



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA ELECTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRONICA

Diseño y desarrollo de un biosensor para la detección de ácido úrico
basado en monocapas autoorganizadas (SAMs) fabricadas sobre
electrodos serigrafiados de oro

Tesis de Maestría

Presenta

Ibt. Héctor David Hernández Moreno

Directores de la Tesis: Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado
Dra. Rocío Berenice Domínguez Cruz

Ciudad de México

Enero 2021

Agradecimientos

A mis padres María Gabriela Moreno Flores y Jaime Hernández Viegra, por inculcarme los valores con los cuales he podido realizar y cumplir cada una de mis metas. Así también por brindarme su apoyo y amor de manera incondicional a lo largo de todo este camino.

A cada uno de los miembros de mi familia que me apoyaron durante este recorrido, que con su ánimo y afecto me impulsaron para seguir adelante, para nunca rendirme y sentirme siempre orgulloso de mis logros, los cuales he tenido la dicha de poder compartir con cada uno de ellos.

A mis asesores el Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado y la Dra. Rocío Berenice Domínguez Cruz, por su paciencia y por transmitirme sus conocimientos de excelente calidad con los cuales pude lograr mis objetivos. Por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, así como el tiempo dado de su parte para aclarar mis dudas en los momentos más difíciles.

A los miembros del jurado, Dr. Arturo Vera Hernández y Dr. Lorenzo Leija Salas por su tiempo y por todas sus aportaciones con las cuales se pudo terminar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Jessica Piedras, Gerardo Lara, Elida Florencio y Jeniffer Molina, con los cuales pude tener una increíble convivencia dentro y fuera del laboratorio, además del haberme brindado su amistad y el hecho de que me permitieran brindarles la mía. De igual forma, quisiera agradecer a mis compañeros de generación principalmente a Jonathan Vázquez y Alberto Limón con los cuales pude entablar una gran amistad tanto dentro como fuera del centro, así como el apoyo brindado de su parte en los momentos complicados.

Un sincero agradecimiento a la QFB. Isabel Wens Flores, por la incalculable ayuda y facilidades dadas durante mi estancia en el Laboratorio 11, las cuales fueron

indispensables para poder alcanzar mis objetivos planteados, así como el gran compañerismo que siempre me brindo.

Quiero dar un agradecimiento especial a Jazmín Elizabeth Velo Silvestre por ser una de las personas más maravillosas, y que la vida pudo darme la fortuna de conocer, agradecer por sus consejos y regaños dados en los momentos más importantes a lo largo de estos años, así como el apoyo brindado cuando más lo necesite.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados por permitirme ser parte de su comunidad, y por las experiencias vividas dentro del centro en donde pude aprender tantas cosas de una manera increíble.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca con la cual pude hacer posible el desarrollo de mis estudios de maestría.

CONTENIDO

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Estructura de la tesis.....	6
Capítulo 2. Antecedentes.....	8
2.1 Ácido úrico.....	8
2.2 Biosensores.....	12
2.2.1 Sensores biocatalíticos de Oxido-Reducción (Redox).....	15
2.2.2 Enzimas.....	16
2.2.2.1 Urato oxidasa.....	18
2.2.3 Inmovilización enzimática.....	19
2.2.3.1 Inmovilización de enzimas en soportes solidos por unión química..	20
2.2.4 Efectos de la inmovilización en la estabilidad y actividad enzimática....	25
2.2.5 Elección del método de inmovilización.....	28
2.2.6 Electrodo serigrafiados.....	29
2.2.7 Electrodeposición de nanopartículas de oro.....	31
2.3 Técnicas para la caracterización de biosensores.....	34
2.3.1 Microscopia electrónica de barrido.....	34
2.3.2 Espectroscopia de dispersión por rayos X.....	36
2.3.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.....	37
2.3.4 Voltamperometría cíclica.....	39
2.4 Monocapas Autoorganizadas.....	41
2.4.1 Cisteamina.....	43
2.4.2 Formación de monocapas autoorganizadas sobre superficies de oro....	44
2.4.3 Inmovilización por enlace covalente EDC/NHS sobre una superficie de trabajo.....	46
2.4.4 Inmovilización por entrecruzamiento utilizando glutaraldehído.....	47
2.5. Estado del Arte.....	48
Capítulo 3. Solución Propuesta/Desarrollo.....	52
3.1 Reactivos, materiales y equipo.....	53
3.2 Activación del electrodo serigrafiado.....	56
3.3 Electrodeposición de NpAu.....	56
3.4 Fabricación de SAM de CYS.....	59
3.5 Inmovilización por adsorción física.....	61
3.6 Inmovilización por enlace covalente.....	61
3.7 Inmovilización por entrecruzamiento.....	62
3.8 Caracterización de las etapas de modificación por SEM, FTIR y EDS.....	63
3.9 Caracterización electroquímica.....	64
3.10 Detección de ácido úrico.....	65

3.11 Prueba de selectividad.....	67
Capítulo 4. Resultados.....	68
4.1 Estado de la superficie del electrodo de trabajo.....	68
4.2 Caracterización de SAM con FTIR y EDS.....	72
4.3 Caracterización electroquímica.....	75
4.3.1 Prueba de longevidad de las SAM.....	80
4.4 Resultados Analíticos	82
4.4.1 Detección de ácido úrico.....	82
4.4.1.1 Superficie sin NpAu.....	82
4.4.1.2 Superficie con NpAu.....	89
4.4.2 Pruebas de detección de ácido úrico a diferente valor de pH.....	94
4.4.3 Linealidad y sensibilidad.....	96
4.4.4 Prueba de selectividad.....	100
Capítulo 5. Conclusiones y Perspectivas.....	102
5.1 Estado de la superficie de trabajo.....	102
5.2 Caracterización física de la superficie de trabajo.....	103
5.3 Caracterización electroquímica de la superficie de trabajo.....	104
5.4 Detección de ácido úrico.....	105
5.5 Trabajo a futuro.....	109
Referencias y Bibliografía.....	111
APENDICE: CALCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES QUIMICAS.....	121

Índice de Tablas

Tabla 1. Criterios de clasificación de los biosensores.....	14
Tabla 2. Clasificación de las enzimas por su mecanismo de acción.....	18
Tabla 3. Comparativa entre diferentes métodos de inmovilización de enzimas.....	29
Tabla 4. Características técnicas de la unidad Autolab 910 PSTAT mini.....	55
Tabla 5. Reactivos químicos utilizados durante el proceso experimental.....	56
Tabla 6. Temperatura y humedad registrada para cada proceso de inmovilización....	76
Tabla 7. Resultados de la caracterización electroquímica de cada una de las etapas de modificación de las superficies de trabajo.....	78
Tabla 8. Resultados de la caracterización electroquímica de cada una de las etapas de modificación de las superficies de trabajo incluyendo la electrodeposición de NpAu.....	80
Tabla 9. Comparativa de resultados entre diferentes fechas de caracterización electroquímica de las mismas SAM formadas sobre electrodos de oro.....	82
Tabla 10. Valores de corriente de oxidación de ácido úrico obtenidos para cada etapa de modificación de la superficie de trabajo.....	87
Tabla 11. Valores de voltaje de oxidación de ácido úrico obtenidos por cada etapa de modificación de la superficie de trabajo.....	88
Tabla 12. Valores de corriente de oxidación de ácido úrico obtenidos por cada etapa de modificación de la superficie de trabajo dopada con NpAu.....	93
Tabla 13. Valores de voltaje de oxidación de ácido úrico obtenidos por cada etapa de modificación de la superficie de trabajo dopada con NpAu.....	93
Tabla 14. Valores de corriente y voltaje de oxidación obtenidos en soluciones de ácido úrico a un pH de 6.0, utilizando un ensamble total de detección en la superficie de trabajo.....	96
Tabla 15. Equivalentes de las diferentes concentraciones analizadas de ácido úrico..	97
Tabla 16. Grado de sensibilidad y de linealidad reportado para cada una de las etapas de modificación de la superficie de trabajo probadas en soluciones de ácido úrico.....	98

Índice de Figuras

Fig. 1. Estructura química del ácido úrico.....	8
Fig. 2. Principio de funcionamiento general de un biosensor.....	13
Fig. 3. Formación del complejo enzima-sustrato y productos.....	17
Fig. 4. Modelos de unión entre las enzimas. 1) Modelo de llave-cerradura: el centro activo se acopla al sustrato. 2) Modelo del acoplamiento inducido: el centro activo deformado se acopla al estado de transición (a).....	17
Fig. 5. Modelo 3-D de la Urato Oxidasa.....	19
Fig. 6. Inmovilización en soporte solido por adsorción.....	22
Fig. 7. Inmovilización en soporte solido por unión covalente.....	24
Fig. 8. Inmovilización por entrecruzamiento o cross-linking.....	25
Fig. 9. Sensor Serigrafiado.....	31
Fig. 10. Reducción de oro y formación de nanopartículas a partir de ácido cloroáurico (HAuCl_4).....	33
Fig. 11. Obtención de imágenes por SEM.....	35
Fig. 12. Relación de porcentaje de absorbancia (%A) en función de la longitud de onda (λ) en un espectro IR.....	38
Fig. 13. Esquema de oscilador armónico aplicado al análisis de frecuencias.....	38
Fig. 14. Voltamperograma cíclico típico donde se muestran la corriente catódica pico (i_{pc}) y la corriente anódica pico (i_{pa}).....	39
Fig. 15. Representación típica de la señal de excitación para la VC de onda triangular.....	40
Fig. 16. Diagrama general de un potenciostato de tres electrodos.....	41
Fig. 17. Representación esquemática de la estructura general de una SAM.....	43
Fig. 18. Estructura química de la cisteamina. (a) Esqueleto 2-D. (b) Modelo 3-D donde se identifican los elementos químicos que forman la molécula de cisteamina: carbono (negro). hidrógeno (blanco). nitrógeno (azul). azufre (amarillo).....	44
Fig. 19. Conformaciones espaciales principales que puede tomar la CYS en la formación de SAM sobre superficies de metales conductores. (a) Conformación "trans". (b) Conformación "Gauche".....	46
Fig. 20. Etapas de modificación de la superficie del electrodo de trabajo.....	53
Fig. 21. AuSPE de Metrohm, Modelo 6.1208.210. (WE) Electrodo de trabajo (Working Electrode). (CE) Electrodo auxiliar (Counter Electrode). (RE) Electrodo de referencia (Reference Electrode).....	54
Fig. 22. Potenciostato Autolab de Metrohm, modelo 910 PSTAT mini.....	54
Fig. 23. Solución de $\text{HAuCl}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$ con agitación magnética.....	57
Fig. 24. Electrodeposito de NpAu sobre la superficie del electrodo de trabajo del AuSPE.....	57
Fig. 25. Comparativa entre un AuSPE con NpAu electrodepositadas en su electrodo de trabajo (izquierda) y un AuSPE sin tratamiento (derecha).....	58

Fig. 26. Protocolo de síntesis y electrodeposición de NpAu a base de H ₂ AuCl ₄ sobre la superficie de los electrodos de trabajo de los AuSPEs.....	58
Fig. 27. AuSPEs sumergidos en una solución de CYS a 20 mM preparada en etanol:agua al 9:1.....	60
Fig. 28. Protocolo experimental desde la activación de los electrodos de trabajo de los AuSPEs, hasta la formación de SAM a base de CYS en su superficie.....	60
Fig. 29. AuSPEs con solución de la enzima Uox en sus electrodos de trabajo.....	61
Fig. 30. Activación de los grupos carboxilo de la enzima inmovilizada por acción de la reacción de EDC y sulfo-NHS.....	62
Fig. 31. Proceso de inmovilización de la enzima Uox sobre las superficies de trabajo de los AuSPEs.....	63
Fig. 32. Tubos Eppendorf con alícuotas enzimáticas de Uox sellados con parafilm. Con una tonalidad amarillenta se identifica la alícuota de Uox con glutaraldehído.....	63
Fig. 33. AuSPE sumergido en solución de K ₃ [Fe(CN) ₆]/KCl para evaluación electroquímica de la superficie de trabajo.....	65
Fig. 34. Matraces volumétricos con soluciones a diferente concentración de ácido úrico disuelto por completo en buffer PBS.....	66
Fig. 35. Microscopia electrónica de barrido de la superficie de los electrodos de trabajo de los AuSPEs.....	71
Fig. 36. Espectro FTIR correspondiente a la superficie Au/KOH/NpAu/SAM.....	73
Fig. 37. Área de análisis de EDS de la superficie de trabajo dopada con NpAu y tratada con una solución de CYS para la formación de SAM con un aumento de x2000.....	74
Fig. 38. Espectro EDS correspondiente al spot 1 del área de sección 2 de la superficie del electrodo de trabajo dopada con NpAu y tratada con una solución de CYS para la formación de SAM.....	75
Fig. 39. Estado electroquímico de la superficie del electrodo de trabajo modificado, sin el uso de NpAu.....	77
Fig. 40. Estado electroquímico de la superficie del electrodo de trabajo modificado, incluyendo el uso de NpAu.....	79
Fig. 41. Comparación de la respuesta electroquímica de SAM formadas el 5 de marzo de 2020 (5/03/20) y las mismas SAM después de ser almacenadas hasta el 26 de junio de 2020 (26/06/20).....	81
Fig. 42. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH.....	83
Fig. 43. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/SAM.....	84
Fig. 44. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/SAM/Uox (inmovilización por adsorción).....	85
Fig. 45. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/SAM/Uox (inmovilización por enlace covalente).....	86
Fig. 46. Perfil electroquímico de respuesta en ácido úrico a una concentración de 500 μM.....	88

Fig. 47. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/NpAu.....	89
Fig. 48. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/NpAu/SAM.....	90
Fig. 49. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (inmovilización por enlace covalente).....	91
Fig. 50. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (inmovilización por entrecruzamiento).....	92
Fig. 51. Perfil electroquímico de respuesta en ácido úrico a una concentración de 500 μ M, utilizando una superficie dopada con NpAu.....	94
Fig. 52. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico en soluciones con un pH de 6.0, utilizando la superficie Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (inmovilización por entrecruzamiento).....	95
Fig. 53 Ajuste lineal de la relación entre la densidad de corriente y la concentración de ácido úrico para la superficie de trabajo modificada sin NpAu.....	99
Fig. 54 Ajuste lineal de la relación entre la densidad de corriente y la concentración de ácido úrico para la superficie de trabajo modificada con NpAu.....	100
Fig. 55. Comparativa de señales de respuesta entre el ácido úrico y el ácido ascórbico.....	101

Resumen

En este trabajo se presenta el diseño e implementación de un biosensor enzimático para la detección de ácido úrico, a través de la acción de la enzima urato oxidasa, mejor conocida como uricasa (Uox). Para inmovilizar esta enzima fue necesario realizar la formación de monocapas autoorganizadas (SAM) a base de cisteamina (CYS) sobre la superficie de un electrodo de trabajo dopado con nanopartículas de oro (NpAu). La electronegatividad de las cabezas azufradas de las moléculas de CYS provoca que estas se unan a la superficie de oro, formando tioles que constituyen a la monocapa, la cual no solo facilita la inmovilización, sino que además protege a la enzima de la desnaturalización provocada por el efecto conductor del metal.

Para la caracterización física de las NpAu se llevaron a cabo pruebas de microscopia electrónica de barrido (SEM), mientras que la formación de las SAMs se caracterizó por medio de dispersión de energía de rayos x (EDS) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Los resultados mostraron evidencias de la presencia de los enlaces característicos presentes en las moléculas de CYS. Posteriormente se realizó una caracterización electroquímica en una solución de ferricianuro de potasio/cloruro de potasio ($K_3(Fe[CN_6])/KCl$) con la cual se mostró un aumento en el aporte electroquímico en cada etapa de modificación.

Para el proceso de inmovilización enzimática se llevaron a cabo 3 métodos diferentes: adsorción, enlace covalente utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y sulfo-N-hidroxisuccinimida (NHS), y entrecruzamiento por glutaraldehído, siendo este último el que presentó los mejores resultados en cuanto a la respuesta en corriente detectada durante el proceso de sensado en muestras líquidas con diferentes concentraciones de ácido úrico.

El dispositivo desarrollado mostro gran estabilidad y un amplio rango de sensado yendo de 1.68 mg/dl – 336.20 mg/dl (equivalente a 5 μ M – 1 mM), siendo el límite de detección de 1.68 mg/dl. Estos valores sugieren que el dispositivo sería

potencialmente aplicable para la detección de ácido úrico en muestras clínicas. En conclusión, el protocolo propuesto es adecuado y eficaz, para el diseño de sistemas de detección que requieran de biosensores en los que se utilicen como elementos de reconocimiento moléculas y compuestos de origen proteico.

Abstract

This work presents the design and implementation of an enzymatic biosensor for uric acid detection through the urate oxidase or uricase (Uox). The enzyme was immobilized through the creation of self-assembled monolayers (SAM) of cysteamine (CYS) on the surface of a gold working electrode doped with gold nanoparticles (NpAu). The sulfurized heads of the CYS were attached to the gold surface due to their electronegativity, forming thiols to build the monolayer. The electronegativity of the sulfurized heads from the CYS resulted in the attachment to the gold surface, forming thiols that build the monolayer. The SAMs facilitate the immobilization and protect the enzyme from denaturation caused by the conductive effect of the metal.

The morphology and size of NpAu were characterized by scanning electron microscopy (SEM). The formation of SAMs was characterized by X-ray energy dispersive spectrometry (EDS) and Fourier-transform infrared spectrometry (FTIR). The results showed evidence of the presence of characteristic chemical bonds in CYS molecules. Finally, an electrochemical characterization in a potassium ferricyanide/potassium chloride solution ($K_3(Fe[CN_6])/KCl$) was carried out, showing an increase in the electrochemical performance after each modification stage.

For the enzymatic immobilization, three different methods were evaluated: adsorption, covalent bonding using 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC)/sulfo-N-hydroxysuccinimide (NHS), and cross-linking by glutaraldehyde. The last one showed the best results in the current response detected during the sensing procedures on liquid samples using different uric acid concentrations.

The developed device developed showed great stability and a wide sensing range from 1.68 mg/dl – 336.20 mg/dL (equivalent to 5 μ M – 1mM), being 1.68 mg/dL the detection limit. These values suggested that the device would be potentially applicable to uric acid detection on clinical samples. In summary, the proposed protocol is

adequate and effective for developing detection systems that require molecules and proteins as recognition elements.

Capítulo 1. Introducción

El creciente interés para realizar controles analíticos efectivos, rápidos y económicos, disponiendo de información *in situ*; y que den respuesta a las necesidades del ámbito médico, ambiental, alimenticio, entre otros, ha dirigido la atención de los investigadores hacia el desarrollo de nuevas técnicas de ensayo y metodologías analíticas. Aunado a ello, la necesidad de disponer de técnicas rápidas, selectivas, sensibles, portables, con gran capacidad de trabajo y nuevas perspectivas de aplicación, ha propiciado el desarrollo de biosensores cada vez más específicos y avanzados que tienen como objetivo cubrir en mayor medida o incluso en su totalidad, las demandas que presentan el análisis y detección de analitos [1].

Las tecnologías de biosensores han experimentado un notable avance en los últimos años, debido fundamentalmente al desarrollo de dispositivos aplicados al área de la biomedicina, que en el año de 1996 representaba el 92% (90% sólo para detección de glucosa en sangre) del total del mercado. Estas tecnologías en avanzado estado de madurez han ido transfiriéndose paulatinamente de forma horizontal a otros sectores como el medioambiental y el alimenticio, aunque sus principales aplicaciones se han visto recientemente explotadas principalmente en áreas de la salud, como la medicina y la farmacéutica. Por lo cual, en la actualidad los biosensores suponen potentes herramientas de análisis con numerosas aplicaciones, apoyándose en los instrumentos de la biotecnología y en los resultados de la investigación postgenómica [2].

Las características más destacables de estos dispositivos que los convierten en opciones altamente atractivas para competir en el mercado con otras tecnologías son: su especificidad, su alta sensibilidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, su facilidad de automatización, su capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad que permite el diseño de dispositivos a la carta, y su bajo costo, entre otras [3].

La capacidad de reconocer un analito en una matriz heterogénea es un aspecto crucial en el desarrollo de biosensores, por lo que la elección del bioreceptor es una de las etapas más críticas. Las moléculas utilizadas en los biosensores como elementos de reconocimiento deben cumplir ciertos criterios fundamentales para poder ser empleadas como unidades sensoras. Así, deben tener afinidad hacia el elemento de reconocimiento y ser suficientemente selectivas para reconocer a éste en presencia de otros compuestos, además de permanecer estables a lo largo del tiempo [1,2].

Si bien el desarrollo e implementación de los biosensores consta de diferentes etapas, sin duda alguna la que es clave para el diseño de estos dispositivos es la inmovilización del elemento de reconocimiento, que a su vez se fija a la superficie del transductor [4]. El material del soporte puede actuar únicamente como base del componente biológico o participar además en la transmisión de la señal al transductor, como por ejemplo sustancias mediadoras en reacciones de oxido-reducción [2].

Se debe recalcar que la elección de uno u otro método de inmovilización depende de la naturaleza del elemento biológico de reconocimiento a usar, así como del tipo de transductor, las propiedades fisicoquímicas del analito y las condiciones de trabajo del propio biosensor [4]. Además, en la mayoría de los casos se requiere una fijación ordenada del elemento biológico al soporte del sistema, formando una capa uniforme en la cual se mantiene su actividad biológica, esto con la finalidad de que se facilite el reconocimiento de los analitos [5].

Recientes investigaciones se han enfocado en modificar los procedimientos de inmovilización, con la finalidad de obtener capas uniformes y mejor orientadas de los elementos de reconocimiento sobre sus respectivos soportes o materiales base [2].

1.2. Planteamiento del problema.

El punto clave del diseño e implementación de un biosensor es la inmovilización del elemento biológico de reconocimiento, procedimiento que debe hacerse meticulosamente para asegurar que se conserve su actividad biológica, y así asegurar una detección rápida y selectiva del analito. El problema principal se centra en el desarrollo de estos procedimientos, ya que la inmovilización misma reduce la actividad biológica, haciendo a estos elementos menos eficientes en comparación a cuando se encuentran en su estado libre [6]. Aunado a lo anterior también es necesario el estudio y selección de las diversas superficies soporte, pues dependiendo de su naturaleza, pueden ayudar a mejorar la respuesta de un biosensor o propiciar la inactividad o desnaturalización de los elementos de reconocimiento por efectos de conductividad.

Es importante resaltar que cuando se diseña e implementa un biosensor, se debe asegurar que este únicamente detectará al analito para el cual está dirigido, lo cual al utilizar un elemento altamente específico como son las enzimas que únicamente reaccionarán al sustrato afín de su sitio activo es un objetivo relativamente sencillo de lograr. Sin embargo, la selectividad de un elemento de reconocimiento puede verse afectada si no se cuidan las condiciones elementales para que este permanezca estable y con su actividad catalítica íntegra, como pueden ser la temperatura, la humedad, el valor de pH de las soluciones a analizar, e incluso en algunos casos la iluminación ambiental. Si el elemento de reconocimiento no se encuentra íntegro sobre una superficie de trabajo, se corre el riesgo de presentar inconvenientes en su funcionamiento, como puede ser una pobre o nula respuesta debido a la degradación, el bloqueo de la superficie por una incorrecta inmovilización donde el sitio activo no puede llevar a cabo la reacción catalítica correspondiente, o incluso la contaminación de la muestra analizada por un desprendimiento de la estructura formada debido a una baja estabilidad.

El uso de tioles para la formación de monocapas autoorganizadas (SAM) sobre la superficie de un electrodo de trabajo, es un tema altamente estudiado en el área de

desarrollo de los biosensores electroquímicos, ya que facilitan la fijación de una enzima a un soporte y, ayudan a obtener una correcta orientación de la misma, asegurando el dejar libre su sitio activo en el cual se llevará a cabo la unión con el analito de interés. Además de facilitar a una correcta orientación, este tipo de estructuras tienen como función principal el proteger de los efectos de conductividad de la superficie a las enzimas inmovilizadas previniendo su desnaturalización. Esto hace de las SAMs un aspecto indispensable a considerar en el diseño e implementación de un biosensor.

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo general.

Desarrollar la modificación de la superficie de trabajo de un electrodo serigrafado de oro (AuSPE) a través del ensamble de monocapas autoorganizadas a base de cisteamina, y de la inmovilización de la enzima urato oxidasa, para la implementación de un biosensor que sea capaz de detectar de manera sensible y selectiva la presencia de ácido úrico en muestras de laboratorio controladas.

1.3.2 Objetivos específicos.

- Acondicionar de manera adecuada AuSPEs, por medio de un lavado con hidróxido de potasio (KOH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) previo a su modificación.
- Realizar la formación de monocapas autoorganizadas SAM sobre la superficie de los electrodos de trabajo, llevando a cabo el protocolo de cisteamina (CYS) diluida en etanol.
- Comprobar la presencia de las SAM formadas en las superficies de los electrodos de trabajo a través de microscopía electrónica de barrido (SEM),

análisis elemental por espectrometría de dispersión de energía de rayos x (EDS) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

- Llevar a cabo la inmovilización de la enzima uricasa por método de adsorción en las SAMs fabricadas.
- Realizar la activación de la superficie de los sensores a través del protocolo EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) –NHS (sulfo-N-hidroxisuccinimida) para llevar a cabo la inmovilización de la enzima uricasa por enlace covalente.
- Llevar a cabo la inmovilización de la enzima uricasa por entrecruzamiento utilizando glutaraldehído.
- Realizar una comparativa entre los métodos de inmovilización desarrollados, para determinar cuál presenta los mejores resultados en la detección de ácido úrico en muestras controladas a diferentes concentraciones.
- Verificar la detección de analitos en muestras de medios controlados a diferentes valores de pH a través de los biosensores implementados.
- Verificar la selectividad del biosensor desarrollado, por medio de la adición de una especie interferente a las mismas condiciones de detección del ácido úrico.

1.4 Estructura de la tesis

El presente documento se encuentra dividido en cinco capítulos y un apéndice.

Capítulo 1: Se describe de manera general la problemática abordada, así como los objetivos tanto general como específicos que fueron considerados para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo.

Capítulo 2: Se describe el marco teórico del trabajo. Presentando la definición de biosensores y sus fundamentos. Se define el concepto de enzimas haciendo énfasis en su uso como elementos de reconocimiento, los conceptos de inmovilización enzimática, sus fundamentos y el impacto que tiene en la implementación de sistemas de sensado de analitos. Posteriormente se presentan los fundamentos de las principales técnicas de caracterización electroquímica para biosensores, así como de las monocapas autoensambladas y su importancia en los procesos de inmovilización sobre superficies conductoras. Finalmente, se presenta una revisión al estado del arte de la implementación de biosensores enzimáticos utilizando monocapas autoensambladas y su impacto en la detección de analitos específicos.

Capítulo 3: Se presenta el desarrollo experimental, en donde se especifican las metodologías que se llevaron a cabo en este trabajo, en donde se incluyen todos los protocolos de modificación de la superficie de trabajo, su evaluación tanto física como electroquímica, así como el procedimiento realizado para la obtención de las señales de respuesta de sensado en soluciones de ácido úrico a diferente concentración y pruebas de selectividad.

Capítulo 4: Se presentan y discuten los resultados obtenidos a través de la implementación de las metodologías propuestas. Se destaca la caracterización tanto física como electroquímica de las superficies de trabajo, además de los resultados obtenidos de las señales resultantes del análisis de las muestras seleccionadas, realizando una comparativa entre los diferentes ensambles de reconocimiento

construidos, dependiendo del método de inmovilización utilizado, así como se especifican los límites mínimos y máximos de detección de ácido úrico alcanzados, también se resalta la selectividad de la superficie completamente modificada.

Capítulo 5: Se presentan las conclusiones del trabajo con base en los resultados obtenidos y discutidos en función de los objetivos establecidos, así como una perspectiva para trabajos futuros derivados de esta tesis.

Finalmente se anexa la descripción de los cálculos matemáticos realizados para cada una de las soluciones químicas utilizadas en este trabajo.

Capítulo 2. Antecedentes.

2.1 Ácido úrico.

El ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las bases nitrogenadas púricas en el cuerpo humano [7,8]. En la mayoría de los animales, el AU es degradado por la enzima hepática urato oxidasa o uricasa (Uox) para generar alantoína, la cual es excretada libremente en la orina [9,10]. La incapacidad de degradar el AU, aunado a un eficiente sistema de reabsorción renal, lleva a considerar que existen otras posibles funciones para este compuesto, entre ellas: neuro-estimulador y neuro-protector, regulador de la función del sistema inmune; mantenimiento de la presión arterial en situaciones de estrés nutritivo y antioxidante [11].

En la Fig. 1 se presenta la estructura del AU, la cual está formada por anillos heterocíclicos de carbono y nitrógeno, resultado del metabolismo de adenosina y guanosina, los cuales son nucleósidos resultantes de las purinas adenina y guanina.

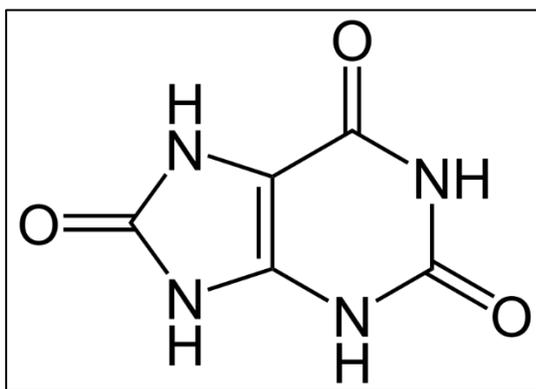


Fig. 1. Estructura química del ácido úrico

La oxidación del AU por acción catalítica de la Uox consiste en 4 pasos fundamentales [12]:

1. Transformación química de 8-hidroxitina a un radical aniónico a través de una transferencia de protones junto con una transferencia de electrones.

2. Transferencia de protones al anión O_2^- .
3. Recombinación di-radical para formar un peróxido intermedio.
4. Disociación de H_2O_2 para generar el deshidrourato. La hidratación, para la vía más favorable, se inicia por el ataque nucleófilo de una molécula de agua en deshidrourato, junto con una transferencia de protones concertada a través del residuo Thr69 en el sitio catalítico.

En cuanto a la bioquímica y metabolismo del AU, se sabe que su producción endógena se da principalmente en el hígado, los intestinos y otros tejidos como los músculos, los riñones y el endotelio vascular [13]. A pH fisiológico el ácido úrico es un ácido débil con una pKa de 5.8 y existe mayormente como urato (99%), la sal del ácido úrico. La solubilidad del AU en agua es baja y la concentración de este metabolito en sangre es cercana a su límite de solubilidad (6.8 mg/dl). Cuando el nivel de AU es mayor de 6.8 mg/dl se forman cristales de urato monosódico [14]. Los sitios de predilección para la formación de los cristales son las regiones periféricas del cuerpo (por ejemplo, las articulaciones de las extremidades) donde la temperatura es menor [15].

El riñón excreta dos terceras partes del total de AU producido diariamente y el resto es metabolizado por la flora intestinal y excretado por las heces [16]. Aunque, en algunas circunstancias los riñones no pueden eliminarlo y se acumulan niveles elevados de esta sustancia en sangre, lo que favorece la aparición de algunas enfermedades, como la gota y los cálculos renales [17]. Esto puede deberse al consumo de muchos alimentos ricos en purinas, como las carnes rojas, las carnes de caza, la casquería, también el sobrepeso, la diabetes o el uso excesivo de diuréticos.

El exceso de ácido úrico en el organismo se conoce como hiperuricemia. Entre las enfermedades y trastornos que puede causar se encuentran los siguientes [18,19]:

- **Artritis inflamatoria asociada con hiperuricemia:** Ocurre cuando hay altos niveles de AU en la sangre circulante, lo que hace que los cristales de urato se

depositen en los tejidos de las articulaciones y se produzca mucho dolor, es lo que se conoce como ataque de gota. Normalmente, aparecen después de las comidas copiosas, con una gran ingesta de alcohol o con el tratamiento con diuréticos.

- **Cálculos renales:** Si la orina contiene más calcio, oxalato y AU es más probable que se desarrollen cálculos renales.
- **Problemas cardiovasculares:** Los niveles elevados de AU se asocian al síndrome metabólico, al colesterol y a un mayor perímetro abdominal, todos ellos factores de riesgo cardiovascular. Este aumento puede ser consecuencia de una mala alimentación y un consumo excesivo de refrescos y alimentos procesados.
- **Diabetes tipo 2:** El AU alto se relaciona con un mayor riesgo de diabetes tipo 2, ya que se produce inflamación en ciertos tejidos y un aumento del estrés oxidativo.
- **La hipertensión y una enfermedad renal crónica:** Son otras de las enfermedades que pueden aparecer en las personas con el AU elevado. Además, los diuréticos, fármacos que se emplean para tratar la hipertensión, favorecen la aparición de la gota.
- **Fractura de huesos:** El AU en cantidades elevadas favorece la inflamación de los huesos, lo que entorpece la actividad de la vitamina D, clave para mantener los huesos sanos.

Por otra parte, los niveles bajos de AU en el organismo (hipouricemia) son poco comunes y generalmente no son motivo de preocupación. Sin embargo, pueden ser indicativos de enfermedades en el riñón, envenenamiento con plomo o consumo excesivo de alcohol. Aunque también, puede presentarse por una dieta vegetariana o con poco contenido de purinas [20].

La detección de AU puede realizarse mediante diferentes métodos y técnicas, dependiendo el origen de las muestras de estudio. La orina y la sangre son las fuentes de análisis para la detección de niveles anormales de AU en un paciente [16,17]. Una de las técnicas más estudiadas para el análisis de este tipo de muestras, es la Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) donde el analito se separa de la mezcla de componentes, basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre la muestra analizada y la columna cromatográfica [21]. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados que puede presentar, la realidad es que se trata de una técnica cada vez más en desuso, debido a su alto costo y demanda de tiempo de análisis. Motivo por el cual, se han propuesto otras técnicas, no solo más simples sino más rápidas y precisas debido a los elementos que combinan para lograr una detección específica dentro de una muestra orgánica [2].

