



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Sensor electroquímico de lactato basado en
el nanocomposite Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺
para el análisis de vinos**

Autor:

Vizcaya Antolín, David

Tutor:

**Rodríguez Méndez, María Luz
Departamento de Química Inorgánica
Fernández Blanco, Ana Cristina
Departamento de Química Inorgánica**

Valladolid, Julio 2017.

Agradecimientos

Quisiera agradecer, en primer lugar, a la doctora María Luz Rodríguez Méndez por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo dentro de su grupo compartiendo conmigo su experiencia y conocimientos, y por haberme prestado su ayuda siempre que así lo he requerido.

Este trabajo ha sido realizado bajo la supervisión de la doctora Ana Cristina Fernández Blanco, a quien me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento por su valiosa dirección durante todos estos meses, sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

También me gustaría dedicar unas palabras de agradecimientos a todos y cada uno de los demás miembros del laboratorio, por hacerme sentir uno más desde el primer día, haciéndome mucho más sencilla la realización de este trabajo.

Por último, agradecer a mi familia y a mis amigos, por su apoyo incondicional en todo momento.

Resumen

El lactato es un compuesto clave en el metabolismo humano, cuya detección es de gran utilidad en diagnóstico clínico, medicina deportiva e industria alimentaria. Los biosensores electroquímicos surgen ante las desventajas de los métodos de medida tradicionales: costosos y requieren un pretratamiento de las muestras.

En este trabajo, se explica la preparación de un biosensor amperométrico mediante la electrodeposición de un composite de polipirrol y nanopartículas de oro (Ppy/AuNPs) modificado con la enzima lactato deshidrogenasa *L*-LDH. Esta enzima se inmoviliza junto a la coenzima NAD⁺ mediante entrecruzamiento con glutaraldehído.

Se ha evaluado el comportamiento del electrodo en términos del límite de detección, sensibilidad e interacción entre el analito y la enzima. Para su optimización, se ha probado con distintas condiciones de preparación del electrodo y concentraciones de la enzima. Por último, se ha estudiado la selectividad del biosensor y comprobado su funcionamiento en la medición de muestras reales de vino.

Palabras clave

Lactato, Biosensor, Electroquímica, Enzima *L*-LDH, Vino.

Abstract

Lactate is a key compound in human metabolism. Lactate detection is useful in clinical diagnosis, sport medicine and food industry. Electrochemical biosensors have arisen due to the drawbacks of traditional methods: high prize and need a difficult sample preparation.

In this work, a voltamperometric biosensor has been prepared through electrodeposition of polypyrrole and gold nanoparticles composite (Ppy/AuNPs). Enzyme lactate dehydrogenase *L*-LDH and cofactor NAD⁺ were subsequently immobilized onto the composite film via cross-linking with glutaraldehyde.

The electrode has been evaluated in terms of limit of detection, sensitivity and interaction between enzyme and analyte. Preparation conditions and enzyme concentration were optimized. Biosensor selectivity has also been evaluated and the applicability of the biosensor for the analysis of lactate in wines has been demonstrated successfully.

Keywords

Lactate, Biosensor, Electrochemistry, Enzyme *L*-LDH, Wine.

Índice

1. Introducción y Objetivos	1
2. Desarrollo del TFG	7
2.1. Estado del arte.....	7
2.2. Teoría.....	17
2.2.1. Electroquímica.....	17
2.2.2. Cálculo del límite de detección	20
2.2.3. Comportamiento enzimático	21
2.2.4. Estudio de selectividad.....	22
2.2.5. Espectroscopia UV-Vis.....	22
2.3. Materiales y equipo empleado	24
2.3.1. Equipos	24
2.3.2. Materiales.....	24
2.4. Desarrollo experimental.....	26
2.4.1. Preparación del sensor electroquímico.....	26
2.4.2. Determinación de lactato	31
2.4.3. Medición de muestras de vino: determinación de la concentración de lactato de sodio en vino	35
2.5. Resultados y discusión	38
2.5.1. Electrodo de trabajo de oro	38
2.5.2. Electrodo de carbono vítreo	48
2.5.3. Optimización del electrodo.....	50
2.5.4. Medición de vinos	55
2.5.5. Estudio de la selectividad del biosensor	59
3. Conclusiones.....	65
4. Bibliografía	69

Introducción y Objetivos

1. Introducción y Objetivos

1.1. Introducción

El grupo UVaSens nace en 1992, situándose su sede en la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid, desarrollando su trabajo principalmente en el laboratorio de Química Inorgánica. El grupo cuenta con integrantes de distintas disciplinas: químicos, físicos e ingenieros que desarrollan dos líneas de investigación principalmente:

- Línea de investigación aplicada: orientada al desarrollo de lenguas y narices electrónicas, que permiten analizar distintos alimentos mediante una red de sensores voltamperométricos modificados con nanopartículas. Actualmente, se está trabajando en un prototipo de lengua electrónica para el análisis de vinos y mostos.
- Línea de investigación básica: estudia la preparación y caracterización de películas nanoestructuradas. Para generar estas películas se emplean las técnicas de *Langmuir-Blodgett* [1] y *layer-by-layer* [2] para su posterior aplicación en sensores resistivos para la detección de gases y electroquímicos para la detección de líquidos.

En lo que al desarrollo de biosensores se refiere, se han publicado artículos sobre distintos mediadores electrónicos como composites de PEDOT/nanopartículas o PEDOT/ftalocianinas [3] o las ventajas que conllevan los electrodos serigrafiados en la medición de uvas [4].

Nuestro trabajo sigue la línea de investigación del artículo *Electrochemical behavior of polypyrrol/AuNP composites deposited by different electrochemical methods: sensing properties towards catecol* [5]. Este artículo se centra en la preparación, caracterización y comportamiento del composite de polipirrol y nanopartículas de oro (Ppy/AuNPs) para la determinación de catecol.

En la actualidad, existe un gran interés en el desarrollo de sensores rápidos, precisos y reproducibles para la medición de lactato, debido a la importancia de la medida de este compuesto en el diagnóstico clínico [6], la medicina deportiva [7] y la industria alimentaria [8]. Los métodos tradicionales de medida presentan ciertas desventajas que han provocado un gran desarrollo de los biosensores, que suponen un método de medida sensible, selectivo y rápido [9].

En los últimos años se ha trabajado con distintos nanomateriales, enzimas, formas de preparación de los biosensores, etc. para optimizar las características de mayor interés.

Principalmente, lo que se busca en un biosensor es que sea capaz de dar una medición fiable y rápida. Siguiendo esta línea, D. Calabria *et al.* han desarrollado un biosensor basado en la tecnología *smartphone*, que permite una medición rápida de lactato en fluidos orales dentro del rango habitual de concentraciones (límites de detección de $1 \cdot 10^{-4}$ M) [10]. Otros sensores desarrollados buscan límites de detección más bajos, empleando materiales que optimizan la respuesta del electrodo. Por ejemplo, un biosensor basado en la enzima lactato oxidasa, que se inmoviliza en un composite formado por nanotubos de carbono de pared múltiple, nanopartículas de cobre y polianilina. Este biosensor tiene un límite de detección de $2.5 \cdot 10^{-7}$ M y, además, presenta una rápida respuesta (5 segundos) y una gran estabilidad, permitiendo su uso en 180 ocasiones en un período de 140 días [11].

En otros casos, el objetivo principal es que la medida sea lo menos agresiva en análisis clínicos. Para ello se fabrican biosensores para la medición de fluidos distintos de la sangre, para que la toma de muestras no sea invasiva, y que son, generalmente, de tercera generación, ya que estos no requieren de mediadores electrónicos (algunos de ellos tóxicos) ni otros materiales exógenos. Recientemente, se ha desarrollado un biosensor para la medición de lactato en la de saliva y el sudor basado en flavocitocromo b2 inmovilizado en *nanoclusters* de oro [12].

Otros estudios han ido dirigidos a la fabricación de biosensores autoalimentados, es decir, que no requieran de un potencial externo para la medición de lactato. Uno de ellos emplea la enzima lactato oxidasa que se inmoviliza con ferrocianuro de dimetilo modificado con polietilenimina lineal (LPEI). Este electrodo actúa como ánodo, emparejándose con el cátodo, que mide la concentración de lactato gracias a la densidad de corriente electrónica que le proporciona el ánodo [9].

Apoyándonos en estudios previos realizados por el grupo de investigación UVaSens, se ha desarrollado un biosensor electroquímico basado en el composite de polipirrol y nanopartículas de oro (Ppy/AuNPs) [5] y modificado con la enzima L-LDH, inmovilizada conjuntamente a la coenzima NAD⁺ mediante entrecruzamiento con glutaraldehído.

1.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es diseñar un biosensor para la detección y medida del lactato en disoluciones. Debe ser capaz de detectar bajas concentraciones (bajo límite de detección) y de distinguir pequeños cambios en la medida (buena sensibilidad).

Una vez desarrollado el biosensor, valorar si su funcionamiento es correcto, viendo cómo pueden afectar la presencia de distintos compuestos a su medida (selectividad) y si se puede utilizar para analizar muestras de vino.

Desarrollo del TFG

2. Desarrollo del TFG

2.1. Estado del arte

El lactato es la forma ionizada del ácido láctico, un compuesto químico cuya fórmula molecular es $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$ con importantes funciones en procesos bioquímicos, como la fermentación láctica, en la que, en condiciones anaeróbicas, el piruvato se reduce a ácido láctico. Este piruvato se obtiene a partir de la glucosa mediante la glucólisis, una vía metabólica que consta de 10 reacciones catalizadas por enzimas en las que se forman también dos moléculas de ATP y dos de NADH. En la fermentación láctica, se produce la reducción del piruvato a lactato, regenerándose el NAD^+ , lo que permite que la glucólisis siga teniendo lugar [13]. Estas dos reacciones están representadas en la figura 1:

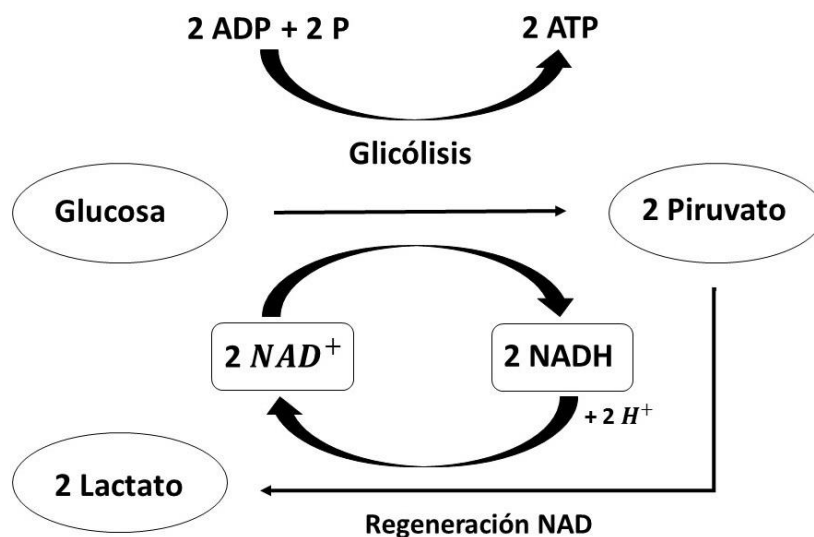


Figura 1: Obtención de lactato a partir de glucosa mediante la glucólisis y la fermentación láctica

El ácido láctico, en disolución, puede perder el protón unido al grupo carboxilo convirtiéndose así en lactato: $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COO}^-$. Este equilibrio se muestra en la figura 2:

Es importante un equilibrio adecuado entre estos parámetros ya que el intervalo de pH en el que nuestro cuerpo puede operar correctamente es muy pequeño (de 7.2 a 7.4). Una producción elevada de lactato se traduce en un desequilibrio en el organismo que puede provocar una acidosis de tipo metabólica, la acidosis láctica [17].

Se ha demostrado que una eliminación temprana del lactato puede ayudar a acabar con esta disfunción del organismo. De ahí que el nivel de lactato en sangre se haya convertido en una importante alarma frente a este problema, ayudando a mejorar el diagnóstico y el tratamiento de distintas enfermedades relacionadas con la acidosis metabólica, que pueden ser de tipo respiratorio (disnea de esfuerzo), cardiovascular (arritmias ventriculares) o neurológicas (cefalea) [17].

Además, su medida, comparada con la del pH, requiere de una cantidad menor de sangre, su muestreo tiene una tasa de fallo menor y, los resultados suelen obtenerse más rápido [16].

También se ha comprobado su uso en medicina deportiva, campo en el que el control de la concentración de lactato en sangre se usa como indicador del estado del atleta ya que concentraciones altas llevan a disminución en el nivel de pH lo que se traduce a su vez en fatiga [18].

Otro campo donde es importante la medición de este compuesto es la industria alimentaria y fermentativa. El nivel de lactato permite evaluar propiedades tan importantes como la frescura, la estabilidad y calidad de la leche y sus derivados, y de otros productos de consumo diario. Esto se debe a que se forma en muchos procesos fermentativos, y puede ser un indicador del estado físico de algunos seres vivos, así se evalúa, por ejemplo, el nivel de lactato en sangre de los peces en las piscifactorías para comprobar si se encuentran sanos [19]. También se ha empleado para el control de calidad de otros tipos de alimentos que no se producen mediante procesos fermentativos, como por ejemplo, los tomates [8].

De este modo, la detección y medida del lactato se ha convertido en un aspecto esencial en muchas industrias. Esta medición se puede llevar a cabo mediante diversos métodos como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [15], fluorimetría [20], quimioluminiscencia [21] o espectroscopia de resonancia magnética [22] entre otros. Sin embargo, estos métodos presentan ciertos inconvenientes como son el gran tiempo que requieren (principalmente en la preparación de la muestra), el alto coste del equipo empleado y la necesidad de operarios cualificados. Estos problemas han derivado en el auge de los biosensores debido a las ventajas que presentan: alta sensibilidad, medidas directas y rápidas, bajo coste y, además no requiere la preparación de las muestras [23].

Los biosensores son un tipo de sensores en los que se ha añadido un compuesto biológico como puede ser una enzima [24] o una secuencia de ADN [25] que puede interactuar de alguna manera con el analito. Un biosensor está formado por un elemento biológico y un transductor, que se encarga de transformar la señal producida por la interacción del elemento biológico y el analito (figura 3) en un parámetro medible que puede ser de tipo eléctrico, espectrométrico o lumínico. La selectividad del sensor dependerá del material biológico empleado, mientras que la sensibilidad, del transductor [19].

Los biosensores pueden dividirse en tres generaciones dependiendo del método empleado para unir el elemento biológico con el transductor. En los de primera generación, se emplea una membrana que se ensambla en el transductor y que, a su vez, atrapa el compuesto biológico. En los de segunda generación, esta unión es directa, realizándose mediante adsorción o por enlaces de tipo covalente y se suelen añadir mediadores para mejorar la sensibilidad del biosensor. Para los biosensores de tercera generación, la unión es aún más estrecha, quedando integrado el elemento biológico en la estructura del sensor [26].

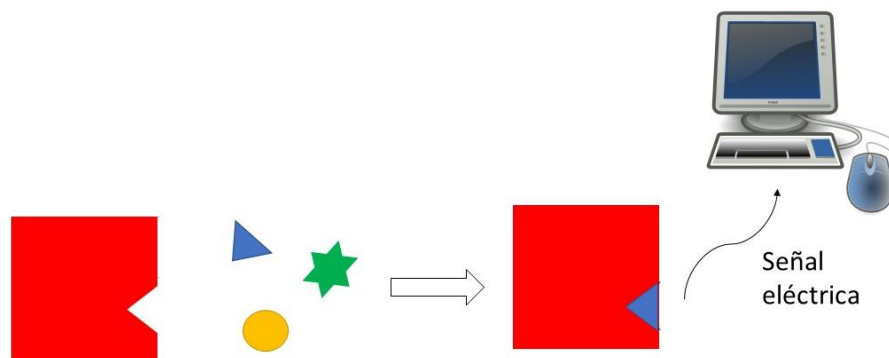


Figura 3: Interacción entre el compuesto biológico y el analito.

Dentro de los sensores electroquímicos, uno de los más extendidos es el sensor amperométrico, donde el parámetro medido es la intensidad de corriente eléctrica. Esta intensidad dependerá de la concentración del reactivo/producto que se oxida/reduce en una reacción inducida por el elemento biológico [27].

Generalmente, se emplean enzimas debido a su simple diseño y a su buen funcionamiento en términos de selectividad y sensibilidad. Estas enzimas deben ser capaces de catalizar una reacción con el analito, consumiendo o produciendo un cierto elemento electroactivo, lo que dará lugar a una transferencia de electrones y con ello a una corriente eléctrica a partir de cuya medida evaluamos la concentración del analito de interés. Su principal inconveniente es la pérdida de actividad con el paso del tiempo [26].

Las dos enzimas más empleadas en los biosensores de lactato son la enzima lactato oxidasa (LOx) y la enzima lactato deshidrogenasa (LDH); la enzima monooxigenasa y el citocromo b2 también se emplean, pero en menor medida [16]. En este apartado cobra importancia la quiralidad del lactato que hemos comentado al inicio de esta introducción, ya que las enzimas empleadas son distintas para el enantiómero *L* o el *D*.

A continuación, se expone el funcionamiento de ambas enzimas:

- La enzima lactato oxidasa (LOx) es una flavoproteína que puede obtenerse a partir de distintas bacterias como *Pediococcus* y *Aerococcus viridans*. Esta enzima cataliza la oxidación del lactato a piruvato formando peróxido de hidrógeno como producto en una reacción que tiene lugar en presencia de oxígeno disuelto. El peróxido es un elemento electroactivo, que puede ser reducido u oxidado, siendo preferente su oxidación para la medida de la corriente eléctrica [28]. El conjunto de reacciones químicas que tiene lugar se muestra en la figura 4:

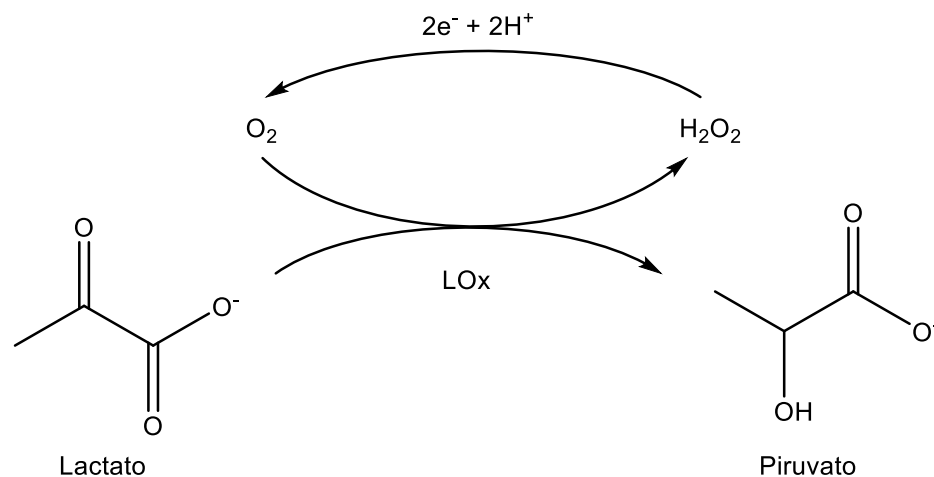


Figura 4: Mecanismo de reacción de la enzima LOx

Existe un problema relacionado con el uso de esta enzima, y es que la señal depende de la concentración de oxígeno en el ambiente que, por tanto, debe ser monitorizada, aumentando la complejidad y coste del equipo. Una forma de solucionar este problema es usar otra enzima, como es la lactato deshidrogenasa [16].

- La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima catalizadora, perteneciente al grupo de las oxidoreductasas que se encuentra en tejidos animales, vegetales y en microorganismos. En el cuerpo humano se encuentra principalmente en el corazón, el hígado o los riñones. teniendo un papel fundamental en el metabolismo anaerobio. La LDH cataliza la oxidación del lactato a piruvato en la presencia de la forma

oxidada de la coenzima dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+), como se explica en la figura 5 [19].

La coenzima NAD^+ actúa como mediador para el transporte de los electrones entre la enzima y el electrodo. El inconveniente principal del uso de esta enzima está relacionado con la regeneración de la coenzima NAD^+ , ya que se necesita un potencial muy alto para la oxidación del NADH , lo que puede provocar la oxidación de distintos compuestos presentes en la disolución, dando lugar a una medida incorrecta [28].

