



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Química

Área de Química Analítica

Trabajo fin de grado

***DESARROLLO DE BIOSENSORES
NANOESTRUCTURADOS ENZIMÁTICOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE
CONTAMINANTES ORGÁNICOS VOLÁTILES***

Autora: Noemí Pérez González

Tutoras del trabajo: M. Asunción Alonso Lomillo

Olga Domínguez Renedo

Junio de 2011



Grado en Química

Departamento de Química

Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos

AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO: 2010/11

Dña. M. Asunción Alonso Lomillo y Dña. Olga Domínguez Renedo Directoras del Trabajo Fin de Grado de Dña. Noemí Pérez González, que lleva por título "Desarrollo de biosensores nanoestructurados enzimáticos para la determinación de contaminantes orgánicos volátiles"

Autorizan

No autorizan

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, 16 de junio de 2011

Dña. M. Asunción Alonso Lomillo

Dña. Olga Domínguez Renedo

I.- INTRODUCCIÓN.....	3
II.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
II.I.- Formaldehyde	4
II.II.- Analytical determinations: electrochemical sensors and biosensors.....	4
II.II.1.- Electrochemical methods: SPEs.....	4
II.II.2.- Enzyme modified SPEs	5
III.- REAGENTS, APPARATUS AND SOFTWARE	7
III.I.– Reagents.....	7
III.II.- Apparatus and software	9
IV.- DETERMINATION OF FORMALDEHYDE USING Pt-SPCEs AND SPC _{Pt} Es	9
V.- BIOSENSORES BASADOS EN SPCEs Y SPC _{Pt} Es PARA LA DETERMINACIÓN DE FORMALDEHIDO	13
V.I.- SPCEs modificados covalentemente con AOx.....	13
V.II.- Pt-SPCEs y SPC _{Pt} Es modificados por entrecruzamiento con AOx/HRP	17
V.III.- Caracterización de AOx/HRP-SPC _{Pt} Es en la determinación de formaldehido	19
VIII.- CONCLUSIONES.....	21

I.- INTRODUCCIÓN

El formaldehído (FA) es un compuesto considerado como tóxico que ejerce, sin duda, una influencia negativa en la salud humana, actuando sobre el sistema nervioso central, la sangre y el sistema inmunológico. Es también un potente irritante nasal que puede llegar a producir importantes problemas respiratorios. Además, presenta propiedades mutagénicas y es considerado por ello como un compuesto cancerígeno [1].

A pesar de sus propiedades tóxicas, el FA es ampliamente utilizado en numerosos procesos industriales, médicos y farmacéuticos. Así como, en variados productos de limpieza de uso doméstico. Además, al tratarse de uno de los productos del metabolismo de organismos vivos, su presencia en vegetales, pescados y fluidos biológicos es también frecuente [1].

Teniendo en cuenta la gran variedad de aplicaciones del FA y su alto nivel de toxicidad, se hace patente la necesidad de disponer de métodos lo suficientemente sensibles y selectivos para su determinación.

Las técnicas electroquímicas presentan importantes ventajas entre las que destacan su bajo coste, la simplicidad de los métodos y su elevada sensibilidad. Estas ventajas pueden verse incrementadas mediante la sustitución de los electrodos convencionales por electrodos serigrafiados que evitan todo el proceso de limpieza habitual en los electrodos sólidos clásicos. Además, resultan más adecuados para ser utilizados en dispositivos portátiles constituyendo un medio sencillo para llevar a cabo análisis *in situ*.

El interés por la elaboración de métodos que permitan llevar a cabo análisis rápidos, selectivos y con elevada sensibilidad de distintas sustancias en muestras complejas, ha dado lugar al desarrollo de distintos tipos de sensores. Entre dichos dispositivos destacan los biosensores basados en el empleo de un elemento de reconocimiento biológico inmovilizado en un sistema transductor apropiado. En este sentido, el empleo de biosensores basados en transductores electroquímicos abre un campo importante de posibilidades de análisis al combinar el potencial de las técnicas electroquímicas con la especificidad de los procesos de reconocimiento biológico.

En este trabajo se ha llevado a cabo un la determinación de FA empleando biosensores electroquímicos bienzimáticos basados en la inmovilización del enzima alcohol oxidasa (AOx) y el enzima Horseradish peroxidasa (HRP) en electrodos serigrafiados de carbono platinizado.

La inmovilización de los enzimas sobre la superficie electródica se llevó a cabo mediante entrecruzamiento. Los biosensores desarrollados presentaron buena reproducibilidad en el análisis de FA, permitiendo la determinación cuantitativa de dicha sustancia a muy bajas concentraciones (del orden de nM).

II.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

II.I.- Formaldehyde

FA is the simplest aldehyde compound [2]. FA is considered to be one of the most important commercial chemicals due to its chemical activity, high purity and relative cheapness. Annual world production of FA reaches up to 10 million tons, half of this volume being utilized for the production of phenol-, urea- and melamine-FA resins, which are widely used in the manufacturing of building plates, plywood and lacquer materials. It is also used in chemical synthesis as an intermediate in the production of such consumer goods as detergents, soaps, shampoos, and as a sterilizing agent in pharmacology and medicine [3]. FA is also naturally present in living organisms, fruits, vegetables and biological compounds [3,4]. Relatively high concentration of formaldehyde can be found in seafood and crustaceans, due to the enzymatic dissociation of trimethylamine-oxide (TMAO) [2]. Moreover, saturated solutions of FA, formalin, are also used in medical laboratories for its disinfection and preservative efficacy. Local FA level, in particular, becomes several parts per million in a pathology laboratory, which consumes large amount of formalin [4]. However, a high content of accumulated FA poses a threat to human health [5], so it has been declared a potential carcinogen and mutagen [2].

Thus, simple, sensitive and selective methods for FA control analysis are required in the different fields.

II.II.- Analytical determinations: electrochemical sensors and biosensors

Analytical methods for FA determination have been developed including spectrophotometry [6,7], fluorimetry [8,9], HPLC [10], gas chromatography [11] and electrochemistry [3]. Electroanalytical methods enable direct, reliable and reproducible measurements, using inexpensive instrumentation. These characteristics may be improved by the use of screen-printed electrodes (SPEs), which allow the design of portable and disposable instrumentation [12,13].

II.II.1.- Electrochemical methods: SPEs

Screen printing technology, a direct printing method otherwise known as penetration printing, has been successfully used in the construction of disposable, miniaturized electrodes since 1990. It consists of layer-by-layer depositions of ink upon a substrate, through the use of a screen or mesh, in such a way that the ink passes through the open spaces in the screen to be printed on the substrate, thereby defining the geometry of the sensor [13].

SPEs developed with this technology go a long way to meeting the requirements for sensitivity, selectivity, stability, precision, ease of use, low cost and robustness that are currently pursued in the development of analytical sensors. Their low cost, and easy use, coupled with an almost infinite number of possible modifications that can be made to SPEs, have all played a decisive role in the development of successful commercial versions of these electrodes. The high levels of demand are principally because of the need for analysis in the food industry, and in clinical and environmental sectors of the economy.

The problems of reproducibility associated with the use of solid electrodes, which require the regeneration of the electrode surface after usage, constitute the greatest drawback to the treatments capable of efficiently regenerating a surface. These are inappropriate for sensors that are designed for commercial use, as they depend to a great extent on the operating mode. Disposable SPEs have undoubtedly provided an answer to this problem, as they eliminate the need for regeneration of the surface.