Una de ellas, la colorimetría, permite determinar la concentración de AU en muestras biológicas, al añadir un reactivo a la muestra que, tras reaccionar con el analito, producirá un producto coloreado. De este producto se mide la absorbancia y, mediante una sencilla ecuación, es posible obtener el valor de concentración buscado. Otro tipo de técnicas muy utilizadas para estos fines son las electroquímicas, que relacionan la respuesta eléctrica dada por un dispositivo ante la concentración del analito de interés, la cual se puede asociar con la generación de productos metabólicos a partir del analito o por cambios en la conductividad del medio debido a la presencia de los mismos [22]. Ambas técnicas han tenido un gran avance incorporando elementos químico-biológicos de detección como pueden ser las enzimas, anticuerpos, o incluso hasta áptameros de ADN, dando como resultado el diseño de biosensores altamente específicos. Uno de los principales métodos de bio-reconocimiento del AU es el de la uricasa, la cual lo metaboliza para producir alantoína, dióxido de carbono (CO_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [23].

2.2 Biosensores.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) define a los biosensores como dispositivos receptores-transductores integrados, que pueden proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa selectiva utilizando un elemento de reconocimiento biológico [23]. Los biosensores combinan un elemento de reconocimiento con un método de transducción de señal adecuado (electroquímico, óptico, acústico y calorimétrico, entre otros) de tal manera que la unión o reacción entre el objetivo y el elemento de reconocimiento se traduzca en una señal primaria [2].

Dispositivos como los sensores químicos que se caracterizan por su bajo costo, la poca cantidad de muestra requerida para llevar a cabo una medición, su capacidad para monitorear en continuo la calidad química y microbiológica de un producto, tiempos de respuesta rápidos, y su sencillez de operación, pueden satisfacer las necesidades de la medicina moderna en cuanto al diagnóstico y supervisión continua del estado de salud de una persona [6,15,23].

Los sensores químicos pueden ser clasificados de acuerdo con el mecanismo que les confiere la especificidad química. Un biosensor pertenece a un subgrupo de sensores químicos que incorpora un elemento biológico o biomimético como elemento de reconocimiento [24]. En la Fig. 2 se muestra el diagrama a bloques de la construcción de un biosensor que consta en su primera etapa del mencionado bioreceptor.

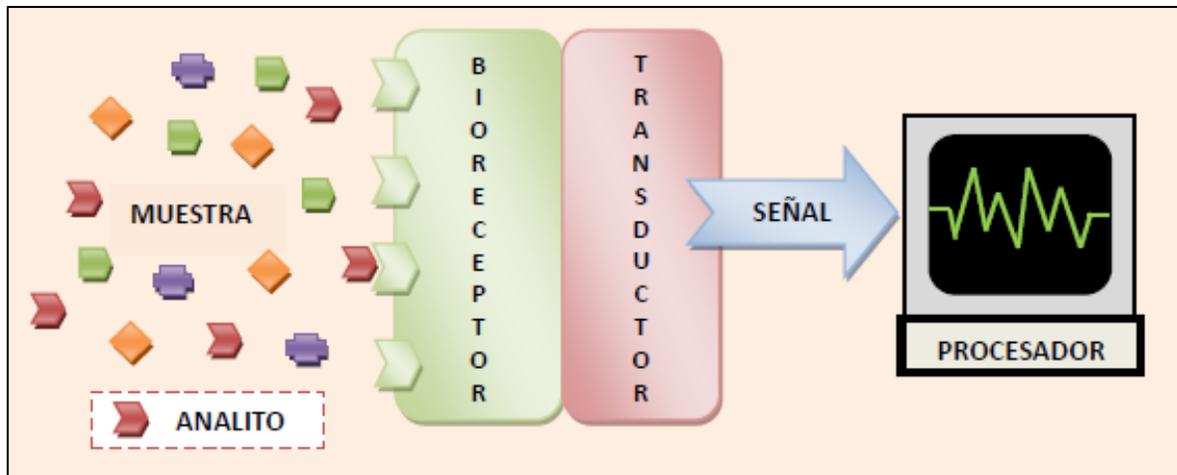


Fig. 2. Principio de funcionamiento general de un biosensor

Los principales materiales biológicos utilizados en la tecnología de biosensores son las parejas de enzima/sustrato, antígeno-anticuerpo (At-Ac) y ácidos nucleicos/secuencias complementarias [4]. La selectividad del elemento de detección biológica ofrece la oportunidad para el desarrollo de dispositivos altamente específicos para el análisis en tiempo real de mezclas complejas. En medicina, los biosensores pueden fácilmente hallarse implementados en sus principales áreas como son: el diagnóstico clínico, en el área farmacéutica para la síntesis y control de calidad de medicamentos y vacunas, y para el seguimiento y tratamiento de múltiples enfermedades, como el dengue, la diabetes o incluso el cáncer [25].

El elemento de reconocimiento biológico de un biosensor se puede clasificar en dos clases principales: biocatalizadores (enzimas, tejidos, etc.) y bioligandos (anticuerpos, ácidos nucleicos, lectinas, etc.).

Como se muestra en Tabla 1 existen múltiples elementos de reconocimiento, cuya elección depende de las características del compuesto a analizar. Por ejemplo, cuando se trata de detectar una sustancia alérgena, la cual es consecuencia de una sobre respuesta inmune en el organismo, se utilizan anticuerpos [2,26].

Tabla 1. Criterios de clasificación de los biosensores

Tipo de iteración	Detección de la iteración
Biocatalítica Bioafinidad	Directa Indirecta
Elemento de reconocimiento	Sistema de transducción
Enzima Orgánulo, tejido, célula completa Receptor biológico Anticuerpo Ácidos nucleicos Polímeros de impresión molecular (PIM) Péptidos de ácido nucleico (PNA) y áptameros	Electroquímico Óptico Piezoeléctrico Magnetoelástico Nano mecánico

La segunda parte del diagrama presentado en la Fig. 2 corresponde al sistema de transducción o transductor, el cual es el elemento que convierte las variaciones de las propiedades físicas o químicas que se producen por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito en una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada. La señal generada por el transductor en algunos casos no puede ser interpretada directamente y es necesario la utilización de un software para su procesamiento. Existen varios tipos de transductores: electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos (másicos, gravimétricos, acústicos), termométricos, nano mecánicos y magnéticos. Dependiendo de la naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y la especie de interés se puede utilizar un tipo de transductor u otro [27].

Entre los sensores químicos, los electroquímicos, en los que el elemento transductor basa su respuesta en la medida de una propiedad eléctrica generada en un sistema electródico (potencial, corriente, relación de corriente-potencial), son los más estudiados [28]. Según la técnica electroquímica utilizada, dichos transductores se dividen en conductimétricos, potenciométricos y amperométricos, y se caracterizan por su sencilla y económica fabricación, su amplio rango de linealidad y cortos tiempos de respuesta [29]. El elemento de transducción que se utiliza para fines de esta tesis es un electrodo serigrafiado o screen printed electrode (SPE) de oro, este tipo de transductores transforman la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito a detectar en una señal eléctrica, proporcionando información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica [2].

2.2.1 Sensores biocatalíticos de oxido-reducción (redox).

Los biosensores biocatalíticos son los mejor conocidos y los más aplicados. Se basan en la utilización de biocatalizadores, que son elementos que favorecen que ocurra una reacción química en la cual a partir de uno o varios sustratos se forman uno o varios productos conocidos sin consumo del biocatalizador, que se regenera y puede ser utilizado de nuevo [2]. Estos biocatalizadores pueden ser sistemas que contienen enzimas o sistemas multi-enzimáticos aislados, orgánulos celulares, células completas o tejidos animales o vegetales en los que estos sistemas se encuentran en su medio natural [23]. También pueden utilizarse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, mediante la detección de la desaparición de algún co-sustrato conocido distinto de aquel que se quiere detectar o bien por la aparición de algún producto conocido [2].

Para los biosensores de fenómeno redox, la clave para su construcción es facilitar la transferencia de los electrones generados por una enzima óxido-reductasa (o un sistema enzimático) a la superficie de un electrodo. El tiempo de respuesta de estos biosensores puede ser del orden de segundos cuando están presentes compuestos organometálicos como el ferroceno o sus derivados. Con el desarrollo de semiconductores orgánicos más eficientes (usualmente por técnicas de "doping"), es posible obtener una asociación todavía más íntima entre la enzima empleada y la superficie del electrodo, un ejemplo de esto es la formación de monocapas autoorganizadas construidas comúnmente a base de tioles, las cuales no solo favorecen la unión y orientación de la enzima con la superficie, sino que además la protege de los efectos conductivos de la misma, así como también favorece la sensibilidad del electrodo permitiendo así tener respuestas de mayor magnitud, promoviendo además la miniaturización de este tipo de sistemas [30].

2.2.2 Enzimas.

Las enzimas son biocatalizadores eficaces que aceleran las reacciones químicas que suceden en los organismos. Su eficacia se debe a que facilitan las reacciones químicas que suceden en la célula disminuyendo la energía de activación de cada reacción. La energía de activación es la cantidad de energía necesaria que se aplica (en forma de calor, radiación o electricidad) para que dos moléculas choquen y se produzca una reacción. La mayoría de las enzimas son de naturaleza proteínica; sin embargo, hay otras que pertenecen a los nucleótidos, llamadas ribozimas [31].

Además de lo señalado, las enzimas no permiten que sucedan reacciones energéticamente desfavorables para el organismo, no modifican el punto de equilibrio de las reacciones y no se consumen en éstas. Actúan en pequeñas cantidades y se utilizan cuantas veces sean necesarias. Por lo anterior, el poder catalítico, aunado a su especificidad y a la regulación bajo la cual trabajan, aseguran que el proceso metabólico de todas las reacciones que se llevan a cabo en las células sea adecuado y ordenado [31,32].

La enzima se une selectivamente a las moléculas sobre las cuales deben actuar, que reciben el nombre de sustratos. Como se observa en la Fig. 3, la enzima se une con el sustrato y en consecuencia se forma un complejo llamado enzima-sustrato, que se desdobra en otra molécula denominada producto, con lo que comienza un nuevo ciclo de reacción formando una y otra vez otro complejo y otro producto hasta que la reacción de transformación termina [31,33].

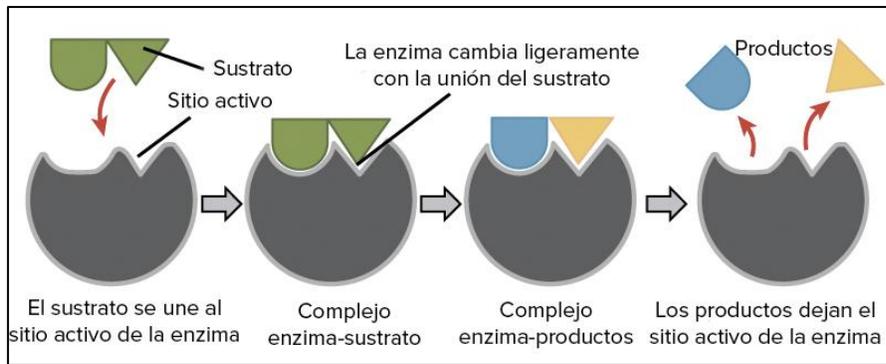


Fig. 3. Formación del complejo enzima-sustrato y productos.

Toda enzima es específica, es decir, sólo cataliza un grupo de sustratos, con lo que regula la rapidez de sus reacciones. Además, presenta un dominio específico, como si fuera una ranura o muesca, por donde se une a los sustratos. A este dominio se le conoce como sitio activo. En la Fig. 4 se muestran las 2 formas de unión comúnmente existentes entre las enzimas y los sustratos: uno, llamado modelo de llave-cerradura, donde cada enzima sólo puede unirse con el sustrato que le corresponde, y otro el modelo de acoplamiento inducido, donde es el sustrato el que induce el cambio estructural del sitio activo de la enzima y ambos, enzima y sustrato, se adaptan de manera transitoria para realizar la reacción [31–33].

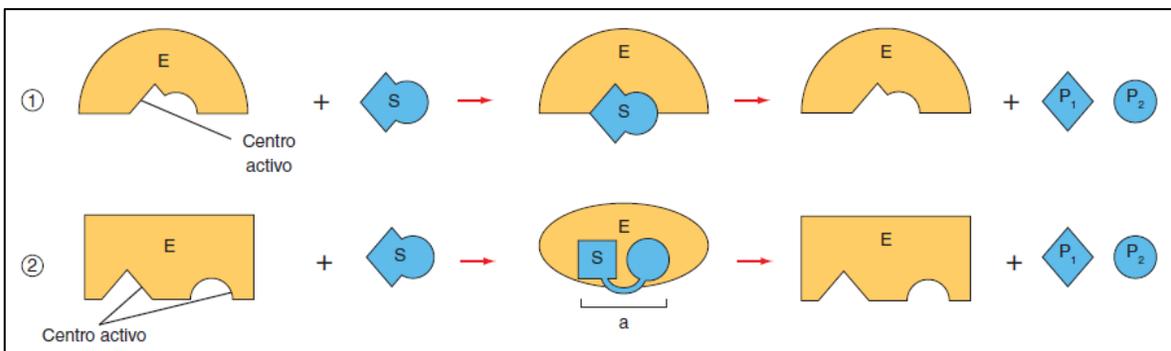


Fig. 4. Modelos de unión entre las enzimas. 1) Modelo de llave-cerradura: el centro activo se acopla al sustrato. 2) Modelo del acoplamiento inducido: el centro activo deformado se acopla al estado de transición (a).

El nombre de las enzimas proviene de la sustancia sobre la que actúan más la terminación -asa. En Tabla 2, se presenta la principal clasificación de las enzimas en

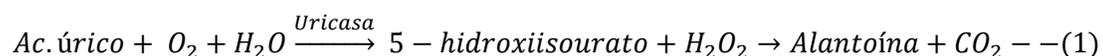
función de su mecanismo de acción, de acuerdo con las reacciones catalíticas que estas producen [31,34,35].

Tabla 2. Clasificación de las enzimas por su mecanismo de acción.

Tipo de Enzimas	Mecanismo de acción
Oxidorreductasas	Participan en reacciones de óxido-reducción, es decir, transfieren electrones (e ⁻) o protones de hidrógeno (H ⁺) de un sustrato a otro. Ejemplos: citocromos C y deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas, reductasas.
Transferasas	Catalizan la transferencia de grupos funcionales de un grupo químico diferente del hidrógeno de un sustrato a otro. Ejemplos: glucoquinasas, transaminasas, transmetilasas, fosfotransferasas.
Hidrolasas	Catalizan las reacciones de hidrólisis. Ejemplo: lactasas, sacarasas, amilasas, lipasas, fosfatasas. Transfieren grupos donde el aceptor siempre es una molécula de agua. Ejemplo: glucosidasas, amidasas, peptidasas.
Liasas	Catalizan las reacciones de ruptura de forma no hidrolítica. Ejemplos: acetoacetato de descarboxilasa para la obtención de acetona y dióxido de carbono (CO ₂).
Isomerasas	Catalizan reacciones de isomerización, cambiando de sitio el mismo grupo funcional, sin modificar la fórmula general del sustrato. Ejemplos: fosfotriosa isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, transferasas intramoleculares, isomerasas cis-trans.
Ligasas	Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato como el ATP. Unen C-C, C-O, C-N y C-S. Ejemplo: piruvato carboxilasa.

2.2.2.1 Urato oxidasa.

En esta tesis se utilizó la enzima urato oxidasa o uricasa (Uox). Esta enzima participa en la degradación de las purinas al catalizar la descomposición oxidativa del ácido úrico en alantoína. La Uox cataliza la oxidación *in vivo* del AU en presencia de oxígeno para producir alantoína y CO₂ como productos de la oxidación del ácido úrico y el peróxido de hidrógeno como producto reductor de O₂, tal y como se presenta en la ecuación (1) [36].



En la Fig. 5 se presenta un modelo tridimensional de la Uox donde se puede observar que se trata de una enzima homotetramérica que contiene 4 sitios activos

idénticos situados en la superficie de contacto existente entre sus 4 subunidades. Se compone de un número variable de aminoácidos (según la especie) siendo alrededor de 300 residuos de estos, con un peso molecular de unos 33 kDa [37].

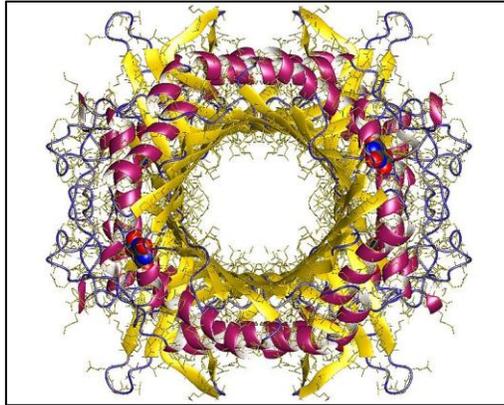


Fig. 5. Modelo 3-D de la Urato Oxidasa.

El interés en el mecanismo de reacción de la urato oxidasa deriva en gran medida del hecho de que ningún cofactor participa en la reacción catalítica. Los metales de transición como el cobre y el hierro y los cofactores orgánicos flavina y pterina desempeñan papeles clave en las reacciones de mediación entre dioxígeno en estado triplete y sustratos orgánicos emparejados por rotación en la mayoría de las reacciones de oxidasa y oxigenasa [38]. De hecho, durante mucho tiempo se creyó que la urato oxidasa era una enzima dependiente del cobre, pero los estudios han demostrado que la enzima no contiene un cofactor y es activada en ausencia de cobre [39].

2.2.3 Inmovilización enzimática.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente [5].

Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte [40]. Uno de los objetivos de la

inmovilización es conseguir uniones estables. Para alcanzar esta estabilidad y evitar los problemas derivados de la adsorción física, generalmente se procura unir una enzima mediante técnicas de inmovilización irreversibles [41].

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar [42]:

- El aumento de la estabilidad de la enzima.
- La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
- La construcción de sistemas portátiles, para la detección de analitos a partir de superficies modificadas altamente específicas.

Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son [43]:

- La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
- Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.

2.2.3.1 Inmovilización de enzimas en soportes solidos por unión química.

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior de la enzima inmovilizada. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y

más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos [6]:

- 1. Soportes inorgánicos:** Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)
- 2. Soportes orgánicos:** Se pueden clasificar en: polímeros naturales: a su vez divididos en: polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosán, etc.), proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc.). Y polímeros sintéticos: divididos en: poliolefinas (como el poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.), entre otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.).

Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente.

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son [6]:

- **El pH del medio:** controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.
- **La fuerza iónica:** al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína.
- La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Entre las principales ventajas de una inmovilización por adsorción se tiene: su sencilla preparación, bajo costo, los nulos cambios en la especificidad enzimática y los

derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido de agua. Por otro lado, dentro de sus principales inconvenientes se tiene: una unión al soporte débil, dificultad en la optimización de las variables que controlan el proceso y sus derivados pueden ser poco estables desde el punto de vista mecánico [6].

En la Fig. 6 se muestra una representación gráfica de la unión entre las enzimas y su soporte por medio de la técnica de adsorción, en donde no se indica la intervención de una especie química que favorezca dicha unión. Se debe tomar en cuenta que cuando el proceso de inmovilización se realiza sobre un electrodo de trabajo, al no existir una activación propia de la superficie y la enzima, la unión tiende a ser débil a inestable, además de que la orientación no es favorecida teniendo enzimas con el sitio activo bloqueado por la propia superficie.

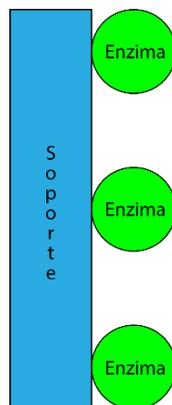


Fig. 6. Inmovilización en soporte sólido por adsorción

Además de la adsorción, se tiene a la técnica de inmovilización por unión covalente de una enzima en soportes sólidos, la cual es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los veinte aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de los aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se

encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente [6].

Para fines de este trabajo los grupos químicos activados de las enzimas son los de grupo carboxilo (-COOH), los cuales reaccionan con los grupos amina de las cadenas de CYS, favoreciendo la fuerza de unión y la orientación.

Para resaltar las principales ventajas de una inmovilización por unión covalente se puede mencionar que: la manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla, la carga enzimática permanece constante aun después de llevar a cabo la fijación, y presenta una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, presencia de disolventes orgánicos o variación del pH, esto debido a que su estructura terciaria se encuentra fuertemente estabilizada. Por otro lado, de los inconvenientes que esta técnica puede presentar, se puede resaltar que: es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos, también hay que tomar en cuenta que el solo proceso de inmovilización puede alterar la estructura del sitio activo, por lo que se requiere la presencia de un inhibidor y por último, este procedimiento no es recomendable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc. [6].

En la Fig. 7 se muestra una representación esquemática de la inmovilización por unión covalente, en donde se observa la participación de una estructura química (para esta tesis, se refiere a las SAM) que sirve de intermediario entre la superficie del soporte y las enzimas fijadas a ella, favoreciendo la fuerza de unión y su orientación.

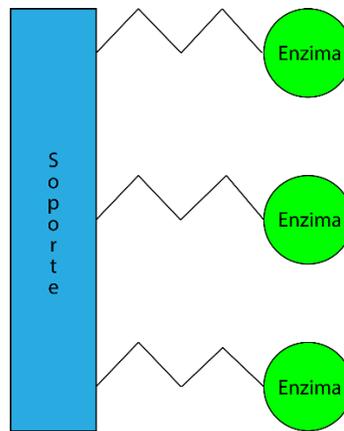


Fig. 7. Inmovilización en soporte sólido por unión covalente.

Por último, se tiene la técnica de inmovilización por entrecruzamiento o *cross-linking*. Este tipo de inmovilización consiste en la formación de una gran estructura tridimensional compleja entre las mismas moléculas de la enzima por medios físicos o químicos. Por lo general en los métodos químicos se forman enlaces de unión covalente empleando ciertos agentes como el glutaraldehído, ácido dicarboxílico o tolueno disocianato. Por métodos físicos se utilizan agentes floclulantes como poliaminas, polietilenamina, sulfonatos de poliestireno y fosfatos. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina) [6,44].

En la Fig. 8 se muestra una representación esquemática del reticulado formado por la técnica de *cross-linking*, donde se observan los enlaces de unión formados entre cada una de las enzimas participantes.

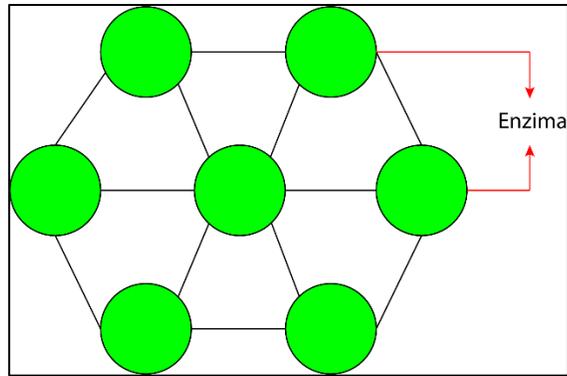


Fig. 8. Inmovilización por entrecruzamiento o *cross-linking*.

Para fines de inmovilización sobre electrodos el principio es básicamente el mismo. La estructura de co-reticulado presenta varios grupos -COOH , que a diferencia de la inmovilización por enlace covalente donde la fijación y orientación con respecto a la superficie del electrodo es individual, en este caso estos grupos al ser activados para reaccionar con los grupos -NH_2 promueven la orientación y fijación de manera conjunta.

2.2.4 Efectos de la inmovilización en la estabilidad y actividad enzimática.

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar, se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por la superficie de trabajo con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno [6].

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones [45]:

1. Una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados, tales como electrodos con superficies funcionalizadas. La inmovilización covalente multipuntual se puede combinar con la adición de reactivos bifuncionales que den mayor rigidez a la estructura de la enzima.
2. Una protección frente a las proteasas en el medio. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.
3. Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio sobre la superficie de trabajo.
4. Existe una alteración del microentorno de la enzima debida a su interacción con el soporte. Por ejemplo, si una enzima sensible al oxígeno (como las nitrogenasas, hidrogenasas, etc.) se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción [46]. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la “acuofilia” del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima [47]. Cuanto mayor es la acuofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

Por otra parte, tras una inmovilización la actividad catalítica de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que [6]:

- La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al sitio activo está impedido.
- Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del sitio activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
- La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva.
- Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Los efectos difusionales, se originan como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el sitio activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno. En el caso de las resistencias externas, se presentan si el soporte es insoluble en el medio de reacción, el sustrato deberá atravesar una película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte. En las proximidades de un soporte no cargado, la concentración de sustrato es menor que en el resto de la disolución, puesto que existe un gradiente de concentración a través de la zona de difusión. Mientras que las resistencias internas son debido a que los sustratos tienen que atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada. [48]. En el caso de las superficies de trabajo de un electrodo, los efectos difusionales se presentan por efecto de un gradiente de concentración entre la interfaz de reconocimiento y la solución analizada.

Los efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte se presentan de tal manera que si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción (esto es aplicable tanto en reactores como en superficies electroquímicas). Cuando el sustrato y el soporte tienen cargas opuestas, el valor de una constante de Michaelis aparente (K_m') puede verse reducido hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución [49].

Para los impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato, se debe considerar en un principio que cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente. Por ejemplo, muchas hidrolasas unidas covalentemente a soportes sólidos, a pesar de que son muy activas frente a sustratos pequeños, muestran una actividad muy baja hacia proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos [50]. Este “efecto estérico” se puede evitar mediante una inmovilización covalente a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo [6].

Finalmente, los efectos en el microentorno se presentan cuando la enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento en el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar [51].

2.2.5 Elección del método de inmovilización.

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todas ellas. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización (véase la Tabla 3), permitiendo de esta manera poder seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica [52,53]. La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de soporte a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y algunos factores adicionales [6].

Generalmente los procedimientos de inmovilización por inclusión en membranas y atrapamientos no son recomendados para ser aplicados sobre electrodos electroquímicos, ya que la resistencia de los geles y polímeros puede significar un

aumento en la resistencia de la superficie reactiva provocando una disminución en la respuesta a obtener. Por otra parte como ya se mencionó anteriormente, los procedimientos por adsorción, enlace covalente y entrecruzado son los más recomendados a utilizar sobre este tipo de electrodos, ya que están dirigidos a soportes sólidos los cuales pueden tener propiedades conductivas, y cuyos protocolos se basan en la orientación del elemento enzimático, y de la fuerza de unión entre el soporte (en este caso la superficie de trabajo) y la enzima [23,27,29].

Tabla 3. Comparativa entre diferentes métodos de inmovilización de enzimas.

Método	Inclusión en Membranas	Atrapamiento	Entrecruzado o Reticulado	Adsorción Química	Unión covalente
Preparación	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Débil	Media	Débil-Media	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Media-Alta	Baja	Baja	Media	Alta
Regeneración de soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Coste de proceso	Medio-Alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	Baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia microbiana	Si	Si	Si	No	No

En general, los métodos de preparación difícil y de mayor costo proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos; en cambio aquellos métodos más sencillos como el atrapamiento o la adsorción, donde la unión de la enzima con el soporte es débil, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y que deben ser repuestos continuamente [6].

2.2.6 Electrodo serigrafiados.

La utilización de los sensores electroquímicos en muchas áreas de análisis ha demandado mejoras en las características de los electrodos convencionales asociadas con: mala reproducibilidad, tareas de limpieza o recuperaciones tediosas. En los últimos años se están popularizando los electrodos serigrafiados (SPEs) como

herramienta para el análisis electroquímico, en sustitución de las celdas convencionales.

Esencialmente, el proceso de fabricación de los electrodos serigrafiados consiste en la deposición de una tinta sobre un sustrato determinado utilizando una plantilla con la geometría deseada (generalmente circular). La variedad de las tintas para serigrafiar es enorme, existen de muchos materiales como carbón (el cual es el más común), oro, platino, plata, nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de oro, etc. Un material puede ser más adecuado para el análisis de una sustancia que otro, y se debe utilizar el más conveniente en cada caso [29].

En la Fig. 9 se presenta el esquema de un electrodo serigrafiado, el cual es una pequeña tarjeta donde se encuentra integrada la celda de tres electrodos convencional, junto a contactos eléctricos para su conexión al sistema de medida. Los primeros trabajos con electrodos serigrafiados aparecieron en la década de los 90, por lo que es una tecnología relativamente moderna. En la actualidad se aplican para el análisis en ámbitos tan variados como el industrial, medioambiental, agroalimentario y farmacéutico. En general, los SPEs se caracterizan por [29]:

- Proporcionar una gran flexibilidad en el diseño del electrodo en cuanto a su distribución espacial, forma y área.
- Ser desechables, por lo que se eliminan tareas de limpieza.
- Presentar mayor reproducibilidad.
- Disponer de una amplia gama de materiales para su fabricación.
- Tener bajo coste en su producción.
- Ser viables para la realización de análisis in situ.
- Ser susceptibles de numerosas modificaciones que dan lugar, por ejemplo, a la fabricación de biosensores.

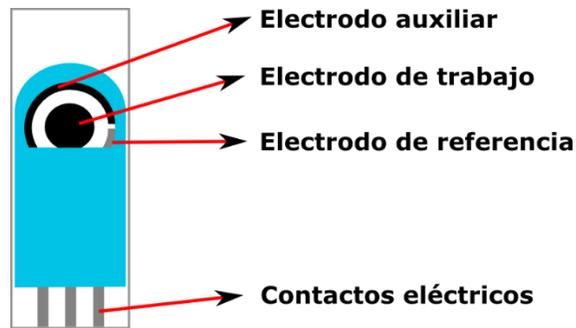


Fig. 9. Sensor Serigrafiado

Teniendo en cuenta las ventajas de los dispositivos fabricados con la tecnología serigráfica, y considerando que sus aplicaciones están al mismo nivel que las de los electrodos convencionales, se presenta un gran campo de investigación basado en este tipo de electrodos [54].

En la fabricación de este tipo de dispositivos, las distintas tintas que definen las partes funcionales del sensor se depositan secuencialmente sobre un sustrato o material soporte. El sustrato debe de ser inerte y de bajo costo, puesto que son dispositivos desechables y de un solo uso. Algunos materiales utilizados con este propósito son PVC, cerámicos, policarbonatos, nitrocelulosa o fibra de vidrio [29,54].

2.2.7 Electrodeposición de nanopartículas de oro.

La electrodeposición es un procedimiento electroquímico mediante el cual se busca cubrir un electrodo con una fina capa de un determinado metal. Este procedimiento es de suma importancia debido a las propiedades físicas que se le otorgan al electrodo tratado. Entre las principales se debe mencionar un aumento de la resistencia a la corrosión, la cual puede presentarse debió a reacciones oxidativas llevadas a cabo en una solución electrolítica de interés o por las simples características físico-químicas de la misma [55]. También se presenta un aumento en la conductividad de la superficie, permitiendo una mayor interacción con moléculas y/o compuestos polares que pueden ser utilizados para la formación de estructuras de reconocimiento específico [56]. Otro

punto importante a destacar es que dependiendo del metal que se deposite, permite al electrodo interactuar a niveles celulares, sub celulares o incluso moleculares [57].

Para llevar a cabo este procedimiento, el electrodo se sumerge en una solución electrolítica que contiene los iones del metal que formará la capa. Posteriormente se pondrá en contacto con una fuente de corriente continua y con un electrodo que cumplirá la función de ánodo, cediendo electrones para que los iones metálicos en solución se reduzcan y se depositen sobre el electrodo, que cumple la función de cátodo [55]. Un punto importante a destacar es que las propiedades que tendrá la capa, dependen directamente de la corriente que se haya aplicado. La adherencia de la capa, su calidad y la velocidad de deposición, dependen del voltaje y de otros factores relacionados con la corriente aplicada. También hay que tener en cuenta que si la superficie tratada se encuentra intrincada, la capa formada será más gruesa en algunos puntos y más fina en otros [58].

De manera evidente, las nanopartículas frecuentemente desempeñan un rol clave en diversas aplicaciones debido a sus propiedades inherentes únicas como son su fuerte absorción o dispersión óptica, emisión fluorescente o momento magnético, lo cual las vuelve una opción viable en estudios de análisis cuantitativo debido a su interacción con el medio, especialmente en los sistemas biológicos [59].

Las nanopartículas de oro (NpAu) de unos pocos nanómetros se encuentran en el mismo rango de tamaño que las proteínas, enzimas y ADN y, por tanto, son adecuados para interactuar con subunidades celulares o proteínas, permitiendo la preparación de nuevos híbridos biomolécula-nanopartícula [60]. Se caracterizan por tener un tamaño de partícula muy pequeño, actualmente considerado en el orden de 1 nm - 300 nm. Las aplicaciones más novedosas de las NpAu las encontramos en el área química y biológica [61]. La catálisis es probablemente la aplicación química más importante de las NpAu, ya que exhiben propiedades catalíticas para muchas reacciones orgánicas con alta actividad y selectividad, utilizándose en solución o adsorbidas sobre un soporte sólido. Su alta eficiencia catalítica se explica en función de su alta relación

superficie/volumen en comparación con otros sistemas [62]. Aunado a lo anterior, el tamaño y forma de las nanopartículas ejercen una gran influencia en sus propiedades ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas, dando lugar a un interés creciente en la búsqueda de nuevos procesos de síntesis que permitan controlar su geometría y morfología [63].

El mecanismo básico para dar lugar a la formación de clusters es reducir el Au^{3+} a Au elemental, las NpAu hay que protegerlas con un recubrimiento estabilizante adsorbido sobre su superficie para evitar la agregación [64].

En la Fig. 10 se esquematiza el método de preparación de una solución coloidal de NpAu a partir de la reducción de ácido cloroáurico (HAuCl_4), la cual consiste en la nucleación de átomos metálicos libres para la formación y crecimiento de las nanopartículas metálicas deseadas. Actualmente, este es uno de los métodos más utilizados, combinado con el autoensamblaje de monocapas de tioles y alcanotioles [62].

