- Electrodo de trabajo y contraelectrodo	C	-	-	-
$T_{\text{curado}} (^{\circ}\text{C})$	60	-	-	-
$t_{\text{curado}} (\text{min})$	30	-	-	-
5.- Material dieléctrico	242-SB	242-SB	452 SS*	D2071120D1
$T_{\text{curado}} (^{\circ}\text{C})$	120	120	-	80
$t_{\text{curado}} (\text{min})$	60	60	-	30

* Curado en horno UV

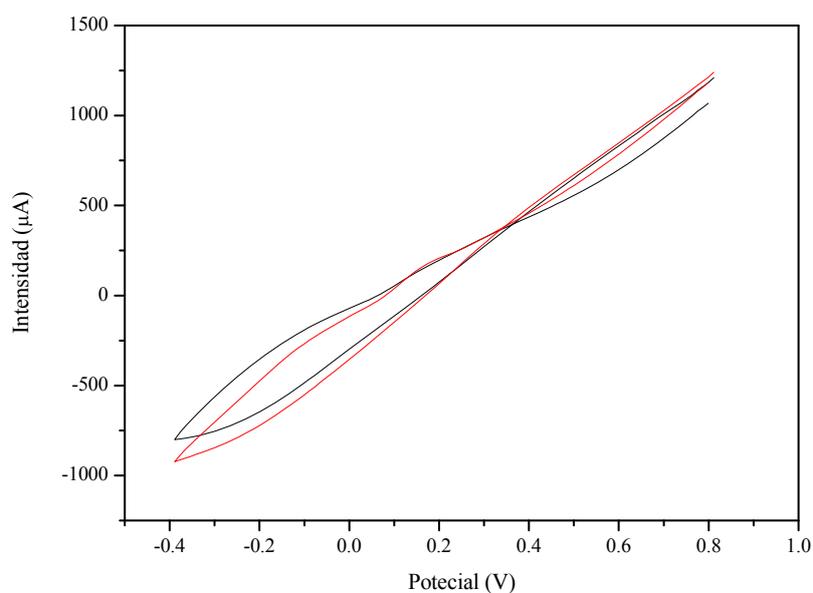


Figura 5.- Formación de la monocapa de sal de diazonio mediante barridos voltamperométricos en una disolución 3 mM de $\text{N}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \text{BF}_4$, 0.1 M de NB_4BF_4 en acetonitrilo, entre 0.8 y -0.4 V, a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} .

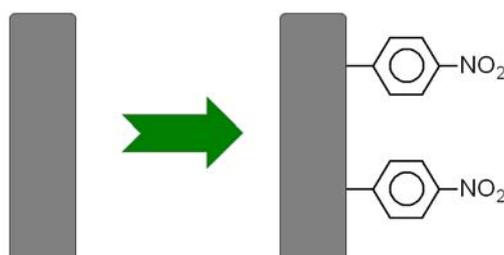


Figura 6.- Formación de la monocapa de la sal de diazonio sobre la superficie del electrodo

A continuación, el electrodo funcionalizado se introdujo en una disolución desoxigenada de agua/etanol (9:1) y KCl 0.1 M, en la que se realizaron dos barridos voltamperométricos de 0 a - 1.7 V a una velocidad de barrido 200 mV s^{-1} [17, 18] (Figura 7). Se produce de esta manera la reducción de los grupos nitro a amino, lo que se constata a través del pico registrado a un potencial aproximado de -1.2 V en el primer barrido voltamperométrico. En el segundo barrido se observa un par redox reversible que puede asignarse al equilibrio amina \leftrightarrow hidroxilamina.

Estos grupos amino proporcionan una conexión física y/o eléctrica con el enzima a inmovilizar en la última etapa de la construcción del biosensor (Figura 8).