One of the principal aspects of SPEs, which makes them highly attractive when seeking to develop commercial sensors, is the possibility of total automatization in the fabrication of a complete system containing the working electrode, and also the auxiliary and the reference electrodes, all of which are printed on the same substrate. Furthermore, the ease with which these electrodes may be miniaturized means that they are suitable to be integrated in lightweight, portable equipment, which enable readings to be taken *in situ*.

All of the above features, associated with their ease of preparation, flexible design, and the great number of modifications to which SPEs may be subjected, provide them a great number of advantages in comparison with other devices [12,13].

II.II.2.- Enzyme modified SPEs

One of the most important objectives of screen-printing technology is the preparation of modified electrodes. The enzymatic immobilization has proved to be one of the modifications to have stimulated the greatest interest.

Enzymatic sensors reduce the time needed for analysis and offer a rapid screening method for industrial food quality testing. The use of disposable transducers, such as SPEs, boosts the intrinsic characteristics of enzymatic sensors. Screen-printing technology had been shown as a method for mass production of biosensors at low cost.

One of the key stages in the design and manufacture of enzymatic biosensors is the immobilization of the enzyme on the electrochemical transducer. Features as important as their working life and their sensitivity depend in great measure on the immobilization methodology used. An adequate confinement of the biological material on the electrochemical surface can lead to an increase in its stability, as well as to the possible reuse of the biosensor, reducing the cost of the process [12,13].

II.II.2.1.- Immobilization of enzymes

Immobilization of enzymes on SPEs is usually performed in one of a variety of separate steps: the adsorption of the enzyme on the electrode surface, or on a membrane; its entrapment in a carbon ink or in a polymer matrix; the formation of either a cross-linked enzyme layer, or a covalent bond between the enzyme and the electrode surface; and, finally, by screen printing an enzyme-containing ink onto the working electrode. The aforementioned approach results in a biosensor manufactured with only one technology.

Adsorption is the simplest immobilization method and has been widely used in the construction of disposable biosensors. It is based on the fact that many substances, such as alumina, clays, graphite and silica gel share the property of adsorbing biological material on their surfaces. In the process, the enzyme bonds with the surface due to ionic interactions, Van der Waals forces and hydrogen bridges, without any functionalization. Factors such as the pH of the medium, ionic strengths, temperature or the presence of other ions can significantly affect the process of enzymatic adsorption. The greatest drawbacks of this method are its limited mechanical stability and the weak bond that is formed with the substrate.

Entrapment consists of the physical retention of the enzyme in the inner cavities of the porous matrix, which are generally constituted by photocurable monomers or polyethylenimine-type polymers, Nafion, polyvinyl alcohol, polyvinyl alcohol containing stilbazolium groups (PVA-SbQ) or polypyrrole. Hydrogels are also commonly used, such as poly (carbonyl sulphonate) and sodium carboxymethyl cellulose. It is a simple technique from the experimental point of view, and it does not require a great amount of biological material. An additional advantage is that enzyme undergoes no structural alteration. One of the drawbacks is the creation of a significant barrier that prevents the diffusion of the analyte towards the active centre of the enzyme, increasing the response time of the sensor. Entrapment requires rigorous control of the polymerization conditions, as they can alter the reactive groups of the protein, which can reduce enzymatic activity.

In microencapsulation technique, the enzymes are surrounded by semi-permeable membranes that allow substrate molecules and products to pass through them, but which block the enzyme. This method allows the biological material to enter into direct contact with the transducer, and, in turn, maintains the high selectivity of the enzymes given that they are not affected by the changes in the pH, the temperature or the ionic strength of the medium.

Cross-linking has been widely used in the stabilisation of enzymes. The method uses bifunctional reactives (dialdehydes, diiminoesters, diisocyanates, diazonium salts, and even diamines) activated with carbodiimide, that give rise to intermolecular bonds between enzyme molecules. Among the most widely used bifunctional reagents for the immobilization of enzymes on SPEs is glutaraldehyde (GA). A very common mixed immobilization procedure consists in immobilizing the enzyme by adsorption in a polymeric matrix. In this way, a prominent enzymatic face is constructed, which is subsequently modified with bifunctional reagent. Protein-rich residues of lysine, such as serum albumin, are frequently added so as to prevent loss of enzymatic activity.

Covalent bonding as a methodology is based on the activation of chemical groups in the substrate so that they react with the nucleophiles of the proteins. To form covalent bonds, the most often used amino acids are lysine, cysteine, tyrosine and histidine. This type of immobilization requires close control of parameters such as the pH or the ionic strength of the solution. It also requires a perfectly clean transducer surface. The great advantage of this method is that it achieves very long working lives of between 4 and 16 months.

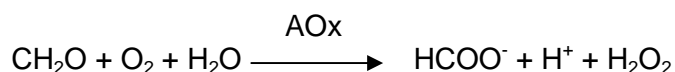
When using SPE-based electrochemical biosensor, the immobilization of the enzyme may be performed during the process of constructing the device. To do so, the enzyme to be immobilized is mixed with the conductive ink. This ink is usually composed of activated carbon, a polymer and silicone oil. A polymeric solution is

first prepared by dissolving the polymer in a buffer solution, and filtering the resulting solution. The filtered solution is thoroughly mixed with silicone oil and finally, with a solution containing the required amount of the chosen enzyme. Other biosensor components such as cofactors or mediators can be added to the ink together with the enzyme [13].

II.II.2.2.- Enzyme modified SPEs for determination of FA

Publications concerning SPEs based biosensors for monitoring FA use either formaldehyde dehydrogenase (FDH) [5,14-16] or AOx [2,17] as the biological component (Table 1).

FDH biosensors, which are NAD-dependent, are usually based on the oxidation of the reduced cofactor NADH. The main drawback of this systems is the high overpotentials required to follow this reaction [14], which lead to the use of mediators [5,15,17]. In the case of AOx biosensors, the enzymatic reaction generates formic acid and hydrogen peroxide. FA determination includes analysis of the oxygen consumption rate by the use of Clark electrodes [17], as well as potentiometric monitoring of the H⁺ ions produced from formic acid dissociation [2]:



A novel procedure based on the measurement of the H₂O₂ enzymatically generated has been developed in this work. In order to reduce the high operational potential usually needed to monitor this analyte, the used of a second enzyme, HRP has been proposed.

III.- REAGENTS, APPARATUS AND SOFTWARE

III.I.- Reagents

Several inks were used in the fabrication of SPEs, namely C10903P14 (carbon ink) and C2050804D9 (platinised carbon ink) (Gwent Electronic Materials, Torfaen, U.K), Electrodag 418 (Ag ink) and Electrodag 6037 SS (Ag/AgCl ink) (Acheson Colloiden, Scheemda, The Netherlands) and 242-SB (dielectric ink) (ELS Europe, Agmet Limited, Reading, UK).

All solutions were prepared with water purified with a Milli-Q device, which provided a resistivity of 18.2 MΩ cm.

100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Germany) solution was used as supporting electrolyte to characterize the electrochemical behaviour of 5 mM potassium ferricyanide (Merck, Darmstadt, Germany) solutions.

1 mM potassium hexachloroplatinate (IV) solutions were prepared in 100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Germany) for the electrochemical platinization of SPCEs (Pt-SPCEs).

Table 1.- Publications concerning SPEs based biosensors for monitoring FA.