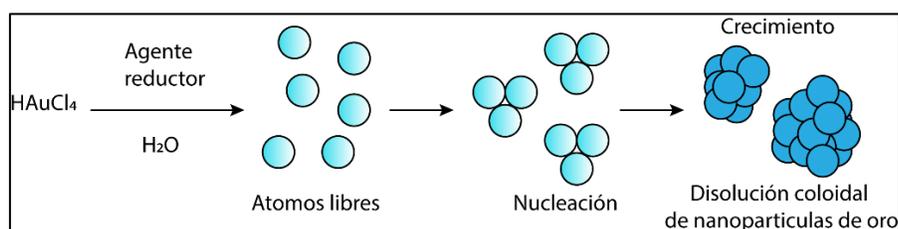


Fig. 10. Reducción de oro y formación de nanopartículas a partir HAuCl_4

En el caso de la electrodeposición, no es necesario el uso de agentes reductores para la formación de los clusters, ya que al aplicar un potencial en la solución coloidal, y llevarse a cabo la reacción redox entre el ánodo y el electrodo de trabajo (cátodo) los nanoclusters de oro se forman y crecen conforme pasa el tiempo, depositándose sobre la superficie de trabajo [65].

2.3 Técnicas para la caracterización de biosensores.

Para poder implementar con éxito y de manera confiable un biosensor, es necesario caracterizar las diferentes etapas de fabricación. La caracterización implica ir desde conocer su superficie de trabajo, hasta medir su aporte electroquímico. Existen múltiples técnicas para lograr una adecuada caracterización, su elección dependerá hacia donde está dirigida la implementación del biosensor, y los aspectos que se desean evaluar para confirmar su correcta modificación.

2.3.1 Microscopía electrónica de barrido.

La microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés de Scanning Electron Microscopy) es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional, la cual se ha usado extensamente en el estudio de semiconductores, nanopartículas, modificación de productos comerciales, catálisis heterogénea, dispositivos de juntura P-N, películas delgadas, física de nanocomposiciones, fotoelectroquímica, entre otras. Dadas sus posibilidades de resolución, magnificación y versatilidad de variantes, permite que sea aplicada a diversidad de muestras, ambientes y necesidades experimentales [66].

En términos generales, un equipo SEM es capaz de tomar una imagen de la muestra, aunque realmente lo que se detecta es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones, en vez de registrar fotones propiamente dichos como sucede en la microscopía óptica. Al ser impactada por el haz de electrones de alta energía, la muestra produce una serie de señales que son registradas en los diferentes detectores del equipo, en donde cada una de dichas señales ofrece independientemente información acerca de la topografía, composición y hasta conductividad eléctrica de la muestra. Por supuesto, para adquirir la imagen se hace mover el haz en el plano “xy” (con sistemas ópticos, antes de impactar la muestra) de forma que recorra el área deseada o planificada. La resolución que puede alcanzarse; es decir, la capacidad de

distinguir en la imagen entre dos puntos diferentes pero próximos entre sí, en la superficie del material, puede ser tan alta como de 2 nm [67].

En la Fig. 11 se muestra una representación esquemática de cómo es incidido un haz de electrones a la muestra de interés, las señales resultantes son recogidas por un detector que envía la información a un procesador que reconstruye la imagen.

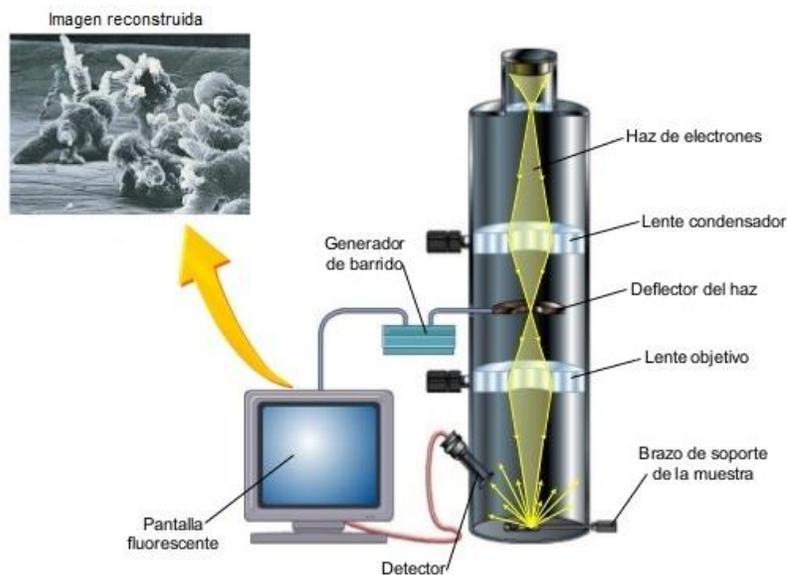


Fig. 11. Obtención de imágenes por SEM.

La idea básica de funcionamiento de un equipo de SEM es la siguiente: se genera un haz de electrones de alta energía (o electrones incidentes) y se usa un sistema de lentes para focalizar el haz y hacerlo incidir sobre una muestra, la cual generará, a su vez, electrones (llamados secundarios y retrodispersados con siglas SE y BSE, respectivamente) como respuesta al impacto electrónico, dichos electrones que salen de la muestra son detectados mediante dispositivos Everhart- Thornley (Detector secundario de electrones y electrones retrodispersados) y SED (Solid State Detector) que registran cada uno la cantidad de electrones detectados y lo convierten en una señal digital que se interpreta como intensidad de color, para construir una "imagen" aunque no se usen fotones. Si, además de lo anterior, se tiene todo el equipo trabajando en una atmósfera interna prácticamente inexistente (alto vacío), y se reemplaza el detector de los SE convencional (Everhart-Thornley) por uno que genera

un campo eléctrico para llevar los SE hacia el cuerpo del detector, entonces se puede hacer una SEM ambiental, la cual es una técnica muy usada en la actualidad para poder tomar imágenes de muestras sensibles de tratar como pueden ser aislantes, muestras sensibles al vacío o radiación, en estado líquido, etc., además de dar la posibilidad de estudiar procesos *in situ* tales como corrosión, estrés mecánico o hidratación y deshidratación. Finalmente, algunas de las aplicaciones generales de la SEM son [66]:

- Análisis de fallo de diseño de productos
- Estudio de contaminantes
- Caracterización de texturizado superficial
- Estudio morfológico y estructural
- Análisis de defectos superficiales y control de calidad

2.3.2 Espectroscopia de dispersión por rayos X.

La espectrometría de dispersión por rayos X (EDS) es una de las técnicas más comúnmente implementadas en SEM para microanálisis. Cuando un sistema físico es bombardeado por electrones pueden ocurrir varios fenómenos: el electrón atraviesa libremente la muestra, es desviado de su trayectoria inicial por la fuerza de interacción con algún átomo del sistema físico en cuestión sin perder velocidad, que el electrón experimente una dispersión inelástica, o que interaccione con algún otro electrón de los orbitales internos y acabe expulsándolo del átomo. Todos estos fenómenos son estudiados para obtener información valiosa sobre el sistema físico de estudio [68].

La técnica EDS, permite estudiar la emisión de fotones de rayos X que se producen cuando un átomo de una muestra presenta transiciones electrónicas entre sus orbitales internos [69]. Esta radiación producida es de gran importancia ya que la energía de los fotones emitidos está directamente relacionada en el peso atómico del elemento emisor (la diferencia de energía entre orbitales aumenta según lo hace el

peso atómico, debido al aumento del número de protones en el núcleo), y así de esta manera determinar [68]:

- De acuerdo con la energía del fotón emitido, el cual es el elemento que lo está emitiendo (análisis cualitativo).
- Por el número de fotones emitidos, la cantidad relativa de cada elemento en la muestra (análisis cuantitativo).

2.3.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es el método por el cual se estudia la absorción o emisión de energía radiante originada por la interacción entre la radiación electromagnética y el material de estudio. La FTIR se basa en que las moléculas tienen la posibilidad de rotar y vibrar a distintas frecuencias (modos normales vibracionales). Es decir que, una molécula puede absorber la energía de fotones en el rango energético de infrarrojo (IR) en el caso en que exista una diferencia en el momento bipolar de la molécula mientras ocurre un movimiento vibracional rotacional y cuando la frecuencia asociada con la radiación resuena con el movimiento vibracional [70].

Existen modos vibracionales que inducen oscilaciones que pueden entrar en resonancia con un haz de IR. Esto produce un intercambio de energía entre el haz y las moléculas constituyentes. Por lo que hay un comportamiento característico para un enlace con un tipo atómico, un entorno químico y una concentración de enlaces determinadas. Con base en lo anterior, en la Fig. 12 se presenta un ejemplo de un espectro IR, en donde se pueden manifestar bandas asociadas a prácticamente todos los compuestos moleculares. Cada una de estas bandas corresponderá a un movimiento de vibración de uno de los enlaces dentro de la molécula. Se sostiene entonces que el conjunto constituye la huella dactilar del compuesto. Cada compuesto tendrá entonces un comportamiento particular frente a un haz de infrarrojos, en esto se basa la eficacia de la FTIR [70].

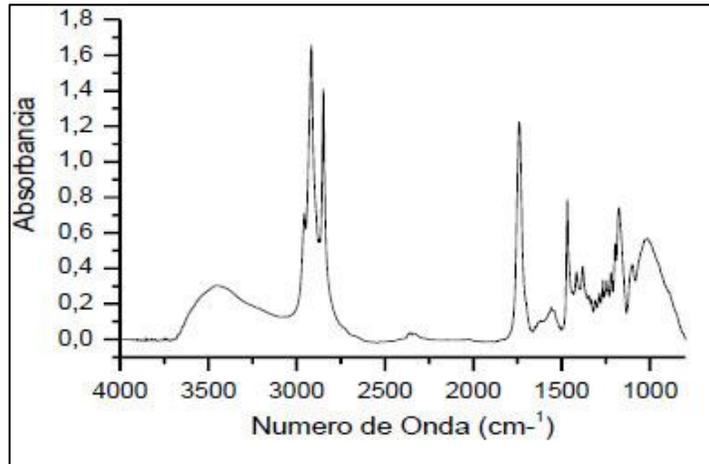


Fig. 12. Relación de absorbancia en función del wavenumber (número de onda) en un espectro IR

Cuando se hace un análisis IR se mide la intensidad del haz antes (I_0) y después (I) de que interactione con la muestra. El resultado se expresa en función de la frecuencia de la luz incidente. Para estudiar las frecuencias se utiliza el modelo del Oscilador Armónico Simple (OAS) basado en la Ley de Hooke el cual se presenta en la Fig. 13, donde la molécula será considerada como dos masas (m_1 y m_2) que están unidas por un resorte de constante K [70].

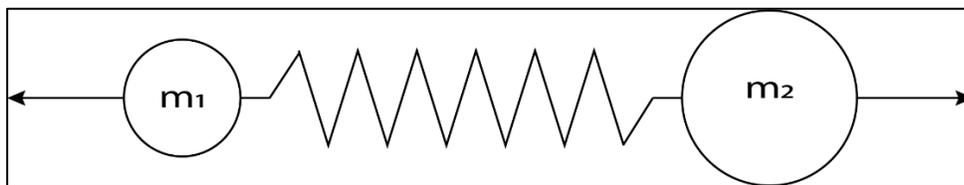


Fig. 13. Esquema de oscilador armónico aplicado al análisis de frecuencias

Si hay resonancia entre la frecuencia de la vibración, la luz es absorbida y se produce un desplazamiento que genera una energía potencial (E), siendo K la constante de la fuerza del enlace y el desplazamiento, lo cual se expresa en la ecuación (2) [70].

$$E = \frac{1}{2} * K * y^2(2)$$

2.3.4. Voltamperometría cíclica.

La Voltamperometría Cíclica (VC), es la técnica electroanalítica más versátil para el estudio de especies electroactivas. Su versatilidad es combinada con la facilidad de identificar los potenciales redox, lo cual hace que sea empleada ampliamente en los campos de la electrosíntesis, bioquímica, química inorgánica y orgánica, entre otras. La VC es frecuentemente el primer experimento representado en un estudio electroquímico de un compuesto, un material biológico, o una superficie de electrodo. La efectividad de la VC se asocia a su capacidad para observar rápidamente los procesos redox sobre un amplio intervalo de potencial. El voltamperograma cíclico resultante se presenta en la Fig. 14, el cual es análogo a un espectro convencional, el cual transmite información como una función de un barrido de energía [71,72].

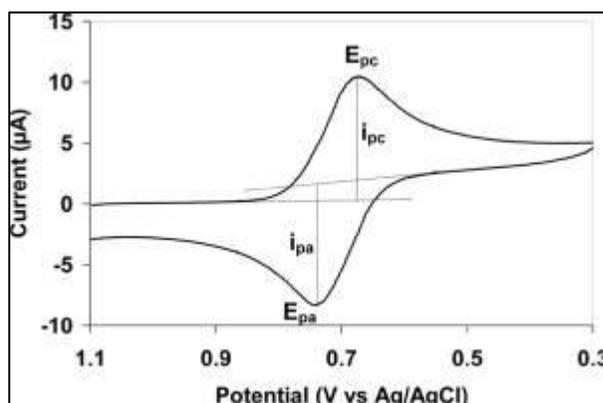


Fig. 14. Voltamperograma cíclico típico donde se muestran la corriente catódica pico (i_{pc}) y la corriente anódica pico (i_{pa}).

La VC consiste en ciclar el potencial de un electrodo, el cual está sumergido en una solución electrolítica, y mide la corriente resultante. El potencial del electrodo trabajo está controlado contra un electrodo de referencia (electrodo de sulfato mercurioso (ESM), electrodo de calomel saturado (ECS), o Ag/AgCl). El potencial aplicado a través de estos dos electrodos puede ser considerado como una señal de excitación. La señal de excitación para la VC es un barrido lineal de potencial con una forma triangular. Esta señal de excitación barre el potencial de electrodo entre los dos valores, algunas veces llamado “switching”. La señal de excitación ocasiona el primer potencial de

barrido en sentido anódico, por ejemplo, en la Fig. 15, se muestra el gráfico de potencial en función del tiempo, donde el barrido de potencial inicial ($E_{inicial}$) es en -0.2 V/ESM hasta 0.8 V/ESM en el cual la dirección del barrido es invertida ($E_{inversión}$), causando un barrido catódico, regresando al potencial original (E_{final}) en -0.2 V/ESM. La velocidad de barrido (v) se refleja en la pendiente de la línea de potencial inicial y del potencial de inversión. Un segundo ciclo es indicado por la línea de inicio, además se pueden realizar una serie de ciclos sucesivos de acuerdo con las necesidades del experimento [71,73].

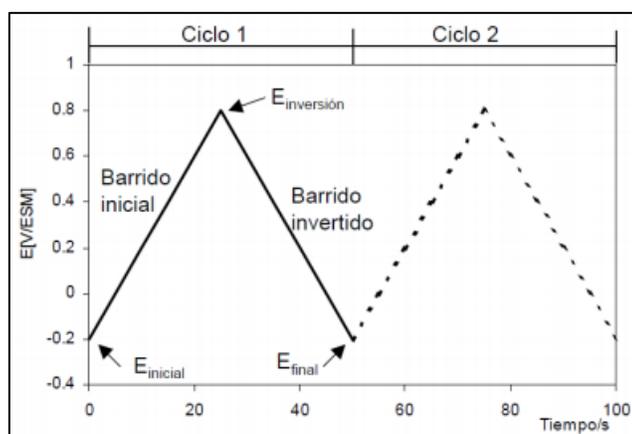


Fig. 15. Representación típica de la señal de excitación para la VC de onda triangular.

El equipo utilizado para realizar mediciones electroquímicas se conoce como potencióstato. El cual, es un instrumento electrónico que puede medir y controlar la diferencia de potencial y la corriente eléctrica que circula entre un electrodo de trabajo y un electrodo auxiliar o contraelectrodo. Para ello la muestra se coloca en una celda electroquímica de tres electrodos (electrodo de trabajo, que es la propia muestra, electrodo de referencia y contraelectrodo) [74].

En la Fig. 16, se muestra la analogía del funcionamiento interno de un potencióstato de tres electrodos, que mantiene un potencial específico constante. El funcionamiento del circuito y de los electrodos consiste en suministrar un potencial a la solución a través del electrodo auxiliar, sin tener en cuenta los cambios en la resistencia, ni en la polarización por concentración en la disolución electrolítica, hasta medir un potencial

prefijado en el electrodo de referencia. Esta medida de tensión se realiza entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. La corriente que circula por la solución se mide a través del electrodo de trabajo [74].

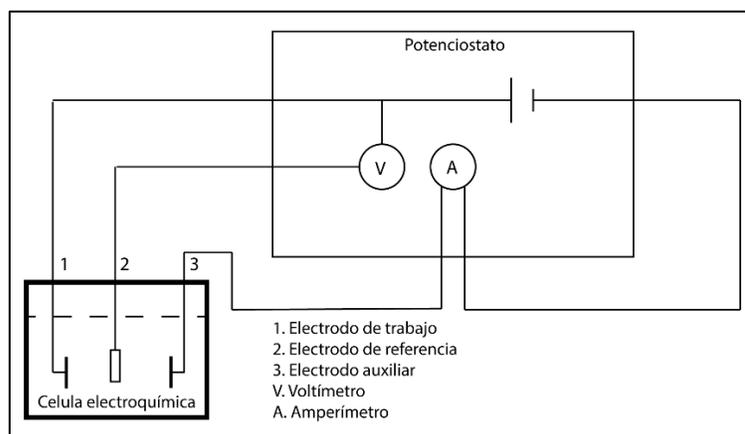


Fig. 16. Diagrama general de un potenciostato de tres electrodos.

2.4 Monocapas Autoorganizadas.

Las monocapas o películas autoorganizadas (SAM, del inglés self-assembled monolayer), son conjuntos moleculares formados espontáneamente en la superficie de un sustrato por adsorción y están organizados en más o menos grandes dominios ordenados. Son ampliamente utilizadas en procesos de inmovilización de proteínas sobre superficies recubiertas con oro, ya que ayudan a evitar su desnaturalización y a mejorar la orientación durante la fijación. Su estructura se esquematiza en la Fig. 17, la cual está compuesta por los siguientes elementos [75,76]:

1. **La cabeza.** Es el lugar donde la molécula anfílica se une al sustrato. Es la parte esencial de la molécula. Los grupos de cabeza son generalmente: tioles (-SH, -SR'), ácido silícico (-Si(OH)₃) y ácido carboxílico (-COOH). Es la parte que proporciona un proceso más exotérmico, es decir la quimisorción en la superficie del sustrato. La energía asociada viene a ser de unos 100-200 kJ/mol. Como resultado de esta interacción exotérmica las moléculas tratan de ocupar cada uno de los sitios que hay disponibles en la superficie del sustrato.

2. **La cadena alifática o cola.** Origina la aparición de fuerzas de van der Waals entre las cadenas produciendo así la organización de la monocapa. Este proceso también es exotérmico, y su energía es menor (de aproximadamente 40 kJ/mol). Es evidente que con estas energías sería muy difícil que se produjera el autoensamblaje y, desde luego, es la quimisorción de la cabeza polar la que facilita este proceso. Cuando se introduce un grupo polar en la cadena, también existen interacciones electrostáticas que en algún caso son más importantes que la propia atracción entre cadenas.

3. **El grupo terminal o funcional.** Es el que proporciona la funcionalidad del SAM. Generalmente es un grupo metilo $-\text{CH}_3$, pero se puede modificar una vez finalizada la formación de la monocapa. Los grupos metilos terminales se hallan desordenados a temperatura ambiente, mientras que los grupos hidroxilo (OH) están organizados. La energía asociada es del orden de 3 kJ/mol algo mayor que la energía que proporciona la agitación térmica a temperatura ambiente.

4. **El sustrato.** Es donde se anclan las moléculas de surfactante por quimisorción, debido a que es un proceso que se debe a una reacción química, el sustrato y el surfactante no pueden ser cualesquiera, ya que debe favorecer el fenómeno de autoensamblaje. Los sustratos que se utilizan son sustancias inorgánicas tales como plata (Ag), oro (Au), cobre (Cu), germanio (Ge), platino (Pt), silicio (Si), arseniuro de galio (GaAs), óxido de silicio (SiO_2), entre otros. El oro es uno de los más utilizados.

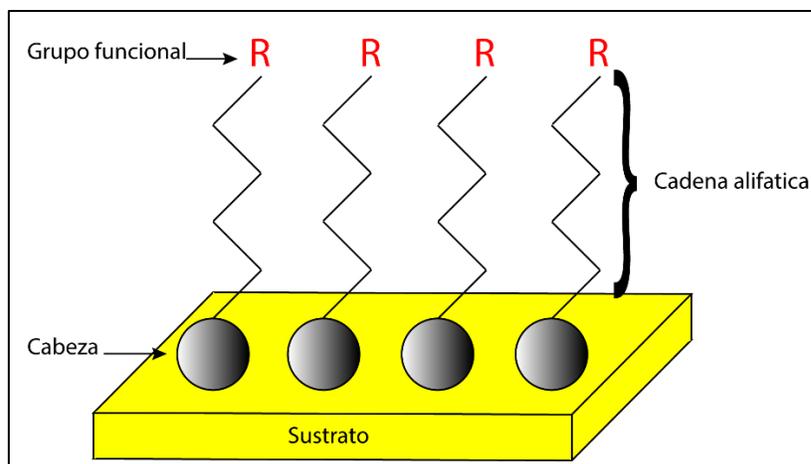


Fig. 17. Representación esquemática de la estructura general de una SAM

2.4.1 Cisteamina.

La cisteamina (CYS) es una molécula altamente biocompatible producto del aminoácido cisteína. Es el aminotiol más simple fisiológicamente presente en las células humanas y también el más estable que se conoce. Es un antioxidante dérmico poderoso que transporta L-cistina para mejorar el proceso de desintoxicación de las células [77].

La CYS se presenta como un sólido de color blanco de olor desagradable. Alcanza el punto de fusión a 95 °C y al aumentar la temperatura se descompone antes de llegar al punto de ebullición. Es un compuesto estable si bien es incompatible con agentes oxidantes enérgicos. Es soluble en agua, metanol, etanol y dimetil sulfóxido. El valor del logaritmo de su coeficiente de reparto, $\log P = 0.028$, indica que su solubilidad en disolventes hidrófilos e hidrófobos es semejante [77].

Su fórmula molecular es C_2H_7NS , formada por una cadena alquílica de 2 carbonos, con un grupo funcional amino ($-NH_2$) en un extremo, y un grupo tiol o sulfhidrilo ($-SH$) en el otro extremo, tal como se indica en la Fig. 18 [77].

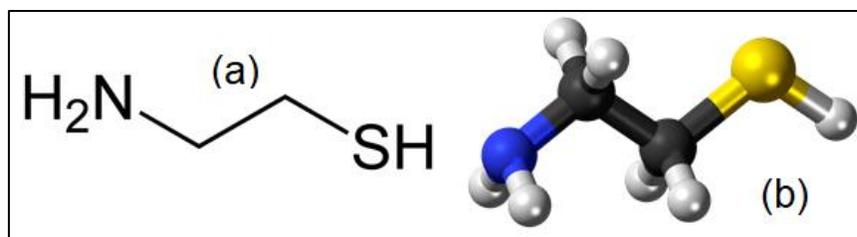


Fig. 18. Estructura química de la cisteamina. (a) Esqueleto 2-D. (b) Modelo 3-D donde se identifican los elementos químicos que forman la molécula de cisteamina: carbono (negro). hidrógeno (blanco). nitrógeno (azul). azufre (amarillo)

La modificación de superficies metálicas con monocapas orgánicas y películas delgadas es un tema que impacta en una amplia variedad de áreas de importancia tecnológica y científica. Los tioles se encuentran entre los productos químicos más exitosos empleados para unir metales porque reaccionan químicamente con el oro, la plata y el cobre, formando así enlaces estables metal-azufre. Se podría concebir que cualquier molécula particular podría primero derivatizarse con un tiol y luego unirse a la superficie metálica respectiva. Sin embargo, existen numerosas sustancias que presentan grupos funcionales activos o estructuras delicadas que no pueden someterse a una reacción de derivatización sin perder sus propiedades esenciales [78].

La CYS se usa ampliamente como agente de enlace en superficies metálicas, porque se supone la formación espontánea de capas autoensambladas terminadas en grupos amino. Situación que no se presenta de manera espontánea cuando se utilizan otros tipos de compuestos como el fullereno, tioninas, azobencenos, quinonas, dopaminas, entre otros [78].

2.4.2 Formación de monocapas autoorganizadas sobre superficies de oro.

La quimisorción de los átomos de azufre de las cadenas de CYS sobre la superficie de oro conduce a su autoensamblado tal y como se indica en la ecuación (3). La densidad de las cabezas azufradas promueve el acercamiento de las cadenas carbonadas unas con otras causando su ordenamiento, “congelando” así la entropía

configuracional que normalmente funde las cadenas libres a temperatura ambiente [79].



Una cierta carga negativa permanece remanente en el átomo de azufre que está unido a la superficie de oro. Este fuerte carácter electronegativo de la cabeza azufrada permite la unión con la superficie conductora, otorgando una fuerte estabilidad [80].

Si bien es cierto, que varios sistemas han sido utilizados para formar SAM. Es una realidad que el sistema modelo utilizado para tales estudios ha sido, sin lugar a duda, el de los tioles sobre superficies de oro, principalmente de electrodos electroquímicos de trabajo [79]. Estos compuestos se organizan formando estructuras ordenadas con un ángulo característico respecto a la superficie del electrodo. Los tioles que forman la monocapa pueden modificarse a través de sus extremos activos, permitiendo la incorporación de enzimas, mediadores, agentes de entrecruzamiento o nanopartículas metálicas. Esta posibilidad de modificación, junto con la variedad de longitudes de cadenas hidrocarbonadas de que se dispone, hacen que sea posible una versatilidad en el diseño de la arquitectura molecular de la superficie de trabajo para diferentes aplicaciones. Además, desde el punto de vista general la presencia de SAM proporciona una elevada relación señal/ruido, así como también una buena reproducibilidad tanto de las medidas electroquímicas como el proceso de fabricación y modificación de la superficie [58].

Sin embargo, en la mayoría de los casos las moléculas que conforman la monocapa presentan una orientación que no es exactamente perpendicular a la superficie. Estas poseen un ángulo de inclinación con respecto a la normal de la superficie, como así una dirección de inclinación y un ángulo de rotación. En principio, la cadena carbonada no necesita estar completamente extendida, sino que las cadenas pueden estar torcidas o presentar defectos “*gauche*”, con lo cual diferentes cadenas carbonadas pueden tener diferentes estados conformacionales [79,80].

En términos óptimos de inmovilización de enzimas sobre SAM, la conformación “*trans*” es la que deben presentar las moléculas de CYS unidas a la superficie de oro. En la Fig. 19 se muestra que las cadenas que poseen una conformación “*trans*” se encuentran extendidas, inclinadas con respecto a la normal de la superficie, lo cual asegura dejar libre el grupo -NH₂ que reaccionara con el grupo carboxilo de la enzima, dando como resultado una correcta orientación de la misma. Por otra parte, si se presentan las cadenas en conformación “*gauche*” la inmovilización orientada de la enzima tiende a no presentarse debido a que el grupo -NH₂ forma un enlace por fuerzas de Van der Waals con la superficie de oro, esto provoca que la cadena sea torcida dejando inaccesible a este grupo amina [79,80].

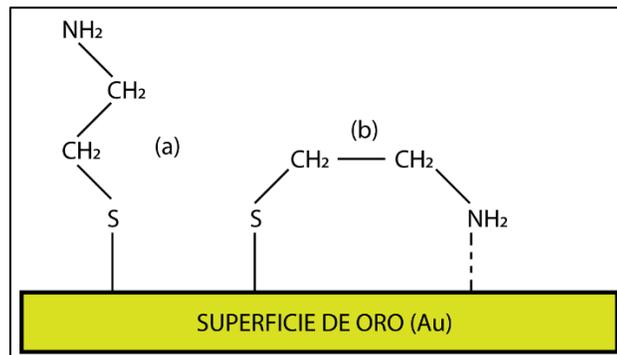


Fig. 19. Conformaciones espaciales principales que puede tomar la CYS en la formación de SAM sobre superficies de metales conductores. (a) Conformación “*trans*”. (b) Conformación “*Gauche*”

2.4.3 Inmovilización por enlace covalente EDC/NHS sobre una superficie de trabajo.

Esta variante de inmovilización se basa en el enlace de los elementos de reconocimiento al soporte sólido o electrodo previamente activado con reactivos multifuncionales tipo carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS). Esta inmovilización puede realizarse directamente sobre la superficie del transductor, sobre membranas fijadas en la superficie del mismo, o sobre una gran variedad de soportes como materiales inorgánicos, polímeros sintéticos o naturales, o incluso membranas que hayan sido previamente activadas [81].

La inmovilización covalente mediante química EDC consiste en la activación previa de los grupos carboxilos (-COOH) presentes en el soporte sólido para, consecuentemente, enlazar con los grupos -NH₂ de la biomolécula. En el proceso de activación mediante EDC, normalmente se emplea NHS con la finalidad de mejorar la eficiencia de la inmovilización [81].

Si el soporte sólido se encuentra funcionalizado con grupos -NH₂, algunos de los métodos para anclar biomoléculas a la superficie consisten en llevar a cabo el enlace entre los grupos -NH₂ y los grupos -COOH del elemento de reconocimiento a partir de agentes entrecruzantes, o transformando previamente los grupos -NH₂ del soporte en sales de diazonio y acoplando las biomoléculas a la superficie mediante enlaces covalentes de tipo diazo [82].

2.4.4. Inmovilización por entrecruzamiento utilizando glutaraldehído.

Actualmente el método más novedoso de *cross-linking* consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído. El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas [6].

Cuando se utiliza este método de inmovilización sobre SAM de CYS, se asume que el grupo -NH₂ de la CYS reacciona con el exceso de grupos -CHO que quedan sin reaccionar de las moléculas de Uox reticuladas o entrecruzadas por el glutaraldehído, formando y protegiendo de la desnaturalización al complejo de inmovilización SAM-Uox sobre una superficie de trabajo [83].

El principal inconveniente del uso del glutaraldehído es su alta reactividad, la cual, en condiciones de reacción no bien controladas, puede dar lugar a un exceso de entrecruzamientos que puede ocasionar una disminución de la actividad catalítica de la preparación final. Del mismo modo el reactivo puede dar lugar a entrecruzamientos entre distintos puntos de la propia proteína dando lugar a modificaciones estructurales conducentes, dando lugar a la pérdida o al menos reducción de su actividad enzimática [84].

2.5. Estado del Arte.

Un objetivo desafiante de la biotecnología, la electrónica molecular y los biosensores es la inmovilización de las proteínas en la superficie manteniendo su plena actividad y estabilidad. La mayoría de los métodos comúnmente usados, por ejemplo, adsorción, atrapamiento físico en geles poliméricos, reticulación química o unión covalente a un soporte, son difíciles de controlar y normalmente producen proteínas unidas al azar [85]. Por el contrario, una inmovilización ideal produciría una cobertura de saturación de proteínas unidas de forma específica. La especificidad permite la inmovilización selectiva de una proteína dada a partir de una mezcla compleja. En circunstancias adecuadas, la unión específica daría lugar a una inmovilización orientada de las proteínas [86].

El desarrollo de aplicaciones de enzimas bioelectrónicas requiere la inmovilización de proteínas activas sobre sustratos sólidos o coloidales como el oro [87]. La forma actual más sencilla de ligar una molécula biológica a una superficie metálica es por adsorción física [88,89], pero esta estrategia no es adecuada para fines analíticos porque, en general, produce una modificación superficial débil que no puede resistir la agitación y el lavado, además de que el sustrato no es biocompatible lo que inactiva o desnaturaliza a la biomolécula [90]. Para prevenir este tipo de incompatibilidades y ligar la molécula de interés al sustrato metálico se pueden utilizar monocapas autoensambladas, básicamente de dos formas: La modificación química de la proteína con una estructura de unión que sea capaz de reaccionar preferentemente con el

sustrato para formar una SAM [91,92], o realizar reacciones en la SAM para luego unir a la biomolécula [90].

El autoensamblaje es uno de los conceptos más importantes del siglo XXI, y se define como la construcción de sistemas sin guía de fuentes externas distintas a las proporcionadas por el entorno. Las SAM son ejemplos de autoensamblaje intermolecular que tiene lugar en las interfaces gas-líquido, gas-sólido y líquido-sólido. Las superficies sólidas de metales, semiconductores y óxidos con diferentes topografías pueden utilizarse como andamios para la construcción de estos sistemas supramoleculares mediante la adsorción de diferentes moléculas [93].

La investigación de la eficiencia de la inmovilización de proteínas en diferentes SAM es un paso esencial para comprender el efecto químico vecino y la contribución de los grupos terminales al proceso de inmovilización, debido a que brinda la oportunidad de explorar el entorno químico con precisión molecular. De esta manera, la tecnología de autoensamblaje es de gran importancia para el desarrollo de bio-superficies que pueden usarse como herramientas bioanalíticas para la administración de fármacos y en sistemas de diagnóstico de enfermedades, en dispositivos de reconocimiento y mapeo genético, y en sensores ambientales, industriales o de aplicaciones clínicas [90].

La mayoría de las estrategias de inmovilización disponibles para acoplar biomoléculas a las superficies de un electrodo comprenden la unión covalente por la formación de un enlace amida [36,94,95], o por el uso de un agente de reticulación a los grupos funcionales de superficie [96–98], por acoplamiento no covalente mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o hidrofílicas [99,100], y a través de interacciones de afinidad y pares de reconocimiento como las interacciones At-Ac [101].

En 1997 se desarrolla una de las primeras estrategias de inmovilización orientada de enzimas sobre superficies de oro a través de la formación de monocapas

autoensambladas a base de tioles [85], la cual se convirtió en la base de un gran número de protocolos de inmovilización orientada a aplicaciones electroquímicas cuantitativas, debido a que no solo se logró la correcta orientación de especies proteicas, sino que además se logró conservar su actividad catalítica completa. En 2002, se desarrolla un protocolo de inmovilización orientada de enlace covalente a partir del uso de SAM mixtas a base de tioles, en donde se logra una fijación estable de múltiples enzimas de naturaleza redox, también se logran realizar pruebas de caracterización por SEM sin que exista una degradación significativa del elemento proteico [87]. Posteriormente, en 2008 se presenta uno de los protocolos más estables utilizando SAM a base de CYS, en donde se logra la inmovilización orientada por enlace covalente sobre una superficie de oro, en función de los enlaces formados entre los grupos carboxilos de una enzima redox y los grupos $-NH_2$ presentes en los extremos de la monocapa, verificando su rendimiento a partir de la medición y cuantificación de H_2O_2 producido por la acción catalítica generada por la interacción de la enzima con el analito [90].