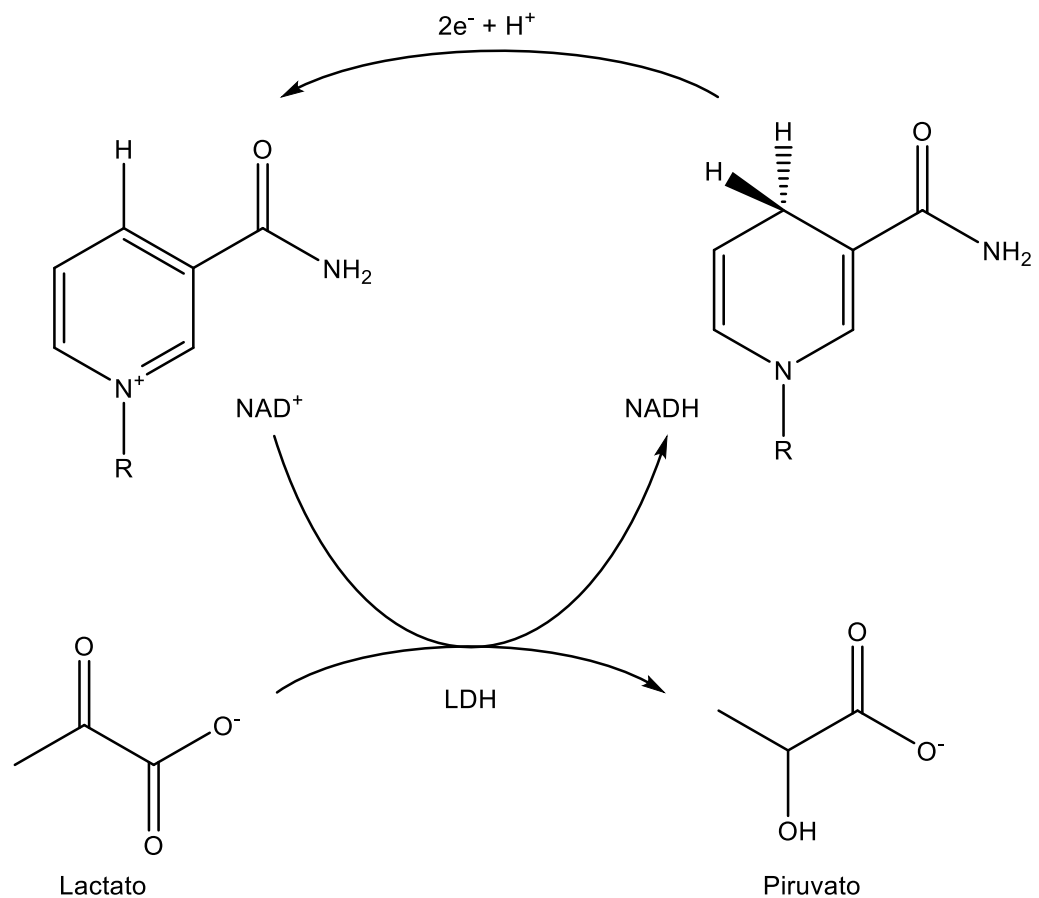


Figura 5: Mecanismo de reacción de la enzima LDH

A pesar de que el potencial teórico, en condiciones estándar, para oxidar el NADH es de $+0.56 \text{ V}$, en la práctica se requieren de potenciales mayores que rondan $+1 \text{ V}$. Para reducir este potencial, se pueden realizar distintas modificaciones sobre el electrodo de trabajo con diversos materiales [29].

Muchas investigaciones relacionadas con el desarrollo de los biosensores de lactato se han centrado en los materiales que conforman el electrodo y las estrategias de inmovilización de las enzimas, los mediadores y

las coenzimas, tratando de mejorar las propiedades del sensor: sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad [16].

La inmovilización de la enzima es uno de estos factores clave en la fabricación del biosensor. Algunas enzimas presentan una estabilidad intrínseca mientras que otras pierden su actividad al ser retiradas de su medio natural, de ahí que sea de suma importancia su correcta inmovilización, que siempre conllevará una cierta pérdida de la actividad de la misma. El objetivo es optimizar la estabilidad de la enzima y la eficiencia de las reacciones, para ello debemos inmovilizar la enzima en su forma activa y mantener ese estado de activación, evitando así que se vea afectada por agentes externos [16].

Existen distintos métodos para la inmovilización de la enzima sobre la matriz (el soporte), que se describen a continuación:

- Confinamiento físico en una matriz sol-gel. Se emplea el método sol-gel, formándose un gel de sílice alrededor de la enzima. Mediante el proceso sol-gel se obtiene una fase sólida (gel) a partir de un líquido (sol) que se forma generalmente a partir de un precursor de silicio (tetraetil ortosilicato) que se mezcla con agua teniendo lugar la hidrólisis, y la posterior condensación con pérdida de agua. Las propiedades de la matriz dependerán de la cantidad de agua, el tipo de disolvente y de las condiciones de operación principalmente. A continuación, se produce el envejecimiento de la matriz, momento en el que el disolvente es expulsado de la misma, lo que provoca un cambio en la estructura interna, disminuyendo el volumen de poro lo que permite retener las biomoléculas deseadas [30].

Este recubrimiento permite eliminar ciertas interferencias, haciendo el electrodo más estable frente a cambios en la temperatura o el pH. Sin embargo, requiere que el proceso se lleve a cabo en condiciones que no desnaturalicen la enzima evitando que pierda su actividad.

- Adsorción física. Se basa en la interacción física entre la enzima y la superficie de la matriz mediante fuerzas de carácter débil como las fuerzas de Van der Waals o los puentes de hidrógeno. La unión se realiza mezclando el adsorbente con una disolución concentrada de la enzima. El inconveniente principal de esta técnica es la falta de reproducibilidad y estabilidad a largo plazo [31].
- Entrecruzamiento. Se emplea un agente que promueve el enlace entre distintos grupos biocatalíticos. Es un método simple, con el que obtenemos sensores de alta estabilidad y reproducibilidad. Uno de los reactivos usados es el glutaraldehído, que otorga una alta estabilidad a la enzima, aunque le hace perder parte de su actividad ya que bloquea algunos de sus sitios activos [32].

- Coinmovilización con otro compuesto biológico. La fabricación de biosensores con capacidad para analizar más de un compuesto da lugar a este tipo de inmovilización, en los que se deposita cada enzima por separado en el electrodo evitando su mezcla, ya que ésta afectaría a la medida del electrodo. Un ejemplo de este método de inmovilización es la medida simultánea de lactato y de glucosa [33].
- Inmovilización en polímeros conductores. La enzima se mezcla con el monómero del polímero al que se puede unir mediante distintas técnicas como la electropolimerización del polímero conductor (anilina o polipirrol por ejemplo) que atrapa a la enzima [29].

Como hemos comentado, los sensores amperométricos calculan la concentración de lactato a partir de la medida de la corriente eléctrica. Este parámetro está relacionado con la transferencia de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo, por lo que la selección del material que conforma el electrodo de trabajo es de suma importancia en la medida posterior. El material que seleccionemos debe promover una buena transferencia de electrones [19].

Con el objetivo de mejorar dicha transferencia, en la actualidad se emplea alguna de las siguientes técnicas:

- Uso de enzimas modificadas con mediadores. Estos mediadores actúan como puentes entre la enzima y el cofactor que hemos introducido en el electrodo para poder medir el analito (coenzima NAD⁺ en nuestro caso), oxidándose y reduciéndose favoreciendo las reacciones redox de las coenzimas. Una de sus ventajas es que reducen el potencial necesario para oxidar los compuestos a medir. Algunos de estos mediadores, por ejemplo, son el verde de metileno [34] y el ferrocianuro de potasio [35].
- Electrodo modificado con membranas. Entre sus ventajas se incluye que protege al electrodo de las interferencias, preservando la estructura de la enzima, puede llevar a una respuesta lineal y permite controlar la transferencia de electrones mediante el espesor de la membrana. Uno de los compuestos más empleados en este aspecto es el Nafion[®], que elimina las interferencias pero que, a su vez, reduce la sensibilidad del sensor [36].
- Electrodo modificado con polímeros conductores. Sus principales ventajas se basan en la habilidad electrocatalítica de ciertos polímeros conductores, que permite una mayor separación entre los distintos picos, con lo que el análisis es más sencillo. Algunos de los polímeros empleados son el polipirrol (PPy) y el poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) [37].

- Electrodo modificado con nanopartículas. Otra de las formas empleadas para mejorar la sensibilidad del sensor es aumentar el área superficial del mismo, por lo que el desarrollo de la nanotecnología ha sido clave en este aspecto. Se han venido usando nanomateriales de distinto tipo: nanopartículas de metales como el oro [38] o el platino [39], nanotubos de carbono [40], nanopartículas de óxidos metálicos (Nb_2O_5 [41], MoO_3 [42], etc.), nanopartículas de distintos materiales semiconductores (TiO_2 [43], ZnO [44]) siendo las posibilidades incontables.
- Electrodo serigrafiado (SPE). Se forman mediante la deposición de capas de tinta sobre un sustrato. Para ello, se usa una plancha con la geometría del electrodo que queremos obtener, depositando las capas de tinta sucesivamente, lo que permite obtener electrodos reproducibles con diseños flexibles, siendo generalmente desechables. Se han desarrollado biosensores a partir de estos electrodos serigrafiados para la medición de distintos microorganismos como la *Escherichia Coli* o la *Salmonella* [45].

Entre todas estas técnicas, nos vamos a centrar en los electrodos modificados con polímeros conductores y con nanopartículas metálicas.

Dentro de los polímeros conductores, uno de los que más interés ha atraído es el polipirrol [46]. El polipirrol se forma por la polimerización del pirrol, un compuesto orgánico aromático heterocíclico formado por un anillo de cinco átomos de fórmula $\text{C}_4\text{H}_4\text{NH}$ (figura 6).

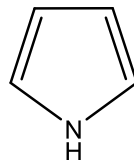


Figura 6: Molécula de pirrol

El polipirrol destaca por sus buenas propiedades referidas a la facilidad a la hora de polimerizar, la estabilidad química y la conductividad eléctrica. Además, su preparación en forma de membranas es sencilla. Para darle mejores propiedades mecánicas a los films de polipirrol, se pueden emplear distintos aditivos como Nafion® o polimetilmetacrilato [46].

El uso de nanoestructuras otorga al electrodo propiedades únicas: alta sensibilidad y eficiencia catalítica, rápida respuesta y gran actividad de adsorción para una inmovilización estable [5].

Recientemente, se ha desarrollado sensores basados en composites de nanopartículas metálicas y polímeros conductores, combinando de esta manera las buenas propiedades de ambos tipos de compuestos, como en el

caso de los composites de polipirrol y nanopartículas de oro. Estos composites ya han sido empleados en la detección de ADN [47], cafeína [48] o amoníaco [49].

Existen diversas formas para fabricar estos composites, destacando la electrodeposición de los compuestos a partir de dos disoluciones por separado, o a partir de una que contenga una sal del metal y el monómero del polímero [5].

Para modificar nuestro electrodo de trabajo, depositaremos un composite de polipirrol y nanopartículas de oro mediante el segundo de los métodos comentados en el párrafo anterior, el cual recibe el nombre de método de cogeneración [5]. Para ello prepararemos una disolución de pirrol y otra de una sal de oro (ácido tetracloroaúrico), las mezclamos y llevamos a cabo la electrodeposición mediante cronopotenciometría. La técnica empleada se explica detalladamente en el apartado del desarrollo experimental.

2.2. Teoría

2.2.1. Electroquímica

Las medidas electroquímicas se realizarán en una celda de tres electrodos formada por el electrodo de trabajo, el contraelectrodo y el electrodo de referencia, de la forma en la que se muestra en la figura 7.b:

- Electrodo de trabajo. Sobre él tiene lugar la transferencia de electrones, ya que es donde se encuentran los materiales electroactivos que hemos empleado en su construcción, y que están en contacto con el analito. Existen diversos materiales con los que se puede construir el electrodo de trabajo, nosotros trabajaremos con electrodos de oro y carbono vítreo.
- Electrodo auxiliar o contraelectrodo. Por él circula la corriente que proviene del electrodo de trabajo, lo que le da estabilidad al sistema. Este electrodo se encarga de equilibrar la carga. El principal inconveniente es la dificultad de mantener un potencial constante cuando está circulando una cierta corriente por este electrodo, de ahí surge la necesidad de añadir un tercer electrodo, el de referencia. Este electrodo auxiliar puede ser de distintos materiales: platino, oro o carbono, entre otros.
- Electrodo de referencia. Mantiene un potencial constante y conocido actuando como referencia en la medición y controlando el potencial de los electrodos de trabajo. No pasa ninguna corriente a través de él, y debe tener una gran estabilidad, que se suele alcanzar usando un sistema redox con concentraciones constantes y conocidas de los reactivos. Algunos ejemplos de electrodos de referencia son: electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), electrodo estándar de hidrógeno (SHE), electrodo reversible de hidrógeno (RHE) o electrodo de calomelanos (SCE).

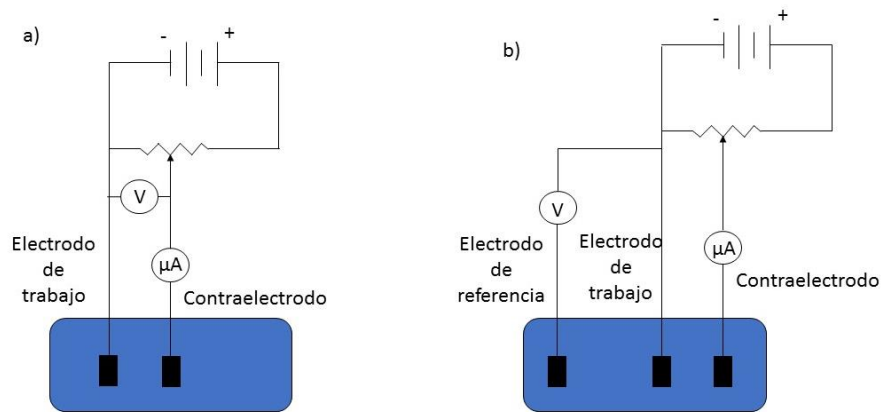


Figura 7: Montaje del sistema para a) dos electrodos y b) tres electrodos

En nuestro caso el electrodo de trabajo es un electrodo de oro o de carbono vítreo, el electrodo de referencia es un electrodo de Ag /AgCl y el contraelectrodo, una lámina de platino de 2 x1 cm.

Para la modificación del electrodo de trabajo se ha empleado como técnica electroquímica la cronoamperometría y la cronopotenciometría para conseguir films de polipirrol y AuNPs de modo reproducible.

La cronoamperometría consiste en aplicar un potencial constante y ver cómo varía la intensidad con el tiempo. Por otro lado, la cronopotenciometría consiste en fijar un valor de intensidad y medir los cambios de potencial con el tiempo.

Para la determinación de lactato de sodio con el sensor de interés la técnica empleada será la voltamperometría de onda cuadrada.

La voltamperometría es un tipo de técnica electroquímica en la que se mide la corriente que circula a través del electrodo de trabajo cuando se barre el potencial aplicado. Al existir en la disolución ciertos elementos que pueden oxidarse/reducirse, podremos observar una cierta corriente que dependerá de la concentración del analito. Al haber una mayor concentración del analito, una cantidad mayor del mismo podrá oxidarse/reducirse con lo que la transferencia de electrones aumenta, y con ello la intensidad de la corriente [27].

Se pueden distinguir distintas técnicas dentro de la voltamperometría dependiendo del muestreo del potencial:

- Voltamperometría lineal. Técnica en que el potencial varía de forma lineal con el tiempo.
- Voltamperometría cíclica. Se realiza un barrido triangular, barriendo entre dos potenciales de forma cíclica, como se muestra en la figura 8. De esta forma, podemos observar simultáneamente los picos de

oxidación y reducción. Es una técnica rápida y sencilla que, generalmente, se emplea como estudio preliminar para obtener información acerca de la respuesta del electrodo [50].

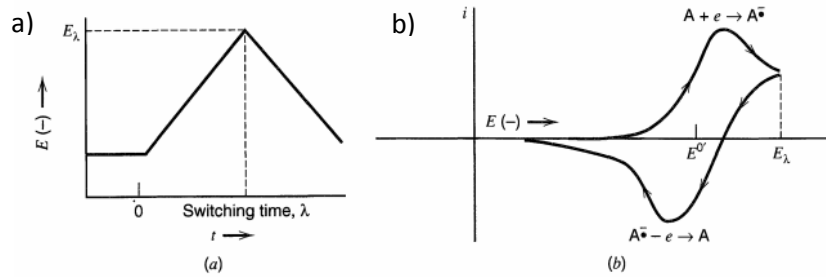


Figura 8: a) Barrido de potencial para una voltamperometría cíclica y b) ejemplo de voltamperograma cíclico típico obtenido [50].

- Voltamperometría escalonada. En este caso, el potencial aumenta a intervalos regulares del tiempo, tomando una forma escalonada.
- Voltamperometría normal de pulsos. Similar al anterior, pero, aquí el electrodo se mantiene a un potencial inactivo la mayor parte del tiempo y, antes del salto, se aplica un pulso de potencial creciente, momento donde se toma la medida. Esto da lugar a un incremento de intensidad mayor, que mejora la sensibilidad en un orden de magnitud aproximadamente con respecto al caso anterior.
- Voltamperometría diferencial de pulsos. Al final del escalón se aplica un pulso de potencial constante. Se denomina diferencial debido a que se mide la intensidad de corriente justo antes y después del salto, y se toma la diferencia. Esto permite reconocer mejor los picos, llegando a valores del límite de detección aún más bajos.
- Voltamperometría diferencial de pulso normal. Se trata de una técnica intermedia entre las dos anteriores [50].
- Voltamperometría de onda cuadrada. Es una de las técnicas más avanzadas en el terreno de la voltamperometría, que incluye las ventajas de las anteriores. La técnica consiste en un potencial escalonado en el que se superponen pulsos de potencial cuadrado. En cada escalón de potencial se suceden dos pulsos de igual amplitud y duración, pero de dirección opuesta, de la forma que se aprecia en la figura 9.

La magnitud medida es la diferencia entre la intensidad del pulso directo con respecto al inverso medido justo después de cada salto. Esto aumenta considerablemente el número de medidas tomadas, presentando los menores límites de detección [51].

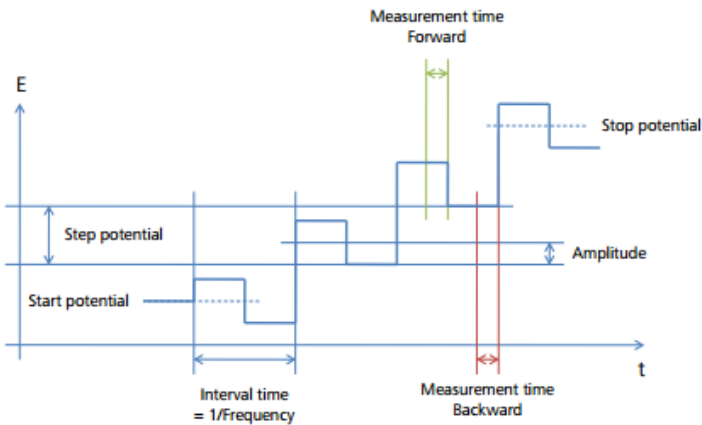


Figura 9: Barrido de potencial y muestreo en una voltamperometría de onda cuadrada [51].

Debido a la mayor sensibilidad de sus medidas, la técnica seleccionada ha sido la voltamperometría de onda cuadrada. Al alcanzar un cierto potencial, se produce la oxidación/reducción del lactato, dando lugar a una transferencia de electrones que tiene como resultado un incremento de la corriente eléctrica. La intensidad de dicha corriente depende del número de electrones que se transfieren y, por tanto, de la concentración del analito [27].

2.2.2. Cálculo del límite de detección

Para el cálculo del límite de detección utilizamos una regresión por mínimos cuadrados ajustando la zona lineal de la curva de calibrado a una recta: $y = m \cdot x + n$. Esto se da para un cierto intervalo de concentraciones de lactato de sodio, que se conoce como rango de linealidad.

A partir de la ecuación de esta recta, podemos hallar dos de los parámetros principales en lo referido a la calidad del biosensor: la sensibilidad y el límite de detección.

La sensibilidad de un sensor hace referencia al mínimo cambio en la concentración del analito que produce un cambio medible por el sensor, para nuestro caso, la intensidad del pico de oxidación/reducción. Un valor alto en la sensibilidad de un electrodo se traduce en que éste es capaz de distinguir entre concentraciones similares del analito, lo que es esencial para un método analítico. La sensibilidad coincide con el valor de la pendiente de la recta de calibrado (m) [52].

El límite de detección (LD) es un concepto relacionado con la mínima cantidad de una sustancia que es capaz de detectar con fiabilidad un método analítico. De acuerdo con la IUPAC, el límite de detección es la menor

concentración del analito que presenta una señal significativamente mayor que la señal del blanco (concentración nula de analito) [53].

La ecuación más usada para el cálculo del límite de detección (cuando tenemos una recta de calibración lineal) y que nosotros usaremos, es la ecuación 1 [53]:

$$LD = \frac{k \cdot \sigma}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo σ la desviación típica del blanco (se han realizado medidas del blanco en cada calibración) y m la pendiente de la recta de calibrado. El valor de k , depende del nivel de confianza que busquemos en el cálculo del límite de detección y suele tomar un valor de 3 (nivel de confianza del 99.86 %).

2.2.3. Comportamiento enzimático

Al tratarse el electrodo medido de un biosensor modificado con una enzima, podemos valorar la constante de Michaelis-Menten. La ecuación de Henri-Michaelis-Menten o de Michaelis-Menten simplemente, explica la cinética de las reacciones catalizadas por enzimas, siguiendo la ecuación 2, que supone un estado cuasi-estacionario, concentración de sustrato constante y que se aplica la ecuación de conservación sólo a la enzima [54].

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ecuación 2}$$

Siendo v la velocidad de reacción, v_{max} el valor máximo que puede alcanzar esta velocidad de reacción, $[S]$ la concentración de sustrato, y K_M la constante de Michaelis-Menten [54].

La K_M es una medida de lo fuerte que es la interacción biomolecular entre la enzima y el analito, haciendo referencia al valor de la concentración del sustrato que da lugar a una velocidad de reacción igual a la mitad de la velocidad máxima. Cuanto mayor sea esta interacción, menor será el valor de la constante, ya que menor será la concentración necesaria de sustrato para alcanzar ese valor de la velocidad de reacción.

Para el cálculo de esta constante, existen diferentes linealizaciones de la ecuación 2. En nuestro caso, hemos empleado la linealización de Hanes Woolf, con la que obteníamos buenos resultados [55]. Esta linealización consiste simplemente, en invertir la ecuación 2 y multiplicar ambos lados de la ecuación por la concentración de sustrato, obteniendo de esta forma la ecuación 3:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Realizando una analogía entre la ecuación de Michaelis-Menten linealizada y la electroquímica, podemos equiparar la concentración del sustrato a la concentración de la muestra y la velocidad de reacción al incremento de intensidad medido, obteniendo así la ecuación 4:

$$\frac{[\text{Lactato}]}{I_{\text{pico}}} = \frac{[\text{Lactato}]}{I_{\text{pico Max}}} + \frac{K_M^{app}}{I_{\text{pico Max}}} \quad \text{Ecuación 4}$$

De esta manera, obtenemos la constante aparente de Michaelis-Menten K_M^{app} , que equivale a aquel valor de la concentración del analito que genera un incremento de intensidad de corriente que es la mitad de la intensidad máxima. Por tanto, una alta afinidad entre enzima y analito se traduce en un valor bajo de la constante aparente.