Ref	Screen-printed working electrode material	Enzyme	Immobilization type	Mode of operation	Mediator	Concentration range	Capability of detection
[16]	C	FDH	Entrapment within reverse micelles	Amperometry ($E_{ap} = 800$ mV)	-	1.3 ppb - 1.2 ppm	-
[15]	C	FDH	Microencapsulation	Amperometry ($E_{ap} = 350$ mV; pH solution = 8)	Os polymer	0.3 ppb - 1.5 ppm	0.3 ppb
[5]	Platinized carbon	FDH	Microencapsulation	Amperometry ($E_{ap} =$ not said; pH solution = 7)	Tetrathiafulvalene	-	-
[17]	Pt	AOX + FDH	Entrapment in gel	Clark electrode (pH solution = 7)	-	1.5 – 90 ppm	22.8 ppm
[17]	Pt	AOX + FDH	Entrapment in gel	Amperometry ($E_{ap} = 200$ mV; pH solution = 7)	DCIP	30-210.2 ppm	22.22 ppm
[17]	Pt	AOX	Entrapment in gel	Clark electrode (pH solution = 7)	-	9.09-120.12 ppm	8.1 ppm
[14]	Carbon modified by carbon nanotubes	FDH	-	Amperometry ($E_{ap} = 300$ mV; pH solution = 7.5)	-	3 ppb – 45 ppm	-
[2]	Ag/AgCl modified by acrylic microspheres	AOX	Adsorption	Potentiometry	-	9 ppm – 9500 ppm	9 ppm

AOx solution from *Pichia pastoris* (EC 1.1.3.13; activity, 32 units/mg; Sigma, Steinheim, Germany), HRP (EC 1.11.1.7.; activity, 191 purpurogallin units/mg; Sigma, Steinheim, Germany), GA (Sigma, Steinheim, Germany) and bovine serum albumine (BSA) (Sigma, Steinheim, Germany) were used as received.

3 mM solution of 4-Nitrobenzenediazonium tetrafluoroborate ($\text{N}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2\text{BF}_4$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was prepared in acetonitrile containing 0.1 M tetrabutylammonium tetrafluoroborate (NBu_4BF_4) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Solutions of 40 mM *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 80 mM *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Fluka, Steinheim, Germany) were prepared in 10 mM phosphate buffer pH 8 and used for the covalent immobilization procedure.

Stock standard solutions of FA were prepared by dissolving the adequate amount of a FA solution (Sigma, Steinheim, Germany).

100 mM phosphate buffer and 100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Germany) solutions were used as supporting electrolyte. 1 M NaOH solutions (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) was used to adjust the pH value.

III.II.- Apparatus and software

Screen-printed carbon electrodes (SPCEs) were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using screen polyester mesh and polyurethane squeegees. Electrochemical measurements were made by a μ Autolab type II electrochemical system with GPES software (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands). The pH of the solutions was measured with a Crison Model 2002 (Barcelona, Spain) pHmeter.

Data analysis was processed with STATGRAPHICS PLUS [18], for experimental designs, PROGRESS for robust regressions [19] and DETARCHI [20] for the capability of detection.

IV.- DETERMINATION OF FORMALDEHYDE USING Pt-SPCEs AND SPC_{Pt}Es

The redox peaks intensities of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ in a 100 mM solution of KCl were used as sensitivity identification of the built SPEs. Cyclic voltammograms of a 5 mM ferricyanide solution were recorded prior to use them (Figure 1), scanning the potential between + 800 mV and – 400 mV vs screen-printed Ag/AgCl reference electrode at a scan rate of 100 mV s⁻¹.

SPEs based on conventional inks, such as carbon, have been reported not to be useful for the sensing of FA [21]. Taking into account the oxidation scheme of FA described at Pt electrodes [22], SPCEs have been modified with this metal following two different approaches.

On one hand, SPCEs were electrochemically platinised (Pt-SPCEs) in a 1 mM solution of potassium hexachloroplatinate (IV) in 100 mM KCl by cyclic voltammetry (- 600 V to 400 V vs. screen-printed Ag/AgCl reference electrode, at a scan rate of 50 mV s⁻¹, 4 potential cycles) [1]. Figure 2 shows the cyclic voltammogram registered using a Pt-SPCE in a 100 mM H₂SO₄ solution. The

reduction peak observed points out the presence of Pt nanoparticles at the electrode surface.

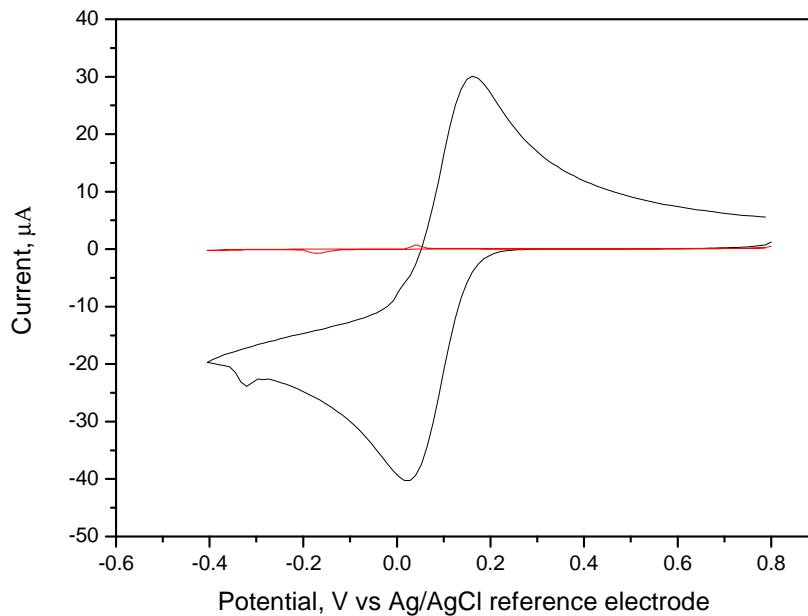


Figure 1.- Cyclic voltammograms recorded in a 100 mM KCl solution (dot line) and in a 5 mM de ferricyanide solution in a 100 mM KCl solution (solid line) using a SPCE.

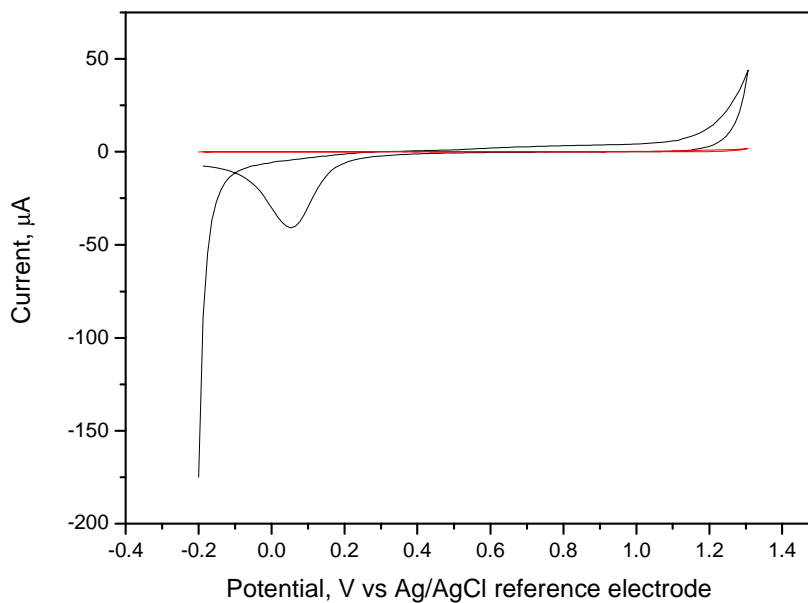


Figure 2.- Cyclic voltammograms registered in a 100 mM H_2SO_4 solution using a Pt-SPCE (solid line) and a SPCE (dot line)

On the other hand, platinised carbon was used instead of the conventional carbon for the working electrode fabrication ($\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{Es}$). Figure 3 shows the cyclic voltammograms of a 0.35 M FA solution at SPCE (dot line), Pt-SPCE (solid line) and $\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{E}$ (dash line). An increase of peak current was observed at both modified electrodes compared with bare SPCE, which confirm the electrocatalysis toward the HCHO redox [22].