Aunque la inmovilización por enlace covalente podría disminuir la actividad catalítica de una enzima cuando se emplea algún grupo funcional esencial para conectarlo a la interfaz del transductor, ese enfoque se considera el método más adecuadamente robusto para fabricar biosensores viables. Por el contrario, se sabe que el enfoque no covalente proporciona superficies de detección con la estabilidad más corta, pero consiste en una forma rápida y fácil de construir interfaces de bio-reconocimiento. No obstante, el uso de agentes bifuncionales para unir el biomaterial a los soportes sólidos se emplea en gran medida debido a la fácil formación de monocapas con una estabilidad razonable incluso con una difusión limitada del sustrato hacia el elemento biológico inmovilizado [90].

Dentro del desarrollo actual de técnicas y sistemas para detección y cuantificación de AU en muestras líquidas controladas y de origen humano, se tiene el desarrollado por Mulyasuryani y Srihardiastutie [88], quienes en 2011 presentan un biosensor conductimétrico construido a partir de un SPE utilizando como elemento de

reconocimiento a la enzima Uox, el cual pudo mantener una estabilidad operativa no menor a 3 días con un rango de detección de 1 a 6 ppm, cuyos resultados de cuantificación fueron de los primeros en ser comparados con sistemas de laboratorios médicos, presentando un error relativo inferior al 10%. Ese mismo año, se presenta un biosensor amperimétrico y voltamperométrico para la medición de AU en muestras acuosas, en donde se utilizó una superficie dopada con NpAu para mejorar su conductividad y aporte electroquímico, lo cual favoreció en gran medida la formación de SAM en su superficie, como la inmovilización del elemento de reconocimiento [36].

En 2013, se presenta un gran avance en la tecnología de desarrollo de biosensores para la medición de AU, con la implementación de un sistema portátil impedimétrico y voltamperométrico capaz de analizar muestras de suero sanguíneo humano, desarrollado sobre electrodos de trabajo de SPEs de oro y platino, cuyo proceso de inmovilización de la Uox se llevó a cabo por entrecruzamiento utilizando glutaraldehído, lo cual le brinda una gran estabilidad y selectividad debido a la estructura generada de reticulado [98]. Un año después, se presenta un biosensor amperimétrico que combina las técnicas de electrodeposición de nanopartículas metálicas con una inmovilización por entrecruzamiento sobre SAM tioladas, además de la incorporación de enzimas recombinantes como elemento de reconocimiento para un análisis sanguíneo [99].

Finalmente, en años más recientes se han presentado otros tipos de biosensores que van dirigidos únicamente al análisis de muestras de laboratorio a condiciones de temperatura y pH variables, y que utilizan variantes de los métodos de inmovilización ya estudiados con el objetivo de optimizar recursos y lograr avances en conjunto con los obtenidos constantemente en la medicina moderna, estos dispositivos generalmente voltamperométricos y amperométricos, buscan establecer las bases para una nueva generación de sistemas de sensado [89,100].

Capítulo 3. Solución Propuesta/Desarrollo

En este trabajo, se implementan las bases para el desarrollo y modificación de una superficie de trabajo de un AuSPE a partir de la construcción de SAM a base de CYS y la posterior inmovilización de la enzima Uox, para la detección de ácido úrico en muestras de laboratorio controladas. Estas modificaciones, tienen como objetivo la formación uniforme de una capa de elementos inmovilizados correctamente orientados, en donde los sitios de afinidad con el analito de interés se encuentren libres para mejorar la detección lo mejor posible. Dicho protocolo puede ser utilizado en el futuro para el diseño e implementación de biosensores que utilicen elementos de reconocimiento de origen proteico, como pueden ser otro tipo de enzimas además de las oxidorreductasas (como lo es la uricasa) o incluso anticuerpos.

Para analizar más a detalle las etapas de modificación de la superficie del electrodo de trabajo y su aporte electroquímico, así como la evaluación del uso de NpAu sobre una superficie igualmente de oro, se propusieron dos vertientes de experimentación. En la primera de ellas la modificación se llevará a cabo sin la presencia de las NpAu, mientras que en la segunda se incluye la electrodeposición de las mismas. Los estados de las superficies de trabajo obtenidos durante la modificación con base en la metodología descrita se muestran en la Fig. 20.

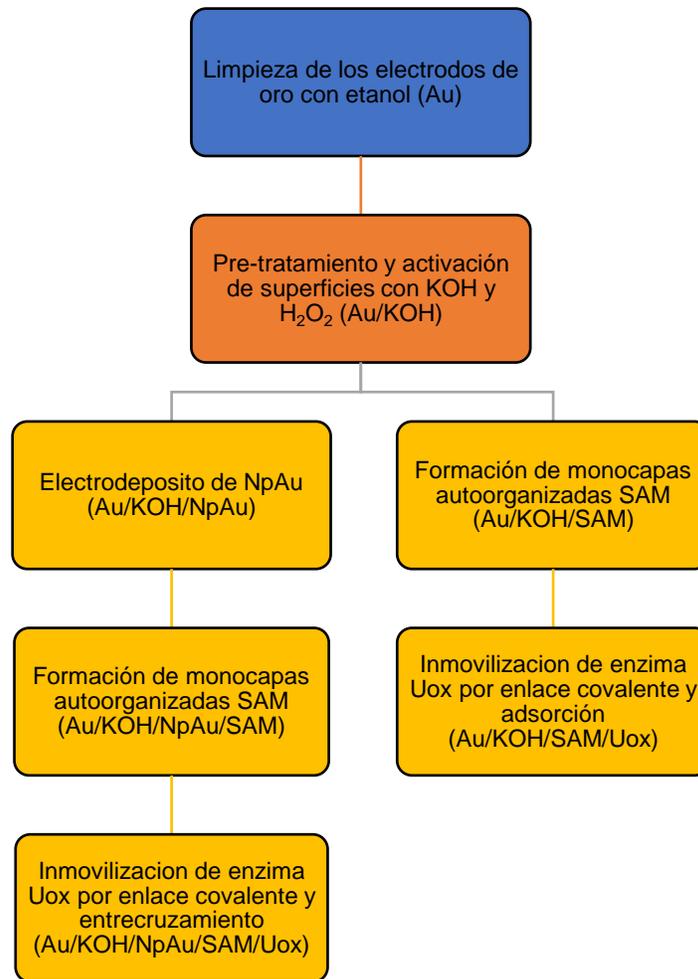


Fig. 20. Etapas de modificación de la superficie del electrodo de trabajo.

Las etapas principales para el diseño, caracterización y verificación que conlleva esta propuesta, son las siguientes:

3.1 Reactivos, materiales y equipo

Se hará uso de AuSPEs (Metrohm, MOD 6.1208.210) el cual se muestra en la Fig 21, donde se identifican el electrodo de trabajo, de referencia y auxiliar.

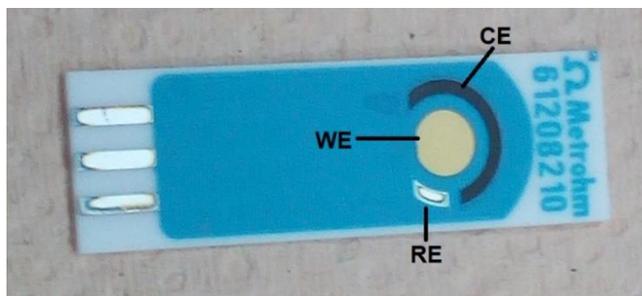


Fig. 21. AuSPE de Metrohm, Modelo 6.1208.210. (WE) Electrodo de trabajo (Working Electrode). (CE) Electrodo auxiliar (Counter Electrode). (RE) Electrodo de referencia (Reference Electrode).

Para las aplicaciones cuantitativas se utilizarán técnicas de medición de voltamperometría cíclica a través de la unidad Metrohm 910 PSTAT mini el cual se muestra en la Fig. 22, y que consiste en un potencioestado con conexión USB, pequeño, compacto y controlado por ordenador, que cuenta con un cable específico para SPEs que facilita su conexión. Antes de cada medición se le dará un tiempo de equilibrio de 5 segundos, este es el tiempo en que el equipo tarda en acondicionar y equilibra a la celda. Sus especificaciones técnicas son mostradas en Tabla 4.



Fig. 22. Potencioestado Autolab de Metrohm, modelo 910 PSTAT mini.

Tabla 4. Características técnicas de la unidad Autolab 910 PSTAT mini [102].

Características	Rango
Margen de Tensión	$\pm 2 \text{ V}$
Resolución de Tensión	1 mV
Rango de Corriente	$\pm 200 \mu\text{A}$
Medida de Corriente	6 rangos (2 nA a 200 μA)
Resolución de Corriente	0.1 % del rango de corriente (para los rangos de 10 nA a 100 μA), 10 pA en el menor rango de corriente (1 nA)

Para el pesado de los reactivos en la preparación de las soluciones químicas se utilizo la Balanza Mettler Toledo. Modelo: MS105, y la Balanza Ohaus. Modelo: PA313.

Para los ensayos de caracterización por SEM de la superficie de trabajo se utilizo la unidad SEM Hitachi SU3500, para los ensayos EDS se utilizo la unidad JSM-7401F, y finalmente para la caracterización FTIR se utilizó la unidad Perkin-Elmer GX-FTIR, todos del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), Unidad Chihuahua.

A continuación en Tabla 5 se presentan los reactivos utilizados, para la preparación de cada una de las soluciones empleadas:

Tabla 5. Reactivos químicos utilizados durante el proceso experimental

Reactivo	Abreviatura o Siglas	Proveedor	Referencia/CAS
Cloruro de Sodio	NaCl	Sigma-Aldrich	7647-14-5
Cloruro de Potasio	KCl	Sigma-Aldrich	7447-40-7
Fosfato de Disodio	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	7558-79-4
Fosfato Monobásico	KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	7778-77-0
Ferricianuro de potasio.	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Sigma-Aldrich	13746-66-2
Hidróxido de potasio	KOH	Sigma-Aldrich	1310-58-3
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Thermo Fisher	7722-84-1
Ácido cloroáurico	HAuCl ₄	Sigma-Aldrich	16961-25-4
Acido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich	7664-93-9
Diclorhidrato de cisteamina	C ₄ H ₁₂ N ₂ S ₂ – 2HCl	Sigma-Aldrich	56-17-7
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Sigma-Aldrich	64-17-5
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	EDC	Sigma-Aldrich	22572-40-3
N-hidroxisulfosuccinimida	Sulfo-NHS	Sigma-Aldrich	106627-54-7
Acido úrico	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	Sigma-Aldrich	69-93-2
Acido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Sigma-Aldrich	50-81-7
Uricasa de <i>Candida sp.</i>	Uox	Sigma-Aldrich	9002-12-4
Suero de albumina bovina	BSA	Sigma-Aldrich	9048-46-8
Glutaraldehido	C ₅ H ₈ O ₂	Sigma-Aldrich	111-30-8

Por último el material de vidrio utilizado se resume a: vasos de precipitados (10 ml, 20 ml, 30 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml y 2000 ml) y matraces volumétricos (25 ml, 50 ml, 100 ml y 2000 ml) de clase A de la marca Pyrex. Cajas Petri de 90 mm de diámetro, matraces Erlenmeyer de clase B (250 ml y 500 ml), y tubos de ensayo de 10 ml, de la marca Kimax.

3.2 Activación del electrodo serigrafiado

Para la activación de las superficies de los AuSPEs, estos fueron sumergidos en una solución de hidróxido de potasio (KOH) a 50 mM, preparada en 5 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30%. Los electrodos permanecieron sumergidos durante 10 minutos y posteriormente fueron enjuagados con agua mili-Q [103].

3.3 Electrodeposición de NpAu

Se prepararon 250 ml de una solución de HAuCl₄ a 1 mM, usando como disolvente una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 0.5 M, esta solución debe permanecer en

agitación hasta obtener una coloración amarillenta y homogénea como se muestra en la Fig. 23. Posteriormente los AuSPEs fueron sumergidos en posición vertical lo suficiente como para cubrir el electrodo de trabajo, cuidando que el conector del potenciostato no haga nunca contacto con la solución tal como se muestra en la Fig. 24. Una vez sumergidos se realiza una voltamperometría cíclica de 2 ciclos sucesivos a una velocidad de 20 mV/s en una ventana de -0.5 V - 1 V. Finalmente los AuSPEs fueron retirados de la solución electrolítica y limpiados cuidadosamente con etanol y agua mili-Q [65].

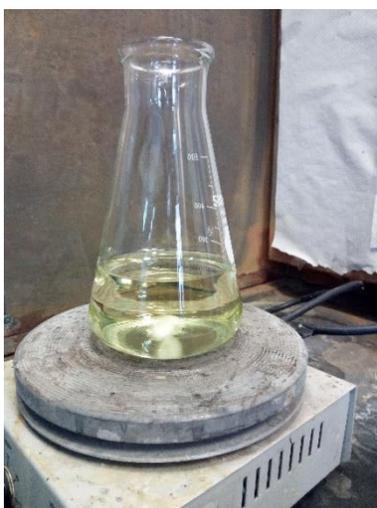


Fig. 23. Solución de $\text{HAuCl}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$ con agitación magnética.



Fig. 24. Electrodeposito de NpAu sobre la superficie del electrodo de trabajo del AuSPE.

Para saber de primera instancia que la electrodeposición se llevó a cabo, la superficie del electrodo de trabajo debe observarse opaca, incluso después de enjuagarlo con etanol y agua mili-Q, tal y como se observa en la Fig. 25.



Fig. 25. Comparativa entre un AuSPE con NpAu electrodepositadas en su electrodo de trabajo (izquierda) y un AuSPE sin tratamiento (derecha).

El diagrama a bloques correspondiente a este proceso experimental se presenta en la Fig. 26.

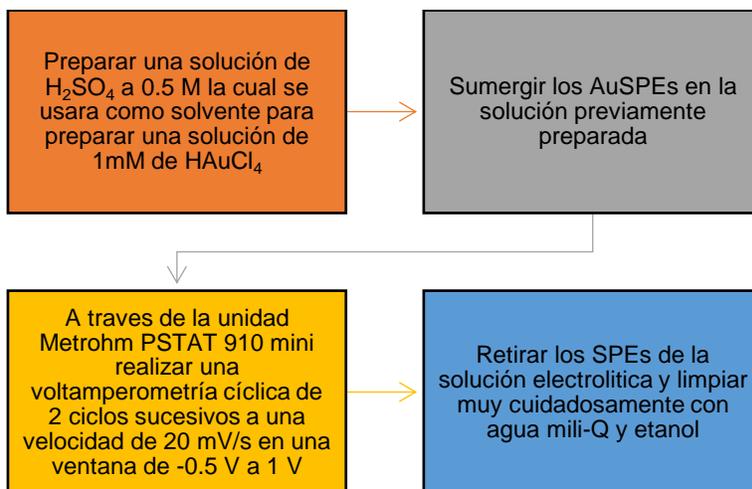


Fig. 26. Protocolo de síntesis y electrodeposición de NpAu a base de HAuCl_4 sobre la superficie de los electrodos de trabajo de los AuSPEs.

La solución coloidal no utilizada puede almacenarse en refrigeración a una temperatura de 4°C libre de humedad.

3.4 Fabricación de SAMs de CYS

Para la inmovilización de la enzima se propone realizar la formación de SAMs sobre la superficie del electrodo de trabajo, esto debido a que las superficies de oro, si bien muestran una gran tendencia a mejorar la fijación de elementos biológicos de naturaleza proteica, también son propensas a la desnaturalización de los mismos. La importancia de las SAM en un proceso de inmovilización sobre una superficie conductora consiste en evitar la formación de multicapas de moléculas organizadas inmovilizadas, conducir en cierta medida la orientación durante la fijación para dejar libres los sitios activos de unión con el sustrato, minimizar el impedimento estérico entre las moléculas y aumentar la prevención de la desnaturalización de proteínas y de las interacciones inespecíficas.

Para las síntesis de las SAMs, se prepara una solución de CYS a 20 mM usando como disolvente una mezcla de etanol:agua con una relación de 9:1, los AuSPEs serán cubiertos con esta solución durante 24 horas. Posteriormente los electrodos deben ser enjuagados con una solución de etanol:agua al 9:1 para eliminar las moléculas de CYS no adheridas [104].

En términos óptimos, se sugiere que únicamente el electrodo de trabajo sea cubierto por la solución. Sin embargo, debido a que es complicado conservar un volumen pequeño de CYS en dicho electrodo durante tanto tiempo, es posible sumergir el AuSPE como se muestra en la Fig. 27. Si se desea, los electrodos de referencia y auxiliar pueden ser protegidos con parafilm. Aunque, es importante recordar que debido a que se trata de un material impreso se corre el riesgo de que al momento de retirarlo del AuSPE, se desprendan los electrodos de la base cerámica. Por otro lado, sumergirlo sin protección no conlleva un problema, ya que debido a la alta electronegatividad de las cabezas azufradas de la CYS, estas tenderán a formar las SAM en el material con mayores propiedades conductivas, lo cual puede comprobarse al momento de retirar los AuSPEs de la solución de CYS, ya que al momento de enjuagarlos con etanol, la CYS no unida se desprenderá en forma de cristal, y se

observara que esta cristalización se presentara en toda el área que permaneció sumergida a excepción del electrodo de trabajo.



Fig. 27. AuSPEs sumergidos en una solución de CYS a 20 mM preparada en etanol:agua al 9:1.

En la Fig. 28 se presenta el diagrama a bloques del proceso experimental resumido desde la activación de las superficies de los electrodos de trabajo hasta la formación de la SAMs.

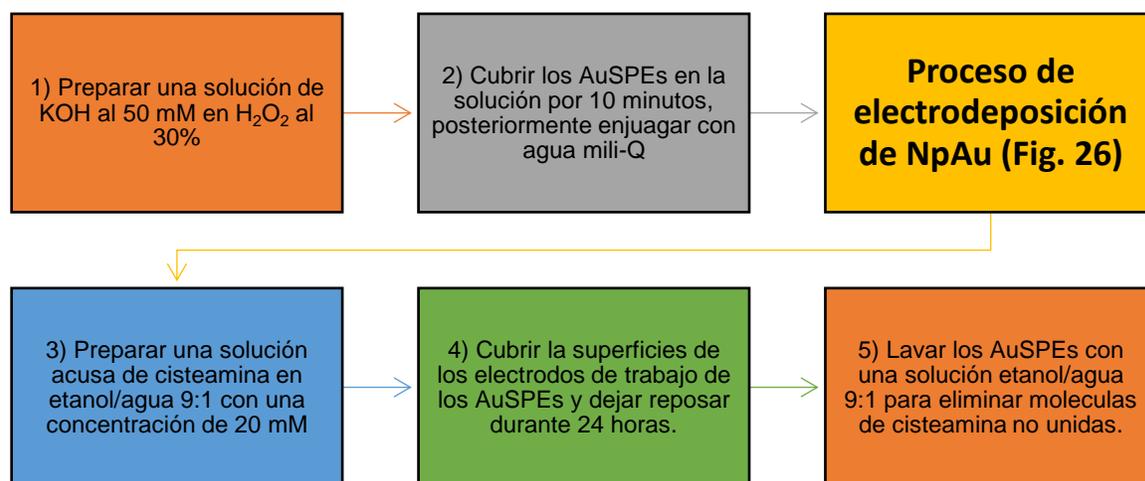


Fig. 28. Protocolo experimental desde la activación de los electrodos de trabajo de los AuSPEs, hasta la formación de SAM a base de CYS en su superficie.

Si los AuSPEs modificados no van a ser usados de manera inmediata, pueden ser almacenados en refrigeración a 4°C libres de humedad.

3.5 Inmovilización por absorción física

Se preparara en un tubo Eppendorf para microcentrifuga una alícuota enzimática con 200 μ L de buffer PBS, en donde se disolvieron 7 mg de Uox (2 U/mg), junto con 2 mg de albumina de suero bovino (BSA), la cual tiene como objetivo llevar a cabo el bloqueo de los sitios de unión no reaccionantes de la superficie de trabajo [105]. Esta alícuota es útil tanto para realizar inmovilización por adsorción como por enlace covalente.

Para el caso de la inmovilización por adsorción se tomaran 20 μ L de la alícuota enzimática y se depositaran sobre del electrodo de trabajo de los AuSPEs cuidando que este sea cubierto en su totalidad sin tocar los electrodos de referencia y auxiliar tal y como se muestra en la Fig. 29. Los electrodos se dejaron reposar a temperatura ambiente por aproximadamente una hora o hasta que la solución colocada se evapore. Posteriormente los electrodos seran enjuagados con buffer PBS y agua mili-Q.



Fig. 29. AuSPEs con solución de la enzima Uox en sus electrodos de trabajo.

3.6 Inmovilización por enlace covalente

Para realizar esta inmovilización, antes de depositar la solución enzimática descrita en la sección anterior, los electrodos de trabajo de los AuSPEs fueron cubiertos durante 1 hora con una solución de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) al 20 mM y NHS (sulfo-N-hidroxisuccinimida) a 100 mM preparada en agua mili-Q

[104]. Dichas soluciones activan los grupos carboxilos de la enzima convirtiéndolos a grupos amina tal como se ilustra en la Fig. 30, lo cual favorece la unión de la Uox con las moléculas de CYS que conforman a las SAM sintetizadas sobre la superficie del electrodo de trabajo.

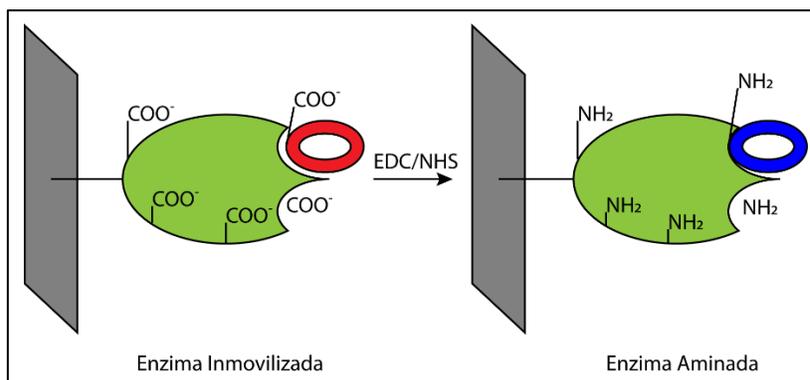


Fig. 30. Activación de los grupos carboxilo de la enzima inmovilizada por acción de la reacción de EDC y sulfo-NHS.

Una vez que los AuSPEs son tratados con EDC y sulfo NHS, se deben enjuagar con agua mili-Q. Para la inmovilización se depositaron 20 μL de la alícuota o solución enzimática de igual forma como se indico en la sección 3.5, dejando reposar hasta que la solución se evapore, enjugando nuevamente con agua mili-Q.

3.7 Inmovilización por entrecruzamiento

Para llevar a cabo la inmovilización por entrecruzamiento, a la alícuota enzimática descrita en la sección 3.5 se le agregó 1 μL de glutaraldehído al 8% [105]. El procedimiento experimental es el mismo al descrito en la sección 3.6 llevando a cabo la activación por EDC y sulfo-NHS, depositando 20 μL de la alícuota (ahora con glutaraldehído) sobre los electrodos de trabajo, dejándolos reposar hasta que la solución se evapore, para finalmente enjuagarlos con agua mili-Q

En la Fig. 31 se presenta de manera generalizada el protocolo experimental para llevar a cabo la inmovilización de la Uox sobre la superficie de trabajo de los AuSPEs.

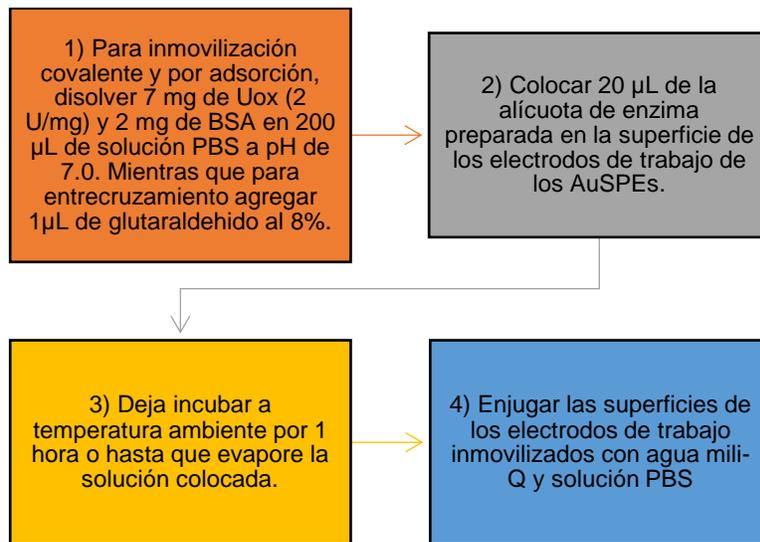


Fig. 31. Proceso de inmovilización de la enzima Uox sobre las superficies de trabajo de los AuSPEs.

Para la conservación de los electrodos, se deben mantener sumergidos en buffer PBS esteril a una temperatura 4°C. Si existe sobrante o se desea conservar la alícuota enzimática para experimentos futuros se recomienda conservarla sellada a una temperatura de 4°C tal y como se muestra en la Fig. 32.



Fig. 32. Tubos Eppendorf con alícuotas enzimáticas de Uox sellados con parafilm. Con una tonalidad amarillenta se identifica la alícuota de Uox con glutaraldehído.

3.8 Caracterización de las etapas de modificación por SEM, FTIR y EDS

Para verificar el estado de la superficie de los electrodos de trabajo, así como la formación adecuada de NpAu, se realizarán pruebas de microscopia electrónica de barrido, en las cuales se obtendrán imágenes en donde puedan observarse las superficies de trabajo sin ninguna modificación, y posteriormente a las NpAu electrodepositadas sobre ellas. Esto con el objetivo de observar el relieve del electrodo de trabajo y el poder evaluar cómo puede afectar a lo largo de las modificaciones a realizar, mientras que, para el caso de las NpAu, se buscara obtener imágenes en donde se logren apreciar la forma de las mismas, así como el poder comprobar que presentan tamaños nanométricos.

Para verificar la formación de las SAM y la fijación correcta de las moléculas de CYS en la superficie de trabajo, se llevará a cabo una FTIR y un ensayo EDS. En los cuales deben observarse los picos de señal característicos de los enlaces C-N, N-H y -SH de la CYS, debido a la vibración que estos presentan. De igual forma deberán observarse indicadores de que las moléculas de CYS están siendo correctamente adsorbidas por la superficie, formando las SAM.

3.9 Caracterización electroquímica

Para evaluar el estado y aporte electroquímico de cada una de las etapas de modificación de la superficie de trabajo descritas en la Fig. 20, se llevarán a cabo voltamperometrías cíclicas en ferricianuro de potasio/cloruro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]/KCl$) con una concentración de 5 mM/100 mM respectivamente, a una velocidad de 100 mV/s en un intervalo de -0.4 V – 0.6 V, colocando los AuSPEs dentro de la solución como se muestra en la Fig. 33. De las señales resultantes se evaluarán 3 aspectos principales: La corriente máxima de oxidación del $K_3[Fe(CN)_6]/KCl$, el voltaje a esa corriente máxima y la diferencia de potencial existente entre la región de oxidación y reducción presente en la solución electrolítica.



Fig. 33. AuSPE sumergido en solución de $K_3[Fe(CN)_6]/KCl$ para evaluación electroquímica de la superficie de trabajo.

3.10 Detección de ácido úrico

Las pruebas de detección de AU se realizaron en soluciones acuosas con un volumen de 50 ml a diferente concentración. Dichas soluciones se prepararon el mismo día en el que se realizaron las pruebas para mantener su calidad lo mejor posible. Las concentraciones de AU a manejar son 5 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM y 1 mM, todas ellas preparadas en solución buffer PBS a un pH de 7.4. Este valor se eligió con el objetivo de emular el pH de los fluidos corporales que ronda entre 7.35 y 7.45. También se realizaron pruebas en soluciones a un valor de pH 6.0, esto con la finalidad de observar los efectos del pH en las respuestas de los sensores.

Un aspecto importante a considerar es que para que el AU sea disuelto por completo en el buffer PBS, se debe ajustar el pH de la solución. A pH ácido además de que el AU es muy difícil de disolver, también se corre el riesgo de que pueda cristalizar. Para el caso de las soluciones a pH 6.0, se recomienda elevar el pH lo suficiente para que el ácido pueda disolverse obteniendo una solución transparente libre de cristales como las que se muestran en la Fig. 34. Una vez disuelto es posible bajar el pH a 6.0 teniendo mucho cuidado de no hacerlo demasiado rápido por el riesgo mencionado de la eventual formación de cristales.



Fig. 34. Matracas volumétricos con soluciones a diferente concentración de ácido úrico disuelto por completo en buffer PBS.

Dichas pruebas consistieron en realizar procedimientos de voltamperometría cíclica en las soluciones, a una velocidad de 100 mV/s, en un intervalo de medición de -0.3 V – 0.8 V. Dentro de este intervalo se debe obtener el pico de corriente de oxidación de AU a un voltaje específico, cabe recalcar que el nivel de corriente se esperaba que fuera proporcional a la concentración medida. De igual forma, se realizó una medición de referencia con una solución únicamente de buffer PBS, a un pH de 7.4 y pH 6.0

Para las mediciones electroquímicas descritas anteriormente, se utilizaron los AuSPEs en cada una de las etapas de modificación realizadas. Es importante mencionar que antes y después de cada medición, los electrodos fueron enjuagados con una solución de PBS y agua mili-Q.

Al analizar de una en una las diferentes etapas de modificación, es posible observar el aporte que da cada proceso a mejorar la respuesta del sensor en presencia del AU, y evaluar la importancia no solo del protocolo realizado sino también de la especie química utilizada durante el proceso.

3.11 Prueba de selectividad

Para determinar la selectividad de la superficie modificada de los AuSPEs cuando está ya cuenta con las SAMs y la Uox inmovilizada, se preparó una solución de ácido ascórbico a 1 mM con la cual se llevaron a cabo pruebas de sensado. Las señales de respuesta resultantes fueron comparadas con las obtenidas al utilizar una solución de AU a 1 mM, esto para determinar el nivel de selectividad alcanzado del biosensor implementado, observando su comportamiento cuando la muestra analizada posee moléculas de compuestos no afines a la enzima, lo cual impide que sean catalizados.

Capítulo 4. Resultados

4.1 Estado de la superficie del electrodo de trabajo.

Uno de los aspectos más importantes a considerar cuando se utiliza una superficie de trabajo como los AuSPEs es su estado físico, así como la homogeneidad y relieve que puede presentar a escala microscópica. Si la superficie no es homogénea y presenta irregularidad en su forma, las modificaciones a base de estructuras formadas sobre ella presentaran resultados no deseados como impedimentos espaciales y/o baja estabilidad.

Para conocer la topografía de los electrodos de trabajo, se llevó a cabo una SEM en donde se obtuvieron imágenes de la superficie conductora, en las cuales fue posible observar su relieve.

En la Fig. 35(a) con un aumento de x50 se puede apreciar en negro elementos que están adheridos a la superficie, los cuales se catalogan como contaminantes. Mientras que en la Fig. 35(b) se tiene la misma vista, pero ahora con un aumento de x5000, en donde es posible observar con detalle el relieve de la superficie, la cual presenta irregularidades y se confirma que no es del todo constante u homogénea.

Se debe mencionar que los electrodos de trabajo de los AuSPEs no son por completo de oro, la base consiste en cerámica, sobre la cual se encuentran “impresos” el electrodo de trabajo, auxiliar y de referencia. Por lo que en el caso del electrodo de trabajo es importante conocer el grosor real de la superficie conductora. El tener una superficie muy delgada conlleva, además de su alta fragilidad, a dificultar la unión o inmovilización de los elementos biológicos de reconocimiento, así como dificultar la formación de las estructuras previas a dicha inmovilización, la conductividad de la superficie no es lo suficientemente buena para que reaccione con las moléculas polares de la CYS, por lo que la unión no será fuerte y estable, teniendo el riesgo de que al momento de incidir una carga es posible de que exista un desprendimiento de

las estructuras formadas. Por el contrario, una superficie demasiado gruesa también puede provocar problemas, como una mayor inducción del ruido ambiental por la desproporcionalidad de los materiales, e inclusive temas de simple manipulación, ya que al trabajar con un conductor demasiado grande se dificulta el tema de miniaturización del sistema y limita su uso a escalas no muy pequeñas.

En términos óptimos, el grosor de la superficie conductora en la cual se busca realizar la inmovilización exitosa de elementos biológicos de reconocimiento de carácter proteico se recomienda de entre 300 nm - 350 nm. Este grosor es independiente a procesos de depósito de nanopartículas metálicas para mejorar en cierta medida la conductividad de la superficie como lo son las NpAu.

Se realizó un corte transversal a los AuSPEs para poder observar la base de cerámica en proporción con la superficie del material conductor. En la Fig. 35(c) se puede observar que la parte de cerámica es una estructura porosa. Con un aumento de $\times 10000$ (Fig. 35(d)) es fácilmente apreciable que la capa de material conductor no es completamente regular. Sin embargo, a pesar de que presenta una topografía con este tipo de relieve, el grosor de dicha capa tiende a mantenerse constante, tomando la forma del soporte de cerámica.

Con base en las imágenes obtenidas a través de la SEM, se realizó la medición de la capa conductora a través del corte analizado, teniendo en promedio un grosor aproximado de 337.75 nm, por lo cual se consideró que el AuSPE es un soporte adecuado para esta aplicación.

Por último, se procedió a analizar la superficie de trabajo después de haber realizado la electrodeposición de NpAu. Las pruebas electroquímicas no dan información sobre su forma y tamaño, por lo que, para observar la forma de estas, así como su distribución sobre el material conductor, se llevaron a cabo de igual forma análisis SEM. En la Fig. 35(e) se observa con un aumento de $\times 10000$ que las NpAu sintetizadas, se distribuyen por toda la capa conductora confirmando de manera

concluyente su presencia. Por otra parte, en la Fig. 35(f) con un aumento de x75000 se aprecia no solo la forma de las nanopartículas, sino que además se confirma que presentan tamaños nanométricos, los cuales rondan en un diámetro promedio de 21.78 nm.