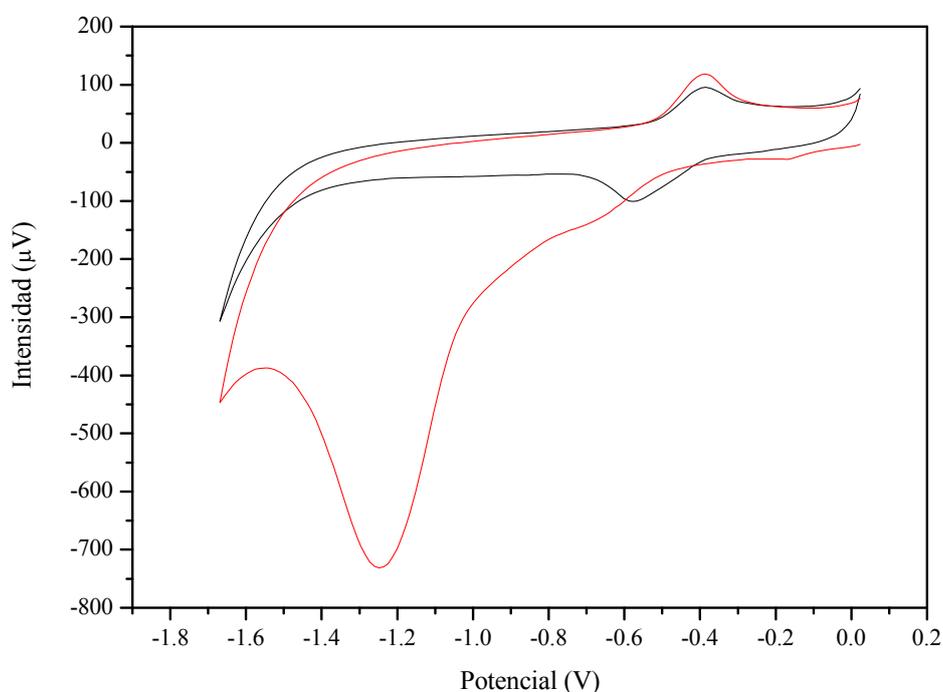


Figura 7.- Reducción de los grupos nitro de la sal de diazonio mediante barridos voltamperométricos en una disolución desoxigenada 0.1 M KCl agua/etanol (9:1) entre 0 y - 1.7 V, a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} .

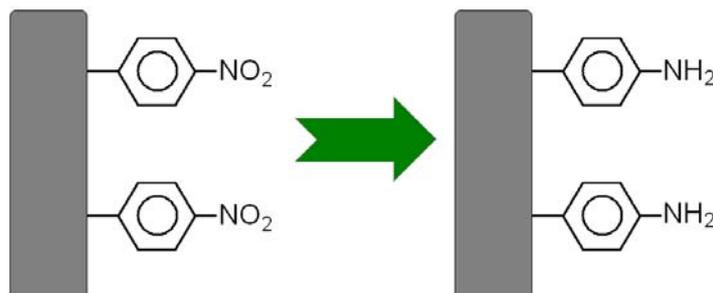


Figura 8.- Reducción de los grupos nitro contenidos en el electrodo funcionalizado con sal de diazonio a grupos amino.

Finalmente, se inmovilizó el enzima, para lo que se depositaron consecutivamente sobre el electrodo de trabajo funcionalizado:

- 5 μl de CYP450 2B4.
- 2 μl de una disolución 20 mM de NHS en tampón fosfato 10 mM pH 4.
- 2 μl de una disolución 40 mM de EDC en tampón fosfato 10 mM pH 4.

Se permitió reaccionar a la mezcla durante 90 minutos a una temperatura de 4°C, tiempo tras el cuál se utilizó el biosensor para la realización de medidas cronoamperométricas.

3.- DETERMINACIÓN DE COCAÍNA UTILIZANDO LOS BIOSENSORES CONSTRUIDOS

3.1.- Caracterización de los electrodos serigrafados

En la fabricación de los dispositivos se utilizaron tintas de distinta composición para la definición de los diferentes elementos, cuya influencia en la sensibilidad del dispositivo final es significativa.

La intensidad de los picos de oxidación y reducción del par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ en una disolución de KNO_3 0.1 M se ha utilizado como identificativo de la sensibilidad de los distintos electrodos serigráficos construidos [18]. El acondicionamiento de un electrodo es un proceso por el cual se eliminan posibles impurezas que haya en la superficie de éste, mejorando la intensidad de la señal analítica.

En la figura 9 pueden observarse los voltamperogramas cíclicos registrados utilizando un dispositivo tipo I sin tratamiento alguno, con activación mecánica (pulido del electrodo de trabajo) y con activación mecánica y electroquímica (20 barridos entre 2 y -2 V vs electrodo de referencia serigrafado de Ag/AgCl, a 100 mV s^{-1} , en una disolución de KCl) [19].

Este tipo de tinta no precisa ningún tipo de acondicionamiento previo a su utilización, lo que facilita considerablemente su uso.