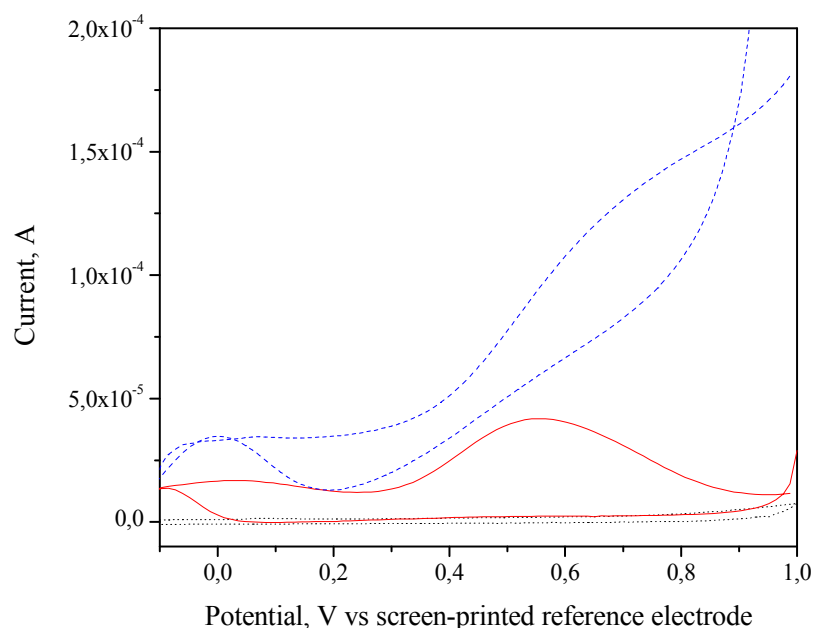


Figure 3.- Cyclic voltammograms of a 0.35 M FA solution at SPCE (dot line), Pt-SPCE (solid line) and $\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{E}$ (dash line) in 50 mM phosphate buffer and 100 mM KCl solution pH 7.5. Scan rate, 100 mV s^{-1} .

Then, chronoamperograms were registered for consecutive additions of FA in 5 mL of a 50 mM phosphate buffer and 100 mM KCl solution pH 7.5 at the operational potential of 600 mV, using Pt-SPCEs and $\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{Es}$. It can be observed in figure 4 the higher sensitivity obtained for FA in the concentration range from 0.99 up to 9.09 mM when using $\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{Es}$.

Repeatability and reproducibility of both sensors were investigated by chronoamperometric measurements. Different calibration curves were recorded under the above-mentioned conditions, using a single Pt-SPCE or $\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{E}$ in the case of repeatability and different ones for reproducibility. In order to detect anomalous points in these regressions, which would alter intercept and slope values, least median of squares (LMS) regressions were applied [19]. Those points were first detected and eliminated, and then, ordinary least squares (OLS) regressions were built avoiding wrong conclusions in the regression parameters. The slopes of the obtained current vs concentration regressions were used to evaluate these figures of merit in terms of relative standard deviation (RSD). The sensors showed acceptable RSD values of 8 % ($n = 4$) and 9 % ($n = 6$) in the case

of repeatability of Pt-SPCE and $\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{E}$, respectively, and 12 % ($n = 5$) and 4 % ($n = 6$) for reproducibility of Pt-SPCEs and $\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{E}$ s, correspondingly.

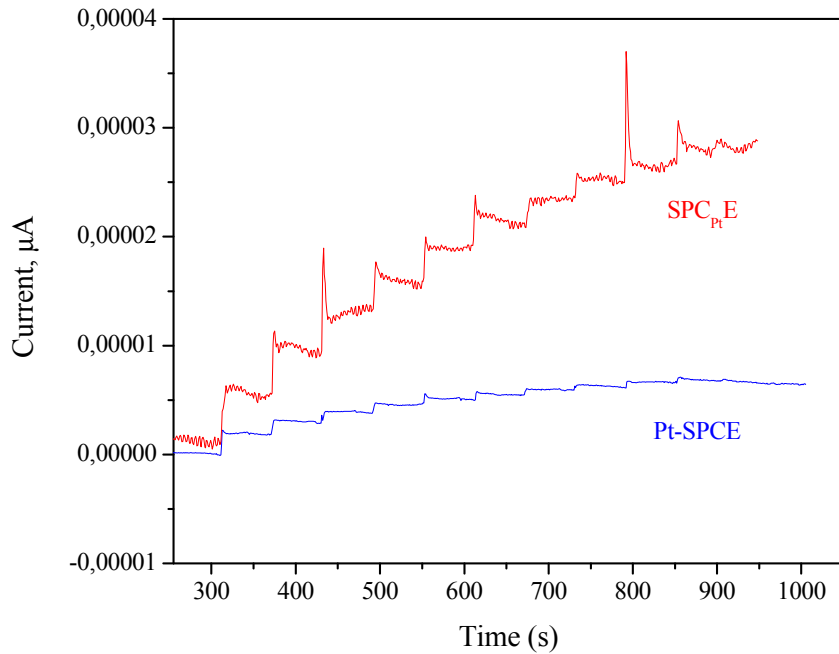


Figure 4.a.- Chronoamperograms recorded for successive additions of 50 μL of a 0.1 M FA solution using a Pt-SPCE and a $\text{SPC}_{\text{Pt}}\text{E}$ at an operational potential of 600 mV in 5 mL of 50 mM phosphate buffer and 100 mM KCl solution pH, 7.5.

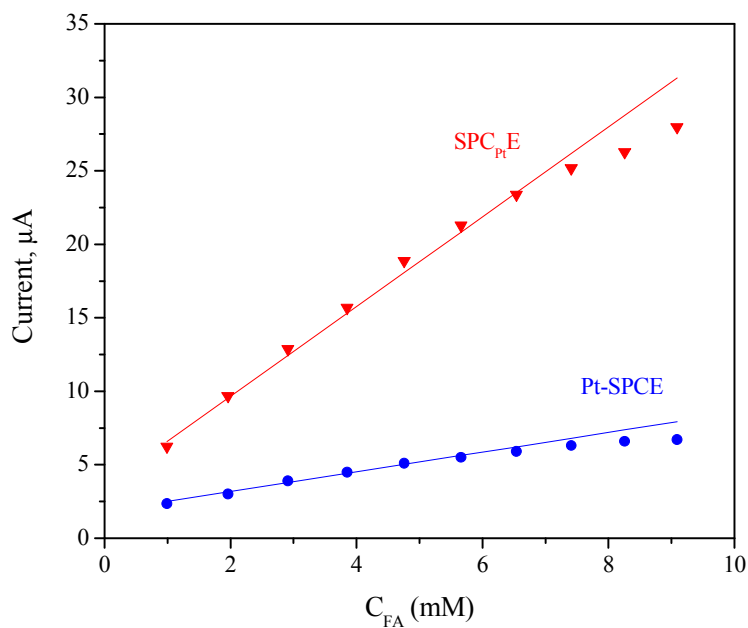


Figure 4.b.- Linear relationships between the oxidation current outputs and FA concentrations at both electrodes.