La presencia de NpAu es de suma importancia, debido a las propiedades que otorgan a la superficie de trabajo, entre las que destacan una mayor resistencia a la corrosión, la cual puede presentarse debido a las reacciones de oxidación que se llevan a cabo en las soluciones electrolíticas utilizadas, el aumento en la conductividad que permite una mayor interacción con moléculas polares como lo son las de CYS lo cual facilita la formación de SAM. Además, las NpAu también permiten que existan interacciones a nivel molecular, volviendo a la superficie altamente sensible. Aunado a lo anterior, se considera que el electrodo de trabajo se encuentra acondicionado físicamente lo necesario para realizar las modificaciones químicas correspondientes a los objetivos planteados.

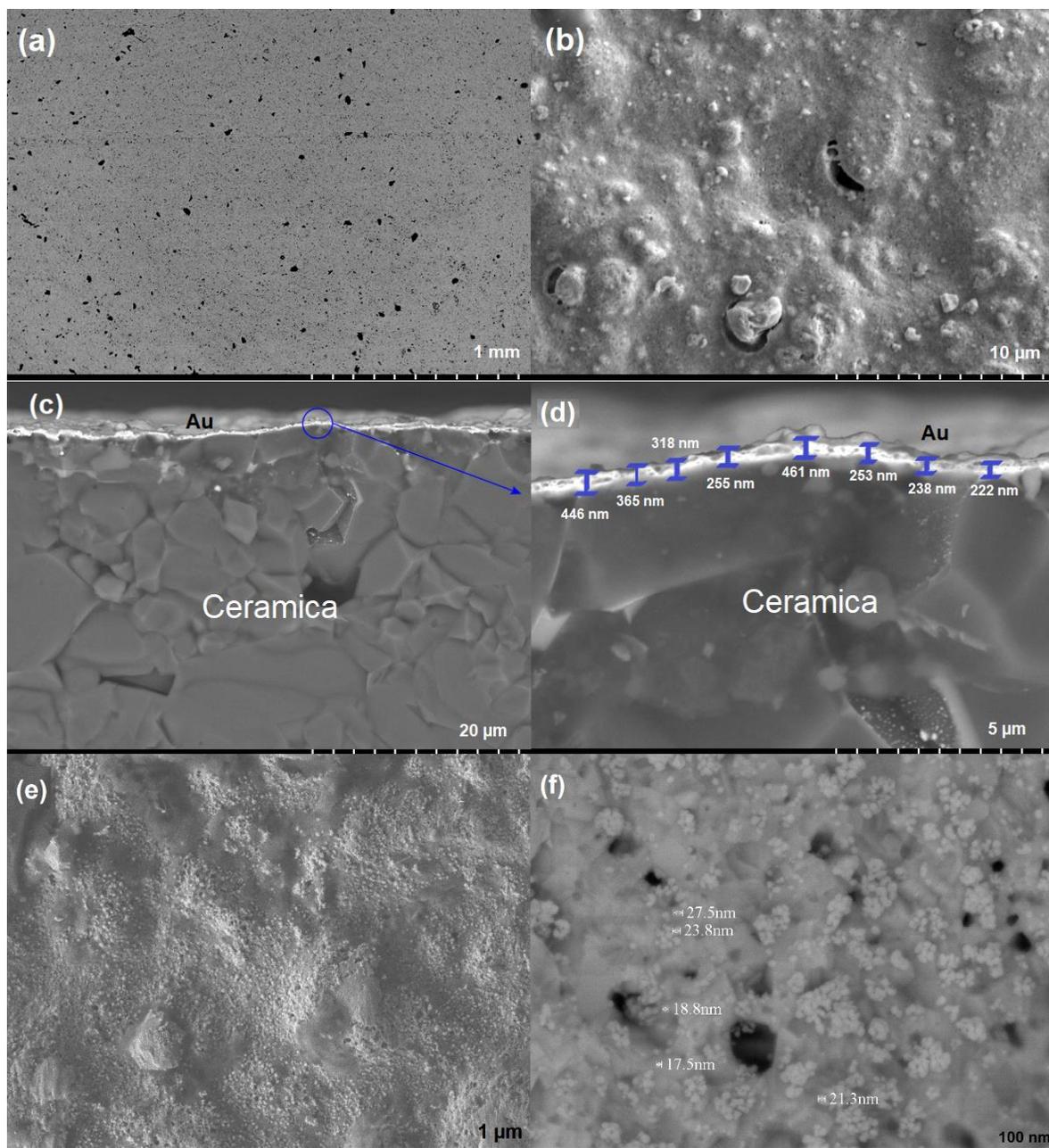


Fig. 35. Microscopía electrónica de barrido de la superficie de los electrodos de trabajo de los AuSPEs. (a) Vista superior del electrodo de trabajo con un aumento de x50. (b) Vista superior del electrodo de trabajo con un aumento de x5000 (c) Imagen del corte transversal con un aumento de x2500. (d) Imagen del corte transversal con un aumento de x10000. (e) Vista superior de la superficie de trabajo dopada con NpAu a partir de H₂AuCl₄, con un aumento de x10000. (f) Vista superior con un aumento de x75000, se incluyen cotas señalando el tamaño de la NpAu sintetizadas.

4.2 Caracterización de SAM con FTIR y EDS.

Para la caracterización física de las SAM, se realizó una prueba de FTIR con el objetivo de comprobar la presencia de los principales enlaces químicos que conforman la estructura de las moléculas de CYS.

En la Fig. 36 se presenta el espectro IR resultante, al medir una superficie dopada con NpAu sobre las cuales se formaron SAMs. Lo primero que se observa es una caída de absorbancia, que se debe a una disminución en la frecuencia de resonancia presente en la superficie por, la adsorción de la monocapa formada [106]. Dentro de la señal del espectro se observa un pico en el *wavenumber* 1036, el cual indica la presencia del enlace C-N que une al grupo -NH₂ a la cadena alquílica, mientras que en 1600 se presenta una pequeña respuesta en absorbancia producto de la presencia de NpAu en la superficie. Mas adelante en 2338 se puede observar el pico de respuesta en absorbancia más grande obtenido en el espectro IR, el cual corresponde al modo de flexión antisimétrica que presenta el grupo metileno, correspondiente al enlace C-H. Finalmente la respuesta detectada en 3728 es atribuida a la flexión presentada por el enlace N-H, que conforma a los grupos -NH₂ en el extremo no unido a la superficie de oro de la CYS.

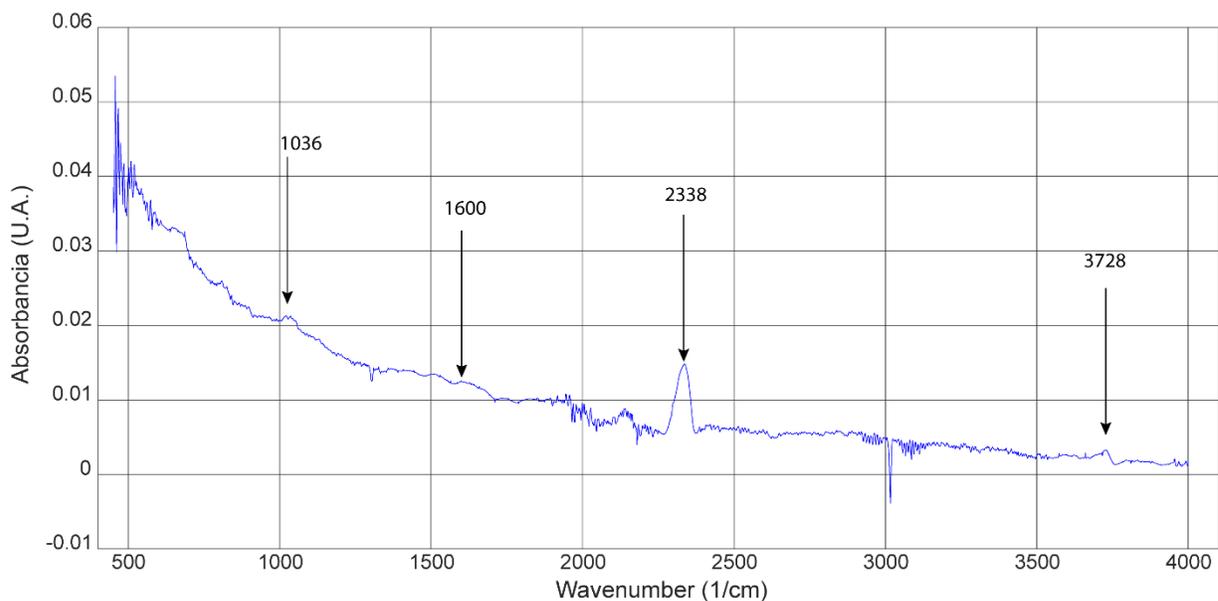


Fig. 36. Espectro FTIR correspondiente a la superficie Au/KOH/NpAu/SAM.

Si bien es cierto, que los resultados presentados en la Fig. 36 son de baja intensidad, se debe mencionar que, por las propiedades de la superficie así como de las propias moléculas de CYS este tipo de intensidades es característico. Un espectro similar al obtenido en este trabajo, fue reportado por Wang y colaboradores [107], en donde se utilizan SAM a base de CYS para la modificación de una superficie de oro para la implementación de un biosensor proteico. En dicho trabajo, se realiza la caracterización de las SAM por FTIR y se obtiene un espectro de muy baja intensidad en donde es apenas apreciable la presencia de los grupos -NH_2 .

Por otra parte, se realizó un análisis de EDS, para el cual la superficie de trabajo fue dividida en 3 secciones de área tal y como se presenta en la Fig. 37. Esto con la finalidad de estudiar áreas específicas de la superficie, ya que debido a su irregularidad es muy probable encontrar puntos con mayores proporciones de compuestos formados en ellas. Siendo así el área de sección 2 precisamente en la zona detectada como “spot 1” o “mancha 1”, la que otorgo una mayor identificación de enlaces presentes.

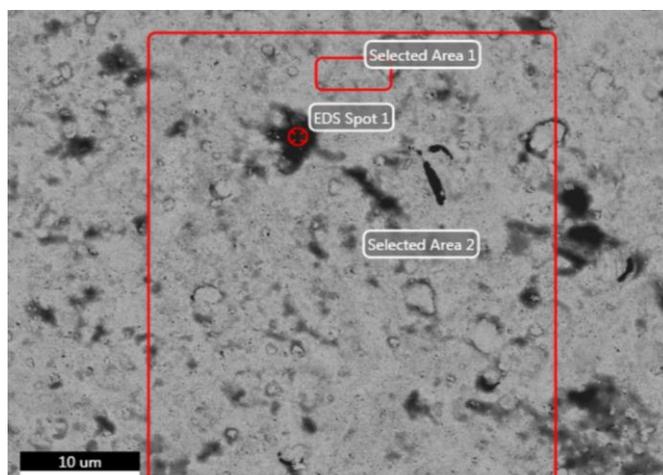


Fig. 37. Área de análisis de EDS de la superficie de trabajo dopada con NpAu y tratada con una solución de CYS para la formación de SAM con un aumento de x2000.

El espectro resultante se presenta en la Fig. 38, donde se puede observar que predomina la presencia del enlace metálico correspondiente a la superficie de oro del electrodo de trabajo, junto a esta banda se puede observar la presencia de sulfuro (S) que corresponde a las cabezas azufradas de las moléculas de CYS que forman un enlace con la superficie de trabajo para construir las SAM. Por otra parte, se identifican los elementos C y N pertenecientes a la cadena alquílica de las moléculas de CYS y a los grupos amino unidos a sus extremos libres, de igual forma es posible identificar la presencia de sodio, magnesio, cloro, aluminio y silicio los cuales pueden ser residuos o contaminantes de la superficie. Sin embargo, para el caso del cloro, puede deberse a la reducción del HAuCl_4 para la formación de las NpAu, así como de las propias moléculas de CYS ya que estas se encuentran en forma de diclorhidrato. Por último, la presencia de oxígeno se puede deber a los grupos OH que participan en cada etapa de modificación, desde el pre-tratamiento con KOH, hasta la formación de SAM debido al uso de una solución alcohólica en la cual se encuentran disueltas las moléculas CYS.

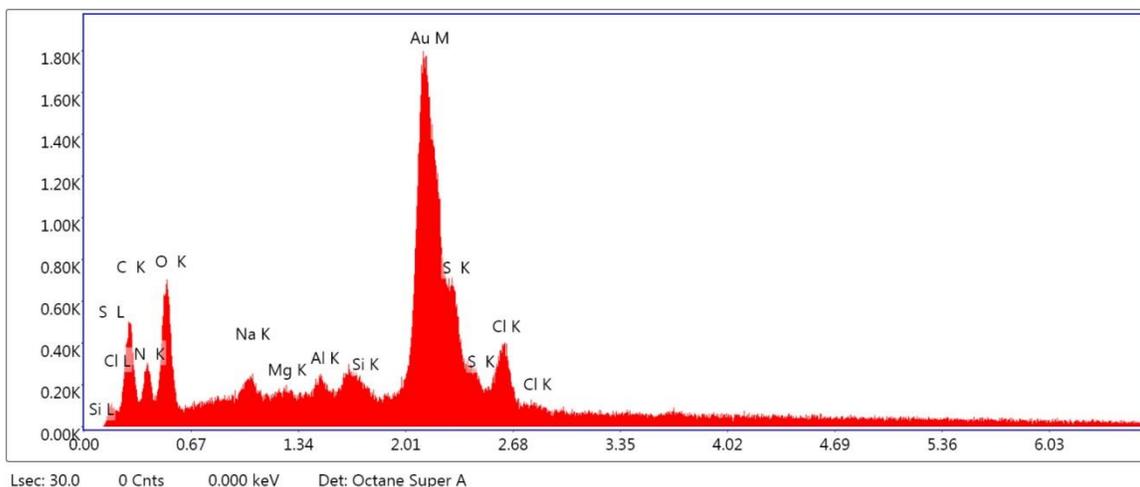


Fig. 38. Espectro EDS correspondiente al spot 1 del área de sección 2 de la superficie del electrodo de trabajo dopada con NpAu y tratada con una solución de CYS para la formación de SAM.

Con base en los resultados obtenidos se tienen evidencias físicas que comprueban la formación de SAM sobre el electrodo de trabajo de los AuSPEs, resaltando la presencia de los enlaces característicos de las cadenas de CYS y los generados por la unión existente entre estas y la superficie metálica.

4.3 Caracterización electroquímica

Se realizaron voltamperometrías cíclicas en una solución de $K_3[Fe(CN)_6]/KCl$ para cada una de las etapas de modificación señaladas en la Fig. 20, en donde también se indica que el proceso experimental fue dividido en dos vertientes.

Para la primera vertiente, las modificaciones fueron desde la superficie limpia de oro hasta la inmovilización por adsorción y enlace covalente de la Uox, sin utilizar NpAu.

Las condiciones de temperatura y humedad registradas con los cuales se llevaron a cabo todos los procesos de inmovilización se muestran en Tabla 6.

Tabla 6. Temperatura y humedad registrada para cada proceso de inmovilización

Proceso de Inmovilización	Temperatura	% Humedad
Adsorción / sin NpAu	16 °C	84%
Unión covalente / sin NpAu	18 °C	89%
Unión covalente	15 °C	77%
Entrecruzamiento	13 °C	69%

En la Fig. 39 se presentan los voltamperogramas resultantes desde la superficie de trabajo limpia hasta la inmovilización por enlace covalente de la Uox. Aquí se observa el comportamiento reversible de la reacción redox presente en la solución electrolítica cuando un potencial es suministrado, identificando una región de reducción (Rx) por un valor de respuesta en corriente negativo, mientras que para la región de oxidación (Ox) se obtiene una respuesta de corriente positiva. La diferencia de potencial entre el punto máximo de corriente de ambas etapas representa la reversibilidad de la reacción redox, a medida que esta diferencia de potencial disminuya y a su vez la corriente máxima de Ox aumente, el desempeño electroquímico de la superficie de trabajo mejora.

Cuando se tiene únicamente la superficie de oro limpia, la respuesta obtenida en corriente Ox fue muy baja, debido a que no existe una activación de la superficie, además de la presencia de agentes contaminantes que pudieron haberse adherido durante su manipulación. Una vez que la superficie es tratada con KOH y H₂O₂, tanto la respuesta en corriente como la reversibilidad de la reacción mejoran debido a la activación del material conductor, así como por la remoción de agentes contaminantes que no pueden ser eliminados con facilidad. La adición de moléculas de CYS para la construcción de SAM no solo mejora la respuesta reversible de la reacción, sino que además se presenta un considerable aumento en la corriente Ox debido a la carga que aportan dichas moléculas [58,79,80]. Por último, cuando la Uox es inmovilizada no es apreciable una mejora en el estado electroquímico de la superficie, lo cual es atribuido a la poca carga presente en las moléculas proteicas que conforman a la enzima.

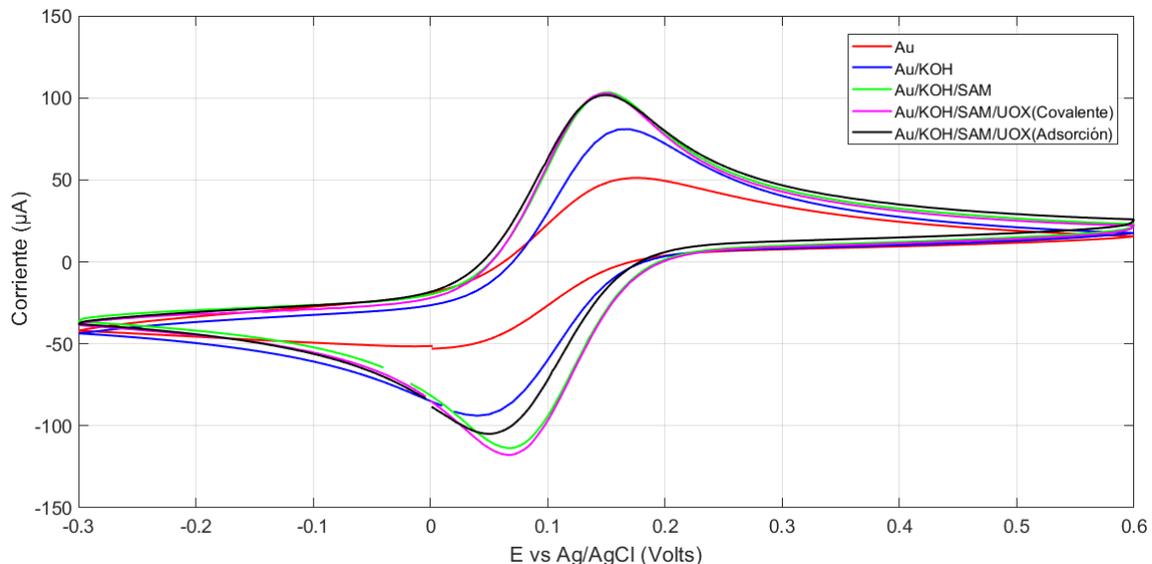


Fig. 39. Estado electroquímico de la superficie del electrodo de trabajo modificado, sin el uso de NpAu.

En tabla 7, se presentan los valores máximos de corriente Ox obtenidos, así como los voltajes a los cuales se presentaron dichas corrientes, y las diferencias de potencial medidas entre las respuestas redox (ΔV). El valor de ΔV es importante en esta prueba, ya que a menor separación de los picos de oxidación y reducción la transferencia electrónica es más rápida y por consiguiente, el desempeño general del sensor es mejor. Como se puede observar, la corriente Ox promedio tiende a aumentar desde la superficie limpia, hasta la formación de las SAM, de igual forma se puede observar como la ΔV disminuye paulatinamente conforme se avanza en la modificación. Sin embargo, cuando se realiza la inmovilización de la Uox se observa que la respuesta en corriente disminuye. Este efecto puede deberse a un aumento contraproducente en la resistencia del electrodo de trabajo por acción de la inmovilización, lo cual no afecta el estado electroquímico de la superficie de manera significativa ya que la tendencia en la que la ΔV disminuye se mantiene.

La superficie con la enzima inmovilizada por enlace covalente presenta el mejor estado electroquímico, debido a la mayor fuerza de unión y estabilidad de los enlaces generados entre la superficie y la Uox, con respecto a los que puede dar una inmovilización por adsorción, en donde dicha unión no se favorece en ningún momento aun con la presencia de las SAM. Sin embargo, si bien las SAM no ayudan a la fijación

ni a la orientación en una inmovilización por adsorción, si protege a las enzimas de los efectos conductivos de la superficie de trabajo que podrían inducir la desnaturalización de la biomolécula.

Tabla 7. Resultados de la caracterización electroquímica de cada una de las etapas de modificación de las superficies de trabajo. (n=6)

Estado de la superficie de trabajo	Corriente Ox (μA)	Voltaje Ox (V)	ΔV
Au	43.2536 \pm 10.8665	0.1861 \pm 0.0200	0.1844 \pm 0.00282
Au/KOH	79.7000 \pm 4.4248	0.1716 \pm 0.0066	0.1366 \pm 0.00238
Au/KOH/SAM	103.4985 \pm 2.2861	0.1523 \pm 0.0034	0.1126 \pm 0.00078
Au/KOH/SAM/Uox (Adsorción)	101.6000 \pm 2.9561	0.1490 \pm 0.0035	0.0980 \pm 0.00240
Au/KOH/SAM/Uox (Covalente)	102.7000 \pm 3.5531	0.1500 \pm 0.0005	0.0820 \pm 0.00199

La segunda vertiente de experimentación consistió en incluir la electrodeposición de las NpAu en la modificación de las superficies, así como la inmovilización por entrecruzamiento con glutaraldehído.

En los voltamperogramas presentados en la Fig. 40, se puede observar que existe un aumento tanto en la reversibilidad de la reacción como en la respuesta en corriente Ox cuando la superficie es dopada con NpAu, dicha tendencia se mantiene de manera paulatina conforme se avanza en la modificación. Esto se debe a una mejora en las características conductivas de la superficie de trabajo por parte de las nanopartículas electrodepositadas. Para el caso del proceso de inmovilización de la Uox, la fijación por entrecruzamiento presenta un mejor estado electroquímico con respecto al dado por enlace covalente, debido a la mayor estabilidad dada por los enlaces que conforman la estructura de co-reticulado en donde la inmovilización se realiza de manera grupal, además de tener una mayor fuerza de unión con la superficie. Por lo que se puede decir que una inmovilización por entrecruzamiento otorga mejores características electroquímicas a la superficie modificada en comparación a las que pueden ser dadas llevando a cabo una inmovilización por enlace covalente.

Por último, se puede detectar un pequeño pico de corriente Rx presente entre -0.3 V y -0.2 V, el cual es atribuido a un efecto causado por las NpAu y las moléculas de CYS que forman a las SAM, las cuales en conjunto reaccionan de manera particular con la solución electrolítica. Por lo cual este pequeño proceso de reducción presente en la solución confirma nuevamente su presencia.

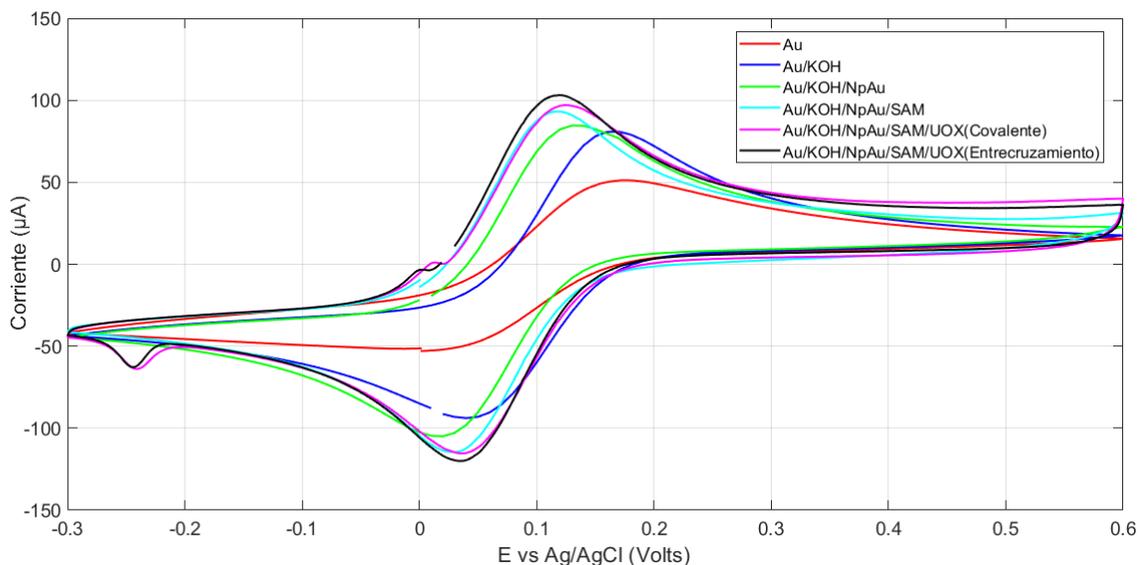


Fig. 40. Estado electroquímico de la superficie del electrodo de trabajo modificado, incluyendo el uso de NpAu.

A continuación, en Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos referentes a las etapas de modificación realizadas con el electrodeposito de NpAu. Se puede apreciar como el valor promedio de la corriente Ox aumenta conforme se modifica la superficie, así como una disminución en la ΔV . La repetibilidad de la corriente Ox se ve afectada ya que la inmovilización no se está realizando de una manera muy uniforme en la superficie, debido a la topografía que esta presenta. De igual forma, se muestra que existe una mejora en el potencial de oxidación con respecto al caso en donde no se utilizan NpAu durante las modificaciones, ya que durante dicha experimentación el potencial promedio se encontraba entre 0.1490 V – 0.1861 V (véase Tabla 7), mientras que para cuando se utilizan NpAu, este rango disminuye para encontrarse entre 0.1015 V – 0.1333 V. Con base en lo anterior, se resalta la importancia de la presencia de las NpAu para la optimización del proceso electroquímico, así como las propiedades

conductivas que otorgan, volviendo a la superficie de trabajo más sensible, permitiendo así una mayor interacción con las moléculas polares presentes en el medio.

Tabla 8. Resultados de la caracterización electroquímica de cada una de las etapas de modificación de las superficies de trabajo incluyendo la electrodeposición de NpAu. (n=3).

Estado de la superficie de trabajo	Corriente Ox (μA)	Voltaje Ox (V)	ΔV
Au/KOH/NpAu	83.9967 ± 0.5202	0.1333 ± 0.0033	0.1133 ± 0.00470
Au/KOH/NpAu/SAM	93.8700 ± 0.9435	0.1160 ± 0.0056	0.0940 ± 0.00928
Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (Covalente)	94.4950 ± 5.3442	0.1250 ± 0.0152	0.0860 ± 0.00210
Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (Entrecruzamiento)	98.7500 ± 3.0052	0.1015 ± 0.0305	0.0855 ± 0.00431

4.3.1 Prueba de longevidad de las SAMs

Uno de los aspectos importantes a considerar cuando se desea ensamblar un complejo químico-biológico es la viabilidad del mismo. En el caso de las enzimas, una vez que estas son inmovilizadas lo recomendable es utilizarlas de forma inmediata ya que su actividad comienza a caer rápidamente. Por otro lado, en el caso de las SAM a base de CYS este efecto no sucede tan rápido, ya que su degradación tiende a ser más lenta si se conservan adecuadamente, pudiéndolas utilizar en experimentaciones futuras.

Para esta prueba se formaron SAM sobre las superficies de electrodos de trabajo y se almacenaron por más de tres meses libres de humedad a una temperatura de 4°C. Se llevaron a cabo voltamperometrías cíclicas en solución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{KCl}$ tanto con las SAM recién formadas como una vez pasado este tiempo. Las señales resultantes se presentan en la Fig. 41, donde se puede observar, que existe una disminución de la respuesta en corriente Ox cuando las SAM tienen más de tres meses de edad, al igual que se observan cambios en el voltaje, ambos efectos son atribuidos a la degradación natural de las moléculas de CYS. Sin embargo, la reversibilidad de la reacción permanece prácticamente íntegra, indicando una notable conservación del estado electroquímico de la superficie.

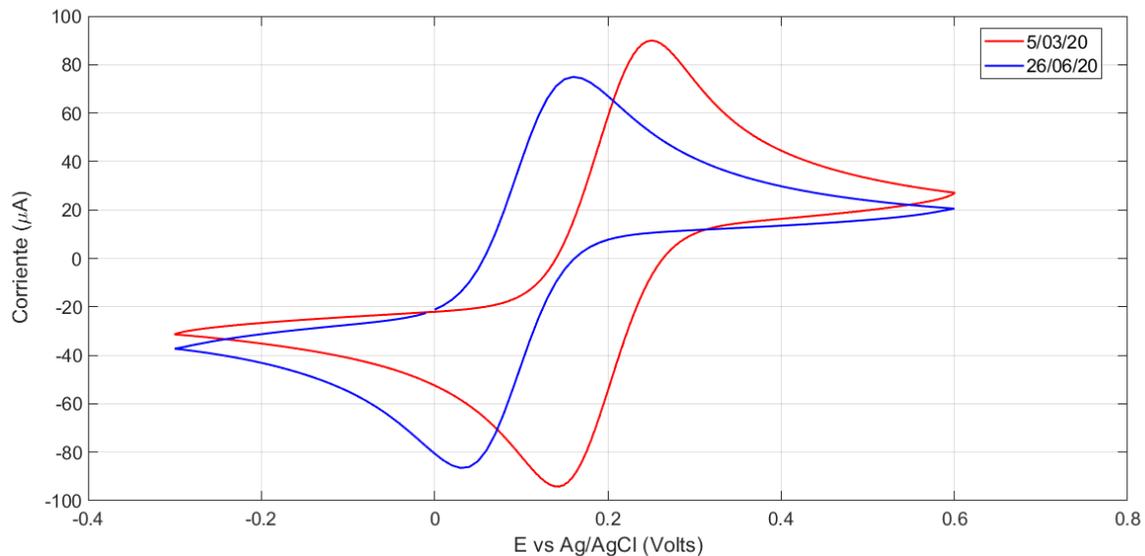


Fig. 41. Comparación de la respuesta electroquímica de SAM formadas el 5 de marzo de 2020 (5/03/20) y las mismas SAM después de ser almacenadas hasta el 26 de junio de 2020 (26/06/20).

En Tabla 9 se muestran y comparan los resultados obtenidos de la caracterización electroquímica realizada a las SAMs tanto recién formadas como después de su almacenamiento, donde se reporta una caída promedio de corriente de aproximadamente $28 \mu\text{A}$ entre cada fecha de experimentación. Por otro lado, se observa un leve aumento de aproximadamente 0.03 V en la ΔV , lo cual representa una disminución en la reversibilidad de la reacción, aunque no muy significativo, indicando que aún se conserva en general un buen estado electroquímico. Por lo que se puede decir que después de tres meses y veintiún días de su formación, las SAM si bien presentan una degradación, aún pueden ser usadas para pruebas futuras. Dichas pruebas se recomiendan que sean dirigidas para comprobar la efectividad de un protocolo experimental, mas no para fines de cuantificación ya que no conservan su máxima viabilidad.

Tabla 9. Comparativa de resultados entre diferentes fechas de caracterización electroquímica de las mismas SAM formadas sobre electrodos de oro.

Fecha de caracterización de las SAM	Corriente Ox (μA)	Voltaje Ox (V)	ΔV
5/03/20	$93.6000 \pm 5.16\text{e-}6$	0.2502 ± 0.0027	0.1044 ± 0.0026
26/06/20	$75.9000 \pm 3.30\text{e-}6$	0.1725 ± 0.0108	0.1350 ± 0.0050

4.4 Resultados Analíticos

En esta sección se presentan todos los resultados analíticos obtenidos de las pruebas de detección en soluciones de AU. El procedimiento se dividió en dos secciones: en la primera se presentan los resultados utilizando la superficie de trabajo modificada de los AuSPEs sin la incorporación de las NpAu, mientras que en la segunda sección se incluye la electrodeposición de las mismas en el proceso de modificación.

4.4.1 Detección de ácido úrico

4.4.1.1 Superficie sin NpAu

Se llevaron a cabo voltamperometrías cíclicas en soluciones de AU, utilizando cada una de las etapas de modificación mencionadas en la Fig. 20, a excepción de la etapa inicial con la superficie de trabajo limpia, debido a la pobre o nula respuesta que otorgaba y que hacía casi imposible el tener un valor de cuantificación. Lo anterior se debe a que la superficie conductora se encuentra inactiva, además de que existe la presencia de elementos contaminantes que perjudican sus propiedades conductivas.

Es importante mencionar que cuando no se tiene un elemento de reconocimiento específico, la oxidación o degradación del analito presente en una solución se lleva a cabo únicamente por acción del potencial de manera indiferente, por lo que la detección que realiza una superficie en este estado no es nada selectiva.

Para el caso de la etapa de pre-tratamiento con KOH y H_2O_2 , los voltamperogramas resultantes se presentan en la Fig. 42, en donde se aprecia que no se obtuvieron

resultados a concentraciones bajas (5 y 50 μM), este efecto fue atribuido a que la superficie de trabajo en ese momento no contaba con ningún elemento de reconocimiento, volviendo posible el solo detectar la oxidación de AU provocada por el potencial aplicado, dicha detección se presentó a partir de la concentración de 100 μM . A partir de esta concentración la respuesta en corriente Ox tiende a aumentar conforme la concentración de AU aumenta, indicando que ambos parámetros son directamente proporcionales.