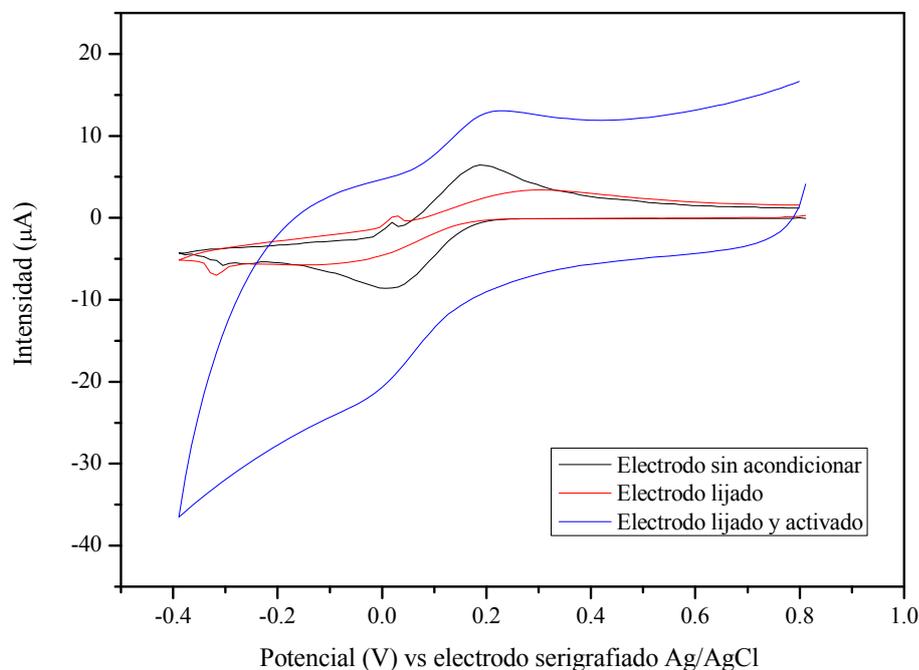


Figura 9.- Estudio voltamperométrico del sistema $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ en los diferentes estadios de la etapa de acondicionamiento. Concentración de ferricianuro, 5.66 mM. Velocidad de barrido, 100 mV s^{-1} .

Seguidamente, se realizó un estudio sobre los diferentes tipos de electrodos fabricados, con el objetivo de seleccionar los dispositivos óptimos en términos de conductividad. Para ello se registraron diferentes voltamperogramas cíclicos de una disolución 5.66 mM de ferricianuro en KNO_3 0.1 M, a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} (Figura 10). Se observó una mejor definición de los picos de oxidación y reducción en el caso de los dispositivos tipo I, sin duda debido a la mayor conductividad que aportan las vías de Ag respecto a la combinación Ag/C.

Si bien los dispositivos tipo III y IV presentaron señales voltamperométricas comparables a los de tipo I, el tipo de material dieléctrico utilizado para su fabricación no reúne las características idóneas para la fabricación de los biosensores desarrollados en este trabajo (el material dieléctrico se degrada en medios orgánicos). Por tanto, el trabajo presentado en las siguientes secciones se centra en los dispositivos tipo I modificados con el enzima CYP450 de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.3.

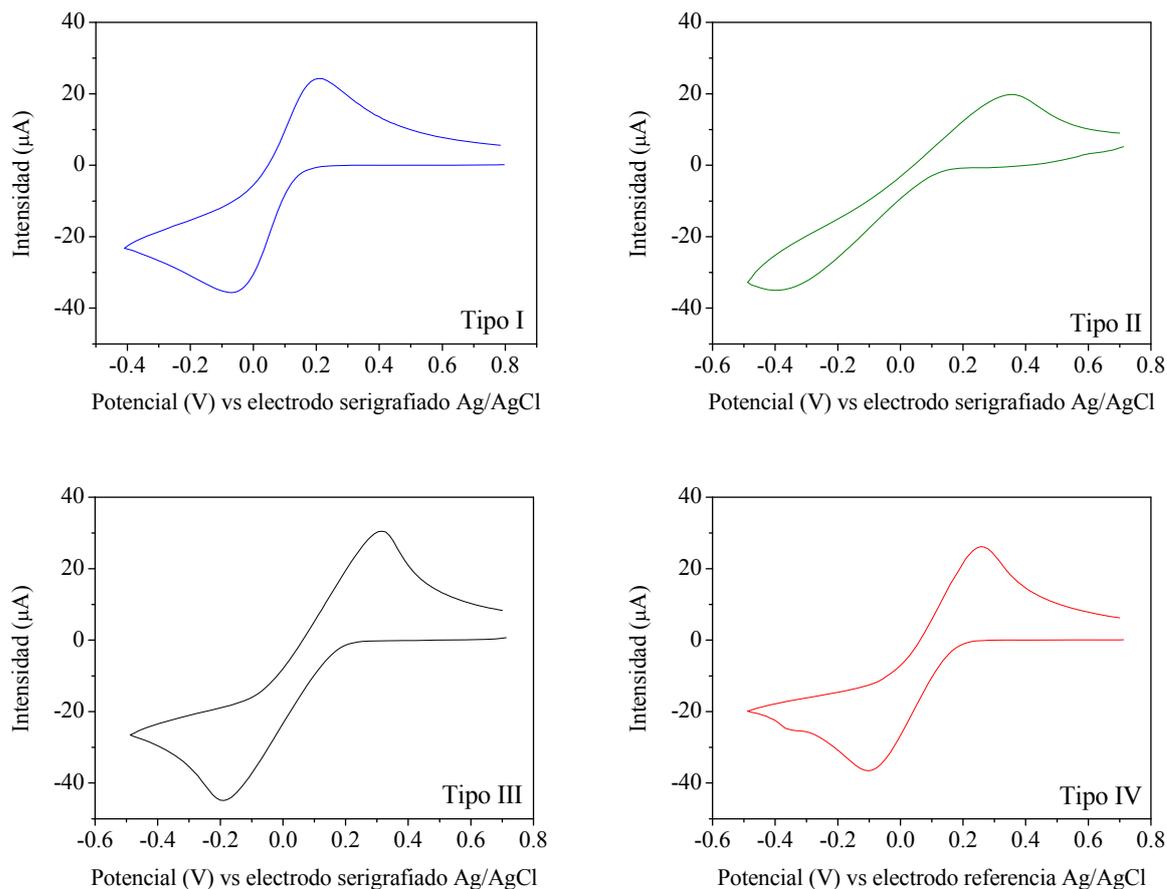


Figura 10.- Estudio voltamperométrico del sistema $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ con los diferentes electrodos fabricados