V.- BIODENSORES BASADOS EN SPCEs Y SPC_{Pt}Es PARA LA DETERMINACIÓN DE FORMALDEHIDO

Como se ha descrito en la primera parte del trabajo, un biosensor es un dispositivo que contiene una molécula biológica inmovilizada (enzimas en este caso) próxima a un transductor (electrodo serigrafiado) que, en contacto con el analito (FA), transforma la señal química producida en una señal eléctrica. La inmovilización del elemento biológico en el reducido área correspondiente al electrodo de trabajo (4 mm²) es la etapa crítica en la fabricación de biosensores electroquímicos. Características tan importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad del biosensor, dependen en gran medida de la metodología de inmovilización utilizada.

V.I.- SPCEs modificados covalentemente con AOx

El enzima AOx cataliza la oxidación de FA a ácido fórmico, produciendo agua oxigenada [2]. La oxidación electroquímica de este producto puede relacionarse con la concentración de FA en el medio de análisis. Por tanto, en esta etapa del trabajo se propuso la puesta a punto de un biosensor basado en el enzima AOx inmovilizado covalentemente sobre SPCEs.

La sensibilidad de los dispositivos serigráficos utilizados se caracterizó en una etapa previa a la modificación de los mismos, registrando voltamperogramas cíclicos de ferricianuro potásico 5 mM en KCl 100 mM a una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de los picos característicos de reducción y de oxidación de este compuesto confirman la excelente capacidad de respuesta de estos transductores.

La inmovilización de enzimas mediante enlace covalente directo precisa de superficies electrónicas funcionalizadas previamente, que aportan puntos de anclaje a las biomoléculas favoreciendo su orientación. Las superficies de carbono fueron modificadas con grupos arilos mediante la reducción electroquímica de sales de diazonio usando acetonitrilo como disolvente [23-25]. El proceso consta de dos etapas.

- ✓ En la primera, se registra un voltamperograma cíclico entre 0.8 y -0.4 V vs. Ag/AgCl-serigrafiado, a 200 mV s⁻¹, en una disolución 3 mM de sal de diazonio de 4-nitrobenceno preparada en CH₃CN anhidro, conteniendo Bu₄NBF₄ en concentración 0.1 M (Fig. 5). De esta manera se obtiene una monocapa de nitrofenilos covalentemente unida, a través de un enlace C-C, a la superficie de carbono.
- ✓ A continuación se realiza la reducción electroquímica de los grupos nitro a amino, para lo que sobre el electrodo se depositaron 100 µL de una mezcla de etanol:H₂O, 1:9, conteniendo KCl 0.1 M, y se realizaron dos ciclos reductivos, entre 0.2 y -1.6 V vs Ag/AgCl-serigrafiado a 200 mV s⁻¹ (Fig. 6).

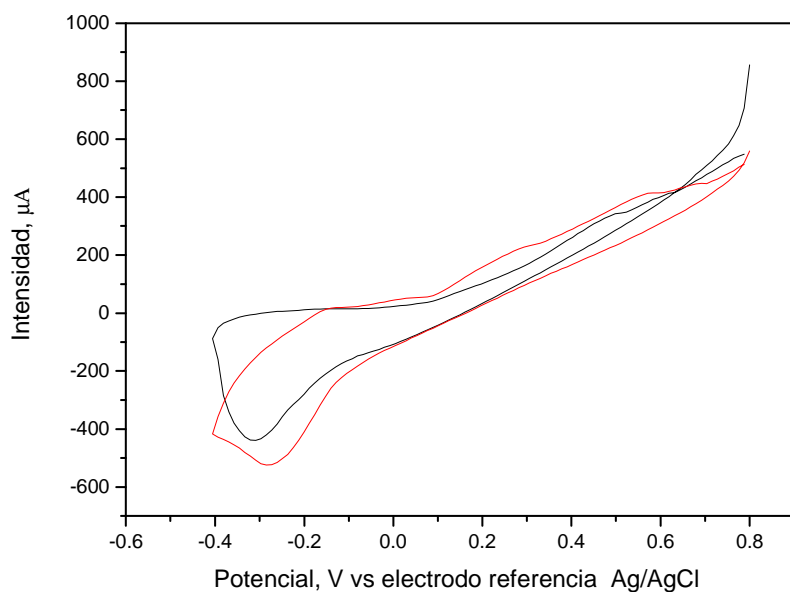


Figura 5.- Formación de la monocapa de sal de diazonio mediante voltamperometría cíclica en una disolución 3 mM de sal de diazonio en acetonitrilo/ $N(\text{Bu}_4)\text{BF}_4$, entre 0.8 y -0.4 V a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} .

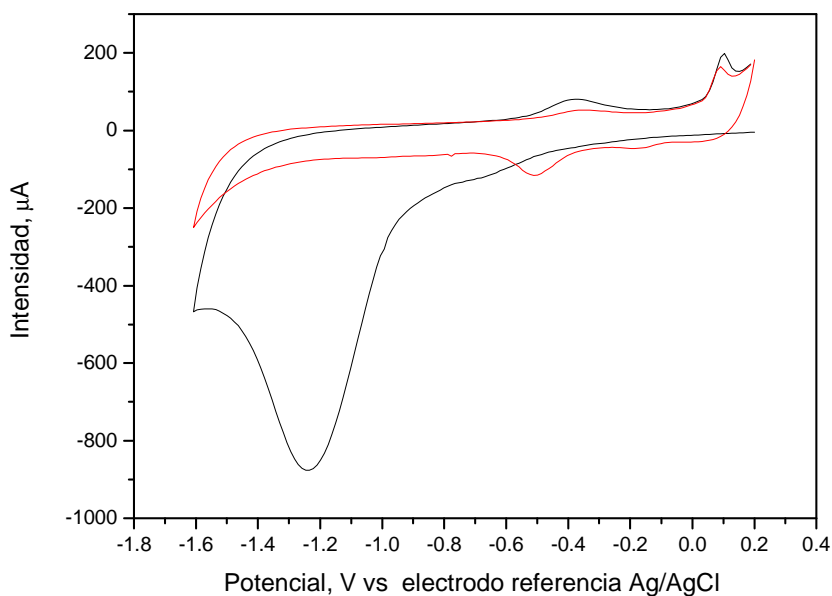


Figura 6: Reducción de los grupos nitro de la sal de diazonio mediante barridos voltamperométricos en una disolución desoxigenada 0,1M KCl agua/etanol (9:1) entre 0 y $-1,7$ V, a una velocidad de barrido de 200 mVs^{-1} .

La última etapa de construcción del biosensor consiste en la inmovilización del enzima. Con este fin, se depositaron secuencialmente sobre la superficie funcionalizada del electrodo de trabajo 3 μL de AOX, 2 μL de NHS y 2 μL de EDC, y se permite reaccionar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente y 60 minutos a 4°C [24-27].

El pH de las disoluciones de NHS y EDC que facilitan la formación del enlace covalente entre el enzima y la monocapa que modifica el electrodo, es una variable experimental de suma importancia. Por tanto, se realizaron experiencias a distintos valores de pH de inmovilización (2, 4, 6, 8 y 10) con el objetivo de seleccionar el que condujera a una mayor intensidad de oxidación medida en un cronoamperograma registrado en fosfato 100 mM y KCl 100 mM (pH 7.5) a un potencial de 600 mV, de acuerdo a experiencias previas. Se obtuvieron los mejores resultados utilizando disoluciones de pH 8.