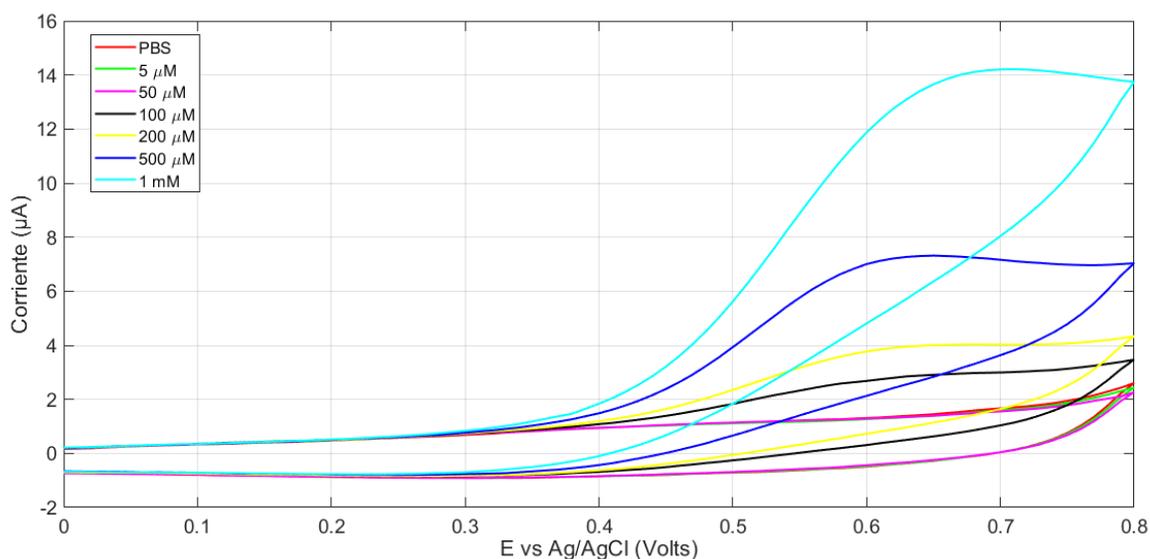


Fig. 42. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH.

Cuando se lleva a cabo la formación de SAM sobre la superficie de trabajo, el aporte electroquímico otorgado por las moléculas de CYS mejora la respuesta en corriente permitiendo obtener mediciones a concentraciones más bajas. Los voltamperogramas resultantes de las mediciones de AU cuando se tienen SAM en la superficie se presentan en la Fig. 43, donde es posible observar que existe una leve respuesta tanto para las concentraciones de 5 μM y 50 μM , situación que no pudo darse cuando la superficie de trabajo solo esta tratada con KOH y H_2O_2 , además de que las señales presentan una mayor respuesta en corriente con respecto a las mostradas en la Fig. 42, debido a las propiedades conductoras que las moléculas polares de CYS otorgan a la superficie de trabajo.

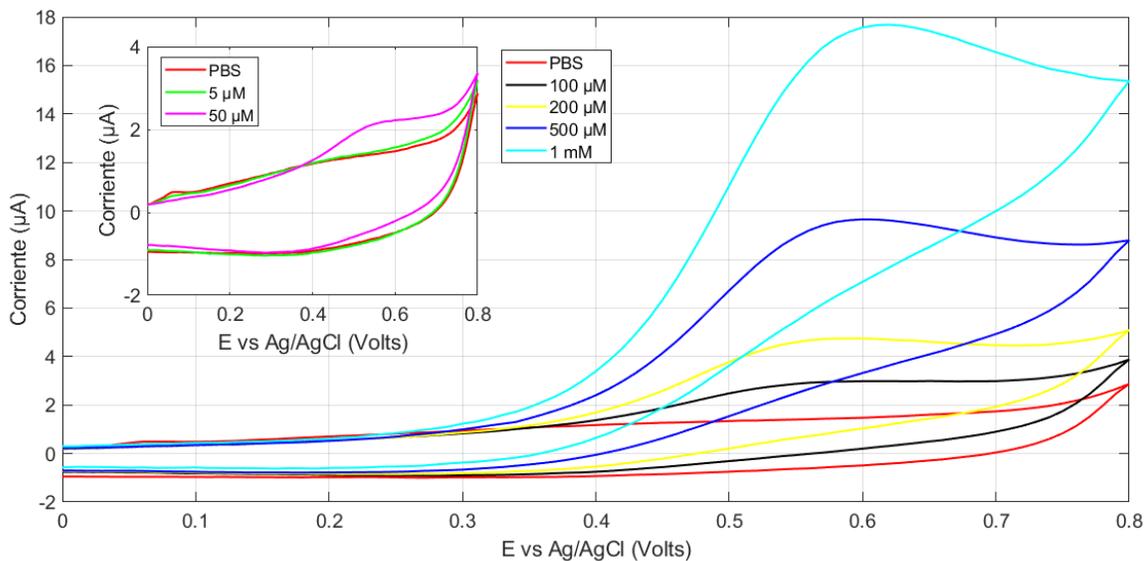


Fig. 43. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/SAM.

Para las pruebas utilizando a la enzima inmovilizada, se realizó primero la fijación de la Uox por adsorción, en donde no se utilizó ningún compuesto químico que favoreciera la unión de la enzima con la superficie más que las SAM previamente formadas. Los voltamperogramas resultantes de esta etapa se presentan en la Fig. 44, donde se puede observar que la oxidación del AU a la concentración mínima de 5 μM no es detectada, como si sucedió cuando la superficie solo tiene SAM. Sin embargo, la respuesta en general mejora para cada una de las concentraciones restantes, lo cual se debe a la selectividad otorgada por la acción catalítica de la enzima.

El hecho de que no se haya obtenido una respuesta a 5 μM , se debe a que como ya se mencionó anteriormente, el método de inmovilización por adsorción no favorece en ningún momento la unión con el soporte ni tampoco lo hace con la orientación, ya que no hay ningún intermediario que active los grupos funcionales de la Uox para que puedan reaccionar con los grupos $-\text{NH}_2$ de las moléculas de CYS. Al respecto, es muy probable que se tengan enzimas inmovilizadas de manera incorrecta con el sitio activo bloqueado, ya sea por la propia superficie o incluso entre ellas mismas. Estas enzimas no participan en la reacción de oxidación del AU, por lo que la superficie está trabajando con el mínimo de acción catalítica producido por las enzimas correctamente

orientadas. Es debido a este bloqueo que la superficie pierde sensibilidad y por ende no le es posible detectar la mínima concentración de AU propuesta.

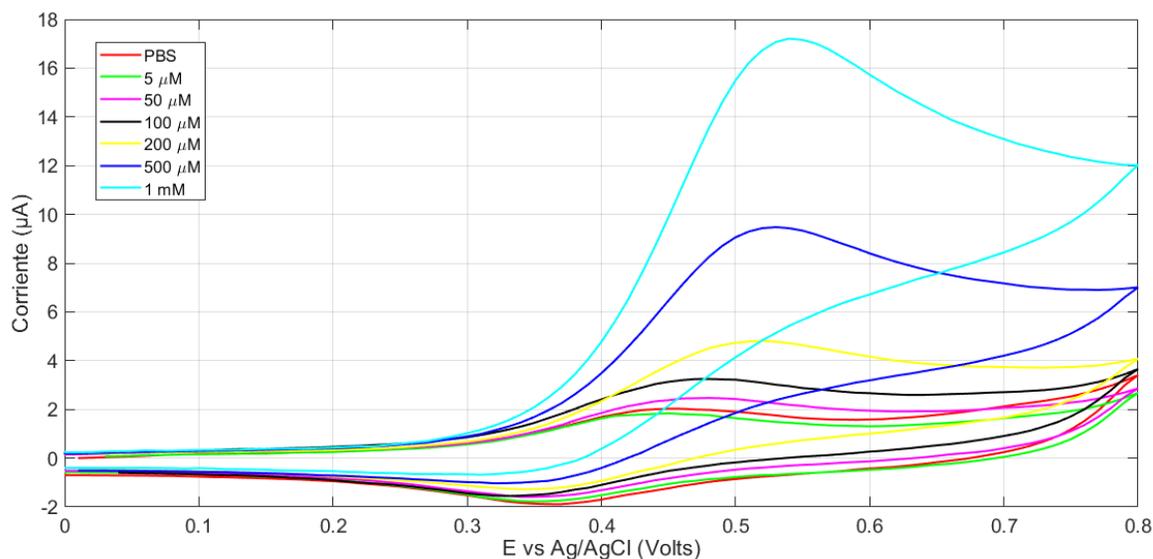


Fig. 44. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/SAM/Uox (inmovilización por adsorción).

Posteriormente se llevaron a cabo pruebas de detección ahora con una fijación por enlace covalente. Los voltamperogramas resultantes de las pruebas realizadas con esta etapa se presentan en la Fig. 45. Para este caso se puede observar no solo que existe detección a concentraciones mínimas, sino en general se presenta una notable mejoría de la respuesta en corriente en comparación a cuando la enzima es inmovilizada por adsorción. Dicha mejoría se debe a enlaces con mayor fuerza y estabilidad entre la enzima y la superficie, así como a una correcta orientación, ya que los grupos carboxilos de la Uox son activados, para poder reaccionar con los grupos -NH₂ de las moléculas de CYS, dejando el sitio activo libre para una máxima interacción con el analito.

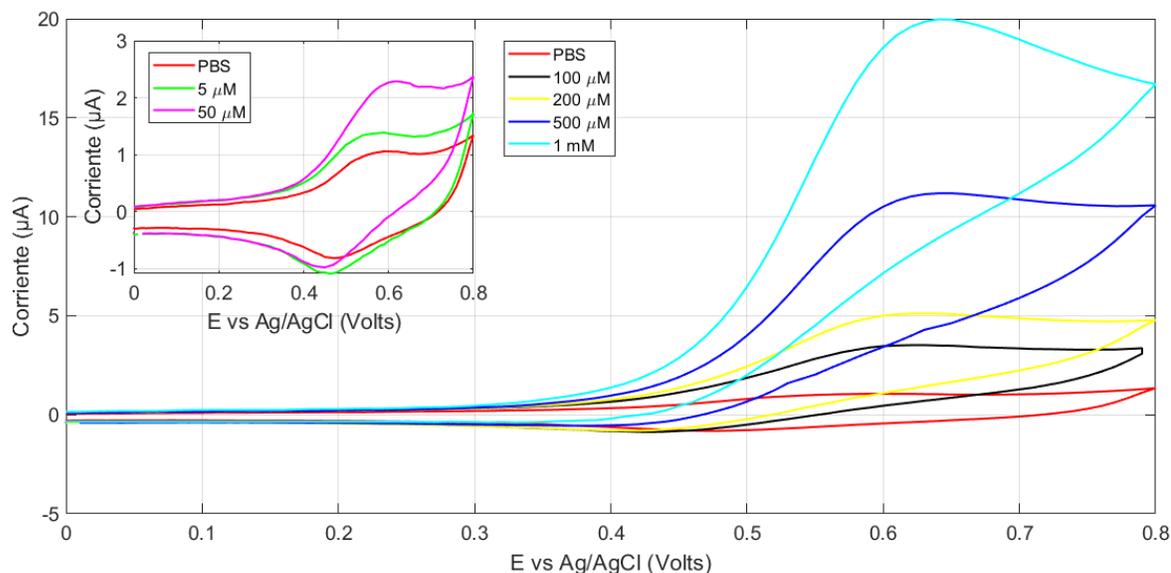


Fig. 45. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/SAM/Uox (inmovilización por enlace covalente).

En Tabla 10, se presentan por etapa de modificación, los valores de corriente Ox obtenidos para cada una de las concentraciones de AU medidas. Se observa que entre las primeras 2 etapas es fácilmente apreciable que la respuesta en corriente de manera general aumenta. Sin embargo, si se observan los valores de corriente Ox obtenidos cuando la enzima se encuentra inmovilizada por adsorción y se comparan con la etapa anterior cuando únicamente se tienen SAM, se puede apreciar una disminución en la respuesta registrada a partir de la concentración de 200 μM , mientras que a concentraciones más bajas se presenta un aumento en dicha respuesta. El aumento de corriente a concentraciones bajas se debe a la actividad catalítica de las enzimas, ya que se aumenta la selectividad respecto a las moléculas AU. Por otra parte, la caída en la respuesta a concentraciones mayores es un indicativo de que la superficie de trabajo cuenta con un cierto bloqueo que impide el paso de la corriente, resultado de la poca o nula orientación que otorga el método de adsorción. La respuesta promedio máxima dada a una concentración de 1 mM de AU para la superficie inmovilizada por adsorción fue de 17.788 μA mientras que para el uso de una inmovilización por enlace covalente este valor de corriente aumenta a 20.7833 μA . Con lo cual se puede decir que una inmovilización por enlace covalente debido a las características que otorga a la superficie de trabajo, presentara un mayor grado de

detección a las moléculas de AU en comparación a la dada por una inmovilización por adsorción.

Tabla 10. Valores de corriente (μA) de oxidación de ácido úrico obtenidos para cada etapa de modificación de la superficie de trabajo. (n=6)

Concentración de ácido úrico	Au/KOH	Au/KOH/SAM	Au/KOH/SAM/Uox (Adsorción)	Au/KOH/SAM/Uox (Unión covalente)
5 μM	X	1.2747 ± 0.0607	X	1.756 ± 0.1503
50 μM	X	2.1187 ± 0.0566	2.1155 ± 0.1013	2.416 ± 0.1309
100 μM	2.4916 ± 0.2942	3.0203 ± 0.1974	3.1197 ± 0.2771	3.238 ± 0.1517
200 μM	4.0956 ± 0.3385	4.8798 ± 0.3191	4.643 ± 0.1912	5.1858 ± 0.2536
500 μM	7.8173 ± 0.5618	10.0135 ± 0.844	8.932 ± 1.1149	11.0187 ± 1.1999
1 mM	14.28 ± 0.1061	19.00 ± 1.5727	17.788 ± 0.699	20.7833 ± 2.1701

En Tabla 11, se presentan los valores de voltaje por etapa de modificación a los cuales se obtuvieron las corrientes Ox, en donde se tiene que el voltaje promedio al cual se presenta la oxidación de AU tiende a disminuir en las primeras 3 etapas. Lo cual confirma que a medida que la superficie es modificada se favorece la reacción de oxidación, ya que tiende a requerir menos potencial para llevarse a cabo y ser detectada, optimizando así el proceso. Sin embargo, para el caso de la inmovilización por enlace covalente este comportamiento no se presentó, ya que, en lugar de disminuir, el potencial aumenta. Este efecto pudo deberse a una degradación o incorrecta inmovilización de la Uox. Sin embargo, en caso de que la enzima estuviera degradada o mal fijada, se hubiera obtenido una mala o incluso nula respuesta en corriente, debido al bloqueo generado en la superficie. Por otra parte, se debe recordar uno de los principios clave a tomar en cuenta cuando se trabaja con elementos proteicos como son las enzimas, y es que son muy susceptibles a las perturbaciones presentes en el ambiente. Las condiciones de temperatura y humedad varían con el paso del tiempo, lo cual en la mayoría de los casos repercute en la viabilidad de una enzima, llegando a modificar por completo su actividad de manera momentánea o incluso permanente. Por lo que este efecto pudo ser el responsable de provocar ese aumento en el potencial, donde la actividad enzimática se modificó lo suficiente para alterar su rendimiento en voltaje, mas no para afectar su selectividad y por ende su respuesta en corriente.

Tabla 11. Valores de voltaje de oxidación de ácido úrico obtenidos por cada etapa de modificación de la superficie de trabajo. (n=6)

Etapas de la superficie de Trabajo	Voltaje Ox (V)
Au/KOH	$0.6643 \pm 1.64e-4$
Au/KOH/SAM	$0.5710 \pm 2.78e-4$
Au/KOH/SAM/Uox (Adsorción)	$0.5093 \pm 1.88e-4$
Au/KOH/SAM/Uox (Unión covalente)	$0.6550 \pm 7.03e-4$

Con el objetivo de poder tener una visión comparativa del diseño del biosensor para cada una de las etapas de modificación de su superficie, se escogió una concentración base de AU, la cual fue de 500 μM . En la Fig. 46 se presentan las señales voltamperométricas obtenidas a dicha concentración para cada una de las etapas probadas, donde se aprecia el aumento paulatino de la respuesta en corriente Ox conforme se avanza en la modificación de la superficie, siendo la etapa con la Uox inmovilizada por enlace covalente la que presenta la mayor respuesta. Mientras que, para el caso de la inmovilización por adsorción, se aprecia un decaimiento tanto en el potencial como en la corriente, indicando que si bien hubo mejores condiciones en la inmovilización por adsorción que provocaron la optimización del potencial de la reacción, las deficiencias que el método presenta perjudican la respuesta en corriente del biosensor.

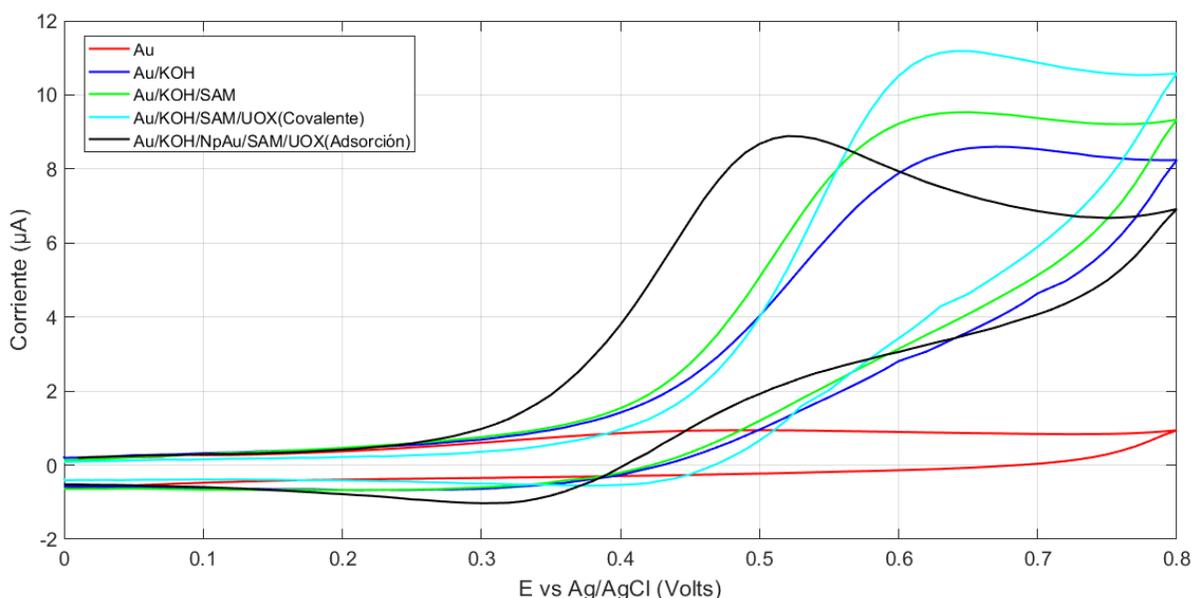


Fig. 46. Perfil electroquímico de respuesta en ácido úrico a una concentración de 500 μM .

4.4.1.2 Superficie con NpAu

Para la siguiente parte experimental, se realizaron las pruebas de detección de AU incluyendo la electrodeposición de NpAu en las modificaciones de la superficie de trabajo, así como la inmovilización por entrecruzamiento utilizando glutaraldehído.

En la Fig. 47 se presentan los voltamperogramas resultantes de las mediciones realizadas, utilizando la superficie de trabajo dopada con NpAu. A partir de esta etapa fue posible obtener una respuesta en corriente desde la concentración mínima, debido al gran aporte electroquímico que otorgan las nanopartículas electrodepositadas, lo cual mejora la conductividad del electrodo de oro permitiendo detectar la oxidación por potencial que se lleva a cabo en las soluciones a pesar de que esta sea mínima. Por otra parte, se presentó un pequeño pico de corriente entre 0 V - 0.1 V, este pico es atribuido a una pequeña reacción de oxidación generada por las NpAu, completamente ajeno a la oxidación de las moléculas de AU, lo cual comprueba su presencia.

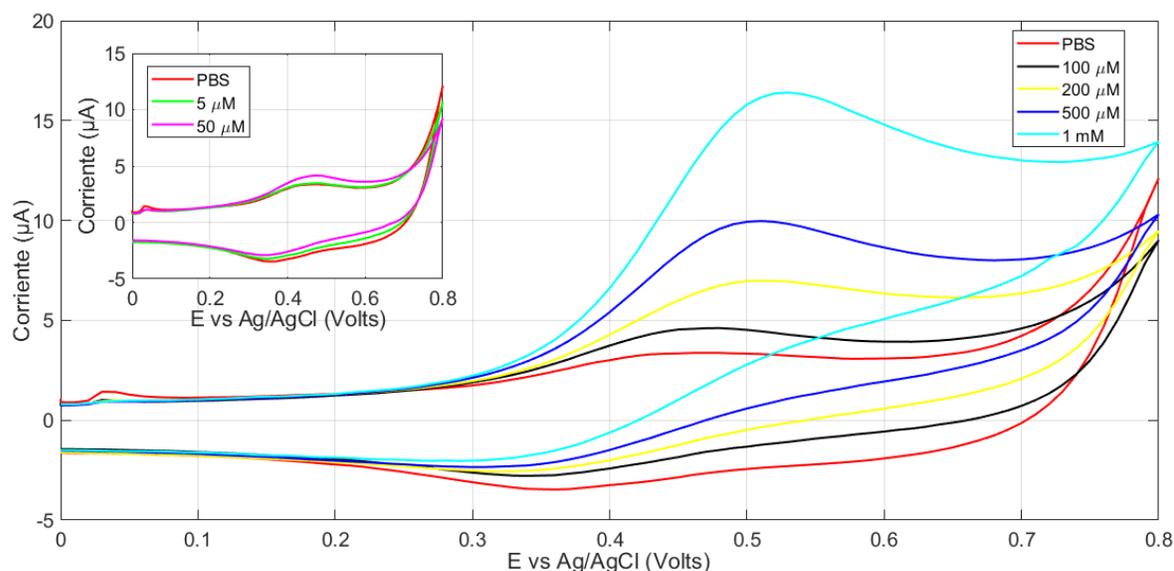


Fig. 47. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/NpAu.

En la Fig. 48 se presentan los voltamperogramas resultantes utilizando una superficie dopada con NpAu y SAM, en donde se puede observar una notable mejoría de la respuesta en corriente Ox con respecto a la obtenida cuando únicamente se tienen NpAu. Debido al aumento en la conductividad por producto del dopaje, la fijación de las moléculas de CYS tiende a realizarse con mayor facilidad. Este aumento de conductividad también repercute en la sensibilidad del electrodo, ya que, si se comparan las señales obtenidas con las mostradas en la Fig. 43, se tiene en general una mayor respuesta de corriente para cada una de las concentraciones. Nuevamente, en el intervalo de potencial de 0 V - 0.1 V en algunas de las señales, principalmente en la respuesta correspondiente a la concentración de 5 μM , se presenta un pequeño proceso de oxidación ajeno a las moléculas de AU, el cual es similar al presentado en la Fig. 47, aunque con una mayor intensidad, dicho efecto es atribuido no solo a la presencia de la NpAu, sino también a las moléculas de CYS, por lo que este efecto es debido a la combinación de ambas estructuras.

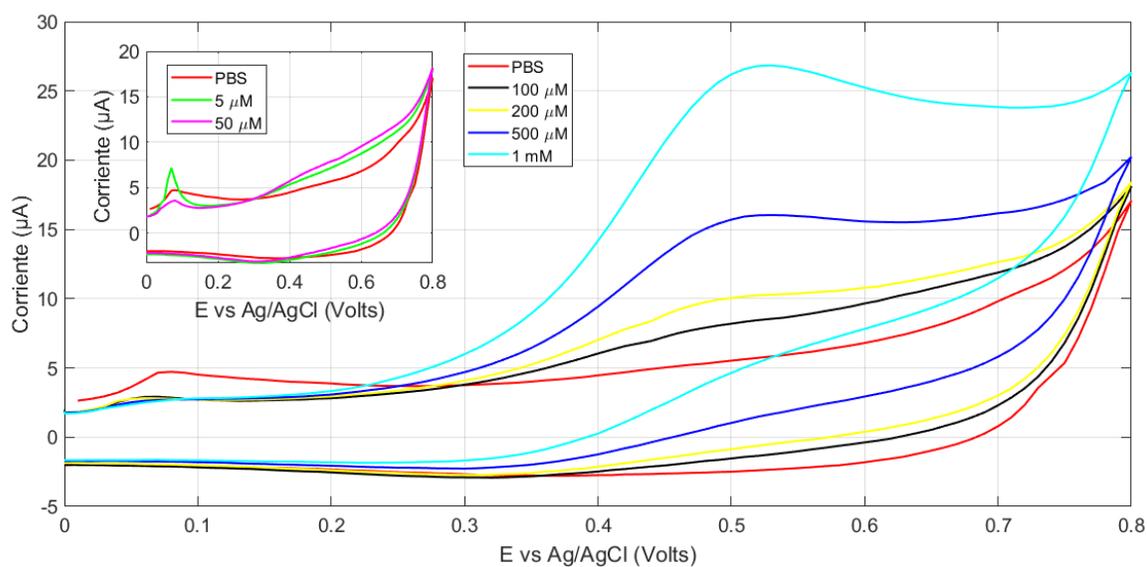


Fig. 48. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/NpAu/SAM.

Si se observan a la Fig. 49 y Fig. 50 se puede notar que en los voltamperogramas resultantes utilizando superficies con una inmovilización tanto por enlace covalente como por entrecruzamiento, no existió una respuesta en corriente Ox para ninguna de

las concentraciones desde 5 μM hasta 200 μM , pudiendo incluso medir valores de corriente más altos en la señal correspondiente al buffer PBS. Para las únicas concentraciones en las que se pudo medir una respuesta de oxidación fueron la de 500 μM y 1 mM. Esto se atribuye a la degradación de la enzima, ya que presenta una muy baja actividad catalítica que no le permite realizar y detectar la oxidación de las moléculas de AU a bajos valores de concentración, pero si a valores altos, lo cual significa que la degradación no es total. Finalmente, la degradación parcial no impide que se tenga evidencia de la inmovilización, ya que además de obtener respuesta en corriente Ox para las dos últimas concentraciones, en el intervalo de potencial que va de 0 V – 0.1 V, se puede apreciar nuevamente una reacción de oxidación. Sin embargo, esta respuesta es mayor en comparación a los dos casos anteriores, dicho aumento en la corriente se atribuye a la carga de las estructuras proteicas que forman a la Uox, la cual se encuentra combinada con la carga dada por la estructura conformada por las NpAu y la SAM.

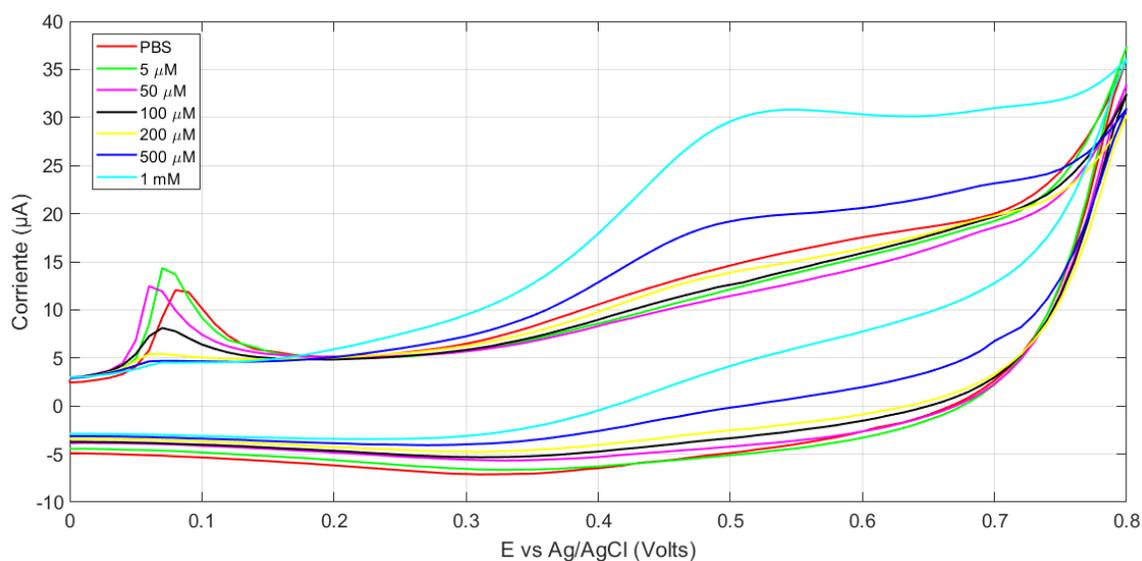


Fig. 49. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (inmovilización por enlace covalente).

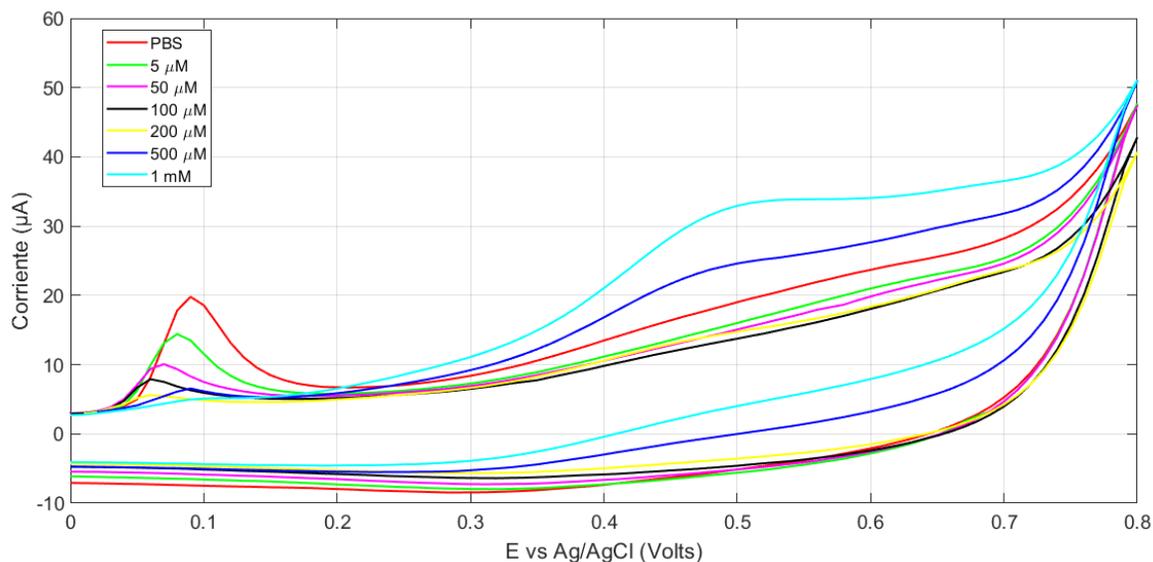


Fig. 50. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico utilizando la superficie Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (inmovilización por entrecruzamiento).

En Tabla 12, se presentan por etapa de modificación que incluyen la electrodeposición de NpAu, los valores de corriente Ox obtenidos para cada una de las concentraciones de AU. Se puede observar que el nivel de respuesta en corriente en general tiende a aumentar conforme se avanza en la modificación de la superficie. Para el uso de las etapas de inmovilización, si bien solo se obtuvieron datos para 500 μM y 1 mM, si se comparan con los valores correspondientes de las etapas previas se puede observar que la tendencia en la cual la corriente Ox aumenta se mantiene. Por ejemplo, para el caso de la concentración de 500 μM el valor promedio de la corriente Ox registrada cuando únicamente se tienen NpAu en la superficie de trabajo fue de 9.268 μA , mientras que la corriente promedio registrada cuando la superficie ya cuenta con las SAM y la enzima inmovilizada por enlace covalente es de 19.2 μA , por último, para el caso en donde se utiliza la inmovilización por entrecruzamiento, este valor aumenta hasta los 24.61 μA . Concluyendo que un proceso de inmovilización por entrecruzamiento presenta un mayor nivel de respuesta a la oxidación del AU, debido a una mayor estabilidad y orientación dada por la estructura de co-reticulado, en comparación con los que puede ofrecer una inmovilización por enlace covalente, ya que por entrecruzamiento la orientación de las enzimas se realiza en conjunto, a diferencia de la unión covalente donde el proceso es meramente individual.

Tabla 12. Valores de corriente de oxidación (μA) de ácido úrico obtenidos por cada etapa de modificación de la superficie de trabajo dopada con NpAu. (n=3)

Concentración de ácido úrico	Au/KOH/NpAu	Au/KOH/NpAu /SAM	Au/KOH/NpAu /SAM/Uox (Unión covalente)	Au/KOH/NpAu /SAM/Uox (Entrecruzamiento)
5 μM	3.337 \pm 0.162	7.088 \pm 1.108	X	X
50 μM	3.923 \pm 0.187	7.423 \pm 1.253	X	X
100 μM	4.356 \pm 0.137	8.270 \pm 0.782	X	X
200 μM	6.717 \pm 0.190	10.266 \pm 0.779	X	X
500 μM	9.268 \pm 0.756	17.200 \pm 0.713	19.200 \pm 1.755	24.610 \pm 2.268
1 mM	16.453 \pm 0.039	26.950 \pm 0.563	30.810 \pm 2.040	33.350 \pm 2.012

En Tabla 13 se presentan los valores promedio de voltajes Ox, donde se puede notar que no siguen una tendencia a la baja como sucedió cuando no se tiene un dopaje en la superficie de trabajo. Sin embargo, se presenta una cierta repetibilidad, lo cual se debe a que el aporte electroquímico presentado a partir de la electrodeposición de las NpAu es suficiente para optimizar el proceso, requiriendo así el mínimo potencial posible para llevar a cabo la reacción de oxidación del AU y por consecuencia su detección. También es importante recalcar que la enzima al encontrarse parcialmente degradada perjudica en mínimas proporciones el estado electroquímico de la superficie, dicho efecto a su vez también provoca un aumento en el potencial de la reacción debido a su baja actividad catalítica.