3.2.- Optimización de las variables experimentales en la determinación cronamperométrica de cocaína utilizando electrodos serigrafiados modificados con CYP450

En cualquier procedimiento analítico en el que se trata de obtener una respuesta relacionada con el analito de interés, es de gran utilidad conocer y controlar los parámetros o variables experimentales que intervienen en el proceso. Con el fin de mejorar la respuesta analítica de una sustancia, es importante tratar sólo aquellos que tienen mayor influencia en la variable respuesta y pueden ser controlados por el investigador.

El diseño de experimentos [20, 21] es uno de los métodos que existen para llevar a cabo la optimización conjunta de las variables experimentales, teniendo en cuenta su influencia en la respuesta de interés.

En el caso de medidas cronamperométricas, los parámetros experimentales más influyentes en la corriente registrada son el potencial aplicado (E_{ap}) y el pH de la disolución tampón en la que se realizan las medidas. Con estos dos factores se realizó

un diseño 2^2 central compuesto en el que se tomó como variable respuesta, el valor de la intensidad de reducción, para una disolución de cocaína de concentración 1.96×10^{-5} M.

De acuerdo con el procedimiento habitual de trabajo en la realización de este tipo de optimización, se seleccionaron dos niveles, alto y bajo, para cada uno de los factores a optimizar:

pH (-) = 6	$E_{ap} (-) = -0.4$ V
pH (+) = 10	$E_{ap} (+) = -0.1$ V
pH (0) = 8	$E_{ap} (0) = -0.25$ V

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para cada experimento individual realizado.

Tabla 2.- Resultados del diseño central compuesto para la optimización de los parámetros experimentales en la determinación de cocaína.

Nº Experiencia	pH	E_{ap} (mV)	Intensidad (nA)
1	6.0	-400	0.01
2	10.0	-400	0.01
3	6.0	-100	0.01
4	10.0	-100	2
5	5.2	-250	0.01
6	10.8	-250	5
7	8.0	-462	0.01
8	8.0	-38	0.01
9	8.0	-250	23
10	8.0	-250	21
11	8.0	-250	18

A partir del análisis de la varianza (ANOVA), que se muestra en la tabla 3, puede observarse que una función de segundo grado es adecuada para modelar los datos, ya que el fallo de ajuste no es significativo a un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 3.- ANOVA de los datos de la tabla 2.

EFEECTO	S.C.	G.L.	M.C.	F_{exp}	P_{actual}
A: pH	10.229	1	10.229	1.62	0.3316
B: E_{ap}	0.495	1	0.495	0.08	0.8061
AA	485.094	1	485.094	76.59	0.0128
AB	0.990	1	0.990	0.16	0.7308
BB	624.466	1	624.466	98.60	0.0100
Fallo de ajuste	4.828	3	1.609	0.25	0.8550
Error puro	12.667	2	6.333		
Total (corr.)	889.429				

$$R^2 = 0.98033$$

La corriente de reducción registrada se representó gráficamente frente a las diversas variaciones de pH y E_{ap} (Figura 11). El estudio de las curvas de nivel indica un máximo claramente definido para la variable respuesta en las siguientes condiciones de las variables experimentales,

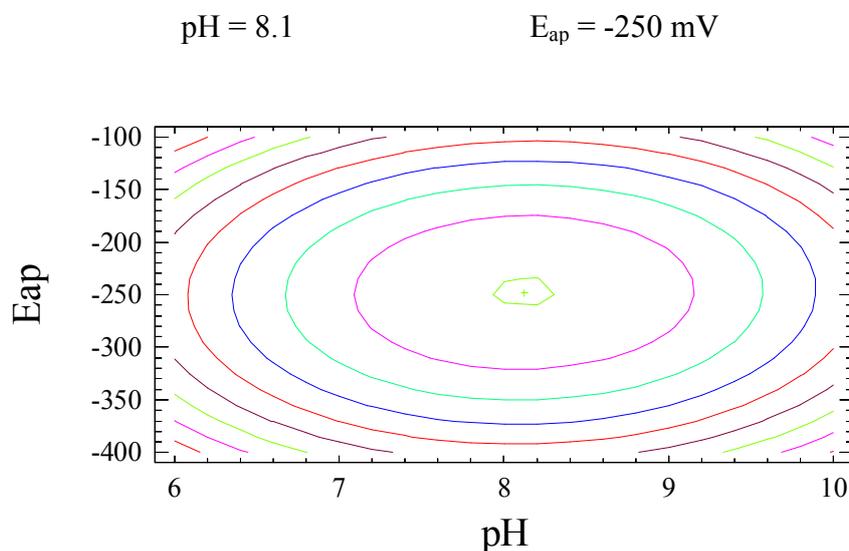


Figura 11.- Curvas de nivel de la variable respuesta obtenidas con los datos de la tabla 2.