A continuación se optimizaron las variables experimentales que influyen en la respuesta cronoamperométrica del FA. La optimización de las variables experimentales en cualquier proceso analítico constituye una etapa muy importante de la experimentación, especialmente cuando se trabaja con técnicas amperométricas, donde la intensidad de pico se ve muy influenciada por parámetros tales como el pH del medio o el potencial aplicado. La influencia de cada una de estas variables se estudió mediante la metodología del diseño de experimentos. Se realizó un diseño central compuesto 2^2 que constó de 11 experimentos, correspondientes a todas las posibles combinaciones entre los niveles de cada factor y de tres replicas en el punto central, necesarias para estimar el error residual.

Los valores correspondientes a los niveles alto (+), bajo (-) y al punto central (0) para cada factor fueron seleccionados de acuerdo a experiencias previas:

$E_{ap} (+) = 600 \text{ mV}$	pH = 9,5
$E_{ap} (-) = 200 \text{ mV}$	pH = 5,5
$E_{ap} (0) = 400 \text{ mV}$	pH = 7,5

Como variable respuesta se tomó la intensidad registrada para una disolución 19.6 mM de FA. Los resultados obtenidos para este diseño experimental son los que aparecen en la Tabla 2. Las experiencias en las que no se obtuvo respuesta alguna, se cuantificaron con el valor de 0,1 nA para poder realizar el análisis de los resultados, que se presentan en forma de ANOVA (Tabla 3). Puede observarse que todos los factores influyen significativamente en el valor de la respuesta, siendo el modelo adecuado ya que no se observó fallo de ajuste ($P_{\text{actual}} > 0,05$) a un nivel de confianza del 95 %.

En las curvas de nivel de la variable respuesta obtenida con los datos de la tabla 2, mostradas en la figura 7, se observa un máximo correspondiente al valor óptimo de las variables experimentales para una disolución de fosfato pH 5,9 y un potencial de trabajo de 450 mV.

Tabla 2.- Resultados del diseño central compuesto 2^2 para la optimización de los parámetros experimentales en la determinación de FA ($C_{FA} = 1 \text{ mM}$).

Medida	pH	E_{ap} (mV)	Intensidad (μA)
1	5,5	200	8,8
2	9,5	200	0,1
3	5,5	600	26
4	9,5	600	0,1
5	4,7	400	20
6	10,3	400	0,1
7	7,5	117	0,1
8	7,5	683	0,1
9	7,5	400	21,6
10	7,5	400	25
11	7,5	400	23,5

Tabla 3.- ANOVA de los datos obtenidos mediante la metodología de diseño de experimentos.

S.C., suma de cuadrados; G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados;

$$F_{exp} = MC_{factor} / MC_{error}; P_{actual}, \text{ nivel de probabilidad};$$

* Factores significativos a $\alpha = 0,05$

Efecto	S.C.	G.L.	M.C.	F_{exp}	P_{actual}
A: pH fosfato	492.088	1	492.088	169.49	0.0058*
B: Eap	36.98	1	36.98	12.74	0.0703
AA	186.032	1	186.032	64.08	0.0153*
AB	73.96	1	73.96	25.47	0.0371*
BB	648.294	1	648.294	223.29	0.0044*
Fallo de ajuste	69.2032	3	23.0677	7.95	0.1138
Error puro	5.80667	2	2.90333		
Total (Corr)	1367.74	10			

$$R^2 = 0.945158$$

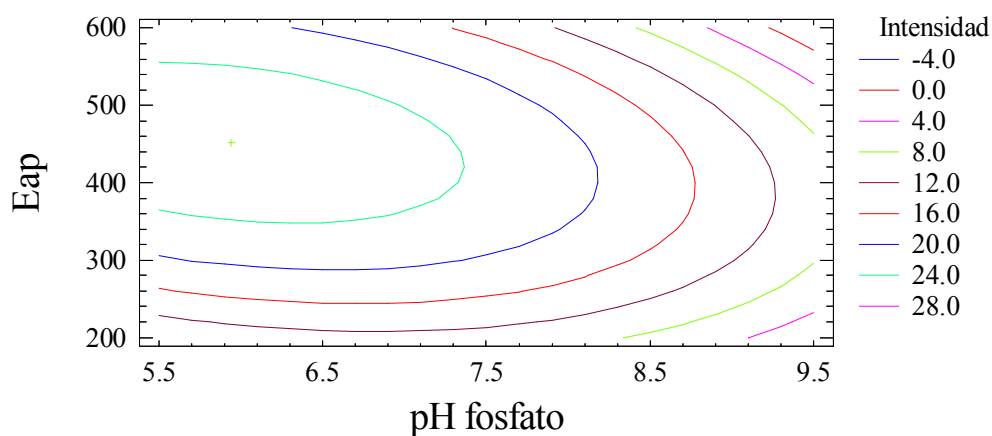


Figura 7.- Curvas de nivel de la variable respuesta obtenidas con los datos de la tabla 3.

En estas condiciones se intentaron realizar los correspondientes calibrados de FA, pero desafortunadamente no se pudieron obtener resultados reproducibles. La cantidad de FA que este procedimiento permitió detectar resultó relativamente elevada (del orden de μM), por lo es muy probable que se produjera la saturación no reversible del enzima. Se contrastó este resultado con diferentes métodos de inmovilización del enzima AOX, como la impresión directa del mismo mediante técnicas serigráficas, obteniéndose un resultado análogo.

Teniendo en cuenta que un subproducto de la reacción es peróxido de hidrógeno, y que el empleo de materiales platinizados en los transductores potencia su detección, se realizaron diferentes experiencias utilizando SPC_{Pt} Es. Además, la introducción de un segundo enzima, HRP, permitiría reducir el potencial operacional. Por tanto, se analizaron otros métodos de inmovilización de la mezcla de enzimas AOX/HRP en la construcción de biosensores para la determinación de FA.

Los mejores resultados, que son los que se detallan a continuación, se obtuvieron inmovilizando los enzimas AOX/HRP por entrecruzamiento con BSA y GA.

V.II.- Pt-SPCEs y SPC_{Pt} Es modificados por entrecruzamiento con AOX/HRP

Los distintos SPEs platinizados se modificaron con los enzimas AOX/HRP por entrecruzamiento siguiendo el procedimiento que se describe a continuación [28]:

- ✓ Se preparan disoluciones de BSA al 6% en tampón fosfato 10 mM a pH 6 y GA al 2,5% en agua.
- ✓ Se mezclan 3 μL de BSA al 6%, 3 μL de GA al 2,5%, 2 μL de una disolución 5 mg/mL de HRP y 4 μL de AOX.
- ✓ Se depositan 5 μL de la mezcla en el electrodo de trabajo y se deja reaccionar durante 90 minutos a 4°C.

En las figuras 8 y 9 se presentan los cronoamperogramas registrados utilizando los distintos transductores modificados con los enzimas AOX/HRP para la determinación de FA en una disolución de fosfato pH 7.5, aplicando un potencial de trabajo de -100 mV (condiciones elegidas de acuerdo con experiencias previas).

Se observa que la utilización de SPC_{Pt} Es da lugar a biosensores mucho más sensibles para la determinación de este analito.

Para comprobar que la respuesta cronoamperométrica se debe exclusivamente a la acción de los enzimas inmovilizados, se realizaron cronoamperogramas en las mismas condiciones experimentales utilizando un SPC_{Pt} E sin modificar y otro modificado únicamente con BSA y GA de acuerdo con el procedimiento descrito. No se obtuvo respuesta alguna.