2.2.4. Estudio de selectividad

En muestras complejas la existencia de más de un analito puede hacer que éstos interfieran en la medida del analito de interés. En el caso de las muestras que contienen lactato pueden contener otros ácidos como el ácido ascórbico, el ácido cítrico o el ácido tartárico. Por ello, se estudiará la respuesta electroquímica del sensor diseñado frente a estos ácidos, realizando una calibración como se explicará en el apartado “Estudio de la selectividad del biosensor”.

2.2.5. Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia estudia la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Las técnicas espectroscópicas se clasifican en función de la radiación que medimos una vez que se ha producido la interacción entre la radiación original y la muestra (luz absorbida, emitida, refractada o dispersada) y el rango de las longitudes de onda de la radiación con la que estamos trabajando: ultravioleta-visible (UV-Vis) o infrarrojo (IR), principalmente.

En la espectroscopia UV-Vis, se analiza la interacción de la radiación de esta zona del espectro, que trabaja en un rango de longitudes de onda de 800 a 200 nm, aproximadamente. El equipo empleado debe contar con tres elementos principales: una fuente de luz policromática capaz de emitir en todo

el espectro UV-Vis, un monocromador, que se encarga de seleccionar una longitud de onda, y un detector que recibe y cuantifica la señal transmitida por la muestra. Entre el monocromador y el detector se sitúa la muestra, que se introduce en una cubeta que debe ser de un material transparente en el espectro UV-Vis para que no afecte a la medida [56].

Las técnicas de absorción se basan en el fenómeno por el cual las sustancias absorben parte de la radiación electromagnética que incide sobre ellas, provocando la transición de los electrones desde los niveles fundamentales a los niveles excitados. A partir del espectro, en el que se representa la absorbancia de la muestra en función de la longitud de onda, se puede realizar un análisis tanto cualitativo, ya que cada sustancia absorbe radiación a unas longitudes de onda determinadas, como cuantitativo, aplicando la ley de Lambert-Beer que relaciona la absorbancia de una sustancia con la concentración de la misma. Es decir, la forma del espectro nos permite saber qué sustancias están presentes en las muestras, y la magnitud de los picos, la concentración de las mismas [56].

La espectroscopia UV-Vis se ha empleado para caracterizar las disoluciones iniciales de las que partimos para formar el composite Ppy/AuNPs, determinando así si se produce la polimerización del pirrol y la formación de las nanopartículas de oro antes de comenzar la electrodeposición del film.

2.3. Materiales y equipo empleado

2.3.1. Equipos

- Potenciostato/Galvanostato (PARSTAT 2273/Princeton Applied Research).
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-2600/Shimadzu)
- Balanzas
- Ultrasonidos (IKA Vortex)
- pH-metro (Crison)
- Agitador (Hytrell HTR)

2.3.2. Materiales

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4 , pureza=96%, PANREAC)
- Ácido tetracloroaúrico (HAuCl_4 , pureza=99.9999%, Sigma-Aldrich)
- Decanosulfonato sódico ($\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{NaO}_3\text{S}$, pureza>99%, Sigma-Aldrich)
- Pirrol ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$, pureza=98%, Sigma-Aldrich)
- Hidrogenofosfato sódico (Na_2HPO_4 , pureza>99%, Sigma-Aldrich)
- Dihidrogenofosfato sódico (NaH_2PO_4 , pureza>99%, Sigma-Aldrich)
- Enzima lactato deshidrogenasa (*L*-LDH obtenida a partir de músculo de conejo, 5 mg/mL, Roche).
- Coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+ , $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$, pureza=100%, Roche)
- Glutaraldehído ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$, 50% en disolución acuosa, Alta Aesar)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}(\text{NO}_3)$, pureza>99,8%, Sigma-Aldrich)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, disolución acuosa 0,01 M, PANREAC)
- Ácido clorhídrico (HCl (ac), 35%, PANREAC)
- *L*-Lactato sódico ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$, pureza>98%, Sigma-Aldrich)
- Electrodo de trabajo de oro (BASi)

- Electrodo de trabajo de carbono vítreo (BASi)
- Electrodo de referencia (Ag/AgCl, Nesslab)
- Contraelectrodo de platino
- Celda electroquímica: hemos trabajado con dos celdas, una de la marca Princeton Applied Research de 50 mL de capacidad, y otra de Trallero and Schlee, de 25 mL de capacidad)
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$, pureza >99,5%, Sigma-Aldrich)
- L-Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$, pureza=99,7%, Riedel de Haën)
- L-Ácido tartárico ($C_4H_6O_6$, pureza >99,5%, Sigma-Aldrich)
- Mopa pulidora (BASi)
- Vinos empleados en las medidas:
 - Tintos jóvenes: de denominación de origen de Ribera de Duero y de El Bierzo.
 - Blanco Sauvignon de denominación de origen de Rueda.

2.4. Desarrollo experimental

2.4.1. Preparación del sensor electroquímico

2.4.1.1 *Preparación de las disoluciones tampón empleadas (buffer)*

Estas disoluciones se han empleado tanto en la preparación de los electrodos como en la medición de las muestras.

Todas las medidas electroquímicas se realizaron utilizando una disolución tampón de fosfato $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, de pH 7 y concentración 0.01 M. La función de esta disolución amortiguadora es controlar la fuerza iónica del medio y el pH de la disolución, de forma que éste no cambie, ya que las variaciones en el pH de la disolución que medimos pueden provocar cambios en la lectura de la intensidad de corriente.

También emplearemos una disolución tampón de Tris-HCl y EDTA para diluir la coenzima NAD^+ (3 mM de NAD^+ en Tris-HCl [38]). Esta disolución tampón presenta un pH de 7.4 y una concentración de 20 mM de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Para la preparación del tampón, disolvemos las cantidades de Tris y EDTA calculadas en agua desionizada y ajustamos el pH de la disolución con ácido clorhídrico 1 M hasta obtener el pH requerido de 7.4. Una vez alcanzado dicho pH, enrasamos hasta el volumen final.

Para preparar todas las disoluciones se emplea agua desionizada Mili-Q de conductividad $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}^{-1}$.

2.4.1.2 *Acondicionamiento del electrodo de trabajo*

Antes de la comenzar la modificación del electrodo de trabajo es necesario acondicionar su superficie activa puliéndolo y lavándolo con el objetivo de obtener una superficie limpia y reproducible. Para ello seguimos el siguiente procedimiento:

- Se pule el electrodo con una mopa pulidora que contiene polvo de alúmina de un tamaño de grano de $1 \mu\text{m}$, presionando el electrodo contra ella haciendo "ochos" durante unos 5 minutos o hasta que observemos que la superficie ha quedado limpia y homogénea.

- A continuación, el electrodo se sumerge en agua desionizada durante 30 minutos en el ultrasonido. Así se consigue eliminar la alúmina y restos de aquellas sustancias que hayan podido absorberse en las mediciones anteriores.
- Finalmente, se introduce el electrodo en la celda electroquímica con una disolución de ácido sulfúrico 0.5 M y se somete a una voltamperometría cíclica. Se mantiene inicialmente un potencial de +1.7 V durante 30 segundos para oxidar cualquier resto de materia que pueda quedar sobre la superficie del electrodo, y después ciclamos 20 veces entre +1.7 V y -0.2 V).

2.4.1.3 Electropolimerización de los films sobre el electrodo de trabajo

Tanto los films de polipirrol como los de polipirrol/nanopartículas de oro (Ppy/AuNPs) han sido preparados mediante técnicas electroquímicas. En el caso de la síntesis del Ppy (figura 10) se prepara una disolución de 0.1 M de pirrol que contiene 0.05 M decanosulfonato sódico (SDS, actuando éste como dopante del polipirrol) que se somete a electropolimerización en la celda electroquímica.

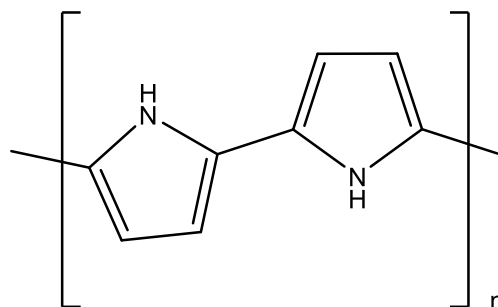


Figura 10: Estructura del polipirrol

Para el composite de Ppy/AuNPs, empleamos el método de cogeneración, que consiste en electrodepositar ambos componentes a partir de una disolución que contiene el monómero y una sal de oro. La disolución empleada se prepara mezclando en proporción 1:1 una disolución que contiene pirrol y el agente dopante (0.2 M de pirrol y 0.1 M de decanosulfonato sódico) con otra que contiene ácido tetracloroaúrico (10^{-3} M). Mediremos 10 mL de ambas disoluciones, mezclándolas para obtener una disolución homogénea y añadiéndolo a la celda donde tendrá lugar la polimerización.

Al mezclar estas disoluciones observamos un extraño fenómeno. Ambas disoluciones son transparentes, pero al mezclarlas, la mezcla presenta color negro. Esto puede indicar el inicio de la polimerización del pirrol y la formación de las nanopartículas de oro. Es cierto que las nanopartículas de oro suelen presentar un color que varía del rojo al violeta en función del tamaño, la geometría y el estado de agregación de las mismas, pero este color se puede ver enmascarado por el negro del polipirrol por lo que no podemos descartar esta posibilidad.

Para comprobar la existencia de estos fenómenos, se ha realizado un estudio de las disoluciones mediante espectroscopia UV-Vis, para ver si identificamos las bandas del polipirrol y de las nanopartículas de oro en el espectro obtenido. El resultado se muestra en la figura 11:

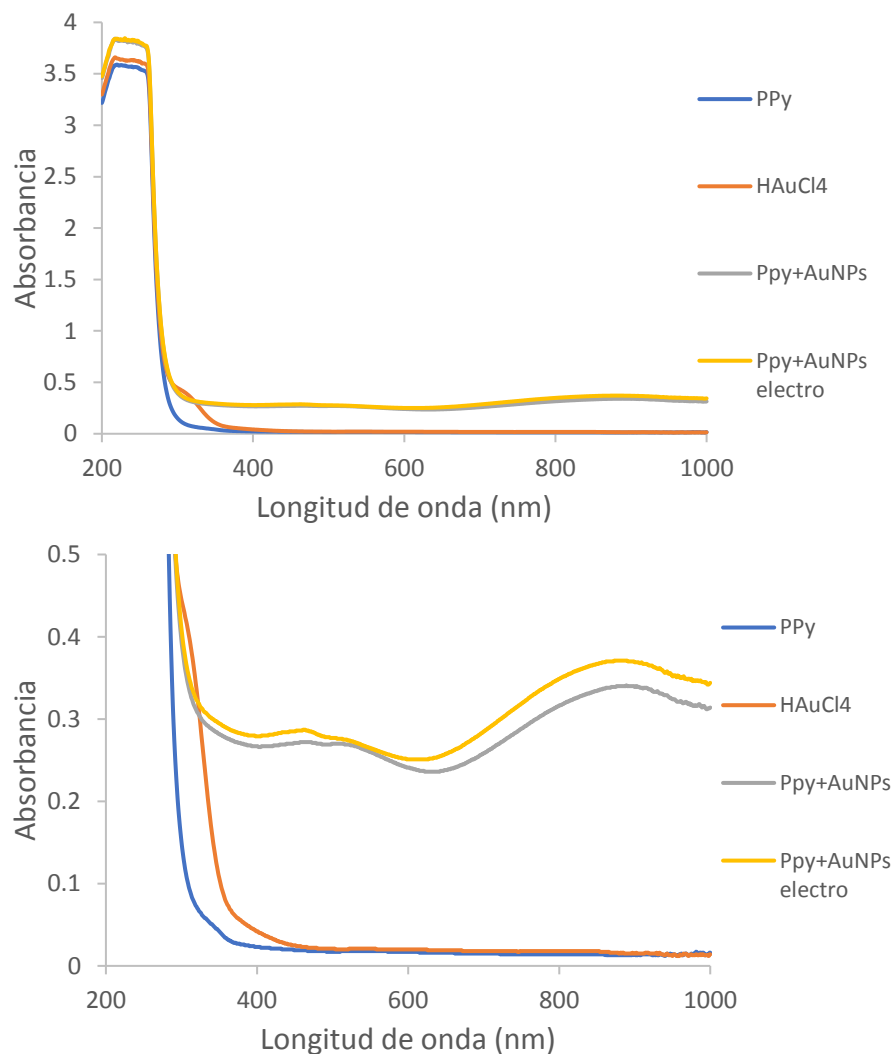


Figura 11: a) Espectro UV-Vis obtenido para las dos disoluciones iniciales y la mezcla (antes y después de electropolimerizar el electrodo), b) zoom del mismo

Se puede observar una banda entre 400 y 500 nm que, de acuerdo a la bibliografía, puede deberse al inicio de la polimerización del pirrol [57]. Por su

parte la banda observada entre 500 y 600 nm así como la banda ancha que se ve en la zona de la derecha del espectro, pueden deberse a la formación de nanopartículas de oro, en un estado alto de aglomeración [58].

Se han probado dos técnicas electroquímicas distintas para la electrodeposición del composite: cronoamperometría y cronopotenciometría, viendo como con la segunda técnica obteníamos un film de mejores características.

Con el objetivo de optimizar las propiedades del film y, por tanto, del electrodo, se han realizado pruebas con distintas intensidades de corrientes y distintos tiempos de electrodeposición. Finalmente, se decidió trabajar a +0.04 mA durante 300 segundos, obteniendo potenciales iniciales en torno a +0.8 V, que van disminuyendo a medida que aumenta el tiempo de electropolimerización alcanzando un potencial *plateau* de +0.75 V (figura 12):

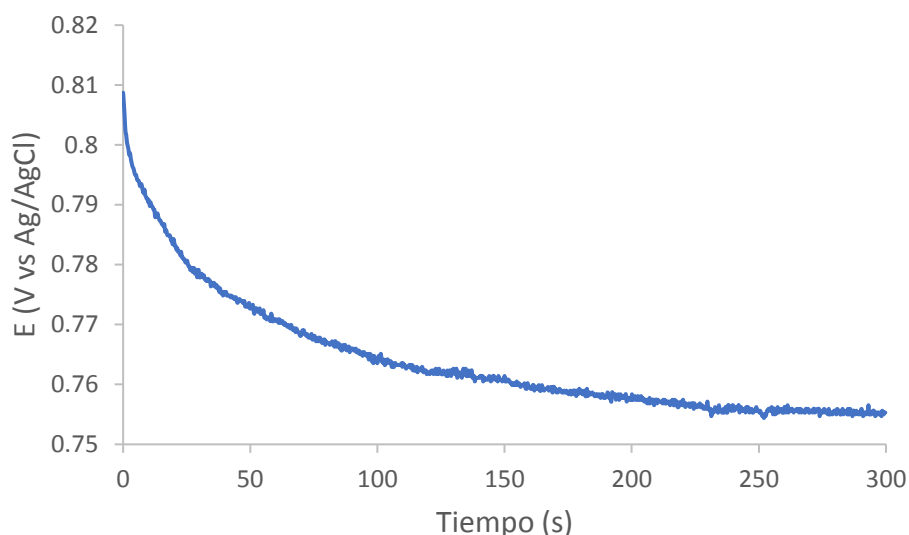


Figura 12: Cronopotenciograma obtenido en la electrodeposición del composite sobre el electrodo a +0,04 mA y durante 300 segundos.

2.4.1.4 Inmovilización de la enzima

Una vez modificado el electrodo, se procede a depositar la enzima. Para ello realizamos un *drop-casting* de una disolución que contiene enzima L-LDH y coenzima NAD⁺ y, a continuación, el entrecruzamiento con glutaraldehído.

El *drop-casting* es una técnica empleada para formar films de un compuesto de interés sobre una superficie. Consiste simplemente en depositar gotas de la disolución del material que queremos depositar sobre dicha

superficie y dejar que el disolvente se evapore. Es una técnica simple, que requiere de poco material, pero inadecuada para aquellos casos en los que pretendemos obtener un film homogéneo de un espesor controlado. El disolvente elegido, así como la concentración de las disoluciones son factores claves a la hora de obtener un film con una estructura adecuada [59].

Hemos realizado distintas pruebas evaluando el rendimiento del electrodo en cada caso:

- Realizar el entrecruzamiento añadiendo el glutaraldehído junto a la enzima y la coenzima, o añadir primero la enzima y la coenzima, dejar secar, y realizar el entrecruzamiento a continuación.
- Inmovilizar la coenzima junto a la enzima o añadirla en la disolución de lactato de sodio a medir.
- Utilizar distintas cantidades de enzima.

Finalmente, el método de inmovilización que hemos seguido, en base a los resultados obtenidos, ha sido el siguiente:

1. Sumergir el electrodo en buffer fosfato pH 7 durante 2 minutos.
2. Colocar el electrodo en posición vertical y añadir con cuidado sobre su parte central 5 μ L de disolución de enzima LDH (concentración 5 mg/mL), 5 μ L de disolución de coenzima NAD⁺ (3 mM en buffer Tris-HCl pH 7.4) y 5 μ L de disolución de glutaraldehído (concentración del 2.5% en buffer fosfato pH 7). Se ha empleado una concentración de coenzima NAD⁺ 3 mM, ya que es el valor para el cual se obtiene una mayor sensibilidad de acuerdo a la bibliografía [38].
3. Guardar en el frigorífico durante una hora y quince minutos, tiempo en el que tiene lugar la inmovilización de la enzima y la coenzima sobre el electrodo de trabajo y la evaporación del disolvente.
4. Lavar el electrodo con buffer fosfato pH 7 durante 30 segundos, con el objetivo de eliminar el exceso de glutaraldehído,

Una vez acabado el procedimiento anterior, almacenamos el electrodo en el frigorífico hasta que llevamos a cabo la medida. No podemos dejar pasar mucho tiempo antes de realizar la medida desde que preparamos el electrodo, ya que las enzimas pierden rápidamente su actividad.

2.4.2. Determinación de lactato

Para la determinación de la concentración de lactato de sodio con el sensor de Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺, empleamos como técnica electroquímica la voltamperometría de onda cuadrada. La corriente anódica se barrerá desde -1 V a +0.8 V, y la corriente catódica desde +0.8 V a -1 V. Ambas a 50 mV/s con una amplitud del pulso de 50 mV y duración del mismo de 20 ms. Estas condiciones serán comunes para todas las medidas de voltamperometría de onda cuadrada realizadas durante el trabajo.

La determinación de lactato con el sensor se lleva a cabo en una celda electroquímica, en la que añadimos inicialmente 40 mL de buffer fosfato pH 7 para llevar a cabo la medición del blanco tres veces (concentración nula de analito). De esta forma hallamos la desviación típica del blanco, dato que emplearemos para calcular el límite de detección del sensor empleando la ecuación 1.

A continuación, vamos añadiendo cantidades conocidas de una disolución 0,1 M de lactato de sodio en buffer fosfato pH 7, manteniendo una agitación constante en la celda. Tras cada adición, se mide la respuesta voltamperométrica del electrodo, observando como la intensidad del pico va aumentando a medida que la concentración de lactato aumenta.

De esta manera, obtenemos un voltamperograma de onda cuadrada similar al que se muestra en la figura 13, para la corriente anódica y en la figura 14 para la corriente catódica:

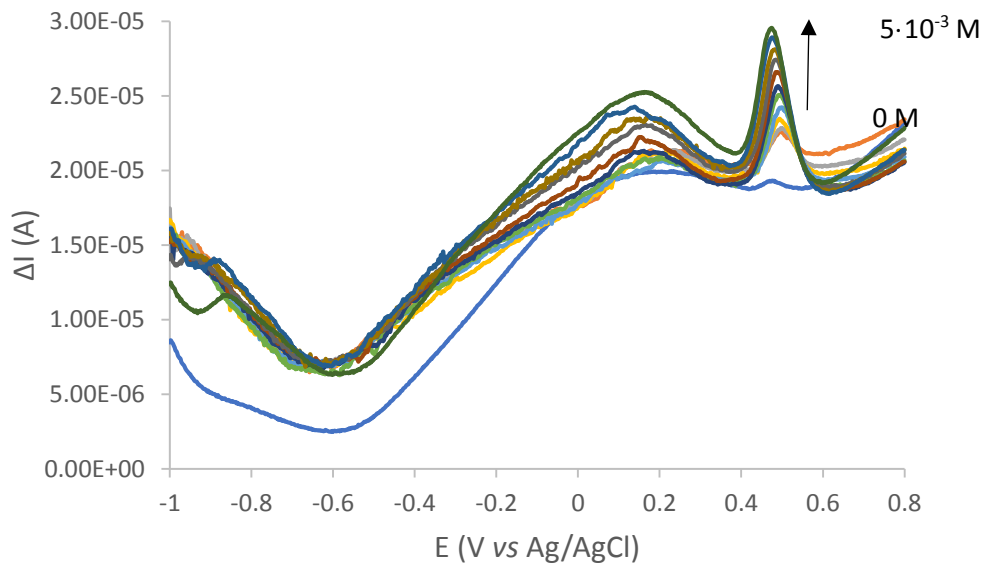


Figura 13: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para la corriente de oxidación medido para el sensor Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ a distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7

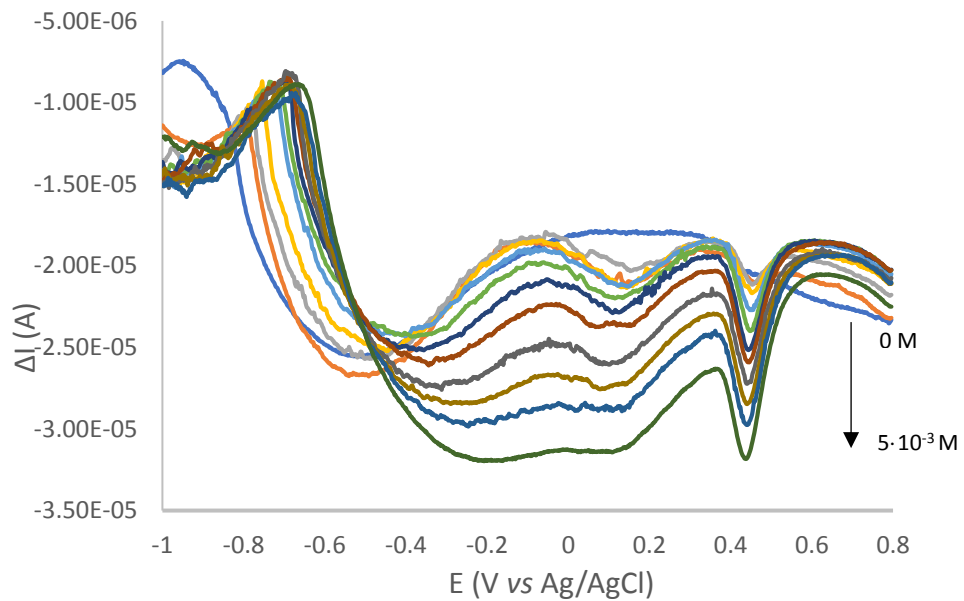


Figura 14: Voltamperograma de onda cuadrada de reducción medido para el sensor Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ a distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7

Representando la intensidad del pico (de oxidación y de reducción) en función de la concentración de lactato que tenemos en la disolución de acuerdo con la ecuación 5, obtenemos las curvas de calibrado:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{Moles lactato}}{\text{Volumen total}} = \frac{[\text{Lactato}]_{\text{Añadido}} \cdot V_{\text{Añadido}}}{V_0 + V_{\text{Añadido}}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Las curvas de calibrado obtenidas para la determinación de lactato con los sensores estudiados presentan un comportamiento como el que se muestra en la figura 15, que es típico de las reacciones enzimáticas de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten.