La gran calidad de la señal obtenida en las condiciones óptimas permite realizar curvas de calibración en el rango de concentraciones de 19 a 166 nM, tal y como se muestra en la figura 12.

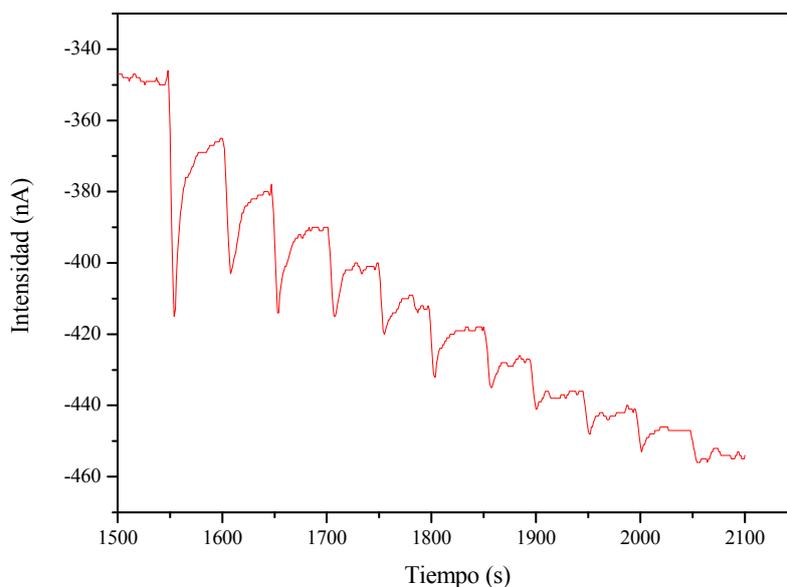


Figura 12- Cronoamperograma registrado para la determinación de cocaína en las condiciones optimizadas, pH 8.1 y $E_{ap} = -250 \text{ mV}$. Cada adición corresponde a 100 μL de una disolución 10^{-6} M de cocaína en 5 mL de tampón fosfato pH 8.1

3.3.- Caracterización de los electrodos serigrafiados modificados con CYP450 contruidos para la determinación de cocaína en estándares puros.

Para caracterizar un procedimiento analítico es importante establecer su precisión, en términos de reproducibilidad y repetibilidad, así como su capacidad de detección.

La reproducibilidad del procedimiento fue comprobada realizando varios experimentos mediante adiciones sucesivas de 100 μL de una disolución 10^{-6} M de cocaína en las condiciones optimizadas de las variables experimentales, utilizando diferentes electrodos serigrafiados de carbono.

Los parámetros del calibrado, así como la desviación típica, fueron óptimamente evaluados. La presencia de puntos anómalos y/o un rango lineal que no sea completamente válido, llevarían a estimaciones incorrectas en el cálculo de dichos parámetros. Con este objetivo se utilizó el programa PROGRESS [15], que evalúa el intervalo lineal y la presencia de datos anómalos mediante una regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS) y una vez que los elimina del conjunto de calibración, construye nuevamente con los restantes una recta de calibración mediante una regresión en mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Esta regresión OLS proporciona una correcta valoración de la pendiente (sensibilidad) y del término independiente del calibrado, siendo ambos importantes para juzgar la calidad del calibrado y a partir de ésta, la del método analítico.

En la figura 13 se presentan los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas a partir de ellos, una vez eliminados los puntos anómalos, en los diferentes calibrados realizados con distintos electrodos.