Tabla 13. Valores de voltaje de oxidación de ácido úrico obtenidos por cada etapa de modificación de la superficie de trabajo dopada con NpAu. (n=3)

Etapas de la superficie de Trabajo	Voltaje Ox (V)
Au/KOH/NpAu	0.4905 \pm 4.44e-5
Au/KOH/NpAu/SAM	0.5018 \pm 1.13e-4
Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (U. Covalente)	0.5250 \pm 1.30e-4
Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (Entrecruzamiento)	0.5050 \pm 1.00e-4

En la Fig. 51 se presenta el perfil electroquímico de respuesta en soluciones de AU a una concentración de 500 μM correspondiente a la modificación de la superficie con NpAu. Es fácilmente apreciable que la etapa con la enzima inmovilizada por entrecruzamiento presenta el mayor nivel de respuesta en corriente Ox en comparación a cuando la enzima es inmovilizada por enlace covalente. Por otro lado, también se detecta una notable disminución en el potencial Ox a partir de que la superficie de trabajo es dopada con NpAu, en comparación a cuando la superficie se

encuentra únicamente pre-tratada, lo cual se debe a una notable mejora en la conductividad de la superficie de trabajo por la presencia de las nanopartículas metálicas.

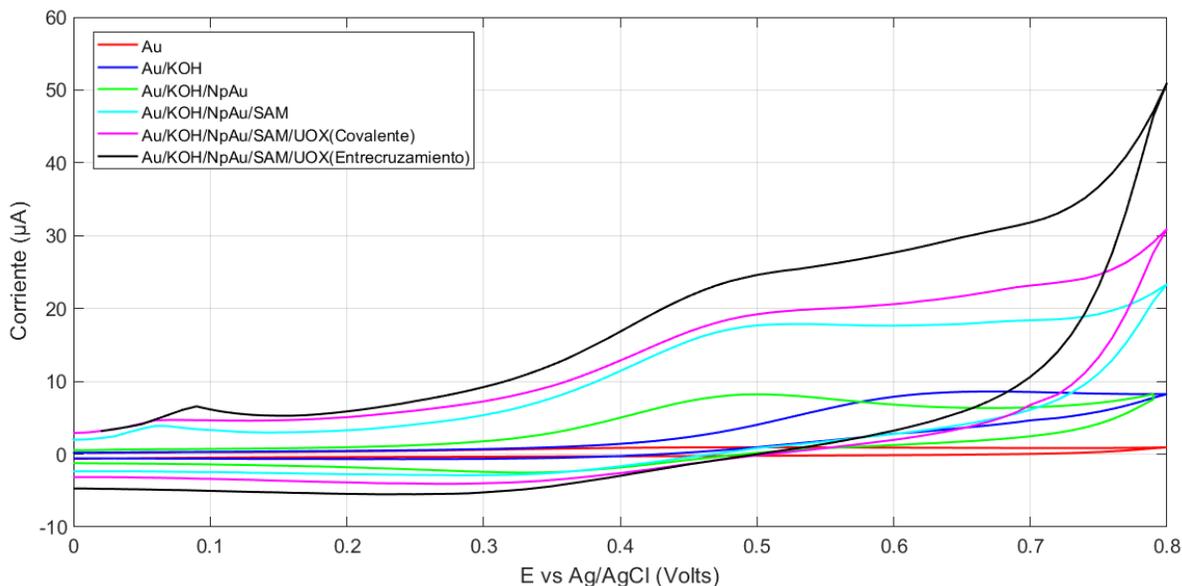


Fig. 51. Perfil electroquímico de respuesta en ácido úrico a una concentración de 500 μM , utilizando una superficie dopada con NpAu.

4.4.2 Pruebas de detección de ácido úrico a diferente valor de pH

Además de la temperatura y la humedad, otro aspecto importante a considerar cuando se trabaja con enzimas es el valor de pH del medio en donde estas participan. Las enzimas poseen un valor óptimo de pH (7.2453 para la Uox), en el cual se tiene su máxima actividad catalítica. Si este valor varía considerablemente se pueden presentar desde leves modificaciones en su actividad hasta su degradación total e inmediata.

Se realizaron mediciones en soluciones de AU con un pH diferente al utilizado (pH 7.4), con el objetivo de poder observar los efectos que conllevan un cambio significativo en el pH sobre las respuestas de sensado. Dichas mediciones se

realizaron con un biosensor cuya superficie de trabajo contaba con la Uox inmovilizada por entrecruzamiento sobre SAM, además de estar dopada con NpAu.

Debido a que las enzimas utilizadas indican una parcial degradación, lo cual conlleva a una considerable disminución en su actividad, el valor propuesto de pH no fue muy diferente al ya utilizado, esto para evitar su completa degradación y por ende un bloqueo total en la superficie de trabajo. El valor de pH elegido fue de 6.0 y en la Fig. 52 se presentan los voltamperogramas obtenidos, donde es posible analizar que a pesar de que las pruebas se realizaron con la enzima parcialmente degradada, fue posible obtener respuesta para cada una de las concentraciones. Sin embargo, también se puede apreciar un segundo pico de corriente Ox a un potencial más alto, este pico representa un segundo proceso de oxidación de las moléculas de AU, el cual es provocado por el potencial aplicado y no precisamente por una acción catalítica. Este doble efecto se origina debido a que el valor de pH utilizado no es el óptimo de trabajo para la Uox, lo cual no le permite catalizar por completo al AU, por otro lado, este efecto favorece en la detección de las concentraciones por debajo de los 500 μM debido a que no existe una saturación en la superficie del electrodo por la división del proceso, permitiendo detectar la oxidación catalítica del AU con una actividad mínima. Por último las moléculas no catalizadas por la enzima pero que si son oxidadas por efecto del potencial pueden ser detectadas una vez que el proceso catalítico concluye.

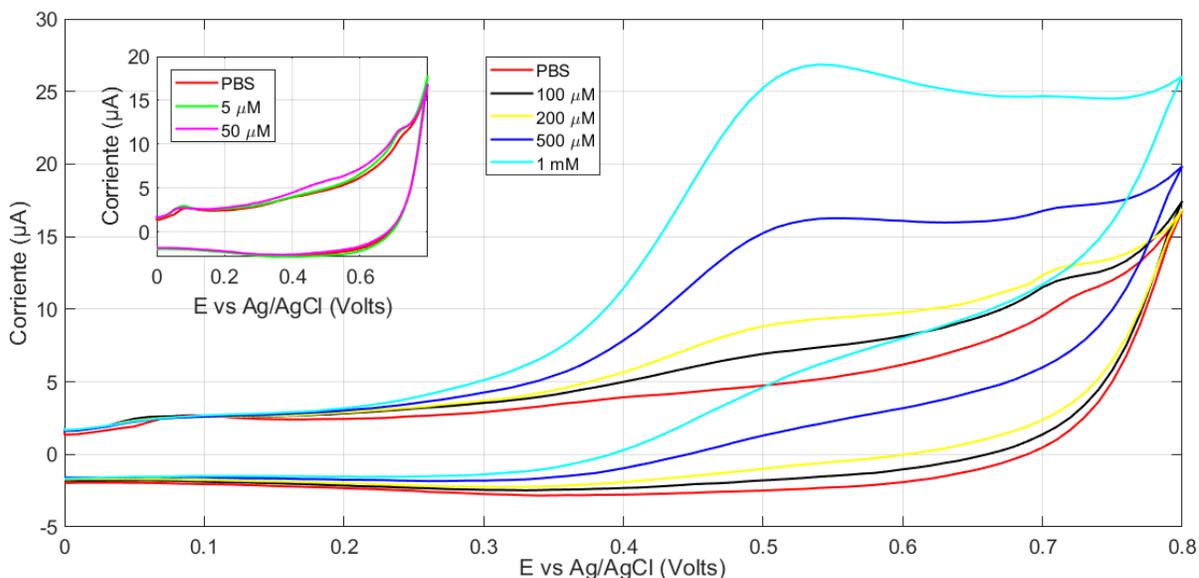


Fig. 52. Respuesta en función de la concentración de ácido úrico en soluciones con un pH de 6.0, utilizando la superficie Au/KOH/NpAu/SAM/Uox (inmovilización por entrecruzamiento).

En Tabla 14 se presentan los valores de respuesta en corriente de Ox, así como los valores de voltaje utilizando una solución de AU a pH de 6.0. Estos resultados solo incluyen las respuestas obtenidas por la acción catalítica de la Uox, en donde es posible observar que la proporcionalidad entre la concentración de AU y su respectiva respuesta en corriente se mantiene tal y como sucedió cuando se utilizan soluciones a un pH de 7.4. Finalmente, se resalta que en función de la concentración de 500 µM el valor promedio de corriente Ox obtenido fue de 16.655 µA, el cual contrasta con los 24.61 µA (Véase Tabla 12) obtenidos cuando el valor de pH es de 7.4, lo cual confirma que dicho valor es óptimo para realizar la detección del analito, en contraste a cuando se utiliza un pH más ácido.

Tabla 14. Valores de corriente y voltaje de oxidación obtenidos en soluciones de ácido úrico a un pH de 6.0, utilizando un ensamble total de detección en la superficie de trabajo. (n=3)

Concentración de ácido úrico	Corriente Ox (µA)	Voltaje Ox (V)
5 µM	4.9370 ± 0.0001	0.5158 ± 1.48e-3
50 µM	6.6000 ± 0.7820	
100 µM	7.6085 ± 0.6835	
200 µM	9.4605 ± 0.3505	
500 µM	16.6550 ± 0.3850	
1 mM	26.9800 ± 0.1200	

4.4.3 Linealidad y sensibilidad

Para determinar la linealidad y sensibilidad del biosensor implementado en cada una de las etapas de modificación de su superficie, se procedió a calcular la relación entre la corriente de respuesta y el área de trabajo, la cual corresponde a un tamaño de 0.11 cm^2 . Esta relación recibe el nombre de densidad de corriente (j), con la cual es posible determinar el grado de linealidad dada por una ecuación de ajuste lineal, ya que los resultados presentan dicha tendencia. Mientras que, la pendiente resultante representa el grado de sensibilidad de la superficie probada, la cual recibe el nombre de Constante Cinética (K)

Debido a que la concentración de AU en el área médica se mide en mg/dl y no en unidades molares, se realizó la conversión y los equivalentes se muestran en Tabla 15.

Tabla 15. Equivalentes de las diferentes concentraciones analizadas de ácido úrico

Concentración de AU (μM)	Concentración de AU (mg/dl)
5	1.68
50	16.81
100	33.62
200	67.25
500	168.12
1000	336.20

El AU como biomarcador clínico tiene un intervalo de referencia normal en sangre de 2.0 mg/dl - 6.0 mg/dl en mujeres, mientras que en hombres es de 2.5 mg/dl - 7.0 mg/dl [17], por lo que la detección mínima lograda y los intervalos de medición obtenidos cubren estos valores.

En Tabla 16 se presentan los valores de K para cada una de las etapas por las cuales paso y se probó a la superficie de trabajo en soluciones de AU así como su grado de linealidad. Se presentan resultados tanto para concentraciones en unidades molares como en mg/dl, los valores se encuentran promediados de acuerdo con el número de repeticiones que se realizaron para el análisis de cada superficie, por lo que se muestran con sus respectivas desviaciones estándar. Se puede observar que

la mayor sensibilidad se obtiene cuando la superficie cuenta con las SAM formadas y la Uox inmovilizada por entrecruzamiento sobre ellas, realizando mediciones en soluciones con un pH de 6.0. Se observa también el aumento de la sensibilidad cuando las modificaciones se realizan en una superficie dopada con NpAu con respecto a las etapas en que estas se encuentran ausentes. Por otra parte, se puede notar la disminución en la sensibilidad cuando la inmovilización se lleva a cabo por adsorción, esto debido al parcial bloqueo causado en la superficie por una mala orientación. Para el caso de la linealidad, esta tiende a aumentar conforme se avanza en las modificaciones, teniendo a la superficie con la enzima inmovilizada por enlace covalente con el mayor ajuste lineal. Sin embargo, cuando la enzima es inmovilizada por entrecruzamiento en una superficie con NpAu y SAM y se realizan mediciones en soluciones con un pH de 6.0, se presenta una disminución de la linealidad comparada con el método de inmovilización covalente, a pesar de que posee un mayor valor de K. Esto puede deberse a los efectos de la degradación y pH, los cuales modifican el grado de tendencia en la detección de AU. Finalmente, debido a que para las pruebas a un pH de 7.4 la enzima presentó respuesta únicamente para las concentraciones de 500 μM y 1 mM, no fue posible obtener un ajuste lineal, así como el calcular un grado de sensibilidad adecuado.

Tabla 16. Grado de sensibilidad y de linealidad reportado para cada una de las etapas de modificación de la superficie de trabajo probadas en soluciones de ácido úrico.

Estado de la superficie de trabajo	K (M)	K (mg/dl)	Linealidad
Au/KOH	0.1178 ± 0.0033	0.3503 ± 0.0095	0.9493 ± 0.0076
Au/KOH/SAM	0.1661 ± 0.0147	0.4791 ± 0.0447	0.9778 ± 0.0188
Au/KOH/SAM/Uox (Adsorción)	0.1453 ± 0.0043	0.4321 ± 0.0129	0.9781 ± 0.0153
Au/KOH/SAM/Uox (Covalente)	0.1784 ± 0.0188	0.5306 ± 0.0559	0.9915 ± 0.0091
Au/KOH/NpAu	0.1278 ± 0.0023	0.3803 ± 0.0067	0.9542 ± 0.0016
Au/KOH/NpAu /SAM	0.2060 ± 0.0039	0.6129 ± 0.0115	0.9747 ± 0.0178
Au/KOH/NpAu /SAM/Uox (Entrecruzamiento) pH 6.0	0.2279 ± 0.0116	0.6607 ± 0.0172	0.9632 ± 0.0005

En la Fig. 53 se presentan las gráficas de ajuste lineal de la relación existente entre la densidad de corriente y la concentración de AU para cada una de las etapas de la superficie de trabajo cuando no se utilizan NpAu, donde es apreciable que la superficie que cuenta con la formación de SAM, y la enzima inmovilizada por enlace covalente, presenta la mayor tendencia de respuesta volviéndola la mejor acondicionada de este bloque para realizar aplicaciones de sensado electroquímico de AU. Mientras que la superficie únicamente pre-tratada con KOH y H₂O₂ presenta la menor tendencia de respuesta de manera general, debido a que no existe nada que favorezca tanto la reacción de oxidación como su detección, además de la inactividad de la superficie conductora, confirmando de manera definitiva que no es óptima para llevar a cabo procesos de sensado cuantitativos.

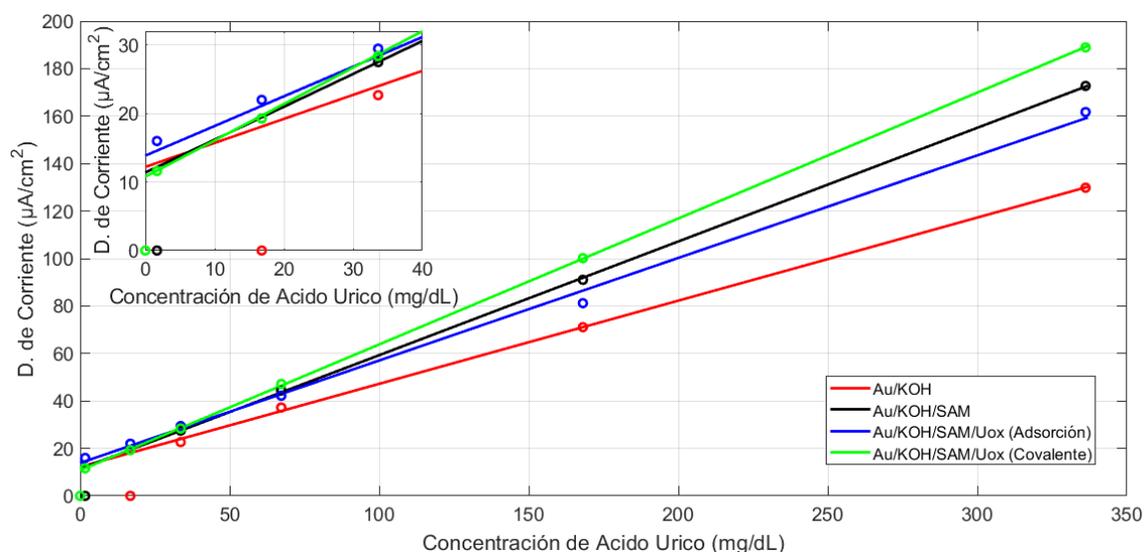


Fig. 53 Ajuste lineal de la relación entre la densidad de corriente y la concentración de ácido úrico para la superficie de trabajo modificada sin NpAu.

En la Fig. 54 se presentan los ajustes lineales para cada una de las etapas de la superficie de trabajo cuando se utilizaron las NpAu en su modificación, se puede observar que la superficie con la formación de SAM y la enzima inmovilizada por glutaraldehído, junto con la que cuenta con solo SAM y NpAu presentan los mayores niveles de respuesta, esto debido a que la Uox al encontrarse parcialmente degradada y que además estuvo trabajando con un valor de pH alejado del óptimo, provoca que

la sensibilidad de la superficie no aumente de manera significativa en comparación con la etapa anterior. Sin embargo, con base en estos resultados se puede concluir que la inmovilización por entrecruzamiento presenta un mayor grado de sensibilidad en comparación a una inmovilización por enlace covalente.

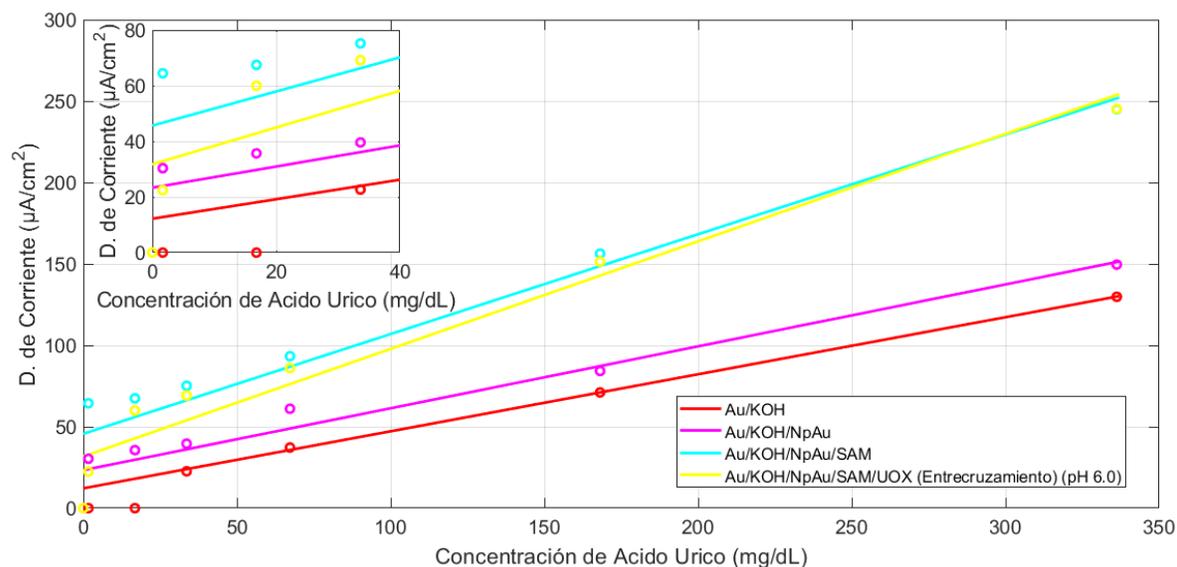


Fig. 54 Ajuste lineal de la relación entre la densidad de corriente y la concentración de ácido úrico para la superficie de trabajo modificada con NpAu.

Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que la superficie de trabajo tiende a volverse más sensible para la detección de moléculas de AU conforme se realizan las modificaciones, lo que a su vez vuelve más lineal al proceso de detección.

4.4.4 Prueba de selectividad

Para esta prueba se preparó una solución de ácido ascórbico a una concentración de 1 mM, con la cual se probó la superficie del electrodo de trabajo modificada por el dopaje de NpAu, la formación de SAM y la inmovilización por entrecruzamiento de la Uox. De igual forma se midió una solución de AU a la misma concentración y buffer PBS. Las señales voltamperométricas obtenidas se presentan en la Fig. 55, en donde se puede observar que para el caso del ácido ascórbico no se pudo realizar una detección, a pesar de que la concentración de la solución es la misma que se utiliza

para el AU, y en su lugar se obtiene una señal muy parecida a la del buffer PBS. Esto se debe a que la Uox está dirigida únicamente a catalizar AU, por lo que en presencia de otro analito la enzima no se vuelve afín, provocando un bloqueo total en la superficie del electrodo de trabajo haciendo imposible realizar una detección, aun cuando se presente un proceso de oxidación por acción del potencial aplicado, ya que los productos obtenidos son completamente diferentes a los que se obtienen en la oxidación del AU.

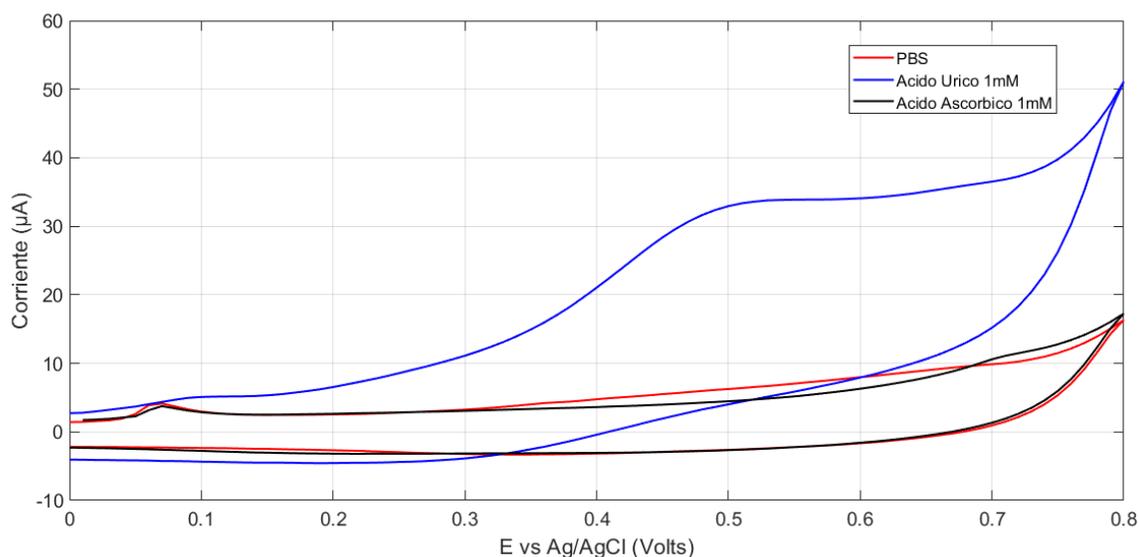


Fig. 55. Comparativa de señales de respuesta entre el ácido úrico y el ácido ascórbico.

Con base en lo anterior, se puede decir que la superficie modificada es selectiva y reaccionara únicamente cuando el sitio activo sea compatible, catalizando las moléculas de AU presentes en una solución. Por lo que, en soluciones donde existan moléculas o compuestos diferentes al AU, estos no serán detectados, orientando la respuesta de sensado únicamente a nuestro analito de interés.

Capítulo 5. Conclusiones y Perspectivas

El objetivo de esta tesis fue desarrollar la modificación de la superficie del electrodo de trabajo de un AuSPE a partir del ensamble de monocapas autoorganizadas a base de cisteamina, que en conjunto con la inmovilización de la enzima urato oxidasa se logrará detectar moléculas de AU en muestras de laboratorio controladas. Para lograrlo, se abordaron varios aspectos como el diseño e implementación de biosensores catalíticos, desde el tratamiento y activación de superficies conductoras, hasta cada uno de los protocolos de modificación de las mismas, así como el aporte tanto físico como electroquímico que cada una de estas proporcionaba. Se tomaron aspectos de la síntesis de monocapas autoorganizadas a base de tioles sobre superficies conductoras, resaltando su relevancia en los procesos de inmovilización enzimática para el desarrollo de compuestos de reconocimiento altamente específicos. Para el proceso cuantitativo se utilizaron los aspectos de mediciones y análisis electroquímicos por medio de mediciones voltamperométricas. En todos los casos de medición se buscó transformar la información química proveniente de las soluciones analizadas, en información útil para la detección de AU.

Con base en los resultados presentados y discutidos en el capítulo 4 de este trabajo, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

5.1 Estado de la superficie de trabajo

Las características físicas del soporte o superficie de trabajo en donde se realizarán las modificaciones para implementar un sistema de reconocimiento para la detección de un analito representan el primer paso para elegir o descartar su uso.

Se conoció la topografía de la superficie del electrodo de trabajo de los AuSPEs utilizados, se pudo constatar que dicha superficie no presenta un relieve constante y homogéneo, en su lugar presenta características porosas resultado de la impresión del material conductor, de igual forma se pudo detectar la presencia de elementos

contaminantes que no pudieron ser removidos por medio de un tratamiento de limpieza básico a base de etanol, lo que llevo a la implementación de un protocolo para la limpieza y activación de la superficie a través de KOH y H₂O₂. Por otra parte, se tuvo conocimiento del grosor del electrodo de trabajo impreso sobre un soporte cerámico, este grosor tuvo un valor promedio de 337.75 nm, con lo cual se concluyó que la superficie resulto ser un soporte adecuado para llevar a cabo la implementación de las modificaciones superficiales correspondientes al desarrollo de aplicaciones de sensado.

Se tuvieron imágenes de la electrodeposición de NpAu, las cuales proporcionaron características adicionales a la superficie de trabajo, entre las que destacan una mayor resistencia a la corrosión provocada por las reacciones de oxidación presentes en las muestras analizadas, así como un aumento en su conductividad, lo que facilito la formación de SAMs y permitió una interacción a nivel molecular.

5.2 Caracterización física de la superficie de trabajo

Una vez que se realiza la formación de SAM sobre la superficie de trabajo, el cual fue el proceso clave en el desarrollo de esta tesis, se debe tener evidencia física de que efectivamente están presentes para poder llevar a cabo el proceso de inmovilización de la mejor manera posible. Tanto por FTIR como por EDS se obtuvo información sobre la presencia de los diferentes enlaces que forman las cadenas de CYS, en los que destacan la presencia del enlace C-N responsable de la unión entre los grupos -NH₂ y la cadena alquílica, el enlace C-H que representa la formación de los grupos metilo que conforman las cadenas de CYS, los enlaces N-H que conforman a los grupos -NH₂, así como de enlaces sulfuro, los cuales indicaron la unión efectiva de las cadenas de CYS a la superficie de trabajo. Además de esto, también se obtuvo información de la presencia de las NpAu electrodepositadas por medio de una pequeña respuesta en absorbancia característica en el espectro IR. Con base en lo anterior se puede afirmar que se comprobó la formación de SAM, así como su complementariedad con las NpAu para la formación de la estructura intermedia que

protege a la enzima de los efectos conductivos de la superficie, así como también favorece su unión con la misma.

5.3 Caracterización electroquímica de la superficie de trabajo

El aporte electroquímico que otorga cada modificación a la superficie de trabajo es indispensable para llevar a cabo la detección sensible y selectiva del analito. Al realizar voltamperometrías cíclicas en $K_3[Fe(CN)_6]$ se analizó el grado de reversibilidad de la reacción redox generada en la solución, a través de la diferencia de potencial registrada entre la región de Ox y Rx, la cual a medida que disminuía indicaba una mayor reversibilidad. Por otro lado, se analizó el valor de respuesta en la corriente pico máxima de oxidación, la cual al mejorar el estado electroquímico tiende a aumentar. Aunado a lo anterior, el mejor estado o aporte electroquímico dado por una superficie fue aquella que presentó el mayor valor de corriente Ox debido a una mejor transferencia de electrones, así como una mayor reversibilidad teniendo la menor ΔV entre los picos de corriente de la reacción redox. La superficie limpia de oro sin ningún tratamiento fue la que presentó el estado electroquímico más pobre, indicando que la superficie en este estado no posee las características óptimas para realizar análisis cuantitativos, resaltando la importancia de llevar a cabo su modificación, mientras que los mejores estados electroquímicos se presentaron en las superficies que contaban con la formación de SAM.

A medida en que se realizaban las modificaciones de la superficie la corriente Ox mostraba un incremento, en tanto que la ΔV tendía a disminuir, con lo cual se comprobó la mejora en las propiedades conductivas de las superficies de trabajo. Sin embargo, cuando se presenta la inmovilización de la Uox se registró una disminución de la corriente Ox en comparación a las etapas previas, debido a un efecto contraproducente por el aumento en el grosor de la doble capa electrolítica formada en la superficie, la cual no disminuyó el estado electroquímico, sino que este continuó mejorando debido a que la reversibilidad de la reacción tendía a aumentar aunque en menor medida. Para el caso de las superficies con NpAu este efecto no se observa,

ya que la tendencia en que la corriente Ox aumenta conforme se avanza en la modificación se mantiene, así como la disminución en la ΔV , esto debido a que el aumento en la conductividad generado por las propias NpAu y su posterior combinación con las moléculas de CYS permite que el aumento presentando en la resistencia sea despreciado. Finalmente, para el caso de la superficies Au/KOH/NpAu/SAM/Uox tanto para la inmovilización por enlace covalente como por entrecruzamiento, se esperaba una mayor respuesta en corriente Ox, y en su lugar se dio una leve disminución de la misma, ya que la Uox presumiblemente presentó una parcial degradación, lo cual además de reducir su actividad catalítica provocó un aumento de resistencia en la superficie de trabajo impidiendo el paso de corriente, este efecto fue tan significativo que la mejora en la conductividad dada por las NpAu y SAMs no evitó que la respuesta de sensado disminuyera.

Otro punto importante a detallar es que las SAM presentaron un buen perfil electroquímico con el paso del tiempo, teniendo como conclusión que sufrirán un nivel de degradación significativo después de tres meses de haberlas fabricado si se conservan de manera adecuada. Sin embargo, esta degradación si bien hace imposible el utilizarlas para aplicaciones cuantitativas, pueden ser usadas para otros fines como en pruebas prácticas para la comprobación de algún protocolo experimental.

5.4 Detección de ácido úrico

Para el caso particular de la superficie de trabajo sin tratar no pudo obtenerse una detección adecuada del analito debido a la presencia de contaminantes en la superficie del electrodo, así como su nula activación.

Cuando no se posee un elemento de reconocimiento en la superficie de trabajo, la detección depende únicamente de las propiedades conductivas de la misma, debido a que en primera instancia las reacciones químicas presentes en la solución a través de las cuales se desea llevar a cabo el sensado de un analito, son originadas por acción

del potencial aplicado y no por algún catalizador específico que provoque su consumo. Para este trabajo las soluciones solo contenían AU, por lo cual la oxidación detectada por las superficies correspondía únicamente a la de estas moléculas, aun cuando no se tenía un elemento de reconocimiento. Por otra parte, si en las soluciones se presentara una mezcla de compuestos, la respuesta obtenida por las superficies con las características mencionadas sería una combinación de los procesos de oxidación de cada uno de los compuestos presentes, volviendo a la detección nada selectiva.

La incorporación del elemento de reconocimiento debe ser adecuada a las características del proceso llevado a cabo para la detección y de las soluciones que se desean analizar, razón por la cual la incorporación de estructuras que sirven de intermediario entre estos elementos y el soporte o superficie de trabajo es un tema creciente en el desarrollo de los biosensores, ya que no solo debe cuidarse la estabilidad y fuerza de unión con la superficie, sino que además se debe asegurar que las características catalíticas de dichos elementos permanezcan íntegros durante todo el ejercicio experimental.

Como se mencionó en el capítulo 4, el intervalo de referencia normal del AU en sangre es de 2.0 mg/dl - 6.0 mg/dl en mujeres, mientras que en hombres es de 2.5 mg/dl - 7.0 mg/dl, por lo que el sistema de sensado desarrollado en este trabajo debía cubrir este intervalo de detección para poder ser aplicado con fines funcionales. La concentración mínima de AU detectada fue de 1.68 mg/dl la cual incluso resulta ser menor a la de los estándares de salud, mientras que la máxima detectada fue de 336.20 mg/dl. Con base en lo anterior se puede decir que el biosensor implementado cumple con los requerimientos para el rango de detección requerido.

Para el caso del uso de la Uox inmovilizada por adsorción se tuvo un nivel de respuesta para cada una de las concentraciones medidas, a excepción de la mínima propuesta (5 μ M / 1.68 mg/dl), esto se debió a que a pesar de que se tiene un elemento de reconocimiento en la superficie, el proceso de inmovilización no es el más adecuado, ya que no favorece en ningún momento la fijación con la superficie ni

tampoco ayuda en la orientación de las enzimas inmovilizadas, lo cual lleva en primera instancia a tener poca estabilidad tanto química como mecánica, además de que al no estar las enzimas orientadas de manera adecuada provoca que exista un bloqueo físico de su sitio activo con la propia superficie o incluso entre ellas, dando lugar a su vez a un bloqueo que impide el análisis a concentraciones pequeñas, y en general a una deficiente detección del analito en comparación a cuando se llevan a cabo inmovilizaciones más específicas que buscan evitar estos inconvenientes. Se debe mencionar, que a pesar de que estén presentes SAM durante la inmovilización por adsorción esto no favoreció en nada la fijación con la superficie ni la orientación, ya que no hay una activación de los grupos funcionales que pueden reaccionar con la monocapa, por lo que su única función fue solo la de proteger a las enzimas de los efectos conductivos.

Cuando se utilizó la Uox inmovilizada sobre SAM por enlace covalente, además de que se pudo obtener una respuesta de sensado para todas las concentraciones incluyendo a la mínima, se presentó una mejora general en la detección de AU en comparación a cuando la enzima esta inmovilizada por adsorción, esto sucedió debido a que las SAM al ser tratadas con EDC y sulfo-NHS, y una vez que entran en contacto con la Uox, se activan los grupos carboxilo de la misma los cuales reaccionan con los grupos amina de las cadenas de CYS, esto favorece a una correcta orientación provocando que el sitio activo quede libre para que pueda unirse con las moléculas de AU, además de que la unión con la superficie resulta ser más fuerte y estable. Es en este tipo de procesos en donde sobresalió la importancia de la formación de las SAM para la posterior incorporación del elemento de reconocimiento. Además de resaltar que las SAMs por sí mismas pueden ser un sensor.