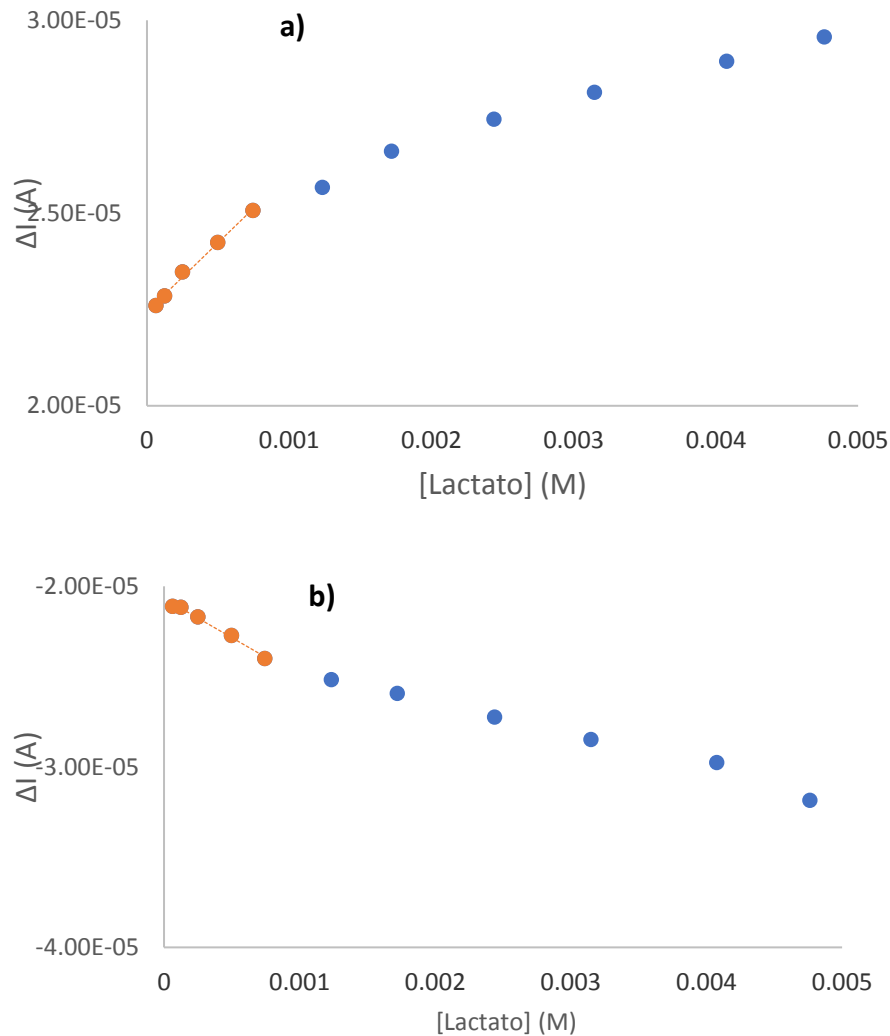


Figura 15: Curvas de calibrado obtenidas para el pico de a) oxidación y b) reducción para el sensor de Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7

En la figura 15 se puede observar un primer tramo (puntos naranjas) en el que la intensidad del pico es proporcional a la concentración del lactato de sodio, siguiendo así la ecuación de una recta: $y = m \cdot x + n$. Esto se da para un cierto intervalo de la concentración de lactato, que se conoce como el rango de linealidad. Después de este tramo, la intensidad deja de ser proporcional a la concentración de lactato de sodio y tiende a estabilizarse.

De acuerdo con la linealización de Hanes-Woolf descrita en el apartado “Comportamiento enzimático” de la página 21 representamos el cociente $\frac{[Lactato]}{I_{pico}}$ en función de la concentración de lactato de sodio obteniendo una recta como la que se muestra en la figura 16:

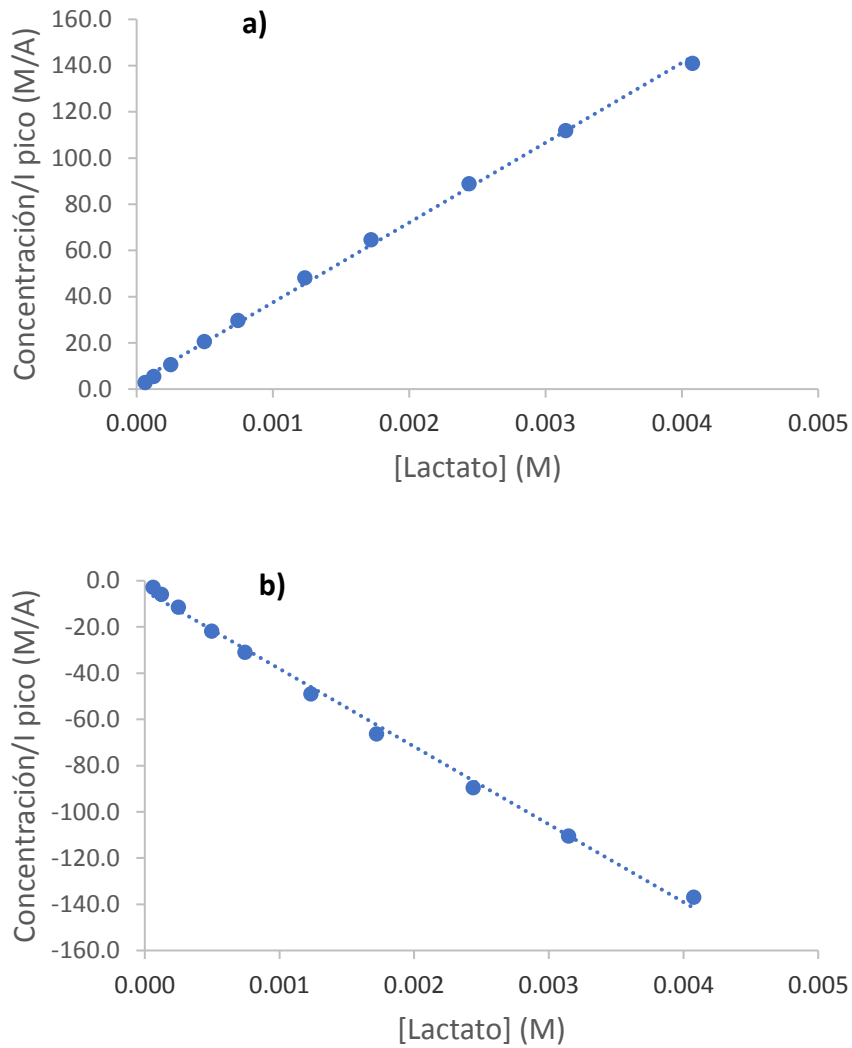


Figura 16: Linealización de Hanes-Woolf obtenida para el cálculo de constante de Michaelis-Menten para los picos de a) oxidación y b) reducción del sensor Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺

A partir del inverso de la pendiente de esta recta obtenemos $I_{pico Max}$ y con este valor y el de la ordenada en el origen, calculamos la constante aparente de Michaelis-Menten ($K_M^{app} = I_{Pico Max} \cdot Ordenada$).

2.4.3. Medición de muestras de vino: determinación de la concentración de lactato de sodio en vino

Como se ha comentado en el apartado “Estado del arte”, el lactato es un compuesto presente en productos de procesos fermentativos, como son el vino, la cerveza, y los derivados de la leche entre otros. Por ello, para evaluar el funcionamiento del sensor desarrollado, se ha realizado la determinación de la concentración de lactato de sodio en vino.

El vino es una bebida alcohólica obtenida a partir de la fermentación del mosto de la uva debido a la acción de levaduras, sobre todo del género *Saccharomyces*. Mediante esta fermentación, el mosto, compuesto principalmente por agua y azúcares, da lugar al vino, transformándose la mayor parte de estos azúcares en alcohol etílico. Además de estos compuestos, el vino también incluye compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados o ácidos como el ácido malónico o el ácido láctico, que se presentan en pequeñas cantidades.

Para medir la concentración de lactato en vino emplearemos el método de adición estándar, usado en casos en los que la matriz de la muestra presenta una composición compleja que influye o puede llegar a influir en la medida de la misma, lo que se conoce como efecto de matriz. Debido a este efecto de matriz, si realizamos la calibración del electrodo con una disolución que sólo contiene lactato y, después, medimos la señal de la muestra, ésta puede no corresponderse con el valor de la concentración real.

Para solucionar este problema, trataremos de minimizar el efecto de la matriz obteniendo todas las señales analíticas bajo las mismas condiciones. Para ello, diluimos la muestra inicial de vino con la disolución amortiguadora de buffer fosfato pH 7, y vamos añadiendo volúmenes variables de una disolución de lactato en buffer fosfato que contenga la misma concentración de vino que la muestra inicial diluida.

La preparación de la disolución inicial diluida de la muestra es clave para la medida final del analito. Debemos elegir una concentración de vino inicial de manera que su concentración de lactato se encuentre en el rango de medida de nuestro electrodo, por encima del límite de detección, pero sin llegar a saturar al mismo.

Como la concentración de lactato en el vino es variable dependiendo del tipo de fermentación que se produce y las condiciones en las que tiene lugar, es difícil calcular inicialmente que cantidad de vino debemos tomar. Debido a esto, se han realizado pruebas con distintas concentraciones de vino, observándose una buena respuesta del electrodo para una dilución de 1.5 mL

de vino por 10 mL de disolución total, es decir, 1.5 mL de vino y 8.5 mL de disolución de buffer fosfato pH 7.

El procedimiento seguido ha sido el siguiente:

- Añadimos la disolución inicial de vino diluido con la disolución tampón fosfato en la celda electroquímica.
- Realizamos la medida inicial mediante voltamperometría de onda cuadrada, empleando las condiciones habituales descritas en el apartado “Determinación de lactato” de la página 31.
- Añadimos volúmenes conocidos de una disolución con lactato de sodio de concentración 0.1 M y una concentración de vino igual a la de la disolución inicial, para que ésta se mantenga constante.
- Tomamos medidas de onda cuadrada a cada adición, obteniendo una gráfica de la forma que se aprecia en la figura 17:

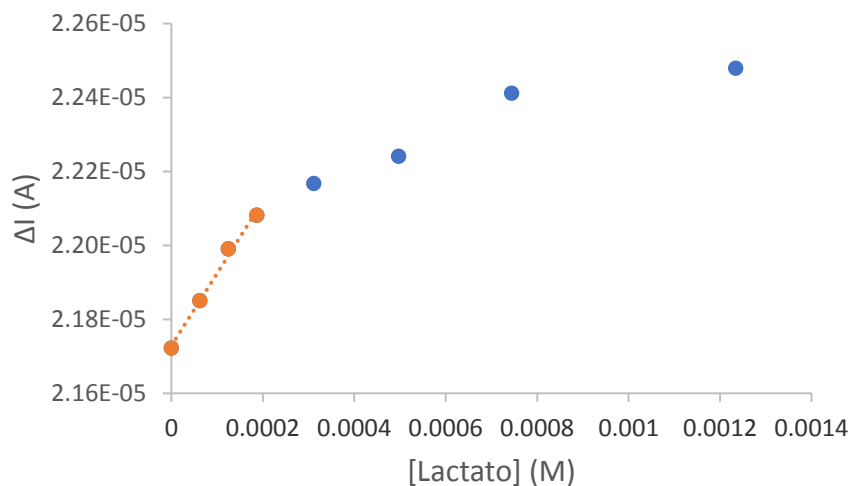


Figura 17: Curva de adición estándar obtenida para el sensor Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ a distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7 y vino

De esta forma, obtenemos una recta para los primeros puntos del calibrado de la forma $y = m \cdot x + n$. Para hallar la concentración de lactato en el vino inicial prolongamos esta recta hasta el punto donde corte el eje de abscisas, es decir, el valor para el que y se hace nulo: $0 = m \cdot x + n \rightarrow x = -\frac{n}{m}$.

Este valor corresponde a la concentración de la mezcla de vino y la disolución tampón. Para hallar el valor de la concentración del vino original, nos basta con emplear el dato de la dilución, aplicando la ecuación 6:

$$[Lactato]_{vino} = [Lactato]_{calculada} \cdot \frac{V_T}{V_{vino}}$$

Ecuación 6

2.5. Resultados y discusión

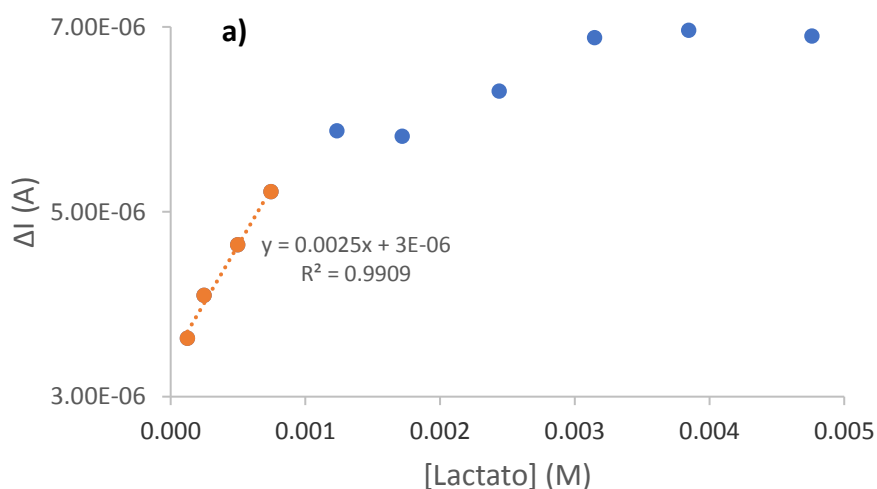
Una vez modificado el electrodo de trabajo y construido así el sensor, llevamos a cabo la medición del mismo, desde el electrodo original sin modificar hasta el electrodo final modificado con el polipirrol, las nanopartículas y la enzima inmovilizada junto a la coenzima. De esta forma, observamos el efecto de las distintas modificaciones en el funcionamiento del electrodo, centrándonos en parámetros como la sensibilidad, el límite de detección y la calidad de la regresión. Calcularemos estos parámetros tanto para el pico de oxidación como para el de reducción siempre que sea posible.

Vamos a trabajar con electrodos de oro y de carbono vítreo. Una vez estudiada la respuesta de ambos dos, elegiremos el mejor y pasaremos a optimizar su funcionamiento.

2.5.1. Electrodo de trabajo de oro

2.5.1.1 Electrodo sin modificar (Au)

Trabajando con el electrodo original, sin llevar a cabo ninguna modificación en él, se observa que es capaz de detectar el lactato. No obstante, las intensidades de las corrientes toman valores muy bajos (del orden de microamperios), lo que dificulta su medición, y se traduce en unos valores de sensibilidad y límite de detección que no son muy bajos (para el pico de oxidación, la sensibilidad es de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ A/M}$ y el LD de $6,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Las curvas se muestran en la figura 18:



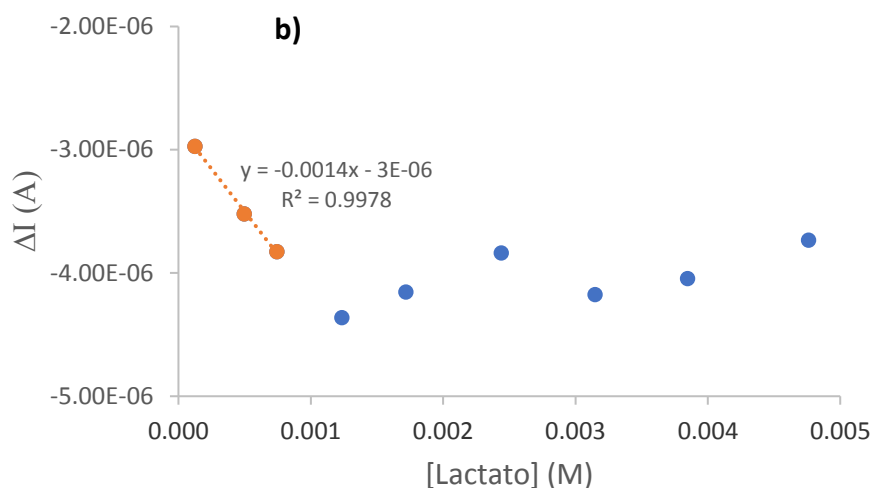


Figura 18: Curvas de calibrado obtenidas para los picos de a) oxidación y b) reducción obtenidas para el electrodo de trabajo sin modificar

2.5.1.2 Electrodo modificado con enzima LDH (Au + LDH/NAD⁺)

En este caso, el electrodo es incapaz de detectar el lactato, como se aprecia en la figura 19. Esto puede deberse a que en ausencia de la matriz polimérica de Ppy, la inmovilización de la enzima no es correcta, por lo que lo único que hacemos es bloquear la superficie del electrodo de oro, perdiendo la actividad que hemos visto en el caso anterior. Además, el sensor no presenta un mediador electrónico entre el electrodo de trabajo y la enzima, que es el papel del Ppy.