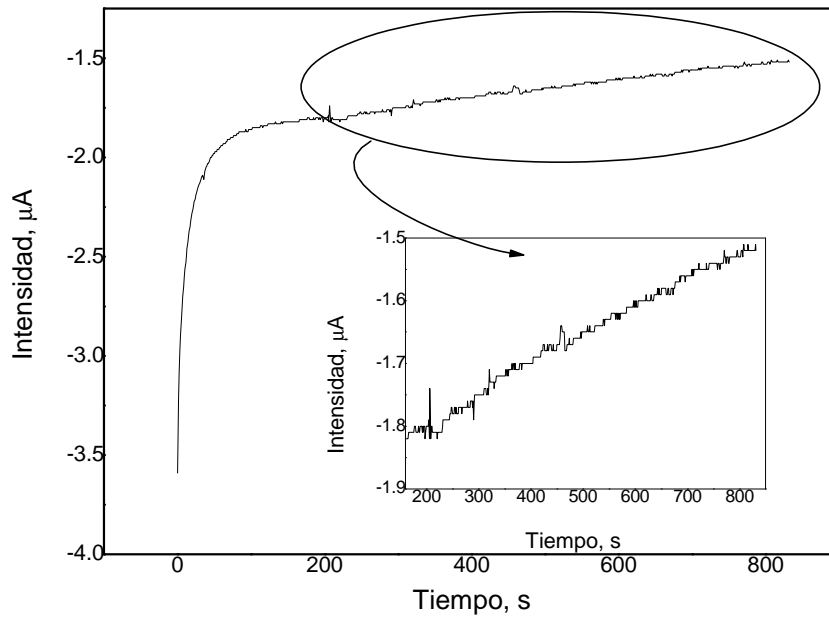


Figura.8.- Cronoamperograma registrado utilizando el biosensor bienzimático basado en un Pt-SPCE en una disolución de fosfato pH 7.5, aplicando un potencial de trabajo de -100 mV. Cada adición se corresponde a $50 \mu\text{L}$ de 4 mM de una disolución de FA.

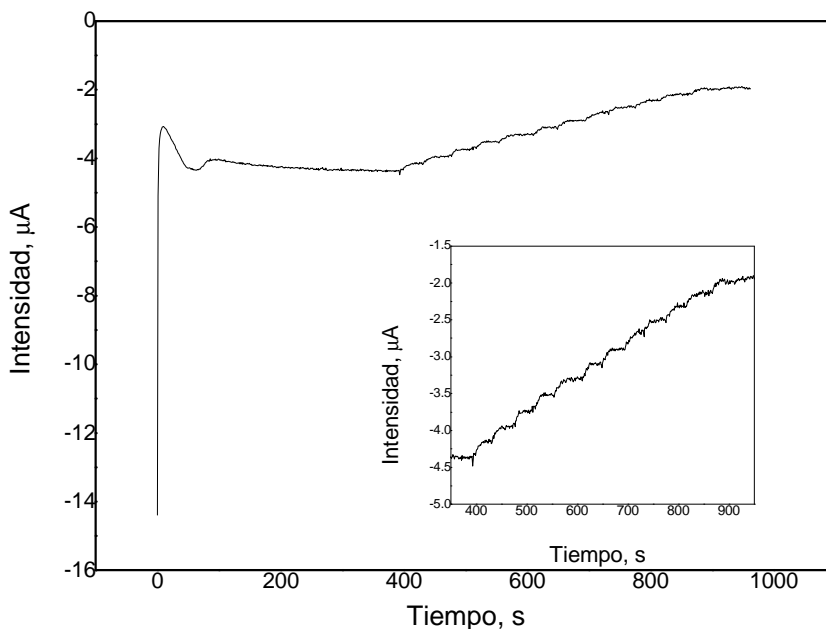


Figura.9.- Cronoamperograma registrado utilizando el biosensor bienzimático basado en un SPC_{PtE} en una disolución de fosfato pH 7.5, aplicando un potencial de trabajo de -100 mV. Cada adición se corresponde a $50 \mu\text{L}$ de 4 mM de una disolución de FA.

V.III.- Caracterización de AOx/HRP-SPC_{Pt}Es en la determinación de formaldehído

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

Inicialmente, se comprobó la reproducibilidad del procedimiento. Para ello, se realizaron varias curvas de calibración mediante adiciones sucesivas de 50 μ L de una disolución 4 mM de FA, en las condiciones óptimas de las variables experimentales, pH 7.5 y - 100 mV, utilizando distintos AOx/HRP-SPC_{Pt}Es (Fig. 10).

Los parámetros del calibrado, así como la desviación típica, fueron óptimamente evaluados de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección IV. Así, la RSD asociada a las pendientes de las rectas construidas una vez eliminados los puntos anómalos, fue de 13.58 %.

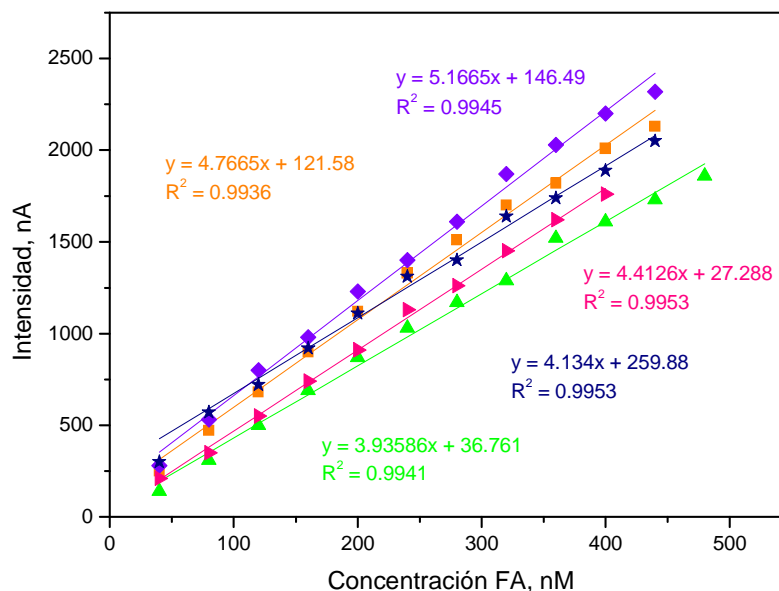


Figura 10.- Puntos experimentales y rectas de calibración construidas en el intervalo de concentración de FA de 40 a 479,94 nM, realizados para la estimación de la reproducibilidad del biosensor.

De igual manera se calculó la repetibilidad de sucesivas curvas de calibración realizadas en las condiciones óptimas de las variables experimentales, utilizando el mismo AOx/HRP-SPC_{Pt}E, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 40 y 479.94 nM. En la figura 11 se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración obtenidas, cuya RSD asociada fue de 3.68 % (n=3). Este valor indica la posibilidad de reutilización del biosensor en múltiples ocasiones sin que disminuya significativamente la sensibilidad del método.