Para el caso de la inmovilización de la Uox por entrecruzamiento sobre las SAM, el procedimiento en general fue el mismo que cuando el proceso se realizó por enlace covalente. Sin embargo, la estructura de co-reticulado formado por las enzimas, permite que la unión a las moléculas de CYS sea de manera conjunta y no de manera individual como sucede con el método de enlace covalente. Esto provoca no solo que

se favorezca a la orientación de las enzimas, sino que además la estructura formada por enlaces entre cada una de ellas provoca que el conjunto gane fuerza y estabilidad extra, además de la proporcionada por la unión con la SAM. Aunado a lo anterior, estos efectos provocaron que la respuesta obtenida en la detección del AU aumente considerablemente en comparación a cuando se utilizan los métodos de inmovilización anteriormente mencionados.

Se debe recalcar que para el caso de las superficies con la Uox inmovilizada sobre una superficie con NpAu y SAM tanto por entrecruzamiento como enlace covalente, en donde debido a la parcial degradación de la enzima no se pudo obtener un perfil de detección completo, los aportes de los métodos de inmovilización junto con la presencia ya mencionada de las NpAu, se pudieron observar con los niveles de respuesta obtenidos para las concentraciones más altas, en donde destaca una mejora desde una corriente Ox promedio de 20.7833 μA correspondiente a una concentración de 1 mM / 336.20 mg/dl para una superficie Au/KOH/SAM/Uox por enlace covalente, hasta 30.81 μA para una superficie Au/KOH/SAM/NpAu/Uox, además de que para una superficie similar pero con la Uox inmovilizada por glutaraldehído el nivel de respuesta obtenido aumenta hasta los 33.35 μA , lo cual comprueba su mayor efectividad con respecto a los otros métodos.

Los efectos en el pH se vieron comprobados cuando las superficies modificadas completamente con el elemento de reconocimiento presentaron niveles de respuesta diferentes a los obtenidos cuando se utilizó el pH propuesto inicialmente, los cuales en general fueron deficientes debido a que la enzima trabajó a un valor alejado de su pH óptimo. Estos efectos se presentaron debido a una modificación en la actividad catalítica de las enzimas inmovilizadas provocando incluso procesos secundarios de oxidación, los cuales fueron identificados. Al dividir el proceso de oxidación en 2 partes fue posible para la superficie de trabajo detectar mínimas concentraciones de AU con el mínimo de actividad catalítica, ya que no existió una saturación total del elemento de reconocimiento.

La linealidad al igual que la sensibilidad del biosensor implementado tendió a aumentar conforme se avanzaba en la modificación de la superficie, debido a las características tanto electroquímicas como selectivas que iba ganando conforme avanzaba el proceso experimental. Teniendo así que la linealidad máxima alcanzada fue de 0.9915, lo cual comprueba una directa relación proporcional entre la corriente Ox obtenida como respuesta en función de las concentraciones de AU. Mientras que el grado de sensibilidad más alto para concentraciones molares fue de 0.2279, y para concentraciones en mg/dl de 0.6607, ambos correspondientes a una superficie Au/KOH/NpAu/SAM/Uox inmovilizada por entrecruzamiento, comprobando que esta fue la superficie mejor acondicionada y modificada para llevar a cabo la detección de las moléculas de AU en muestras controladas.

Por último, se comprobó la selectividad del biosensor implementado probando su superficie modificada en una solución de ácido ascórbico, el cual no puede oxidarse por la acción catalítica de la Uox. Al no contar con un analito afín al sitio activo de la enzima en la solución, esta provoca un bloqueo total en la superficie de trabajo impidiendo que se realice la detección de cualquier proceso o reacción llevada a cabo, por lo que la respuesta en corriente se vuelve nula comprobando que el biosensor es altamente selectivo a únicamente AU.

5.5 Trabajo a futuro

Como parte de los objetivos iniciales, se planteó utilizar métodos electroquímicos para la implementación de un biosensor catalítico. A partir de este punto los resultados obtenidos para el análisis de las superficies Au/KOH/NpAu/SAM/Uox fueron escasas para crear un perfil completo de respuesta en corriente Ox completo, en función de la concentración de las soluciones de AU analizadas, debido a que la Uox presento presumiblemente una degradación provocada por su avanzado tiempo de vida. Lo anterior no implica que el biosensor implementado a partir de las modificaciones indicadas no sea adecuado. Sin embargo, un tema interesante sería implementar una

superficie con una enzima completamente viable, la cual brinde más información con respecto a la detección de AU.

Dado que el protocolo implementado en este trabajo no está dirigido exclusivamente al uso de la enzima Uox como elemento de reconocimiento, sino al uso general de elementos proteicos. Lo cual abre la puerta a la implementación de biosensores que utilicen este tipo de elementos para un gran número de aplicaciones, no solo en el área biomédica sino también en áreas como la farmacéutica, ambiental o alimentaria. Entre los elementos de reconocimiento más atractivos se tienen a los anticuerpos, enzimas recombinantes, o incluso áptameros de ácidos nucleicos, los cuales presentan como principal desventaja su frágil manipulación, aunado a su alto costo. Sin embargo, el protocolo presentado en esta tesis representa una gran opción para el uso de este tipo de elementos en aplicaciones de sensado electroquímico, ya que se garantiza en cierta medida su protección contra los efectos de la conducción, así como también brinda una mayor estabilidad y fuerza de unión con el soporte utilizado, en comparación a lo ofrecido por métodos convencionales que no utilizan estructuras intermedias como lo son las SAM a base de tioles.

Así mismo, el uso de otras técnicas electroquímicas además de la voltamperometría cíclica, como pueden ser la amperometría o la impedanciometría, representan un tema de gran interés para enriquecer la información entregada por parte de los fenómenos redox presentes sobre la superficie del biosensor. Así como también ofrece un abanico de posibilidades para las aplicaciones de múltiples técnicas electroquímicas de sensado, dependiendo de la naturaleza del sistema o los sistemas a analizar.

Por último, a pesar de que la aun posible miniaturización de este biosensor no fue tomada en cuenta para este trabajo, se reconoce su importancia para trabajos futuros, en donde los conceptos y protocolos presentados en esta tesis pueden combinarse con los aspectos manejados en áreas tan específicas como la nanotecnología, con el objetivo de implementar biosensores cada vez más funcionales que buscan satisfacer las necesidades del mercado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] M. V. González, “Estudio de estrategias de inmovilización de biomoléculas sobre soportes rígidos para aplicación en microbiosensores,” Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain), 2012.
- [2] V. G. Rumayor, E. G. Iglesias, O. R. Galán, and L. G. Cabezas, *Aplicaciones de Biosensores en la Industria Agroalimentaria, Informe de vigilancia tecnológica*, Primera Ed. Confederación empresarial de Madrid-CEOE, Comunidad de Madrid: Consejería de Educación. Dirección General de Universidades e Investigación, 2005.
- [3] M. N. Velasco-Garcia and T. Mottram, “Biosensor Technology addressing Agricultural Problems,” *Biosyst. Eng.*, vol. 84, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2003.
- [4] L. D. Mello and L. T. Kubota, “Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries,” *Food Chem.*, vol. 77, no. 2, pp. 237–256, May 2002.
- [5] E. K. Pye and L. B. Wingard, “Enzyme Engineering,” *Science (80-.)*, no. 184, pp. 189–191, 1974.
- [6] M. Arroyo, “Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones,” *Ars Pharm.*, vol. 39, no. 2, pp. 111–127, 1998.
- [7] S. Zharikov *et al.*, “Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells,” *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 295, no. 5, pp. 1183–1190, 2008.
- [8] V. Z. Tabares, “Panorama Cuba y Salud Panorama Cuba y Salud,” *Panor. Cuba y Salud*, vol. 9, no. 3, pp. 42–47, 2014.
- [9] M. Oda, Y. Satta, O. Takenaka, and N. Takahata, “Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 19, no. 5, pp. 640–653, 2002.
- [10] X. Wu, D. M. Muzny, C. Chi Lee, and C. Thomas Caskey, “Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution,” *J. Mol. Evol.*, vol. 34, no. 1, pp. 78–84, 1992.
- [11] G. Ruiz, A. Souki, S. Martínez, C. Cano, M. Vargas, and M. Garcia, “Ácido úrico:

- antioxidante o factor de riesgo cardiovascular. Dos caras de una misma moneda,” *Síndrome Cardiometabólico*, vol. 3, no. 1, pp. 1–5, 2015.
- [12] D. Wei *et al.*, “Catalytic Mechanisms for Cofactor-Free Oxidase-Catalyzed Reactions: Reaction Pathways of Uricase-Catalyzed Oxidation and Hydration of Uric Acid,” *ACS Catal.*, vol. 7, no. 7, pp. 4623–4636, 2017.
- [13] K. Chaudhary, K. Malhotra, J. Sowers, and A. Aroor, “Uric acid-key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome,” *CardioRenal Med.*, vol. 3, no. 3, pp. 208–220, 2013.
- [14] M. Jin *et al.*, “Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases,” *Front. Biosci.*, vol. 17, no. 2, pp. 656–669, 2012.
- [15] A. K. Tausche, T. L. Jansen, H. E. Schröder, S. R. Bornstein, M. Aringer, and U. Müller-Ladner, “Gicht - Aktuelle aspekte in diagnostik und therapie,” *Dtsch. Arztebl.*, vol. 106, no. 34–35, pp. 549–555, 2009.
- [16] D. Grassi *et al.*, “Chronic Hyperuricemia, Uric Acid Deposit and Cardiovascular Risk,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 13, pp. 2432–2438, 2013.
- [17] P. Richette and T. Bardin, “Considerations on gotta, uric acid and cardiovascular risk. Evidences of controversial aspects and future perspectives cristal,” *Gout. Lancet.*, vol. 9711, no. 375, pp. 318–328, 2010.
- [18] B. M. Esteban, M. G. Fernández, and L. T. Casares, *Diagnóstico y tratamiento en enfermedades metabólicas.*, Primera Ed. Madrid, España: Diaz de Santos, 1997.
- [19] L. H. Avendaño, *Nefrología Clínica*, Tercera Ed. Madrid, España: Medica Panamericana, 2008.
- [20] N. E. Martín and V. G. Nieto, “Hypouricemia and tubular transport of uric acid,” *Nefrología*, vol. 1, no. 31, pp. 44–50, 2011.
- [21] S. Santana, L. Muñiz, J. Larramendis, J. Melián, and J. Suardíaz, “Estado del Arte de la en la determinación del ácido úrico,” *Rev Mex Patol Clin*, vol. 48, no. 4, pp. 209–218, 2001.
- [22] J. A. Banda, “Detección amperométrica altamente selectiva de ácido úrico en suero sanguíneo humano mediante electrodos de carbón vítreo modificados con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina y dendrímeros de

- poli(amidoamina) generación 4.5,” Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ)., 2015.
- [23] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, “Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 1–2, pp. 121–131, 2001.
- [24] D. Belén and C. Ec, “Biosensores y sistemas ópticos y de visión avanzados: su aplicación en la evaluación de la calidad de productos IV gama,” *Agrociencia Uruguay*, vol. 22, no. 1, pp. 13–25, 2018.
- [25] O. A. Correa, F. H. Parra, and G. K. Hoyos, “Diagnóstico molecular y biosensores,” Córdoba, Colombia, 2015.
- [26] R. P. Areny, *Sensores y Acondicionadores de Señal*, Cuarta Edi. Marcombo, 2003.
- [27] S. F. D’Souza, “Microbial biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 6, pp. 337–353, Aug. 2001.
- [28] O. D. Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, and M. J. A. Martínez, “Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications,” *Talanta*, vol. 73, no. 2, pp. 202–219, 2007.
- [29] J. Burjes, “Estudio de Sensores Electroquímicos Flexibles,” Universidad de Burgos, 2013.
- [30] L. P. Castro, “Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México,” *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 1, no. 23, pp. 35–45, 2007.
- [31] E. V. De Eurice, *Biología: La ciencia de la vida*, Segunda Ed. Ciudad de México, México: MCGraw-Hill, 2012.
- [32] M. G. Garibay, *Biología alimentaria*, Quinta Edi. Ciudad de México, México: LIMUSA, 2004.
- [33] J. M. Berg, *Bioquímica*, Sexta Edic. Barcelona, España: Reverte S.A., 2007.
- [34] T. McKee, *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida*, Cuarta Edi. Bogotá, Colombia: MCGraw-Hill, 2014.
- [35] D. Pacheco, *Bioquímica médica*, Primera Ed. Ciudad de México, México: LIMUSA, 2004.
- [36] T. Ahuja, V. K. Tanwar, S. K. Mishra, D. Kumar, A. M. Biradar, and Rajesh,

- “Immobilization of uricase enzyme on self-assembled gold nanoparticles for application in uric acid biosensor,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 11, no. 6, pp. 4692–4701, 2011.
- [37] E. R. Jiemenez and L. D. Zuñiga, ““ Estudio Por Homología De La Enzima Uricasa Obtenida Del Hongo Candida ,” *Memorias del XXXVIII Congr. Nac. Ing. Biomed.*, vol. 1, no. 2, pp. 200–203, 2015.
- [38] P. A. Tipton, *Urate oxidase: Single-turnover stopped-flow techniques for detecting two discrete enzyme-bound intermediates*, vol. 354, no. 1997. Elsevier Science (USA), 2002.
- [39] K. Kahn and P. A. Tipton, “Kinetic mechanism and cofactor content of soybean root nodule urate oxidase,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 16, pp. 4731–4738, 1997.
- [40] R. F. Taylor, I. G. Marenchic, and R. H. Spencer, “Antibody- and receptor-based biosensors for detection and process control,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 249, no. 1, pp. 67–70, 1991.
- [41] P. B. Bosquet, “Nuevos métodos para la inmovilización de anticuerpos sobre soportes sólidos,” Universidad Autónoma de Madrid, 2009.
- [42] W. Hartmeier, “Immobilized biocatalysts - From simple to complex systems,” *Trends Biotechnol.*, vol. 3, no. 6, pp. 149–153, 1985.
- [43] K. Martinek and V. V. Mozhaev, “Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry.,” *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, vol. 57, pp. 179–249, 1985.
- [44] L. Cedillo- Romero, C. M. Hernández-Mejía, A. Zapata-Sánchez, N. Balagurusamy, and M. P. Escareño-Luévanos, “Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas,” *Rev. Cient. la Univ. Auton. Coahuila*, vol. 6, no. 11, pp. 1–9, 2014.
- [45] A. M. Klibanov, “Immobilized enzymes and cells as practical catalysts,” *Biotechnol. Biol. Front.*, pp. 230–241, 2019.
- [46] A. M. Klibanov, N. O. Kaplan, and M. D. Kamen, “A rationale for stabilization of oxygen labile enzymes: Application to a clostridial hydrogenase,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 75, no. 8, pp. 3640–3643, 1978.
- [47] M. Reslow, P. Adlercreutz, and B. Mattiasson, “On the importance of the support material for bioorganic synthesis. Influence of water partition between solvent,

- enzyme and solid support in water-proof reaction media,” *Eur. J. Biochem.*, no. 172, pp. 573–578, 1988.
- [48] L. Goldstein, “Kinetic Behavior of Immobilized Enzyme Systems,” *Methods Enzymol.*, vol. 44, no. C, pp. 397–443, 1976.
- [49] W. E. Hornby, M. D. Lilly, and E. M. Crook, “Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose,” *Biochem. J.*, vol. 107, no. 5, pp. 669–674, 1968.
- [50] I. V. Berezin, A. M. Klibanov, and K. Martinek, “Kinetic-thermodynamic aspects of catalysis by immobilized enzymes,” *Russ. Chem. Rev.*, no. 44, pp. 17–47, 1975.
- [51] E. Katchalski, I. Silman, and R. Goldman, “Effect of the Microenvironment on the Mode of Action of Immobilized Enzymes,” *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, vol. 34, pp. 445–536, 2006.
- [52] P. Roca, *Bioquímica: Técnicas y métodos*, Primera Ed. Madrid, España: Hélice, 2003.
- [53] F. Castillo, *Bioteología ambiental*, Primera Ed. Madrid, España: Tébar, 2005.
- [54] J. M. Cooper and A. E. G. Cass, *Biosensors: a practical approach*, Segunda Ed. Londres, Reino Unido: Oxford, 2004.
- [55] E. Julve, “Teoría de la electrodeposición de metales. Parámetros que controlan dicha deposición y control de calidad de los electrodeósitos metálicos obtenidos,” *Rev. Química*, vol. 3, no. 2, pp. 201–219, 1989.
- [56] E. Julve, “La electrodeposición de metales industriales en el actual mundo tecnológico,” *Ing. Química*, no. 464, pp. 78–92, 2008.
- [57] M. Ramos and C. Castillo, “Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas,” *CONCYTEG*, no. 72, pp. 629–646, 2011.
- [58] M. Agüí Chicharro, P. Yáñez Sedeño, A. González Cortés, and M. Mena, “Biosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro,” *An. la Real Soc. Española Química*, no. 3, pp. 12–16, 2005.
- [59] R. A. Sperling and W. J. Parak, “Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal Inorganic nanoparticles,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 368, no. 1915, pp. 1333–1383, 2010.

- [60] M. C. Fraile Romero, "Estudio de las interacciones entre nanopartículas de metales nobles y ADN," Universidad de Sevilla, 2016.
- [61] G. Cao, *Nanoestructuras y nanomateriales*, Primera Ed. Washington DC, EUA: Imperial College Press, 2004.
- [62] M. G. Friederici, "Nanopartículas de Au y Pd: Síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas," Universidad de Barcelona, 2013.
- [63] L. Marzan, "Nanometals formation and color," *Mater. Today*, vol. 2, no. 7, pp. 26–31, 2004.
- [64] I. Quiros, M. Yamada, K. Kubo, J. Mizutani, M. Kurihara, and H. Nishihara, "Preparation of alkanethiolate-protected palladium nanoparticles and their size dependence on synthetic conditions," *Langmuir*, vol. 18, no. 4, pp. 1413–1418, 2002.
- [65] M. S. El-Deab, T. Okajima, and T. Ohsaka, "Electrochemical Reduction of Oxygen on Gold Nanoparticle-Electrodeposited Glassy Carbon Electrodes," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 150, no. 7, p. A851, 2003.
- [66] J. Clavijo, "Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM)," *Elementos*, vol. 3, no. 3, 2013.
- [67] A. Vilà *et al.*, "SEM/FIB for characterization of nanosized imagers," *Procedia Eng.*, vol. 5, pp. 697–700, 2010.
- [68] O. R. Rocha, "Estudio teórico y experimental de nanopartículas bimetálicas de AgCu empleando síntesis verde," Universidad de Sonora, 2015.
- [69] S. Hayashi and H. Kanamori, "Raman scattering from the surface phonon mode in GaP microcrystals," *Phys. Rev. B*, vol. 26, no. 12, pp. 7079–7082, 1982.
- [70] T. M. Piqué and A. Vázquez, "Concreto y cemento: Investigación y desarrollo.," *Concreto y Cem. Investig. y Desarro.*, vol. 3, no. 2, pp. 62–71, 2012.
- [71] B. J. Allen, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Primera Ed. Toronto, Canadá: John Wiley & Sons, 1980.
- [72] J. E. Aldrete, "Electrodos de pasta de carbón modificados con residuos de café para cuantificar metales pesados en solución acuosa," Universidad Autónoma de Nuevo León, 2012.
- [73] G. Roa, "Diseño y caracterización de Electroodos de Pasta de Carbono

modificados con ciclodextrinas: Aplicación en la determinación de metales pesados y determinación de sus complejos de inclusión,” Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, 2003.

- [74] R. A. Salas, “Culminación del diseño y fabricación de un instrumento potenciostato inteligente programable,” Universidad de los Andes, 2008.
- [75] S. Ferretti, S. Paynter, D. A. Russell, K. E. Sapsford, and D. J. Richardson, “Self-assembled monolayers: A versatile tool for the formulation of bio- surfaces,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 19, no. 9, pp. 530–540, 2000.
- [76] T. Wink, S. J. Van Zuilen, A. Bult, and W. P. Van Bennekom, “Self-assembled monolayers for biosensors,” *Analyst*, vol. 122, no. 4, pp. 43–50, 1997.
- [77] E. E. Reid, *Organic Chemistry of Bivalent Sulfur: Volumen 1*, Primera Ed. New York, EUA: Chemical Publishing Company, 1958.
- [78] A. Kudelski, “Raman study on the structure of Cysteamine Monolayers on Silver,” *Langmuir*, vol. 502–503, no. 15, pp. 3162–3168, 1999.
- [79] O. Azzaroni, “Desarrollo de Métodos Alternativos de Micro- y Nanofabricación Utilizando Autoensamblados Moleculares sobre Superficies Sólidas,” Universidad Nacional de la Plata, 2004.
- [80] A. Michota, A. Kudelski, and J. Bukowska, “Molecular structure of cysteamine monolayers on silver and gold substrates,” *Surf. Sci.*, vol. 502–503, pp. 214–218, 2002.
- [81] R. . Torrente, “Bioplataformas electroanalíticas versátiles para diagnóstico temprano y fiable de cáncer a diferentes niveles moleculares,” Universidad Complutense de Madrid, 2019.
- [82] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 489–511, May 2012.
- [83] N. Chauhan, A. Kumar, and C. S. Pundir, “Construction of an Uricase Nanoparticles Modified Au Electrode for Amperometric Determination of Uric Acid,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 174, no. 4, pp. 1683–1694, 2014.
- [84] F. Rojas, “Inmovilización de enzimas en esteres cinámicos de carbohidratos: Nuevos soportes fotoentrecruzables,” Universidad de Murcia, 2002.

- [85] J. Madoz, B. A. Kuznetsov, F. J. Medrano, J. L. Garcia, and V. M. Fernandez, "Functionalization of gold surfaces for specific and reversible attachment of a fused β -galactosidase and choline-receptor protein," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 5, pp. 1043–1051, 1997.
- [86] I. M. Pepe and C. Nicolini, "Langmuir-Blodgett films of photosensitive proteins," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 33, no. 3, pp. 191–200, 1996.
- [87] J. M. Abad *et al.*, "Immobilization of peroxidase glycoprotein on gold electrodes modified with mixed epoxy-boronic acid monolayers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 43, pp. 12845–12853, 2002.
- [88] A. Mulyasuryani and A. Srihardiastutie, "Conductimetric biosensor for the detection of uric acid by immobilization uricase on nata de coco membrane-Pt electrode," *Anal. Chem. Insights*, vol. 6, no. 1, pp. 47–51, 2011.
- [89] J. de Fátima Giarola, V. Mano, and A. C. Pereira, "Development and Application of a Voltammetric Biosensor Based on Polypyrrole/uricase/graphene for Uric Acid Determination," *Electroanalysis*, vol. 30, no. 1, pp. 119–127, 2018.
- [90] R. K. Mendes, R. F. Carvalhal, and L. T. Kubota, "Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 612, no. 2, pp. 164–172, 2008.
- [91] G. Suárez, R. J. Jackson, J. A. Spoons, and C. J. McNeil, "Chemical introduction of disulfide groups on glycoproteins: A direct protein anchoring scenario," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 5, pp. 1961–1969, 2007.
- [92] J. C. Pyun, S. D. Kim, and J. W. Chung, "New immobilization method for immunoaffinity biosensors by using thiolated proteins," *Anal. Biochem.*, vol. 347, no. 2, pp. 227–233, 2005.
- [93] C. Vericat *et al.*, "Self-assembled monolayers of thiolates on metals: A review article on sulfur-metal chemistry and surface structures," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 53, pp. 27730–27754, 2014.
- [94] O. Rüdiger, J. M. Abad, E. C. Hatchikian, V. M. Fernandez, and A. L. De Lacey, "Oriented immobilization of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H₂," *J. Am. Chem.*

- Soc., vol. 127, no. 46, pp. 16008–16009, 2005.
- [95] P. R. Matheus, J. M. Abad, and V. M. Fernández, “Modificación de superficies de oro para la inmovilización orientada de peroxidasa de rábano recombinante,” *Rev. Tec. la Fac. Ing. Univ. del Zulia*, vol. 30, no. 3, pp. 225–235, 2007.
- [96] R. Rawal, S. Chawla, N. Chauhan, T. Dahiya, and C. S. Pundir, “Construction of amperometric uric acid biosensor based on uricase immobilized on PBNPs/cMWCNT/PANI/Au composite,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 50, no. 1, pp. 112–118, 2012.
- [97] R. Suryani, “Biosensor H₂O₂ by Using Immobilized Horseradish Peroxidase Glutaraldehyde on Carbon Polyaniline Nanofiber Composite,” *Enzym. Eng.*, vol. 05, no. 01, pp. 1–5, 2016.
- [98] S. Piermarini *et al.*, “Uricase biosensor based on a screen-printed electrode modified with Prussian blue for detection of uric acid in human blood serum,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 179, pp. 170–174, 2013.
- [99] R. Devi and C. S. Pundir, “Construction and application of an amperometric uric acid biosensor based on covalent immobilization of uricase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g- polyaniline composite film electrodeposited on Pt electrode,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 193, pp. 608–615, 2014.
- [100] R. Jirakunakorn, S. Khumngern, J. Choosang, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, and A. Numnuam, “Uric acid enzyme biosensor based on a screen-printed electrode coated with Prussian blue and modified with chitosan-graphene composite cryogel,” *Microchem. J.*, vol. 154, no. December 2019, p. 104624, 2020.
- [101] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, and J. M. Savéant, “Analyzing Product Inhibition and pH Gradients in Immobilized Enzyme Films As Illustrated Experimentally by Immunologically Bound Glucose Oxidase Electrode Coatings,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, no. 40, pp. 8532–8537, 1999.
- [102] Metrohm, “Autolab 910 PSTAT mini: Manual en línea,” 2020. [Online]. Available: <https://www.metrohm.com/es-mx/productos-general/electroquímica/portable-potentiostats/29100010>. [Accessed: 23-Jul-2020].
- [103] L. M. Fischer *et al.*, “Gold cleaning methods for electrochemical detection

- applications,” *Microelectron. Eng.*, vol. 86, no. 4–6, pp. 1282–1285, 2009.
- [104] A. L. Possan, “Biosensor magnetoelástico para la detección de *Escherichia coli*,” Universidad de Caxias do Sul, 2015.
- [105] J. Kim *et al.*, “Wearable salivary uric acid mouthguard biosensor with integrated wireless electronics,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 74, pp. 1061–1068, 2015.
- [106] A. Tlili, A. Abdelghani, S. Hleli, and M. A. Maaref, “Electrical characterization of a thiol SAM on gold as a first step for the fabrication of immunosensors based on a quartz crystal microbalance,” *Sensors*, vol. 4, no. 6–7, pp. 105–114, 2004.
- [107] Y. M. Wang *et al.*, “Poly(acrylic acid) brushes pattern as a 3D functional biosensor surface for microchips,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 266, pp. 313–318, 2013.

APENDICE: CALCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES QUIMICAS

Ferricianuro de potasio/Cloruro de Potasio (Para 100 ml a 5 mM / 100 mM)

Ferricianuro de potasio.

Formula química: $K_3[Fe(CN)_6]$

Peso Molecular: 329.24 g/mol

Cloruro de Potasio.

Formula química: KCl

Peso Molecular: 74.65 g/mol

$$M_{\text{Ferri}} = \frac{5 \times 10^{-3} \text{ M}}{1 \text{ lt}} (100 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 0.5 \text{ mM}$$

$$X_{\text{Ferri}} = 0.5 \times 10^{-3} \text{ mol} * \left(\frac{329.24 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1 \text{ mol}} \right) = \mathbf{164.62 \text{ mg}}$$

$$M_{\text{KCl}} = \frac{100 \times 10^{-3} \text{ M}}{1 \text{ lt}} (100 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 10 \text{ mM}$$

$$X_{\text{KCl}} = 10 \times 10^{-3} \text{ mol} * \left(\frac{74.65 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1 \text{ mol}} \right) = \mathbf{745.5 \text{ mg}}$$

Disolver en 100 ml de agua mili-Q, 164.62 mg de $Fe(CN)_6$, junto con 745 mg de KCl.

Hidróxido de sodio en peróxido de hidrógeno (Para 5 ml a 50 mM de KOH)

Hidróxido de potasio

Formula química: KOH

Peso Molecular: 56.10 g/mol

Peróxido de hidrógeno

Formula química: H₂O₂

Peso Molecular: 34.01 g/mol

$$M_{KOH} = \frac{50 \times 10^{-3} \text{ M}}{1 \text{ lt}} (5 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 250 \text{ } \mu\text{M}$$
$$X_{KOH} = 250 \times 10^{-6} \text{ mol} * \left(\frac{56.10 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1 \text{ mol}} \right) = \mathbf{14.025 \text{ mg}}$$

Ajuste de pureza al 88%.

$$X_{KOH} = 14.025 \times 10^{-3} \text{ g} * \left(\frac{100}{88} \right) = \mathbf{15.937 \text{ mg}}$$

Disolver en 5 ml de H₂O₂ al 30%, 15.937 mg de KOH.

Solución coloidal de NpAu (250 ml de ácido cloroáurico a 1 mM, en ácido sulfúrico a 0.5 M)

Ácido cloroáurico

Formula química: H₂AuCl₄

Peso molecular: 339.78 g/mol

Ácido sulfúrico

Formula química: H₂SO₄

Peso molecular: 98.79 g/mol

Densidad: 1.83 g/ml

$$M_{H_2AuCl_4} = \frac{1 \times 10^{-3} M}{1 \text{ lt}} (250 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 250 \mu M$$

$$X_{H_2AuCl_4} = 250 \times 10^{-6} \text{ mol} * \left(\frac{339.78 \frac{g}{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = \mathbf{84.94 \text{ mg}}$$

$$M_{H_2SO_4} = \frac{500 \times 10^{-3} M}{1 \text{ lt}} (250 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 125 \text{ mM}$$

$$X_{H_2SO_4} = 0.125 \text{ mol} * \left(\frac{98.79 \frac{g}{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = 12.25 \text{ mg}$$

Ajuste de pureza para el H₂SO₄ al 98%

$$X_{CYS} = 12.25 \times 10^{-3} \text{ g} * \left(\frac{100}{98} \right) = \mathbf{12.51 \text{ mg}}$$

$$V_{H_2SO_4} = \frac{12.51 \text{ g}}{1.83 \frac{g}{ml}} = \mathbf{6.84 \text{ ml}}$$

Agregar 6.84 ml de H₂SO₄ en 250 ml de agua bidestilada, posteriormente disolver 84.94 mg de H₂AuCl₄. (Se recomienda el uso de una campana de extracción)

Solución de Cisteamina (Para 50 ml a 20 mM)

Diclorhidrato de Cisteamina

Formula química: $C_4H_{12}N_2S_2 - 2HCl$

Peso Molecular: 225.20 g/mol

$$M_{CYS} = \frac{20 \times 10^{-3} M}{1 \text{ lt}} (50 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 1 \text{ mM}$$

$$X_{CYS} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} * \left(\frac{225.20 \frac{g}{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = 225.2 \text{ mg}$$

Ajuste de pureza al 96%.

$$X_{CYS} = 225.2 \times 10^{-3} g * \left(\frac{100}{96} \right) = 234.5 \text{ mg}$$

En una solución con 5 ml de agua bidestilada y 45 ml de etanol puro, disolver 234.5 mg de Diclorhidrato de Cisteamina. Ajustar pH a 7.2.

Solución EDC/Sulfo-NHS (Para 10 ml a 100 mM / 20 mM)

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

Formula química: C₈H₁₇N₃

Peso molecular: 297.18 g/mol

N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS)

Formula química: C₄H₄NO₆SNa

Peso molecular: 217.13 g/mol

$$M_{EDC} = \frac{100 \times 10^{-3} \text{ M}}{1 \text{ lt}} (10 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 1 \text{ mM}$$

$$X_{EDC} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} * \left(\frac{297.18 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1 \text{ mol}} \right) = 297.18 \text{ mg}$$

$$M_{Sulfo-NHS} = \frac{20 \times 10^{-3} \text{ M}}{1 \text{ lt}} (10 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 200 \text{ } \mu\text{M}$$

$$X_{Sulfo-NHS} = 200 \times 10^{-6} \text{ mol} * \left(\frac{217.13 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1 \text{ mol}} \right) = 43.42 \text{ mg}$$

Ajuste de pureza para el Sulfo-NHS al 97%

$$X_{Sulfo-NHS} = 43.42 \times 10^{-3} \text{ g} * \left(\frac{100}{97} \right) = 44.76 \text{ mg}$$

Disolver en 10 ml de agua mili-Q, 297.18 mg de EDC junto con 44.76 mg de Sulfo-NHS. Ajustar pH a 7.2.

Solución madre de ácido úrico (50 ml a 1 mM)

Ácido úrico

Formula química: $C_5H_4N_4O_3$

Peso molecular: 168.11 g/mol

$$M_{AU} = \frac{1 \times 10^{-3} M}{1 \text{ lt}} (50 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 50 \mu M$$

$$X_{AU} = 50 \times 10^{-6} \text{ mol} * \left(\frac{168.11 \frac{g}{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = 8.41 \text{ mg}$$

Disolver en buffer PBS, 8.41 mg de ácido úrico. Ajustar pH a 7.4.

Soluciones de ácido úrico a diferente concentración.

A partir de la solución madre de ácido úrico, tomar el volumen señalado en Tabla A, y aforar al volumen deseado con buffer PBS.

Tabla A. Volúmenes en ml necesarios a partir de una solución de ácido úrico de 1 mM para obtener una solución de volumen específico a concentración específica.

Concentración deseada de ácido úrico	Para 25 ml	Para 50 ml	Para 75 ml	Para 100 ml
5 mM	0.125	0.250	0.375	0.500
50 mM	1.25	2.5	3.75	5.0
100 mM	2.5	5.0	7.5	10.0
200 mM	5.0	10.0	15.0	20.0
500 mM	12.5	25.0	37.5	50.0

Solución de ácido ascórbico (Para 50 ml a 1 mM)

Acido ascórbico

Formula química: $C_6H_8O_6$

Peso molecular: 176.12 g/mol

$$M_{ASC} = \frac{1 \times 10^{-3} M}{1 \text{ lt}} (50 \times 10^{-3} \text{ lt}) = 50 \mu M$$

$$X_{ASC} = 50 \times 10^{-6} \text{ mol} * \left(\frac{176.12 \frac{g}{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = 8.806 \text{ mg}$$

Disolver en buffer PBS, 8.806 mg de ácido ascórbico. Ajustar el pH a 7.4.