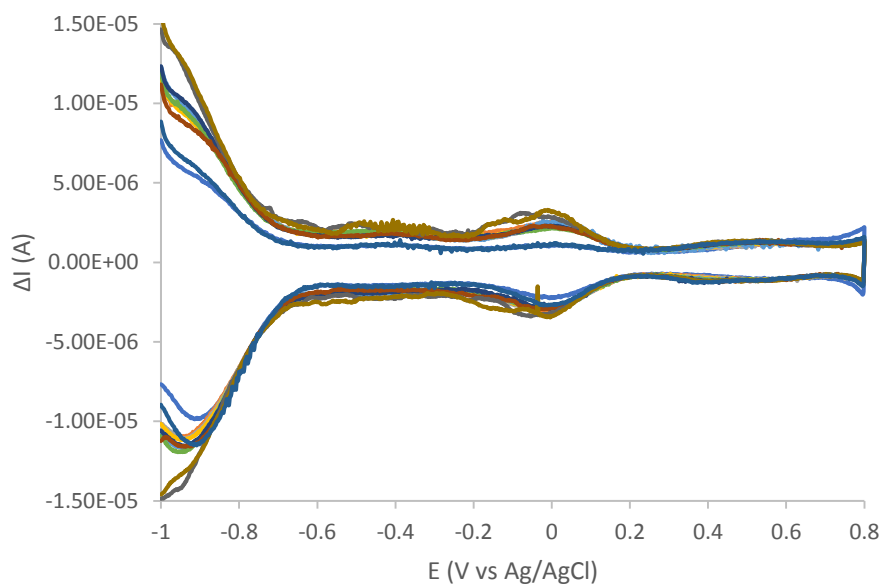


Figura 19: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo modificado sólo con la enzima (Au+LDH/NAD⁺) para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7

2.5.1.3 Electrodo modificado con la matriz polimérica de polipirrol (Au/Ppy)

Si sobre el electrodo de trabajo se electropolimeriza Ppy, vuelve a aparecer el pico del lactato. Además, al introducir el Ppy que es un polímero conductor, conseguimos aumentar la intensidad de pico que obtenemos en un orden de magnitud aproximadamente. Sin embargo, tanto el límite de detección como la sensibilidad empeoran ligeramente respecto al original (pasan a ser, para el pico de oxidación, de $9.03 \cdot 10^{-4}$ A/M y $5.26 \cdot 10^{-3}$ M respectivamente), quedando una regresión lineal también peor, como se observa en la figura 20:

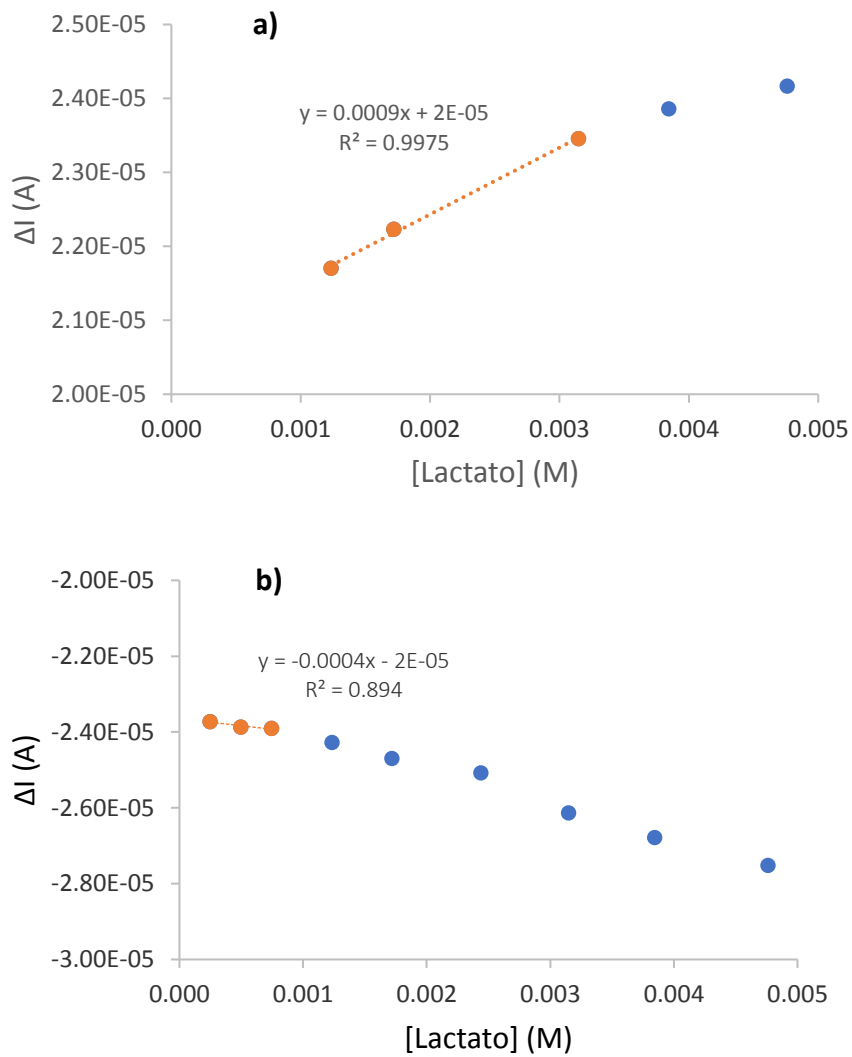


Figura 20: Curvas de calibrado obtenidas para los picos de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el polímero (Au/Ppy)

2.5.1.4 Electrodo modificado con la matriz polimérica de polipirrol y enzima LDH (Au/Ppy/LDH/NAD⁺)

Pasamos a inmovilizar nuestra enzima en un electrodo previamente polimerizado con el polipirrol. Las curvas de calibrado obtenidas se muestran en la figura 21:

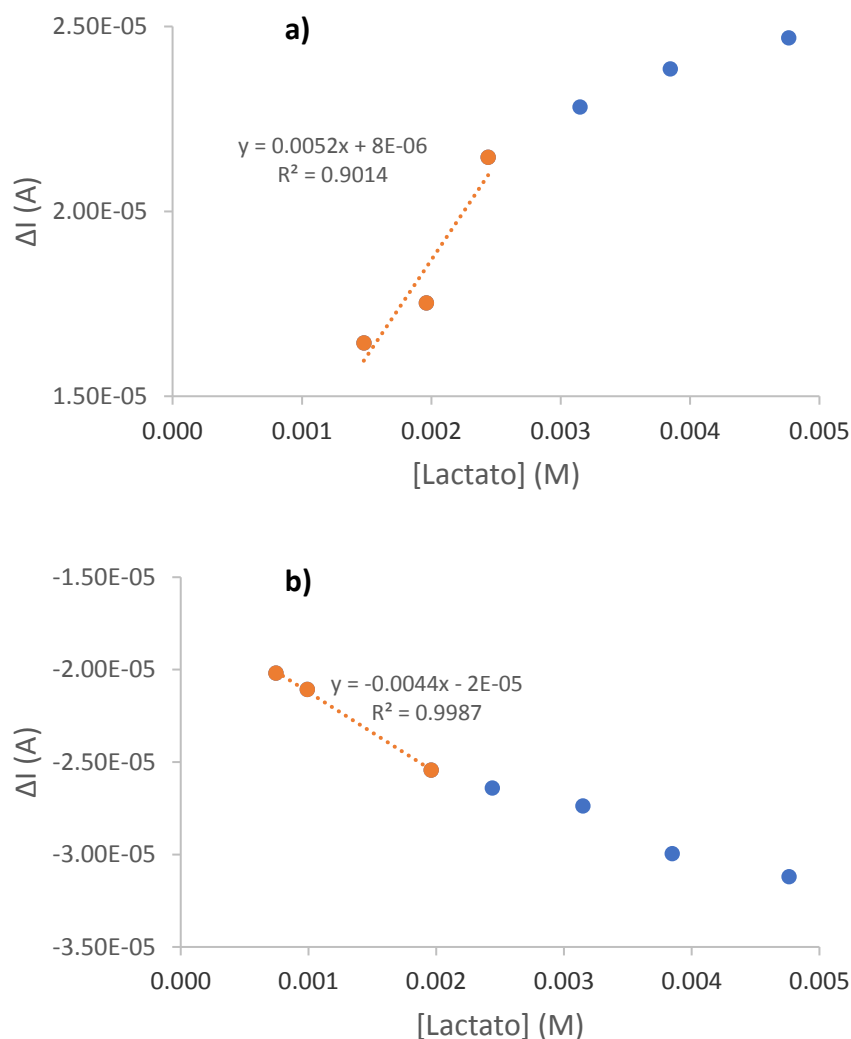


Figura 21: Curvas de calibrado obtenidas para los picos de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el polímero y la enzima inmovilizada (Au/Ppy/LDH/NAD⁺)

Los valores obtenidos así son mejores con respecto al caso anterior (para el pico de oxidación, sensibilidad de $5.22 \cdot 10^{-3}$ A/M y límite de detección de $5.01 \cdot 10^{-4}$ M), en el que sólo habíamos depositado el Ppy, pero la mejora con respecto al electrodo original es prácticamente inexistente. Esto nos lleva al siguiente paso, que consiste en la electrodeposición de nanopartículas de oro junto a la matriz de polipirrol.

2.5.1.5 Electrodo modificado con la matriz polimérica de pirrol nanopartículas de oro (Au + Ppy/AuNPs)

El siguiente paso realizado fue introducir nanopartículas de oro en nuestro sensor, mediante electrodeposición conjunta con el Ppy. Las

nanopartículas provocan un aumento en la superficie específica del electrodo, mejorando las propiedades de nuestro sensor, obteniendo el resultado representado en la figura 22. De esta manera, conseguimos mejorar ligeramente la sensibilidad y el límite de detección (para el pico de reducción la sensibilidad es de $5,92 \cdot 10^{-3} \text{ A/M}$ y el LD de $4,78 \cdot 10^{-4} \text{ M}$):

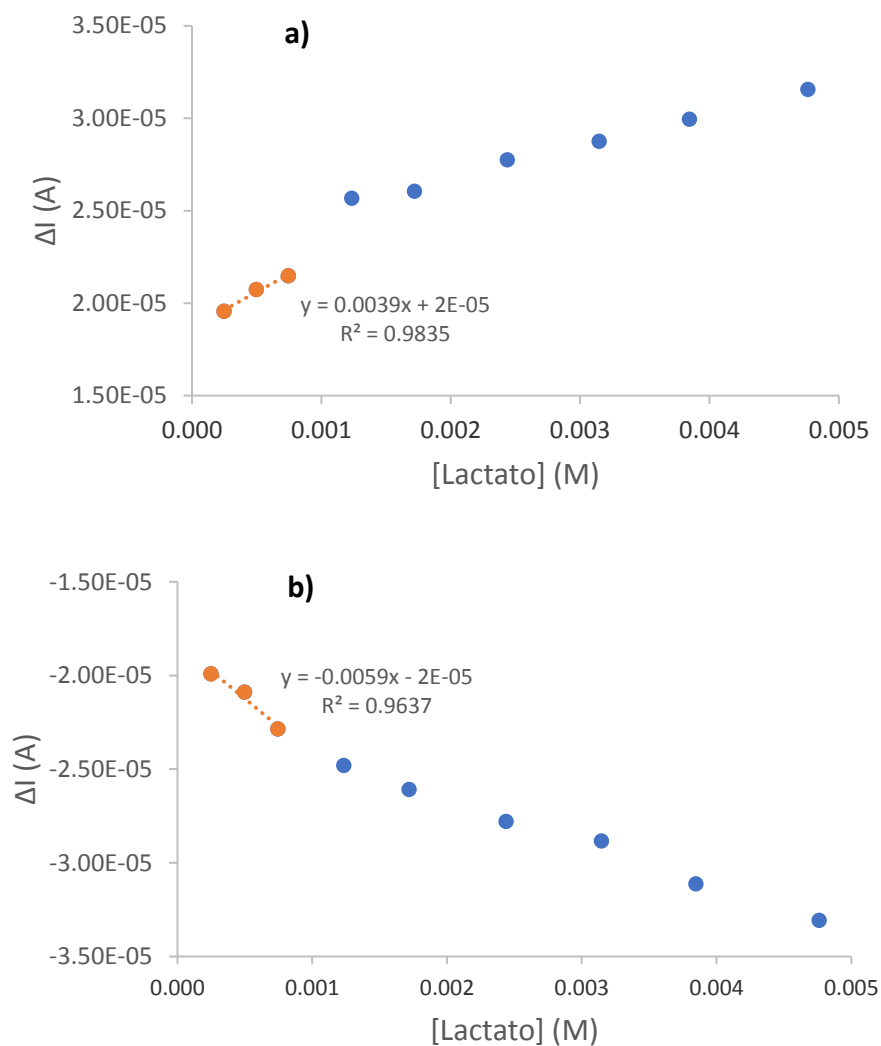


Figura 22: Curvas de calibrado obtenidas para los picos de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el composite formado por la matriz polimérica de polipirrol y nanopartículas de oro (Au+PPy/AuNPs)

2.5.1.6 Electrodo modificado con la matriz polimérica de pirrol, nanopartículas de oro y enzima LDH (Au/PPy/AuNPs/LDH/NAD⁺)

Se plantea ahora la inmovilización de la enzima, tratando de esta manera de optimizar el valor de los parámetros obtenidos.

Este electrodo presenta la mejor respuesta de todos debido a las ventajas que le otorgan conjuntamente el polímero conductor, las nanopartículas de oro y la acción enzimática. No sólo se observa una mejora en la sensibilidad y el límite de detección, sino que, además, presenta una cierta actividad catalítica, reduciendo el potencial necesario para oxidar el lactato. El pico pasa de situarse +0,45 V a +0,35 V aproximadamente (ver figura 23), lo que generalmente es una ventaja para el funcionamiento de los biosensores ya que requiere de un potencial menor para medir la concentración del analito.

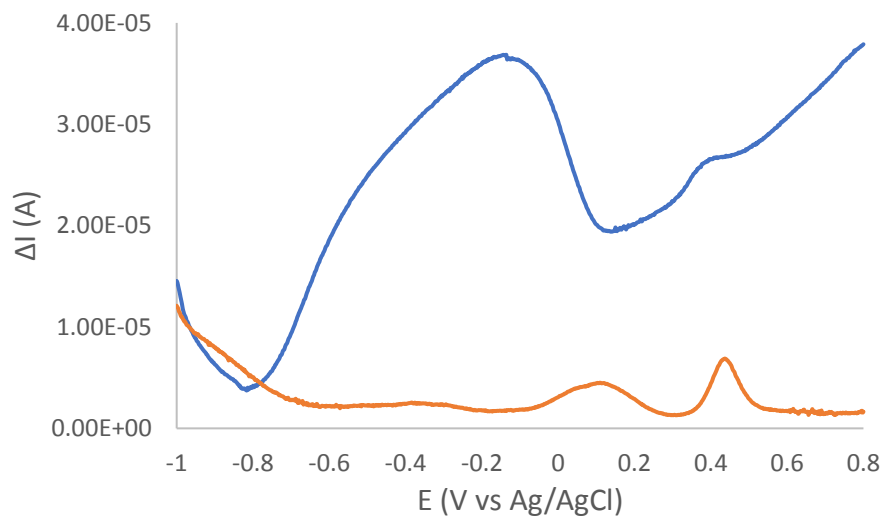


Figura 23: Desplazamiento del pico del lactato comparando el electrodo original sin modificar (naranja) con el electrodo final (azul) para una concentración de lactato de sodio $3.15 \cdot 10^{-3}$ M en buffer fosfato pH 7

Una vez comprobado que este biosensor es el que presenta mejores resultados, decidimos realizar distintas pruebas para optimizar su funcionamiento. En primer lugar, realizando el entrecruzamiento de dos formas distintas:

- Entrecruzamiento por separado: En este caso, añadimos la enzima y la coenzima al electrodo y dejamos secar a temperatura ambiente antes de introducir el electrodo en la disolución de glutaraldehído durante 20 minutos, teniendo lugar así el entrecruzamiento. Después dejamos secar en el frigorífico y lavamos con buffer fosfato siguiendo el procedimiento comentado en el desarrollo experimental. El resultado es bueno, presentando buenos valores de sensibilidad y límite de detección (mejora en un orden de magnitud aproximadamente respecto al electrodo original sin modificar: la sensibilidad es de $1,2 \cdot 10^{-2}$ A/M y el LD de $7,6 \cdot 10^{-5}$ M). Las rectas de calibrado se muestran en la figura 24:

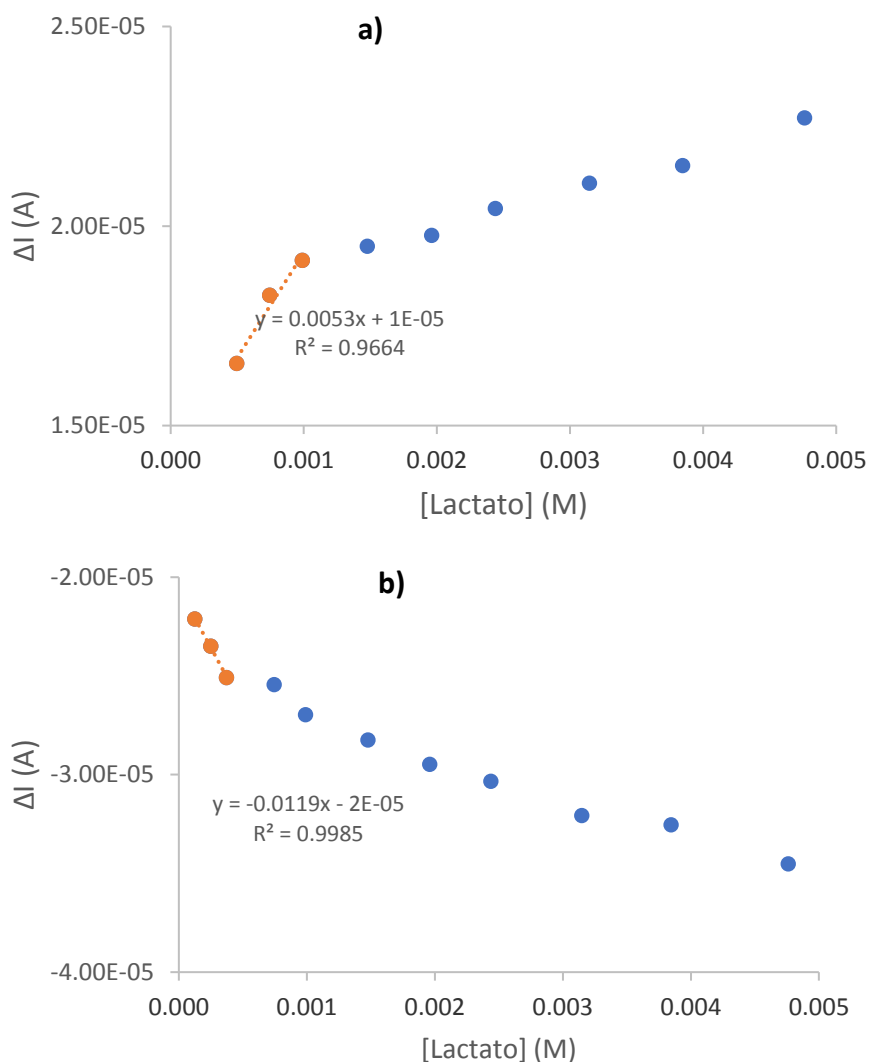


Figura 24: Curvas de calibrado obtenidas para el pico de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el polímero, nanopartículas y la enzima inmovilizada con el entrecruzamiento por separado (Au/Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺)

- Entrecruzamiento junto: trabajamos siguiendo el método explicado en el desarrollo experimental, con el que conseguimos mejorar el resultado anterior. La sensibilidad se duplica prácticamente, mientras que el límite de detección pasa a ser la mitad del anterior (sensibilidad de $1.58 \cdot 10^{-2}$ A/M y límite de detección de $3.07 \cdot 10^{-5}$ para el pico de oxidación). Las rectas de calibrado se ven en la figura 25:

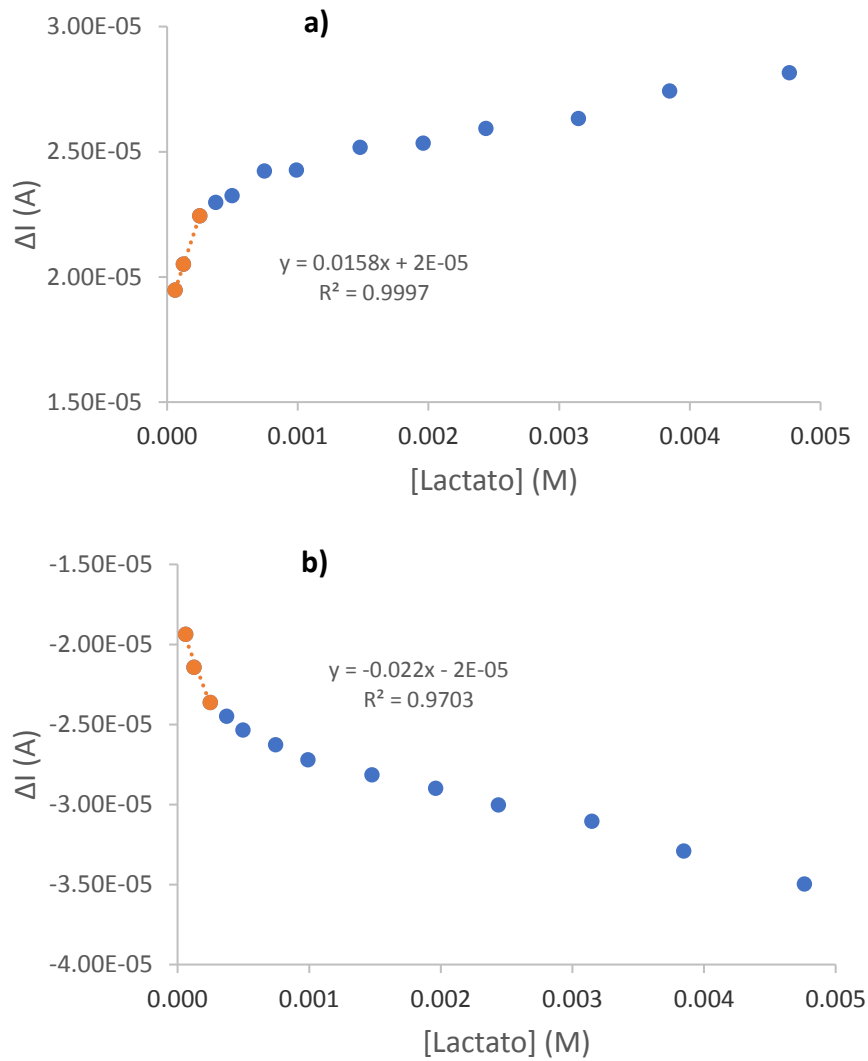


Figura 25: Curvas de calibrado obtenidas para el pico de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el polímero, nanopartículas y la enzima inmovilizada con el entrecruzamiento junto (Au/Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺)

En las tablas siguientes, se recogen los parámetros que resumen el funcionamiento de cada uno de los sensores de acuerdo con las modificaciones que hemos realizado, la tabla 1 para la corriente de oxidación y la tabla 2 para la de reducción.