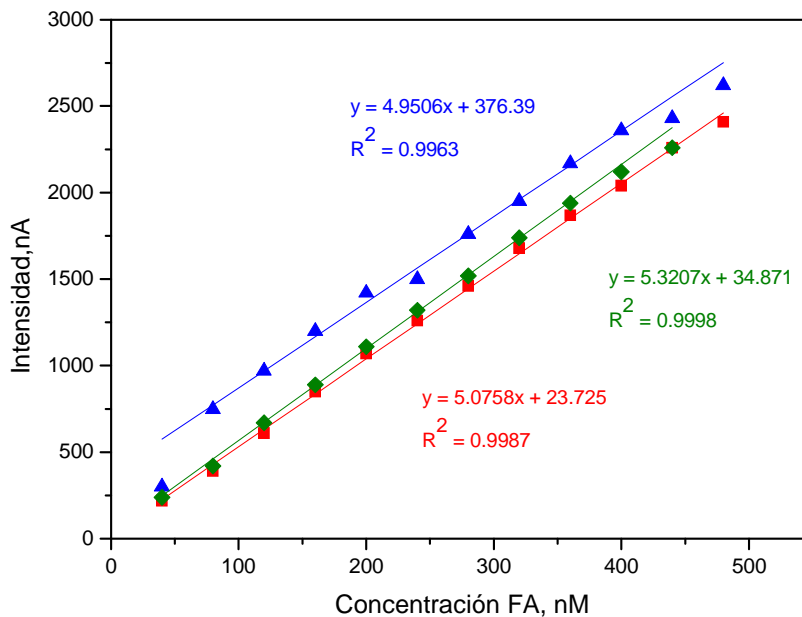


Figura 11.- Puntos experimentales y rectas de calibración construidas en el intervalo de concentración de FA de 40 a 479,94 nM, realizados para la estimación de la repetibilidad del biosensor.

El procedimiento analítico para la determinación de FA fue a su vez caracterizado mediante su capacidad de detección, teniendo en cuenta la probabilidad de falso positivo (α) y falso negativo (β) [29,30], para lo que se utilizó el programa DETARCHI [20]. En el cálculo de este índice de calidad se utilizaron también regresiones lineales validadas entre la concentración y la señal analítica. El valor de capacidad de detección obtenido fue de 47.23 ± 2.70 nM ($\alpha = \beta = 0.05$; $n = 3$).

VIII.- CONCLUSIONES

Con los datos recogidos en este trabajo se puede concluir que:

- ✓ La modificación de electrodos de carbono con platino cataliza la oxidación electroquímica de FA.
- ✓ La construcción de electrodos serigrafiados con carbono platinizado, además de simplificar el propio proceso de fabricación, da lugar a dispositivos más sensibles que los obtenidos con electrodos serigrafiados de carbono modificados con platino electroquímicamente.
- ✓ La inmovilización de los enzimas AOX y HRP por entrecruzamiento con BSA y GA en los electrodos serigrafiados con carbono platinizado, constituye el procedimiento más sencillo y reproducible para la determinación de FA.
- ✓ La reacción bienzimática con FA puede monitorizarse amperométricamente a través de la señal de oxidación registrada a un potencial adecuado. Este potencial, así como el pH del medio de análisis, influyen significativamente en la intensidad registrada.
- ✓ Las condiciones óptimas de las variables experimentales para la determinación de FA utilizando el biosensor bienzimático son pH 7,5 y potencial aplicado - 100 mV.
- ✓ La reproducibilidad del método propuesto en términos de RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración, en el intervalo de concentración de 40 a 479.94 nM, es de 13.58 % (n=3).
- ✓ La repetibilidad del método propuesto en términos de RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración, en el intervalo de concentración de 40 a 479.94 nM, es de 3.68 % (n=3). Aunque los biosensores tienen carácter desechable, puede concluirse que se pueden reutilizar sin pérdida de sensibilidad.
- ✓ La capacidad de detección obtenida para FA en las condiciones óptimas de las variables experimentales es de 47.23 ± 2.70 nM ($\alpha = \beta = 0.05$; n = 3).

IX.- REFERENCIAS

- [1] O. Demkiv, O. Smutok, S. Paryzhak, G. Gayda, Y. Sultanov, D. Guschin, H. Shkil, W. Schuhmann, M. Gonchar, *Talanta* 76 (2008) 837-846.
- [2] Y.P. Ling, L.Y. Heng, *Sensors* 10 (2010) 9963-9981.
- [3] Y.I. Korpan, M.V. Gonchar, A.A. Sibirny, C. Martelet, A.V. El'skaya, T.D. Gibson, A.P. Soldatkin, *Biosensors and Bioelectronics* 15 (2000) 77-83.
- [4] H. Kudo, Y. Suzuki, T. Gessei, D. Takahashi, T. Arakawa, K. Mitsubayashi, *Biosensors and Bioelectronics* 26 854-858.
- [5] R. Katakay, M.R. Bryce, L. Goldenberg, S. Hayes, A. Nowak, *Talanta* 56 (2002) 451-458.
- [6] G. Avigad, *Analytical Biochemistry* 134 (1983) 499-504.
- [7] V.E. Vaskovsky, S.V. Isay, *Analytical Biochemistry* 30 (1969) 25-31.
- [8] H. Chen, C. Zhou, L. Wang, J. Chen, B. Ling, J. Fu, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 78 371-374.
- [9] A.L. Lazrus, K.L. Fong, J.A. Lind, *Analytical Chemistry* 60 (1988) 1074-1078.
- [10] P.R. Houlgate, K.S. Dhingra, S.J. Nash, W.H. Evans, *Analyst* 114 (1989) 355-360.
- [11] E.R. Kennedy, R.H. Hill, *Analytical Chemistry* 54 (1982) 1739-1742.
- [12] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martinez, *Talanta* 73 (2007) 202-219.
- [13] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martinez, Enzyme modified screen printed electrodes. in: R. Comeaux, P. Novotny, (Eds.), *Biosensors: Properties, Materials and Applications*, Nova Publishers, Hauppauge NY, 2009, pp. 1-52.
- [14] L. Bareket, A. Rephaeli, G. Berkovitch, A. Nudelman, J. Rishpon, *Bioelectrochemistry* 77 (2010) 94-99.
- [15] Y. Herschkovitz, I. Eshkenazi, C.E. Campbell, J. Rishpon, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 491 (2000) 182-187.
- [16] M.J. Dennison, J.M. Hall, A.P.F. Turner, *Analyst* 121 (1996) 1769-1773.
- [17] M. Khlupova, B. Kuznetsov, O. Demkiv, M. Gonchar, E. Csoregi, S. Shleev, *Talanta* 71 (2007) 934-940.
- [18] STATGRAPHICS, STATGRAPHICS PLUS for Windows, Statistical Graphics Corp., Copy 1994-2001.
- [19] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection*. (1989) Wiley. New York.
- [20] L. Sarabia, M.C. Ortiz, *Trac-Trends In Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6.
- [21] J. Wang, M. Pedrero, X.H. Cai, *Analyst* 120 (1995) 1969-1972.
- [22] G.P. Jin, J. Li, X. Peng, *Journal of Applied Electrochemistry* 39 (2009) 1889-1895.
- [23] M.A. Alonso Lomillo, O. Domínguez Renedo, P. Matos, M.J. Arcos Martinez, *Anal Chim Acta* in press (2010).
- [24] M.A. Alonso-Lomillo, O. Dominguez-Renedo, A. Hernandez-Martin, M.J. Arcos-Martinez, *Analytical Biochemistry* 395 (2009) 86-90.
- [25] M.A. Alonso-Lomillo, C. Yardimci, O. Dominguez-Renedo, M.J. Arcos-Martinez, *Anal Chim Acta* 633 (2009) 51-56.
- [26] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos, M.J. Arcos-Martinez, *Anal Chim Acta* in press (2010).
- [27] M.A. Alonso-Lomillo, O. Rudiger, A. Maroto-Valiente, M. Velez, I. Rodriguez-Ramos, F.J. Munoz, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, *Nano Lett* 7 (2007) 1603-1608.

- [28] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta* 79 (2009) 1306-1310.
- [29] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, *Compendium of Analytical Nomenclature*, 3rd ed, Port City Press Inc, Baltimore, 2000.
- [30] ISO11843, *Capability of detection*, Part I, 1997 and Part II 2000. Genève, Switzerland.