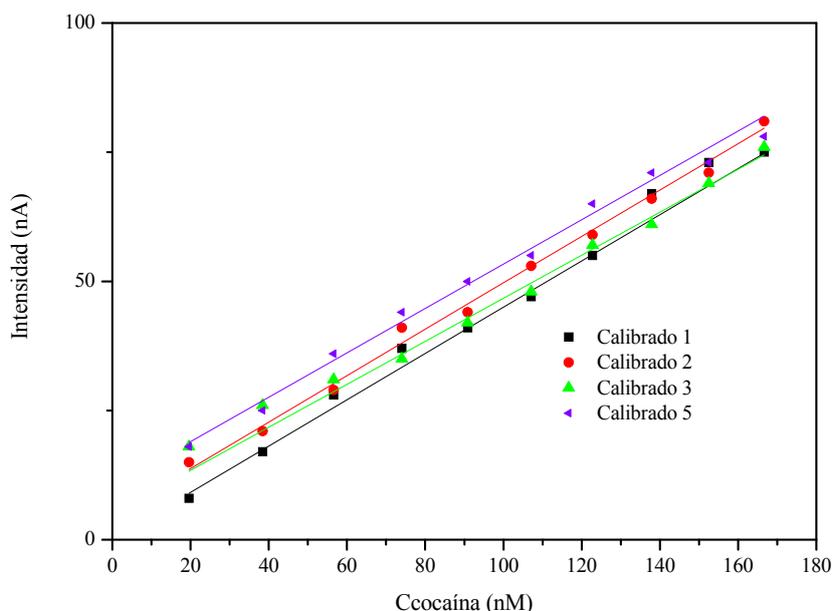


Figura 13.- Rectas de calibrado para el cálculo de la reproducibilidad del método. Adiciones de 100 μL de una disolución 10^{-6} M de cocaína en 5mL de tampón fosfato pH 8.1

La tabla 4 recoge los parámetros de calibración obtenidos con los distintos métodos de regresión utilizados para la estimación de la reproducibilidad del método propuesto.

La reproducibilidad, en términos de desviación estándar relativa (RSD), asociada a las pendientes de dichas rectas, se estima en un 3.56 % (n = 4).

Tabla 4.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la reproducibilidad del método.

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	10	10	7
Pendiente (nA μM^{-1})	0.4647	0.4560	0.4475
Tno. Indep. (nA)	-0.1273	-1.1558	0.2180
Coef. de determ. (R^2)	0.991	0.997	0.997
Desviación estándar residual	2.342		1.313
Nº de datos	10	10	10
Pendiente (nA μM^{-1})	0.4490	0.4524	0.4490
Tno. Indep. (nA)	4.7928	2.7949	4.7928
Coef. de determ. (R^2)	0.992	0.991	0.992
Desviación estándar residual	2.056		2.056
Nº de datos	10	10	8
Pendiente (nA μM^{-1})	0.3868	0.4381	0.4165
Tno. Indep. (nA)	8.9056	2.1323	5.0631
Coef. de determ. (R^2)	0.989	0.993	0.991
Desviación estándar residual	2.049		1.607
Nº de datos	10	10	9
Pendiente (nA μM^{-1})	0.4171	0.4554	0.4297
Tno. Indep. (nA)	11.1749	9.2232	10.3485
Coef. de determ. (R^2)	0.990	0.991	0.992
Desviación estándar residual	2.122		1.901

De igual manera se calculó la repetibilidad de sucesivas curvas de calibración realizadas en las condiciones óptimas de las variables experimentales, utilizando el mismo electrodo serigrafiado.

La tabla 5 recoge los parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión para la estimación de la repetibilidad del método. En la figura 14 puede observarse la pérdida de sensibilidad que se produce en las sucesivas curvas de calibración realizadas.

Finalmente se estimó la capacidad de detección del procedimiento a partir de las curvas de detección construidas con el programa DETARCHI, de acuerdo con la normativa ISO 11843, asumiendo tanto la probabilidad de falso positivo (α) como negativo (β). Esto conlleva relacionar la señal medida con la concentración de analito mediante la realización de calibrados óptimamente evaluados.

Así, se realizaron varios calibrados mediante adiciones de $100 \mu\text{L } 10^{-6} \text{ M}$ de cocaína. En la tabla 6 se recogen los valores de capacidad de detección del procedimiento, asociados a diferentes niveles de error, para cada uno de los calibrados realizados.

Tabla 5.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la repetibilidad del método.

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	10	10	8
Pendiente ($\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$)	0.3559	0.3304	0.3247
Tno. Indep. (nA)	17.8915	20.6279	21.0665
Coef. de determ. (R^2)	0.9914	0.9991	0.9985
Desviación estándar residual	1.7364		0.5346
Nº de datos	10	10	9
Pendiente ($\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$)	0.2871	0.2722	0.2819
Tno. Indep. (nA)	13.0448	13.9175	13.3838
Coef. de determ. (R^2)	0.9973	0.9974	0.9977
Desviación estándar residual	0.7797		0.6612
Nº de datos	10	10	9
Pendiente ($\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$)	0.1800	0.1566	0.1687
Tno. Indep. (nA)	13.5976	15.4497	14.3337
Coef. de determ. (R^2)	0.9816	0.9868	0.9898
Desviación estándar residual	1.2926		0.8329
Nº de datos	10	10	6
Pendiente ($\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$)	0.1567	0.1232	0.1227
Tno. Indep. (nA)	7.2510	11.8367	11.9165
Coef. De determ. (R^2)	0.9847	0.9992	0.9950
Desviación estándar residual	1.0231		0.2752