Tabla 1: Resumen de los parámetros obtenidos para cada modificación del electrodo de trabajo para la corriente de oxidación

Oxidación					
Electrodo	Pendiente	Ordenada	R ²	LD	K_M^{app}
Au	$2.49 \cdot 10^{-3}$	$3.39 \cdot 10^{-6}$	0.991	$6.38 \cdot 10^{-4}$	(1)
Au+Enzima	SIN PICO				
Au+Ppy	$9.03 \cdot 10^{-4}$	$2.06 \cdot 10^{-5}$	0.998	$5.26 \cdot 10^{-3}$	(1)
Au+Ppy+Enzima	$5.22 \cdot 10^{-3}$	$8.24 \cdot 10^{-6}$	0.901	$5.01 \cdot 10^{-4}$	$1.49 \cdot 10^{-3}$
Au+Ppy+AuNPs	$3.86 \cdot 10^{-3}$	$1.87 \cdot 10^{-5}$	0.984	$9.68 \cdot 10^{-4}$	(1)
Au+Ppy+AuNPs+Enzima Entrecruzamiento separado	$5.26 \cdot 10^{-3}$	$1.49 \cdot 10^{-5}$	0.966	$5.69 \cdot 10^{-4}$	$1.39 \cdot 10^{-4}$
Au+Ppy+AuNPs+Enzima Entrecruzamiento junto	$1.58 \cdot 10^{-2}$	$1.85 \cdot 10^{-5}$	1.000	$3.07 \cdot 10^{-5}$	$1.06 \cdot 10^{-4}$

Tabla 2: Resumen de los parámetros obtenidos para cada modificación del electrodo de trabajo para la corriente de reducción

Reducción					
Electrodo	Pendiente	Ordenada	R ²	LD	K_M^{app}
Au	$-1.40 \cdot 10^{-3}$	$-2.81 \cdot 10^{-6}$	0.998	$9.77 \cdot 10^{-4}$	(1)
Au+Enzima	SIN PICO				
Au+Ppy	$-3.70 \cdot 10^{-4}$	$-2.37 \cdot 10^{-5}$	0.894	$7.39 \cdot 10^{-3}$	(1)
Au+Ppy+Enzima	$-4.37 \cdot 10^{-3}$	$-1.68 \cdot 10^{-5}$	0.999	$1.16 \cdot 10^{-3}$	$6.69 \cdot 10^{-4}$
Au+Ppy+AuNPs	$-5.92 \cdot 10^{-3}$	$-1.83 \cdot 10^{-5}$	0.964	$4.78 \cdot 10^{-4}$	(1)
Au+Ppy+AuNPs+Enzima Entrecruzamiento separado	$-1.19 \cdot 10^{-2}$	$-2.06 \cdot 10^{-5}$	0.999	$7.56 \cdot 10^{-5}$	$1.87 \cdot 10^{-4}$
Au+Ppy+AuNPs+Enzima Entrecruzamiento junto	$-2.20 \cdot 10^{-2}$	$-1.83 \cdot 10^{-5}$	0.970	$3.99 \cdot 10^{-5}$	$1.95 \cdot 10^{-4}$

(1) El valor de la constante aparente de Michaelis-Menten sólo se muestra para aquellos electrodos en los que se incluye la enzima durante su modificación, ya que en los demás casos carece de sentido.

2.5.2. Electrodo de carbono vítreo

Con el objetivo de estudiar la influencia del material con el que se construye el electrodo de trabajo, se repitió el procedimiento seguido con un electrodo de carbono vítreo.

En primer lugar, se estudió la respuesta del electrodo sin modificar, donde se observó que la respuesta es peor que en el caso del electrodo de trabajo de oro, ya que no es capaz de detectar el lactato y no se aprecian los picos de oxidación y reducción.

A continuación, se realizaron distintas modificaciones del electrodo de trabajo:

- Electrodo modificado con la matriz polimérica de polipirrol (CG/Ppy)
- Electrodo modificado con polipirrol y nanopartículas de oro (CG/Ppy/AuNPs).
- Electrodo modificado con polipirrol, nanopartículas de oro y la enzima LDH (CG/Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺).

El resultado obtenido en los distintos casos es el mismo, el sensor es incapaz de detectar el lactato. Esto demuestra que el funcionamiento del electrodo de carbono vítreo es bastante peor que del electrodo de oro. En la figura 26 se comparan los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos para cada electrodo de trabajo para una concentración dada de lactato de sodio. En la figura 27 se muestra el voltamperograma obtenido para el electrodo de trabajo CG/Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para distintas concentraciones de lactato.

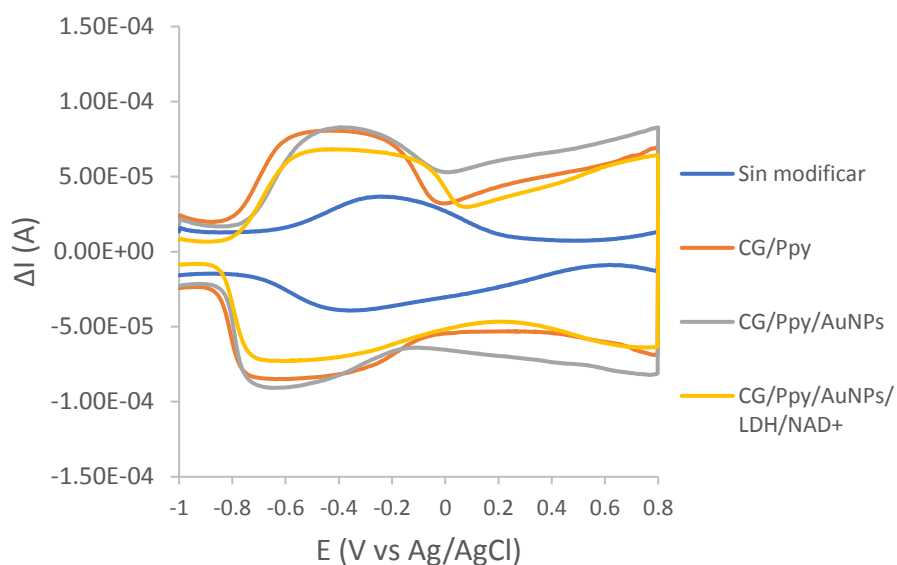


Figura 26: Voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos para las distintas modificaciones del electrodo de carbono vítreo para una concentración de lactato de sodio de $2.44 \cdot 10^{-3} M$ en buffer fosfato pH 7

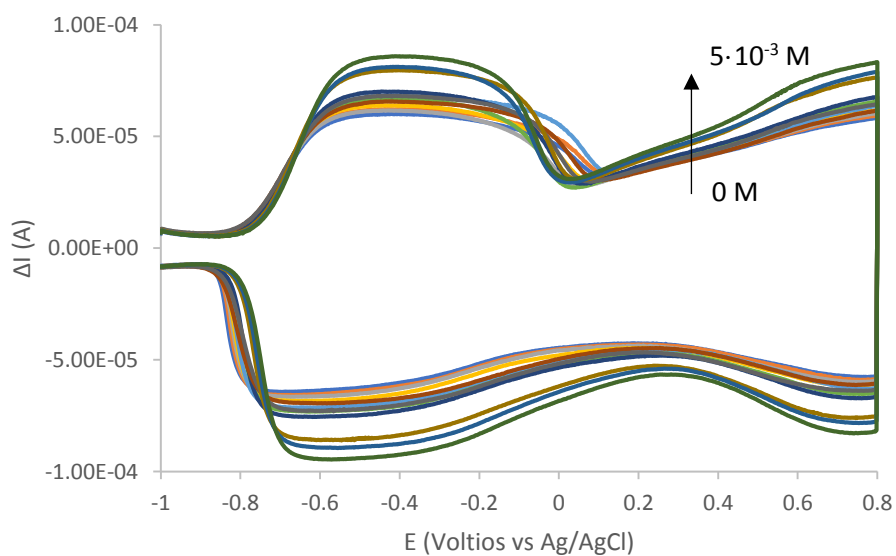


Figura 27: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo de CG+Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7

2.5.3. Optimización del electrodo

Una vez elegida la mejor modificación de electrodo de trabajo, pasamos a optimizar su funcionamiento, variando la cantidad de enzima y analizando la influencia de la coenzima NAD⁺.

2.5.3.1 *Cantidad de enzima*

Se ha estudiado la influencia de la cantidad de enzima empleada en la fabricación del electrodo en el funcionamiento del mismo:

- Disminución de la cantidad de enzima. Hemos probado con dos estrategias distintas, la primera consiste en diluir la enzima con la disolución de Tris-HCl y, la segunda, en añadir una menor cantidad de enzima a la hora de preparar el electrodo:
 - Enzima diluida. Hemos diluido la enzima con la disolución de Tris-HCl usada en la preparación de la coenzima. La disolución se ha realizado al 50% en volumen (concentración de 2.5 mg/mL). Para la preparación del electrodo de trabajo, seguimos el procedimiento habitual, añadiendo 5 µL de la disolución de enzima diluida.

Se realizaron distintas pruebas, sin obtener resultados satisfactorios ya que en la mayoría de los casos el composite se acababa despegando siendo imposible realizar la medida del mismo.

Cuando el electrodo era capaz de realizar la medida era incapaz de detectar el lactato como se muestra en el voltamperograma de onda cuadrada de la figura 28:

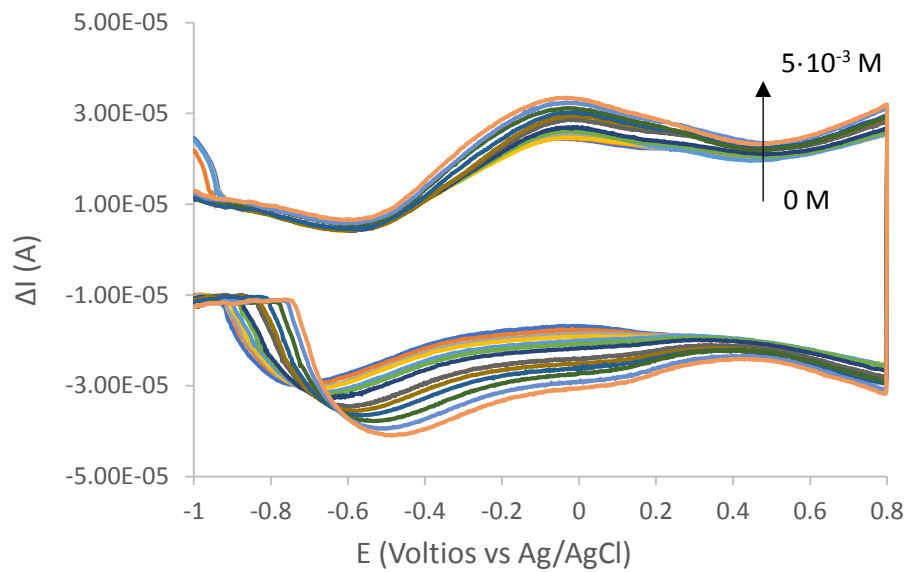
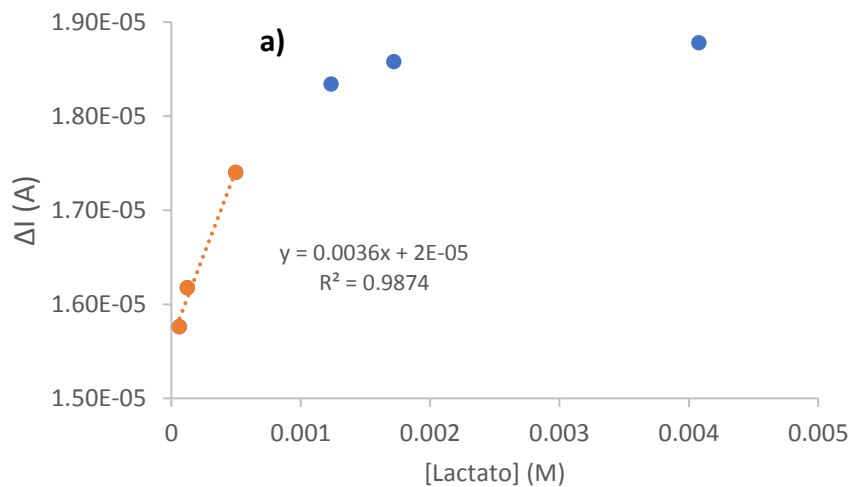


Figura 28: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo Ppy/AunNPs/LDH/NAD⁺ modificado con la enzima diluida con la disolución de Tris-HCl pH 7.4 para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7

- o Menor cantidad de enzima. Las pruebas realizadas se han efectuado añadiendo 3 μL de enzima de disolución 5 mg/mL en lugar de 5 μL .

El resultado es similar al anterior, debido a que, normalmente, se despegaba el composite sin poder realizar la medida. Cuando sí se pudo realizar la medida observando el pico del lactato, se obtuvieron las curvas de calibrado de la figura 29. Los valores del límite de detección y sensibilidad obtenidos para el pico de oxidación fueron de $1.22 \cdot 10^{-3}$ M y $3.6 \cdot 10^{-3}$ A/M respectivamente.



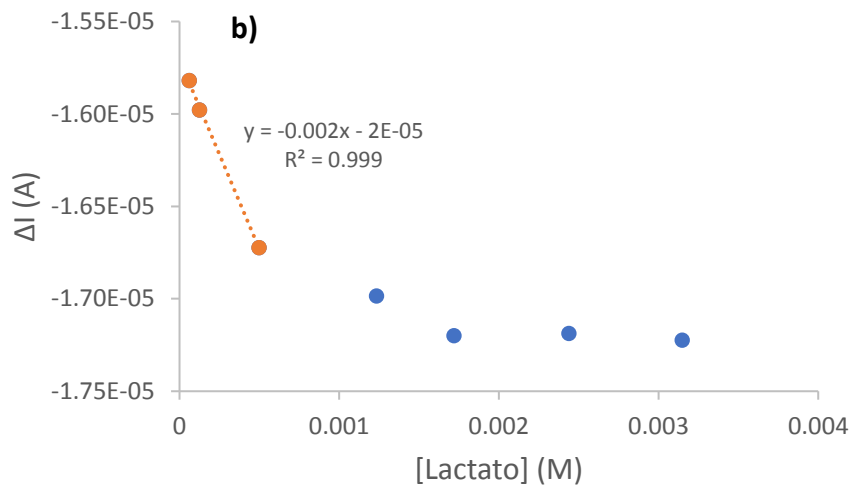


Figura 29: Curvas de calibrado obtenidas para el pico de a) oxidación y b) reducción para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ modificado con una menor cantidad de enzima

- Aumento de la cantidad de enzima. Se ha añadido una mayor cantidad de enzima en la preparación del electrodo, probando con 7 μL de disolución de enzima 5 mg/mL. De nuevo encontramos problemas con la estabilidad del electrodo, desgastándose el polímero con cierta facilidad e incluso despegándose.

Además, en aquellos casos en que podíamos medir, el resultado no fue bueno, como se aprecia en el voltamperograma de la figura 30. El pico de reducción no se observa, y el incremento de intensidad del pico de oxidación varía de forma aleatoria con la concentración de lactato como se muestra en la figura 31, apreciándose incluso una tendencia decreciente en la intensidad de corriente al aumentar la concentración, lo que no tiene sentido.

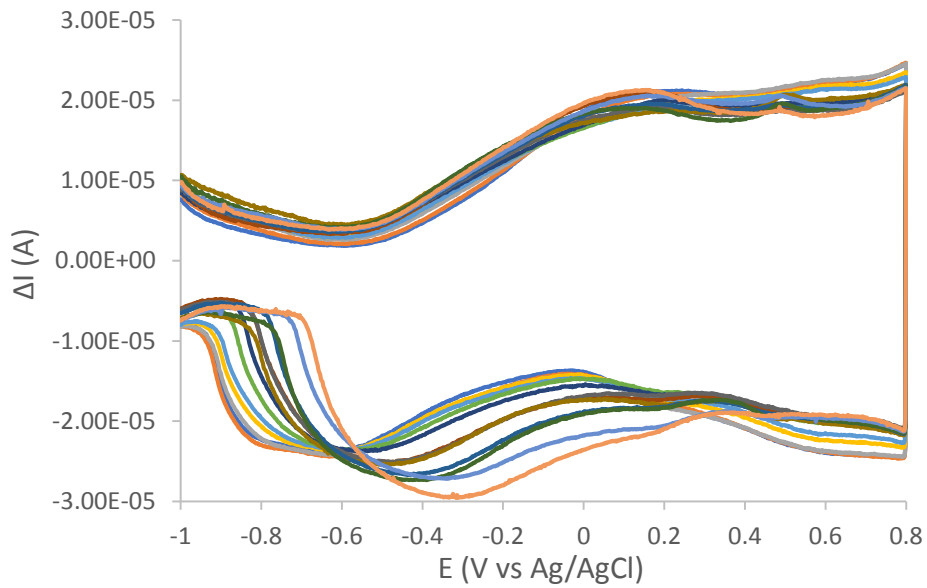


Figura 30: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ modificado con mayor cantidad de enzima (7 μ L) para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7

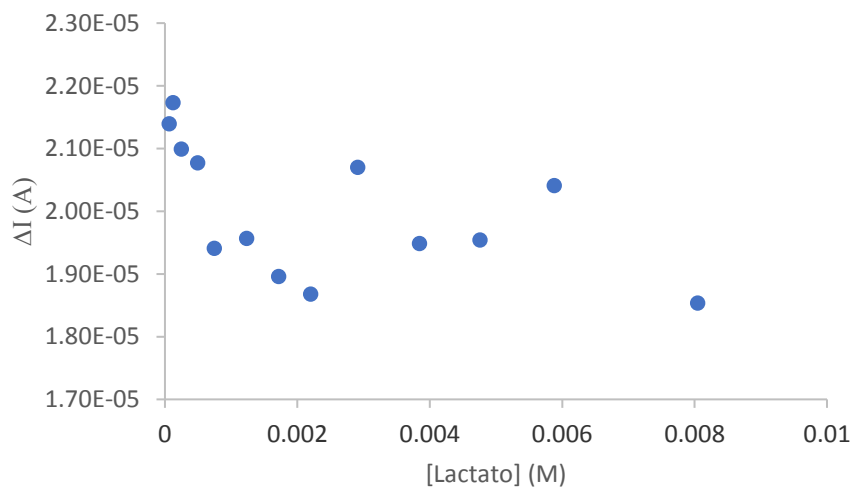


Figura 31: Curva de calibrado obtenida para el pico de oxidación para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ modificado con mayor cantidad de enzima (7 μ L)

En vistas a los resultados obtenidos, se deduce que la mejor respuesta del electrodo se obtiene trabajando con la cantidad y concentración de enzima elegidas inicialmente, es decir, añadiendo 5 μ L de la disolución de enzima LDH de concentración 5 mg/mL durante la modificación del electrodo.

2.5.3.2 Influencia de la coenzima NAD⁺

Otra de las pruebas realizadas consistió en realizar la inmovilización de la enzima LDH sin la coenzima NAD⁺, es decir, añadimos los 5 μ L de la disolución de LDH 5 mg/mL y realizamos el entrecruzamiento sin añadir la coenzima.

Se modificó el electrodo de esta forma y se realizaron dos pruebas:

- Coenzima NAD⁺ en la disolución a medir. En esta primera prueba, añadimos la coenzima NAD⁺ a la disolución de lactato de sodio con la que se realiza el calibrado. Elegimos la cantidad de coenzima de forma que su concentración sea constante durante el calibrado e igual a la concentración de coenzima que presenta el electrodo de trabajo cuando incluimos la coenzima, que es de 3 mM. Para que la concentración de coenzima se mantenga constante durante el calibrado, debemos incluir esta coenzima en el buffer fosfato pH 7 en el que realizamos los blancos.

El voltamperograma obtenido se muestra en la figura 32. En este no se observa el pico del lactato al ir adicionando concentraciones crecientes de lactato de sodio, lo que indica que el método de preparación no es el correcto.

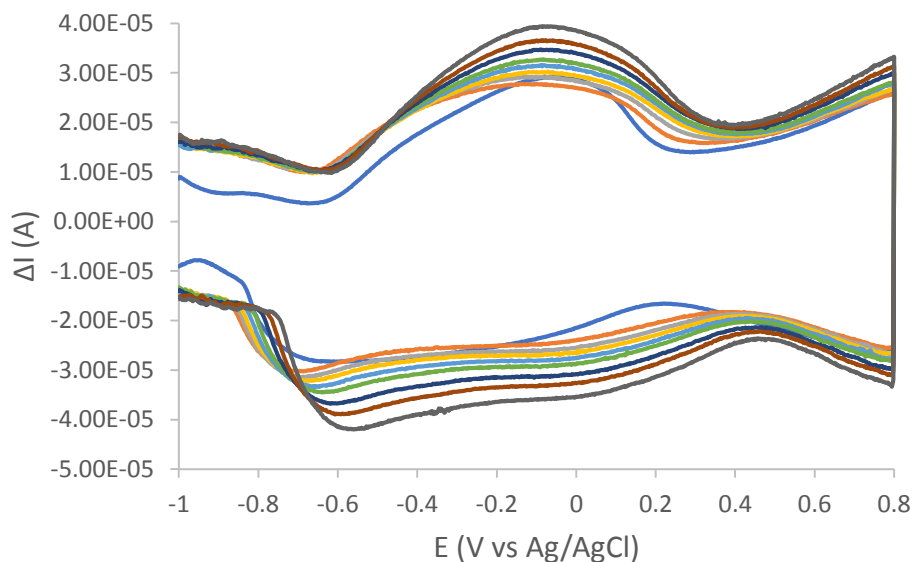


Figura 32: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo de Ppy/AuNPs/LDH midiendo distintas concentraciones de lactato en disolución buffer fosfato pH 7 y coenzima NAD⁺ 3 mM

- Sin coenzima NAD⁺. En esta experiencia, no incluimos la coenzima ni en la disolución a medir ni durante la inmovilización de la enzima. El resultado se muestra en la figura 33:

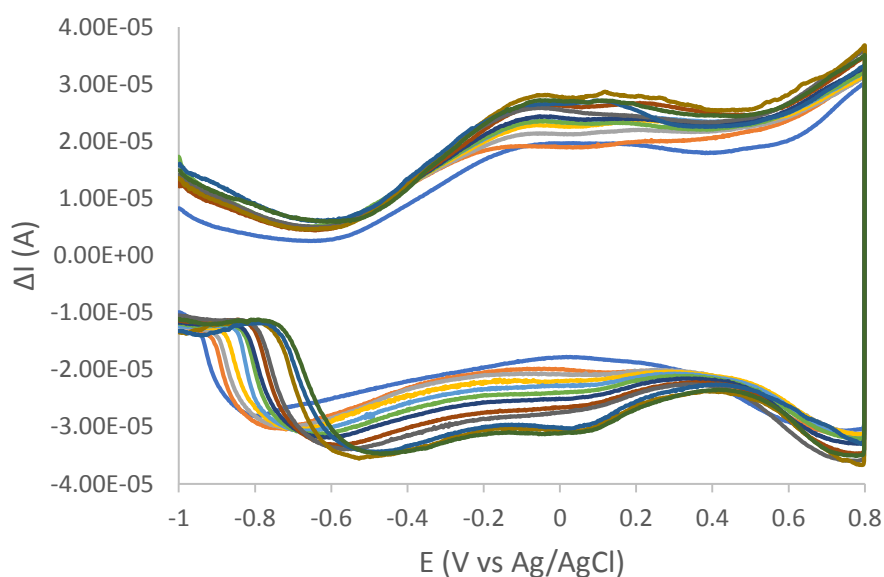


Figura 33: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH para distintas concentraciones de lactato en disolución buffer fosfato pH 7

Como se puede observar, el biosensor es incapaz de detectar el lactato, lo que indica la influencia de la coenzima en el electrodo, que permite llevar a cabo la reducción del lactato a piruvato, y con ello su medida.

Por lo tanto, se deduce que la coenzima NAD^+ debe inmovilizarse junto a la enzima LDH durante la preparación del electrodo para que éste sea capaz de detectar y medir el lactato.

2.5.4. Medición de vinos

Una vez optimizado el diseño del electrodo de trabajo, pasamos a la medición de muestras reales de vino.

Las medidas se realizaron siguiendo el procedimiento explicado y los resultados para los distintos vinos fueron los siguientes:

2.5.4.1 Vinos tintos

Se han medido vinos jóvenes de dos denominaciones de origen distintas: Ribera de Duero y El Bierzo. Para obtener las curvas de adición estándar y calcular así la concentración de lactato en el vino, nos hemos centrado en el pico de oxidación, ya que el de reducción no se solía ver y, cuando aparecía, se obtenían malas regresiones.

Los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos han sido del estilo del que se muestra en la figura 34:

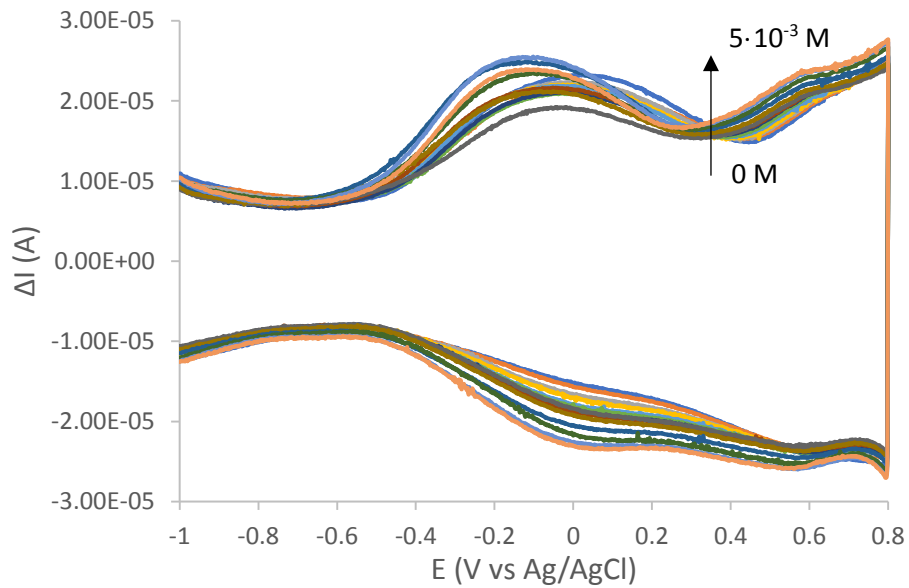


Figura 34: Voltamperograma obtenido para la medición de un vino tinto joven

Se puede observar el pico de oxidación, aunque es menos perceptible que el que veíamos en la medición de los electrodos, y además se encuentra desplazado hacia potenciales mayores.

La curva de adición estándar obtenida para este vino se muestra en la figura 35:

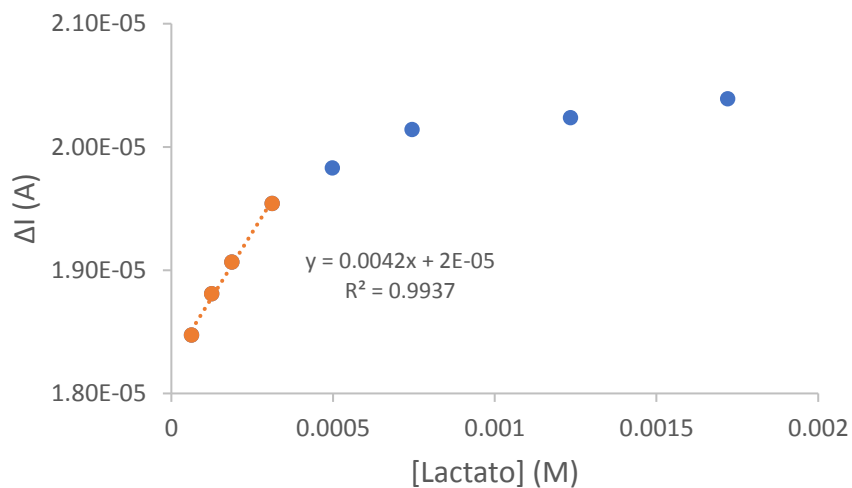


Figura 35: Curva de adición estándar obtenida para la medida de un vino tinto joven para el pico de oxidación.

A partir de la ecuación de la recta obtenida, se calcula la concentración de lactato en el vino.

Con el objetivo de comprobar si la medida es la correcta, se ha llevado a cabo la medición de un mismo vino con dos biosensores. El vino medido ha sido un tinto joven de denominación de origen de Ribera de Duero.

Las curvas de adición estándar, representadas en la figura 36, siguen un comportamiento que es típico de las reacciones enzimáticas de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 2).

Empleando la ecuación de la recta de la zona lineal, podemos calcular la concentración de lactato en el vino como se ha explicado, prolongando la recta para encontrar el punto de corte con el eje de abscisas.

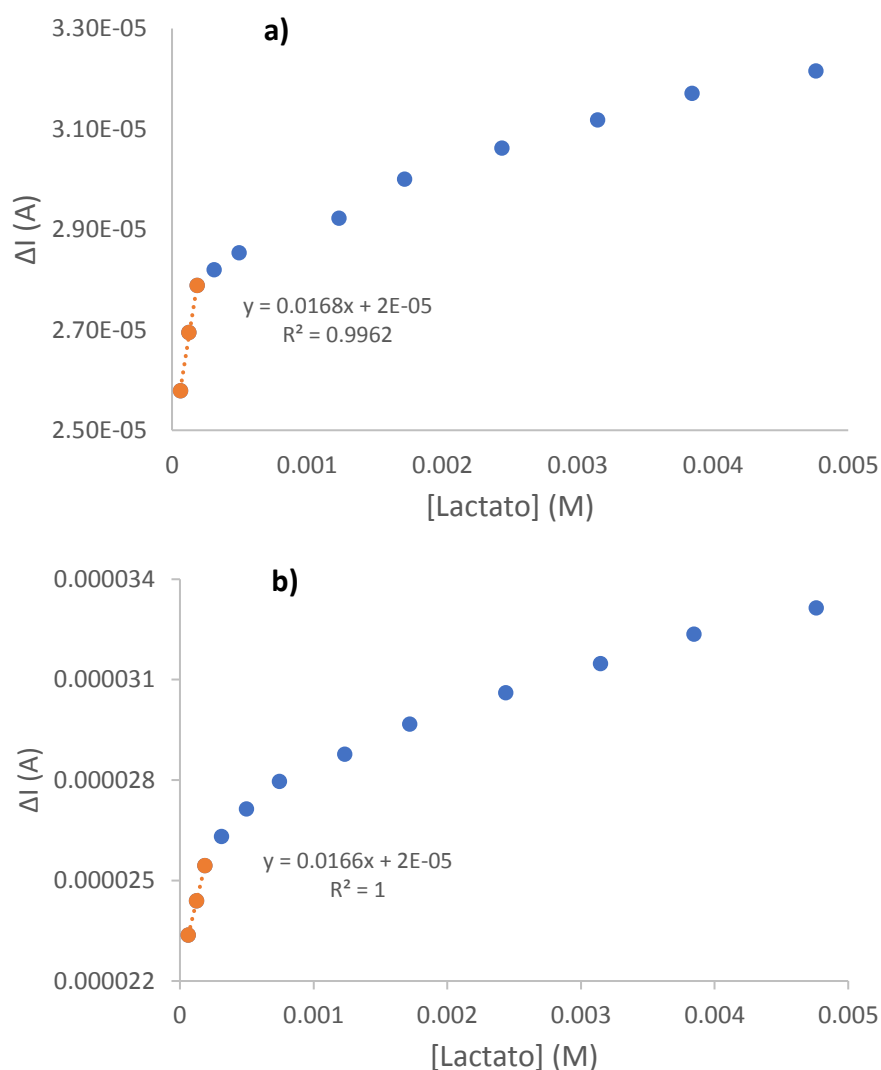


Figura 36: Curvas de adición estándar obtenidas para dos electrodos de trabajo Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para el vino (tinto joven de Ribera de Duero)

La concentración de lactato calculada para este vino por cada electrodo ha sido:

Electrodo a	$9.84 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
Electrodo b	$8.94 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

La concentración de lactato en vinos tintos suelen rondar valores similares a los obtenidos según la bibliografía (aproximadamente $1 \text{ g/L} = 11.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) [60]. Además, el valor de la concentración obtenido para cada sensor ha sido bastante parecido, arrojando un error relativo del 9%, por lo que podemos considerar que la medida es correcta.

2.5.4.2 Vinos blancos

Se ha medido un vino blanco *Sauvignon* de denominación de origen de Rueda, con distintos electrodos sin obtener buenos resultados en ningún caso, ya que no detecta el pico del lactato, con lo que no podemos medir su concentración en el vino. Esto puede deberse a varios motivos: estos vinos presentan más partículas en suspensión que pueden adherirse al electrodo empeorando su funcionamiento; y la concentración de lactato es más variable que en los tintos [60], con lo que es más difícil hallar el valor óptimo de la dilución para realizar la medida.

Un ejemplo de los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos para la medida de vinos blancos se muestra en la figura 37:

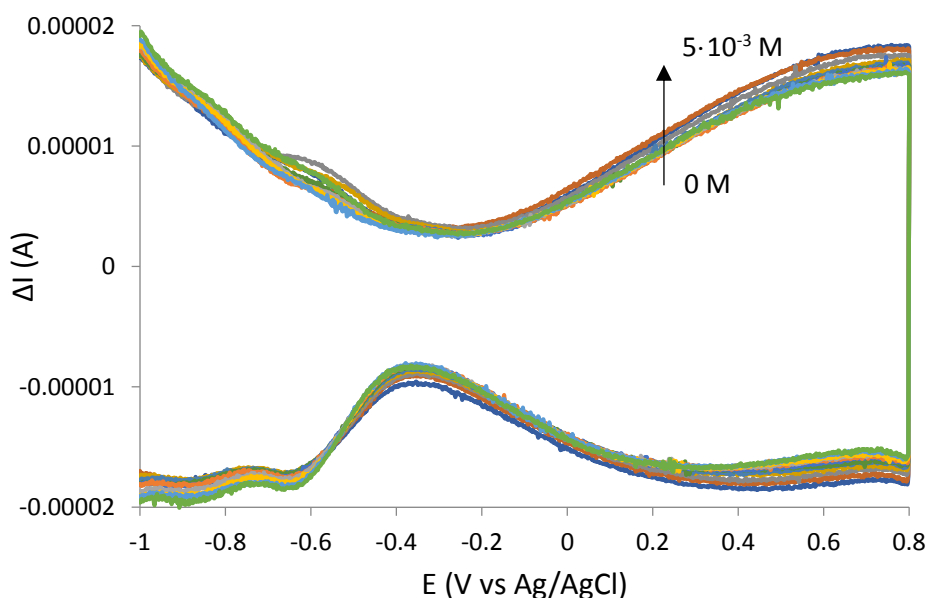


Figura 37: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido en la medición de un vino blanco con nuestro electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para distintas concentraciones de lactato en disolución de vino y buffer fosfato pH 7

2.5.5. Estudio de la selectividad del biosensor

Vamos a estudiar la influencia que pueden tener, distintos compuestos presentes en las disoluciones a medir, en la detección y medida del lactato. Para ello, hemos realizado la medida del electrodo con distintos compuestos como son el ácido ascórbico, el ácido cítrico y el ácido tartárico, de la misma forma que hacíamos con el lactato. El procedimiento seguido es el siguiente:

- Introducimos 40 mL de buffer fosfato pH 7 en la celda electroquímica.
- Añadimos volúmenes conocidos de disoluciones de concentración 0.1 M que contienen los distintos compuestos que pueden actuar como interferentes.
- Medimos la respuesta del electrodo tras cada adición mediante voltamperometría de onda cuadrada, en las condiciones descritas anteriormente.

2.5.5.1 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un ácido orgánico, de fórmula molecular $C_6H_8O_6$ (figura 38), que destaca por su poder antioxidante y su gran importancia en el metabolismo, ayudando a evitar ciertas enfermedades como el cáncer. Al igual que el ácido láctico y el lactato, es un compuesto quiral, cuyo enantiómero *L* se conoce habitualmente como vitamina C.

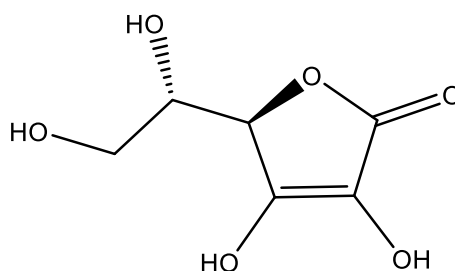


Figura 38: Fórmula molecular del ácido ascórbico.

Está presente en una gran cantidad de frutas y verduras, donde el contenido en vitamina C decae durante su almacenamiento, de ahí que su detección y análisis sea muy importante [61].

Se ha medido el ácido *L*-ascórbico siguiendo el procedimiento comentado, obteniendo una respuesta como se muestra en la figura 39:

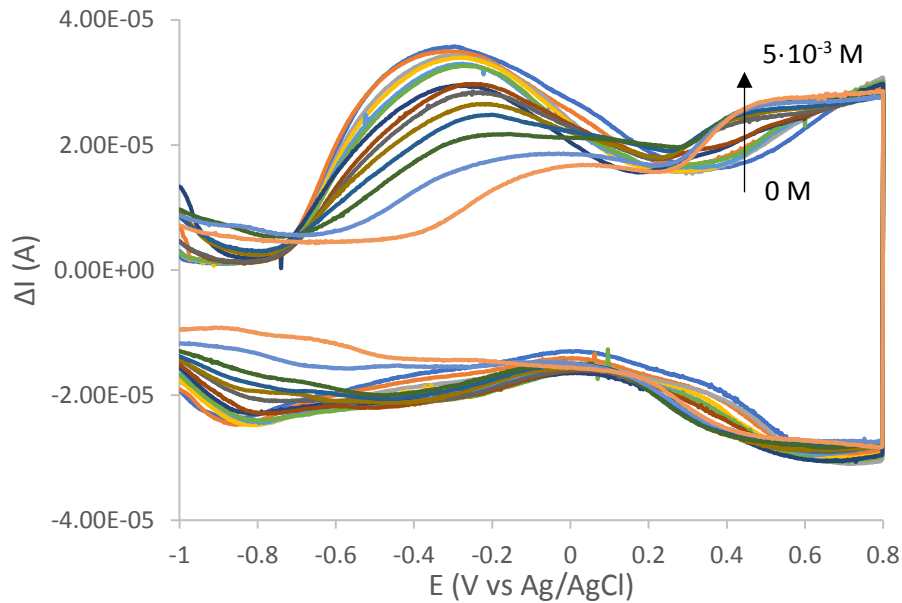


Figura 39: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para la medida del electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para distintas concentraciones de ácido ascórbico en buffer fosfato pH 7

En la figura 39 se observa un pico en torno a potenciales de +0.4 V, que coincide aproximadamente con el potencial correspondiente al pico del lactato, por lo que la presencia de este compuesto puede afectar a la medida del lactato.

2.5.5.2 Ácido cítrico

Es un ácido orgánico tricarboxílico, de fórmula química C₆H₈O₇ (figura 40) con poder conservante y oxidante, de ahí su extendido uso como aditivo en industria alimentaria. Podemos encontrar este compuesto en la mayor parte de las frutas, sobre todo en los cítricos.

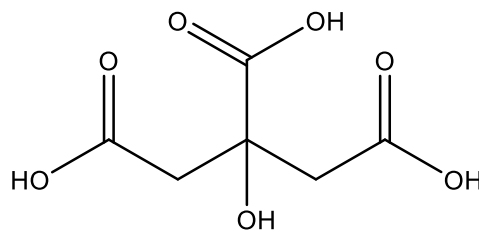


Figura 40: Fórmula química del ácido cítrico

El ácido cítrico es un compuesto de suma importancia en el metabolismo de los organismos vivos, ya que gran parte de ellos obtienen energía a partir del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs. En este ciclo se produce la oxidación completa de la glucosa, que se inicia en la glucólisis. En la glucólisis obtenemos dos moléculas de piruvato que se oxidan a acetil-CoA y

entran en el ciclo de Krebs, donde se oxidan a dióxido de carbono y agua mediante un conjunto de ocho reacciones catalizadas por enzimas. Otros sustratos, a mayores de la glucosa, pueden entrar en este ciclo, como pueden ser el lactato o el etanol [62].

El resultado obtenido de la medida del ácido cítrico se muestra en la figura 41:

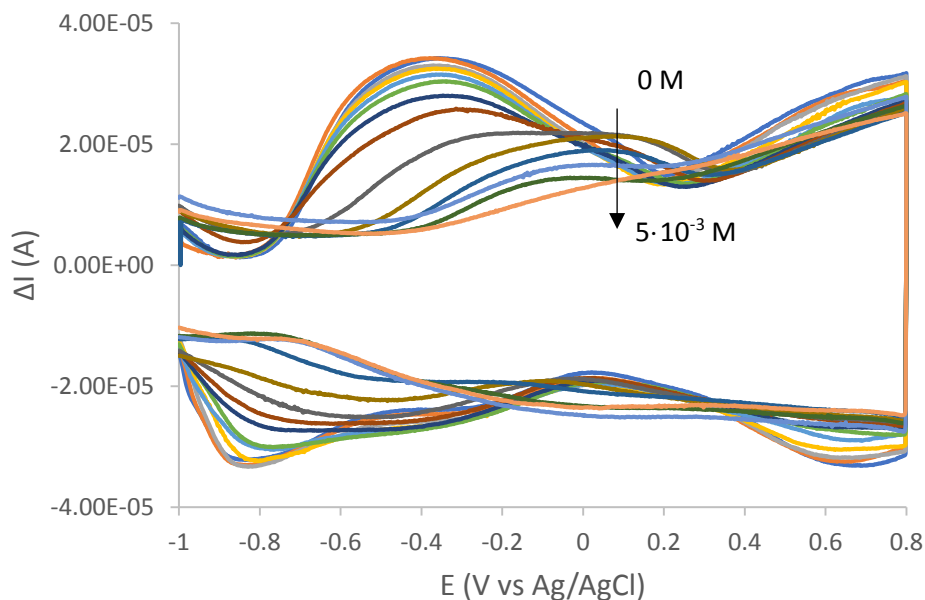


Figura 41: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para la medida del electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para distintas concentraciones de ácido cítrico en buffer fosfato pH 7

En este caso, obtenemos la tendencia contraria al caso anterior, al ir adicionando el ácido cítrico no se observa pico de oxidación ni de reducción y, además, la intensidad va disminuyendo, tanto a potenciales positivos como a potenciales negativos (pico de -0.4 V) lo que podría indicar que la presencia de ácido cítrico puede provocar la pérdida de actividad del electrodo, empeorando su funcionamiento.

2.5.5.3 Ácido tartárico

El ácido tartárico es un compuesto orgánico de fórmula molecular C₄H₆O₆ (figura 42), usado como acidificante y conservador natural (E-334).

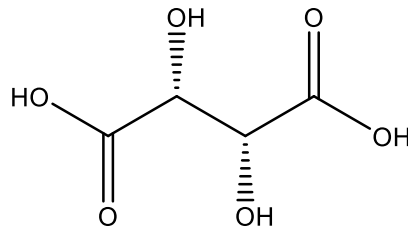


Figura 42: Fórmula del ácido tartárico

El ácido tartárico también es quiral, siendo el compuesto *L* el que procederemos a medir ya que es el de importancia biológica. Se encuentra presente en los vinos y las uvas, siendo el compuesto ácido más significativo, por lo que tiene una gran influencia en su acidez, sabor y estabilidad. Esta estabilidad se ve afectada por la presencia de este ácido, ya que tiende a formar precipitados como bitartato de potasio. Esto convierte a la concentración de tartárico es un parámetro a seguir en la evolución de los vinos [63].

El voltamperograma obtenido que se puede ver en la figura 43:

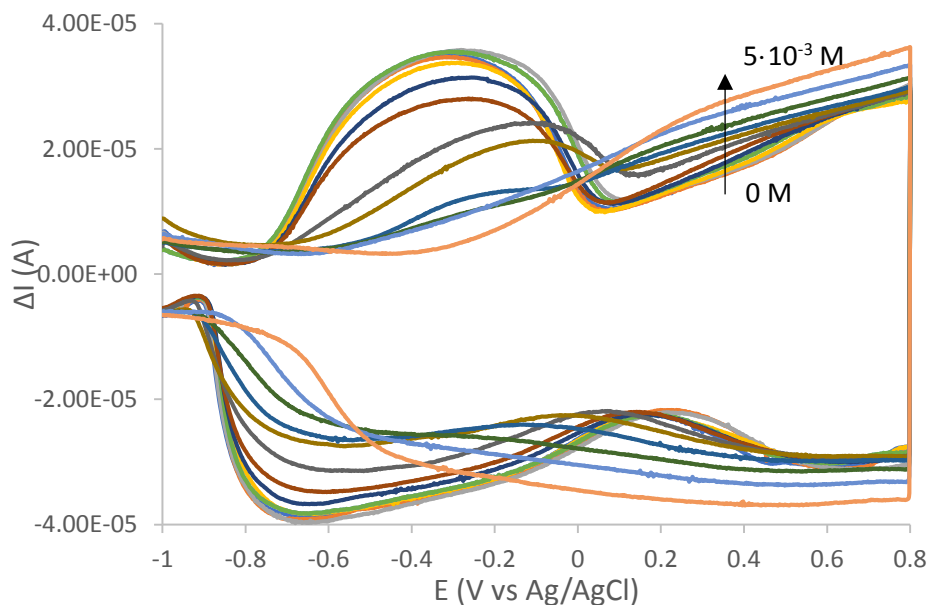


Figura 43: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para la medida del electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para distintas concentraciones de ácido tartárico en buffer fosfato pH 7

En este caso existe un pico para las primeras medidas, pero es prácticamente imperceptible y desaparece al ir adicionando el ácido a la disolución, de manera que la influencia que puede tener en la medida es baja.