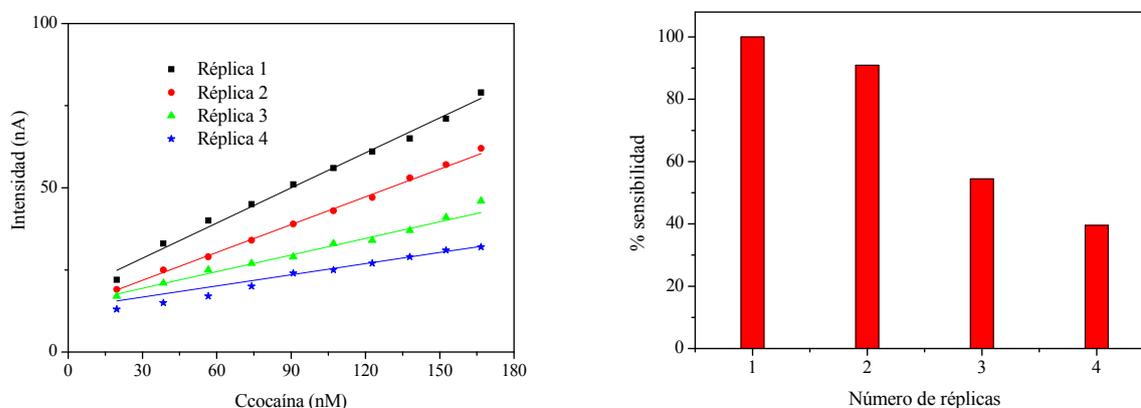


Figura 14.- Repetibilidad de las consecutivas réplicas realizadas con un mismo electrodo.

Tabla 6.- Capacidad de detección (nM) obtenida a partir de curvas de calibración de cocaína realizadas en las condiciones óptimas, en el rango de concentraciones de 19 a 166 nM

Experiencias	Capacidad de detección ($\alpha = 0.05$)			Señal (nA)
	$\beta = 0.05$	$\beta = 0.03$	$\beta = 0.01$	
1	25.07	26.90	30.35	18.58
2	26.44	28.37	32.04	10.94
3	21.79	23.37	26.36	21.88
4	22.01	23.60	26.62	14.56
5	26.40	28.32	31.95	17.69

De acuerdo con la expresión para el cálculo del intervalo de confianza de un valor medio

$$\left[\bar{x} \pm t_{\alpha, n-1, bil.} \frac{s}{\sqrt{n}} \right]$$

se obtuvo el siguiente valor medio de la capacidad de detección del método propuesto:

$$[24 \pm 3] \text{ nM (n = 5, } \alpha = \beta = 0.05).$$

3.4.- Determinación de cocaína en matrices complejas

Los biosensores basados en el enzima CYP450 construidos fueron utilizados para la determinación de cocaína en muestras comerciales, facilitadas para este estudio por entidades autorizadas. El interés de este método sería limitado si no fuera susceptible de ser aplicado a la resolución de un problema real.

La selectividad hacia el sustrato que caracteriza a los biosensores permite el empleo de éstos en complejos análisis utilizando una metodología tan sencilla como la adición estándar, que minimiza el efecto matriz de la muestra.

Una alícuota de la muestra comercial de cocaína (2.2 mg) se disolvió en 1 mL de tampón fosfato 0.05 M, KCl 0.1 M, pH 7. 0.1 mL del sobrenadante de esta disolución, una vez centrifugada, se llevaron a un volumen de 100 mL con el mismo tampón. Esta disolución se utilizó para la cuantificación de cocaína en la muestra.

En la figura 15 se muestra el cronoamperograma registrado, en las condiciones óptimas de las variables experimentales, mediante la adición estándar de idénticos volúmenes (100 μ L) de una disolución de cocaína 10^{-6} M, sobre 100 μ L de la disolución de la muestra comercial.

Así, la concentración de cocaína obtenida en la muestra analizada por cuadruplicado mediante adición estándar fue de $[29 \pm 3] \%$ (m/m).

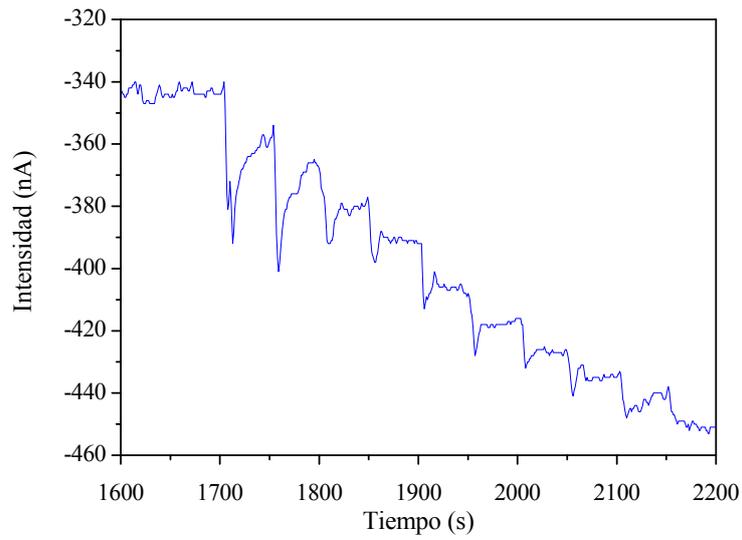


Figura 15.- Cronoamperograma de cocaína en las condiciones optimizadas, $pH = 8.1$ y $E_{ap} = -0.25$ V. La intensidad registrada a 1700 s corresponde a la adición de la muestra real. Las sucesivas señales se corresponden con adiciones de $100 \mu\text{L}$ de 10^{-6} M de cocaína

4.- CONCLUSIONES

De los resultados precedentes se extraen las siguientes conclusiones,

1. La fabricación de electrodos serigrafiados a partir de vías conductoras de Ag, aumenta significativamente la sensibilidad del dispositivo final.
2. La funcionalización de electrodos serigrafiados de carbono mediante sales de diazonio permite la posterior inmovilización del enzima CYP450 para la construcción de biosensores.
3. La respuesta electroquímica de cocaína en el electrodo serigrafiado de carbono modificado con en el enzima CYP450 permite observar una señal de reducción relacionada directamente con la concentración de este analito en el medio.
4. En la determinación de cocaína por cronoamperometría, la señal obtenida está influenciada por diversas variables experimentales tales como el potencial aplicado y el pH del medio. La optimización de estos factores mediante el empleo de un diseño central compuesto 2^2 permite obtener señales cuantificables.
5. El proceso de optimización de las variables experimentales conduce a unos valores de pH y potencial de 8.1 y - 0.25V, respectivamente.
6. La reproducibilidad del método asociada a las pendientes de las curvas de calibración en términos de RSD fue de 3.56 % (n = 4).
7. La capacidad de detección de cocaína obtenida con el método propuesto en las condiciones optimizadas fue de $[24 \pm 3]$ nM ($\alpha = \beta = 0.05$, n = 5).
8. El biosensor basado en el enzima CYP450 mediante unión covalente en electrodos serigrafiados de carbono, permite la determinación de cocaína en muestras reales.

5.- REFERENCIAS

1. Wang, J., *Analytical Electrochemistry*. second ed. 2000, New York: Wiley-VCH.
2. Pingarrón Carrazón, J.M. and P. Sánchez Batanero, *Química electroanalítica, Fundamentos y aplicaciones*. 2003, Madrid: Editorial Síntesis.
3. Eggins, B., *Biosensors: An Introduction*. 1996, New York: Wiley Teubner.
4. Mikkelsen, S.R. and E. Corton, *Bioanalytical Chemistry*. 2004, New Jersey: Wiley-Interscience.
5. Suleiman, A.A. and Y. Xu, *An Amperometric Immunosensor for Cocaine*. *Electroanalysis*, 1998. **10**(4): p. 240-243.
6. Du, Y., et al., *Solid-state probe based electrochemical aptasensor for cocaine: A potentially convenient, sensitive, repeatable, and integrated sensing platform for drugs*. *Analytical Chemistry*. **82**(4): p. 1556-1563.
7. Teller, C., et al., *Development of a bifunctional sensor using haptized acetylcholinesterase and application for the detection of cocaine and organophosphates*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008. **24**(1): p. 111-117.
8. Lewis, D.F.V., *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function*. 2001, Florida: CRC Press, Boca Ratón.
9. Donato, M.T., *¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?*, in *Monografía XIV de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2004.
10. Testa, B. and J. Caldwell, *The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. *Biochemistry of Redox Reactions*. 2004, California (USA): Academic Press.
11. Kloss, M.W., G.M. Rosen, and E.J. Rauckman, *Cocaine-mediated hepatotoxicity. A critical review*. *Biochemical Pharmacology*, 1984. **33**(2): p. 169-173.
12. Devlin, T.M., *Bioquímica*. Cuarta ed. 2006, Barcelona: Reverté, S.A.
13. Shumyantseva, V.V., et al., *Direct electron transfer of cytochrome P450 2B4 at electrodes modified with nonionic detergent and colloidal clay nanoparticles*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(20): p. 6046-6052.
14. STATGRAPHICS, *STATGRAPHICS PLUS for Windows*. 1994-2001, Statistical Graphics Corp.
15. Rousseeuw, P.J. and A.M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection*. 1989, New York: Wiley.

16. Sarabia, L. and M.C. Ortiz, *DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 1994. **13**(1): p. 1-6.
17. Alonso-Lomillo, M.A., et al., *Horseradish peroxidase covalent grafting onto screen-printed carbon electrodes for levetiracetam chronoamperometric determination*. Analytical Biochemistry, 2009. **395**(1): p. 86-90.
18. Alonso-Lomillo, M.A., et al., *CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers*. Analytica Chimica Acta, 2009. **633**(1): p. 51-56.
19. Alonso-Lomillo, M.A., et al., *Disposable biosensors for determination of biogenic amines*. Analytica Chimica Acta, 2010. **665**(1): p. 26-31.
20. Montgomery, D.C., *Diseño y análisis de experimentos*. 1991, México: Iberoamericana.
21. Box, G.E.P., N.G. Hunter, and J.S. Hunter, *Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos. Análisis de datos y construcción del modelo*. 1989, Barcelona: Reverté.