También se observa, al igual que en el caso del ácido cítrico, una pérdida en la actividad del electrodo, con lo que la presencia de ácido tartárico podría afectar al funcionamiento del biosensor si la concentración de este compuesto es alta.

Conclusiones

3. Conclusiones

En este trabajo, se ha estudiado la preparación y respuesta de un biosensor amperométrico para la medición de *L*-lactato de sodio. Este biosensor se construye mediante la electrodeposición de un composite de polipirrol y nanopartículas de oro sobre el que se inmoviliza de forma conjunta la enzima *L*-LDH y la coenzima NAD⁺ mediante entrecruzamiento con glutaraldehído.

De esta manera, hemos conseguido perfeccionar la respuesta del electrodo original de trabajo del que partimos, mejorando en un orden de magnitud la sensibilidad y el límite de detección del mismo, alcanzando valores de $1.58 \cdot 10^{-2}$ A/M y $3.07 \cdot 10^{-5}$ M respectivamente. Estos valores se han obtenido para las condiciones óptimas de fabricación del electrodo referidas a la electropolimerización del composite, el material del electrodo de trabajo, la forma de inmovilizar la enzima, la concentración de la misma y la presencia de la coenzima NAD⁺.

Una vez desarrollado el biosensor, se ha comprobado su funcionamiento en la medida de muestras de vinos tintos, obteniendo un buen resultado. Para finalizar, se ha estudiado la selectividad del biosensor, viendo como la presencia de ciertos compuestos, como el ácido ascórbico principalmente, puede afectar a la medición de lactato.

Bibliografía

4. Bibliografía

- [1] C. Medina-Plaza, C. García-Cabezón, C. García-Hernández, C. Bramorski, Y. Blanco-Val, F. Martín-Pedrosa, T. Kawai, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir-Blodgett films based on functionalized nanoparticles, *Anal. Chim. Acta.* 853 (2015) 572–578.
- [2] P. Alessio, C.S. Martin, J.A. De Saja, M.L. Rodriguez-Mendez, Mimetic biosensors composed by layer-by-layer films of phospholipid, phthalocyanine and silver nanoparticles to polyphenol detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 233 (2016) 654–666.
- [3] C. García-Hernández, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, J.A. De Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Layered composites of PEDOT/PSS/nanoparticles and PEDOT/PSS/phthalocyanines as electron mediators for sensors and biosensors, *Beilstein J. Nanotechnol.* 7 (2016) 1948–1959.
- [4] C. Medina-Plaza, C. García-Hernández, J.A. de Saja, J.A. Fernández-Escudero, E. Barajas, G. Medrano, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez, The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes, *LWT - Food Sci. Technol.* 62 (2015) 940–947.
- [5] C. García-Hernández, C. García-Cabezón, C. Medina-Plaza, F. Martín-Pedrosa, Y. Blanco, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Electrochemical behavior of polypyrrol/AuNP composites deposited by different electrochemical methods: Sensing properties towards catechol, *Beilstein J. Nanotechnol.* 6 (2015) 2052–2061.
- [6] B.D. Malhotra, A. Chaudhary, Biosensors for clinical diagnostics industry, *Sensors Actuators, B Chem.* 91 (2003) 117–127.
- [7] M.L. Goodwin, J.E. Harris, M. Ed, A. Hernández, L.B. Gladden, D. Ph, Blood Lactate Measurements and Analysis during Exercise :, 1 (2007) 558–569.
- [8] F. Mazzei, A. Azzoni, B. Cavalieri, F. Botrè, C. Botrè, A multi-enzyme bioelectrode for the rapid determination of total lactate concentration in tomatoes, tomato juice and tomato paste, *Food Chem.* 55 (1996) 413–418.
- [9] D.P. Hickey, R.C. Reid, R.D. Milton, S.D. Minter, A self-powered amperometric lactate biosensor based on lactate oxidase immobilized in dimethylferrocene-modified LPEI, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 26–31.

- [10] D. Calabria, C. Caliceti, M. Zangheri, M. Mirasoli, P. Simoni, A. Roda, Smartphone-based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry, *Biosens. Bioelectron.* 94 (2017) 124–130.
- [11] K. Dagar, C.S. Pundir, An improved amperometric L-lactate biosensor based on covalent immobilization of microbial lactate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/copper nanoparticles/polyaniline modified pencil graphite electrode, *Enzyme Microb. Technol.* 96 (2017) 177–186.
- [12] O. Smutok, M. Karkovska, R. Serkiz, B. Vus, N. Čenas, M. Gonchar, A novel mediatorless biosensor based on flavocytochrome b2 immobilized onto gold nanoclusters for non-invasive L-lactate analysis of human liquids, *Sensors Actuators B Chem.* 250 (2017) 469–475.
- [13] B. Krantz, Metabolism Lecture 4 – GLYCOLYSIS FEEDER PATHS & GLUCONEOGENESIS – Restricted for students enrolled in MCB102, UC Berkeley, Spring 2008 ONLY, (n.d.). https://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/mcb102/lect_S2008/MCB102-SPRING2008-LECTURE4-FEEDER_GLUONEOGENESIS.pdf (accessed June 19, 2017).
- [14] E. Primo Yúfera, Química orgánica básica y aplicada : de la molécula a la industria, Reverté, 1994. https://books.google.es/books?id=4eX-mdTjyHcC&pg=PA13&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q=enantiómero&f=false (accessed June 14, 2017).
- [15] S.L. Liu, T. Oyama, Y. Miyoshi, S.Y. Sheu, M. Mita, T. Ide, W. Lindner, K. Hamase, J.A. Lee, Establishment of a two-dimensional chiral HPLC system for the simultaneous detection of lactate and 3-hydroxybutyrate enantiomers in human clinical samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 116 (2015) 80–85.
- [16] L. Rassaei, W. Olthuis, S. Tsujimura, E.J.R. Sudhölter, A. Van Den Berg, Lactate biosensors: Current status and outlook, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 123–137.
- [17] E.H. de Lucas, A.A. Rotaecche, P.E. Navas, A.G. de L. y Mateos, Alteraciones del metabolismo Ácido base: acidosis, *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado.* 11 (2015) 4748–4758.
- [18] M.M. Hall, S. Rajasekaran, T.W. Thomsen, A.R. Peterson, Lactate: Friend or Foe, *PM R.* 8 (2016) S8–S15.
- [19] K. Rathee, V. Dhull, R. Dhull, S. Singh, Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review, *Biochem. Biophys. Reports.* 5 (2016) 35–54.

- [20] B. Lloyd, J. Burrin, P. Smythe, K.G.M.M. Alberti, Enzymic fluorometric continuous-flow assays for blood glucose, lactate, pyruvate, alanine, glycerol, and 3-hydroxybutyrate, *Clin. Chem.* 24 (1978) 1724–1729.
- [21] H. Nakamura, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, M. Suda, S. Uchiyama, A compactly integrated flow cell with a chemiluminescent FIA system for determining lactate concentration in serum, *Anal. Chem.* 73 (2001) 373–378.
- [22] J. Ren, A. Dean Sherry, C.R. Malloy, Noninvasive monitoring of lactate dynamics in human forearm muscle after exhaustive exercise by ¹H-magnetic resonance spectroscopy at 7 tesla, *Magn. Reson. Med.* 70 (2013) 610–619.
- [23] A. Parra, E. Casero, L. Vázquez, F. Pariente, E. Lorenzo, Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces, *Anal. Chim. Acta.* 555 (2006) 308–315.
- [24] S. Suman, R. Singhal, A.L. Sharma, B.D. Malhotra, C.S. Pundir, Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase, *Sensors Actuators, B Chem.* 107 (2005) 768–772.
- [25] R. Aghaei, M. Mazloum-Ardakani, M. Abdollahi-Alibeik, S.M. Moshtaghioun, A. Rezaeipoor-Anari, Z. Haghighijoo, L. Zamani, A new electrochemical biosensor based on telomeric G-quadruplex DNA: In silico and experimental study of dihydropyridine derivatives potential effect on telomerase inhibition, *J. Electroanal. Chem.* 796 (2017) 24–32.
- [26] T. Madasamy, N.K. Sethy, Chapter 3 – Enzymatic Biosensors, in: *Biosens. Bioelectron.*, 2015: pp. 133–204.
- [27] C. Karunakaran, R. Rajkumar, K. Bhargava, *Introduction to Biosensors*, Elsevier Inc., 2015.
- [28] I. Bravo, M. Revenga-Parra, F. Pariente, E. Lorenzo, Reagent-less and robust biosensor for direct determination of lactate in food samples, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017) 1–11.
- [29] H.C. Yoon, H.S. Kim, Electrochemical characteristics of a carbon-based thick-film L-lactate biosensor using L-lactate dehydrogenase, *Anal. Chim. Acta.* 336 (1996) 57–65.
- [30] R. Gupta, N.K. Chaudhury, Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2387–2399.
- [31] A. Chaubey, K.K. Pande, V.S. Singh, B.D. Malhotra, Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline

- films, *Anal. Chim. Acta.* 407 (2000) 97–103.
- [32] D. Chan, M.M. Barsan, Y. Korpan, C.M.A. Brett, L-lactate selective impedimetric bienzymatic biosensor based on lactate dehydrogenase and pyruvate oxidase, *Electrochim. Acta.* 231 (2017) 209–215.
- [33] F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze, P.G. Zambonin, Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 531–539.
- [34] J. Kulys, L. Wang, A. Maksimoviene, I-Lactate oxidase electrode based on methylene green and carbon paste, *Anal. Chim. Acta.* 274 (1993) 53–58.
- [35] P. Gros, M. Comtat, A bioelectrochemical polypyrrole-containing $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ interface for the design of a NAD-dependent reagentless biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 204–210.
- [36] M.R. Romero, F. Ahumada, F. Garay, A.M. Baruzzi, Amperometric biosensor for direct blood lactate detection, *Anal. Chem.* 82 (2010) 5568–5572.
- [37] U. Lange, N. V. Roznyatovskaya, V.M. Mirsky, Conducting polymers in chemical sensors and arrays, *Anal. Chim. Acta.* 614 (2008) 1–26.
- [38] S. Azzouzi, L. Rotariu, A.M. Benito, W.K. Maser, M. Ben Ali, C. Bala, A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for sensitive detection of l-lactate tumor biomarker, *Biosens. Bioelectron.* 69 (2015) 280–286.
- [39] P.J. Lamas-Ardisana, O.A. Loaiza, L. Añorga, E. Jubete, M. Borghei, V. Ruiz, E. Ochoteco, G. Cabañero, H.J. Grande, Disposable amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilised on platinum nanoparticle-decorated carbon nanofiber and poly(diallyldimethylammonium chloride) films, *Biosens. Bioelectron.* 56 (2014) 345–351.
- [40] B.H. Meshram, R.P. Mahore, P.D. Virutkar, S.B. Kondawar, Polypyrrole/Carbon Nanotubes/Lactate Oxidase Nanobiocomposite Film based Modified Stainless Steel Electrode Lactate biosensor, *Procedia Mater. Sci.* 10 (2015) 176–185.
- [41] S. Rho, D. Jahng, J.H. Lim, J. Choi, J.H. Chang, S.C. Lee, K.J. Kim, Electrochemical DNA biosensors based on thin gold films sputtered on capacitive nanoporous niobium oxide, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 852–856.
- [42] I. Shakir, M. Shahid, H.W. Yang, S. Cherevko, C.H. Chung, D.J. Kang, α -

- MoO₃ nanowire-based amperometric biosensor for L-lactate detection, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 2197–2201.
- [43] F. Kuralay, S. Tunç, F. Bozduman, L. Oksuz, A.U. Oksuz, Biosensing applications of titanium dioxide coated graphene modified disposable electrodes, *Talanta*. 160 (2016) 325–331.
- [44] Y. Zhao, X. Fang, Y. Gu, X. Yan, Z. Kang, X. Zheng, P. Lin, L. Zhao, Y. Zhang, Gold nanoparticles coated zinc oxide nanorods as the matrix for enhanced l-lactate sensing, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 126 (2015) 476–480.
- [45] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Screen-printed biosensors in microbiology; A review, *Talanta*. 82 (2010) 1629–1636.
- [46] A. Chaubey, M. Gerard, R. Singhal, V.S. Singh, B.D. Malhotra, Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole – polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors, *Electrochim. Acta* 46 (2000) 723–729.
- [47] T.E. Keyes, R.J. Forster, *Electrochimica Acta* Polypyrrole – gold nanoparticle composites for highly sensitive DNA detection, *Electrochim. Acta*. 109 (2013) 102–109.
- [48] B. Rezaei, M.K. Boroujeni, A.A. Ensa, Biosensors and Bioelectronics Caffeine electrochemical sensor using imprinted film as recognition element based on polypyrrole, sol-gel, and gold nanoparticles hybrid nanocomposite modified pencil graphite electrode, *Sensors* 60 (2014) 77–83.
- [49] J. Zhang, X. Liu, S. Wu, H. Xu, B. Cao, *Sensors and Actuators B: Chemical* One-pot fabrication of uniform polypyrrole / Au nanocomposites and investigation for gas sensing, *Sensors Actuators B. Chem.* 186 (2013) 695–700.
- [50] A.J. Bard, L.R. Faulkner, N. York, C. @bullet, W. Brisbane, S.E. Toronto, *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*, 1944.
- [51] V. Mirceski, R. Gulaboski, M. Lovric, I. Bogeski, R. Kappl, M. Hoth, Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress, *Electroanalysis*. 25 (2013) 2411–2422.
- [52] sensitivity in metrology and analytical chemistry, A, in: *IUPAC Compend. Chem. Terminol.*, IUPAC, Research Triangle Park, NC, n.d.
- [53] A. Shrivastava, V. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles Young Sci.* 2 (2011) 21.
- [54] Ž. Bajzer, E.E. Strehler, About and beyond the henri-michaelis-menten

- rate equation for single-substrate enzyme kinetics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 (2012) 982–985.
- [55] A. Pandey, *Enzyme Technology*, Interciencia. (2005) 760.
- [56] D. de I. Química, *Espectroscopia Ultravioleta - Visible*, Univ. Carlos III Madrid. (2010) 1–9.
- [57] D.N. Huyen, N.T. Tung, T.D. Vinh, N.D. Thien, Synergistic Effects in the Gas Sensitivity of Polypyrrole/Single Wall Carbon Nanotube Composites, *Sensors*. 12 (2012) 7965–7974.
- [58] Introduction to Gold Nanoparticle Characterization - Cytodiagnosics, (n.d.). <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Introduction-to-Gold-Nanoparticle-Characterization-d3.htm> (accessed June 29, 2017).
- [59] G. Bussetti, S. Trabattoni, S. Uttiya, A. Sassella, M. Riva, A. Picone, A. Brambilla, L. Duò, F. Ciccacci, M. Finazzi, Controlling drop-casting deposition of 2D Pt-octaethyl porphyrin layers on graphite, *Synth. Met.* 195 (2014) 201–207.
- [60] T.B. Goriushkina, A.P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, Application of Amperometric Enzyme Biosensors for Wine and Must Analysis, *Procedia Chem.* 1 (2009) 277–280.
- [61] A. Barberis, G. Bazzu, G. Calia, G.M.G. Puggioni, G.G. Rocchitta, R. Migheli, M. Schirra, M.S. Desole, P.A. Serra, New ultralow-cost telemetric system for a rapid electrochemical detection of vitamin C in fresh orange juice, *Anal. Chem.* 82 (2010) 5134–5140.
- [62] D. Sokic-Lazic, S.D. Minteer, Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 939–944.
- [63] S.M. Oliveira, T.I.M.S. Lopes, I. V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, Simultaneous determination of tartaric acid and potassium in wines using a multicommutated flow system with dialysis, *Talanta*. 81 (2010) 1735–1741.

Índice de figuras

Figura 1: Obtención de lactato a partir de glucosa mediante la glucólisis y la fermentación láctica	7
Figura 2: Equilibrio entre ácido láctico y lactato	8
Figura 3: Interacción entre el compuesto biológico y el analito.	10
Figura 4: Mecanismo de reacción de la enzima LOx	11
Figura 5: Mecanismo de reacción de la enzima LDH	12
Figura 6: Molécula de pirrol.....	15
Figura 7: Montaje del sistema para a) dos electrodos y b) tres electrodos.....	18
Figura 8: a) Barrido de potencial para una voltamperometría cíclica y b) ejemplo de voltamperograma cíclico típico obtenido [50].	19
Figura 9: Barrido de potencial y muestreo en una voltamperometría de onda cuadrada [51].....	20
Figura 10: Estructura del polipirrol	27
Figura 11: a) Espectro UV-Vis obtenido para las dos disoluciones iniciales y la mezcla (antes y después de electropolimerizar el electrodo), b) zoom del mismo	28
Figura 12: Cronopotenciograma obtenido en la electrodeposición del composite sobre el electrodo a +0,04 mA y durante 300 segundos.	29
Figura 13: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para la corriente de oxidación medido para el sensor Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ a distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7	32
Figura 14: Voltamperograma de onda cuadrada de reducción medido para el sensor Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ a distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7	32
Figura 15: Curvas de calibrado obtenidas para el pico de a) oxidación y b) reducción para el sensor de Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7	33
Figura 16: Linealización de Hanes-Woolf obtenida para el cálculo de constante de Michaelis-Menten para los picos de a) oxidación y b) reducción del sensor Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺	34
Figura 17: Curva de adición estándar obtenida para el sensor Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ a distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7 y vino	36

Figura 18: Curvas de calibrado obtenidas para los picos de a) oxidación y b) reducción obtenidas para el electrodo de trabajo sin modificar	39
Figura 19: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo modificado sólo con la enzima (Au+LDH/NAD ⁺) para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7	40
Figura 20: Curvas de calibrado obtenidas para los picos de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el polímero (Au/Ppy)	41
Figura 21: Curvas de calibrado obtenidas para los picos de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el polímero y la enzima inmovilizada (Au/Ppy/LDH/NAD ⁺).....	42
Figura 22: Curvas de calibrado obtenidas para los picos de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el composite formado por la matriz polimérica de polipirrol y nanopartículas de oro (Au+Ppy/AuNPs).....	43
Figura 23: Desplazamiento del pico del lactato comparando el electrodo original sin modificar (naranja) con el electrodo final (azul) para una concentración de lactato de sodio $3.15 \cdot 10^{-3}$ M en buffer fosfato pH 7	44
Figura 24: Curvas de calibrado obtenidas para el pico de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el polímero, nanopartículas y la enzima inmovilizada con el entrecruzamiento por separado (Au/Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺).....	45
Figura 25: Curvas de calibrado obtenidas para el pico de a) oxidación y b) reducción para el electrodo modificado con el polímero, nanopartículas y la enzima inmovilizada con el entrecruzamiento junto (Au/Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺)	46
Figura 26: Voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos para las distintas modificaciones del electrodo de carbono vítreo para una concentración de lactato de sodio de $2.44 \cdot 10^{-3}$ M en buffer fosfato pH 7	49
Figura 27: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo de CG+Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7	49
Figura 28: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ modificado con la enzima diluida con la disolución de Tris-HCl pH 7.4 para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7	51
Figura 29: Curvas de calibrado obtenidas para el pico de a) oxidación y b) reducción para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ modificado con una menor cantidad de enzima.....	52

Figura 30: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ modificado con mayor cantidad de enzima (7 μL) para distintas concentraciones de lactato sódico en disolución buffer fosfato pH 7	53
Figura 31: Curva de calibrado obtenida para el pico de oxidación para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ modificado con mayor cantidad de enzima (7 μL)	53
Figura 32: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo de Ppy/AuNPs/LDH midiendo distintas concentraciones de lactato en disolución buffer fosfato pH 7 y coenzima NAD ⁺ 3 mM	54
Figura 33: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para el electrodo Ppy/AuNPs/LDH para distintas concentraciones de lactato en disolución buffer fosfato pH 7	55
Figura 34: Voltamperograma obtenido para la medición de un vino tinto joven	56
Figura 35: Curva de adición estándar obtenida para la medida de un vino tinto joven para el pico de oxidación.....	56
Figura 36: Curvas de adición estándar obtenidas para dos electrodos de trabajo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ para el vino (tinto joven de Ribera de Duero).....	57
Figura 37: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido en la medición de un vino blanco con nuestro electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ para distintas concentraciones de lactato en disolución de vino y buffer fosfato pH 7	58
Figura 38: Fórmula molecular del ácido ascórbico.	59
Figura 39: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para la medida del electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ para distintas concentraciones de ácido ascórbico en buffer fosfato pH 7	60
Figura 40: Fórmula química del ácido cítrico.....	60
Figura 41: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para la medida del electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ para distintas concentraciones de ácido cítrico en buffer fosfato pH 7	61
Figura 42: Fórmula del ácido tartárico	62
Figura 43: Voltamperograma de onda cuadrada obtenido para la medida del electrodo Ppy/AuNPs/LDH/NAD ⁺ para distintas concentraciones de ácido tartárico en buffer fosfato pH 7	62

