

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**DESARROLLO DE ELECTRODOS DE COLESTEROL
OXIDASA PARA SU APLICACIÓN EN BIOSENSORES
AUTOALIMENTABLES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOMÉDICA

P R E S E N T A:

JOHANNES PEDRO MARTÍNEZ MORALES



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Alejandra Álvarez López

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

Especialidad en Ingeniería Biomédica



“Desarrollo de electrodos de Colesterol Oxidasa para su aplicación
en biosensores autoalimentables”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
INGENIERO EN BIOMÉDICA

Presenta:

Johannes Pedro Martínez Morales

Dirigido por:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Presidente

Dra. Alejandra Álvarez López

Vicepresidente

Dr. Andrés Déctor Espinoza

Secretario

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Vocal

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Julio, 2022

México

Resumen

Los dispositivos clínicos de detección rápida hoy en día han aumentado su demanda por la sociedad como consecuencia de sus diversas ventajas que presentan, como su precisión, bajo costo de producción y tiempo de respuesta inmediato. Sin embargo, dichos dispositivos presentan una dependencia hacia fuentes de energía externas, que al ser desechadas en gran cantidad representan una amenaza para el medio ambiente por ser fuentes de contaminación tóxicas, y al mismo tiempo, esto limita significativamente la portabilidad de dichos dispositivos. Es por eso que, en los últimos años, diversos trabajos de investigación se han realizado para estudiar la producción de energía para llevar a cabo reacciones en las que ocurran transferencia de electrones partiendo de la oxidación de un sustrato orgánico y de esta forma poder alimentar energéticamente a los dispositivos como es el caso de los biosensores.

En el presente trabajo se desarrollaron electrodos anódicos haciendo uso de la enzima *Cholesterol Oxidase (COx)* inmovilizada sobre nanotubos de carbono de multipared para ser empleados en biosensores auto-alimentables. Se realizaron estudios bioquímicos y electroquímicos de los electrodos desarrollados para estudiar la oxidación de colesterol a diferentes concentraciones y obtener lecturas de la corriente producida durante la transferencia de electrones. Se construyeron las celdas de biocombustible microfluídicas de flujo lateral, las cuales fueron caracterizadas electroquímicamente por medio de las técnicas de potencial circuito abierto (OCV), curvas de descarga, cronoamperometría para obtener las curvas de polarización de la celda y evaluar su comportamiento en presencia de colesterol a diferentes concentraciones. Se pudo obtener una buena detección del colesterol utilizando soluciones sintéticas, así como una buena densidad de potencia por el dispositivo microfluídico utilizando el electrodo desarrollado como bioánodo.

Palabras clave: *Cholesterol Oxidase*, colesterol, celda de biocombustible microfluídica, biosensor.

Summary

Rapid clinical detection devices are increasingly in demand by society today due to their various advantages, such as accuracy, low production cost and immediate response time. However, such devices present a dependence on external energy sources, which when discarded in large quantities represent a threat to the environment as sources of toxic contamination, and at the same time, this significantly limits the portability of such devices. That is why, in recent years, several research works have been carried out to study the production of energy to carry out reactions in which electron transfer occurs from the oxidation of an organic substrate and thus be able to power devices such as biosensors.

In the present work, anodic electrodes were developed using the enzyme Cholesterol Oxidase (COx) immobilized on multi-walled carbon nanotubes to be used in self-powered biosensors. Biochemical and electrochemical studies were performed on the electrodes developed to study the oxidation of cholesterol at different concentrations and to obtain readings of the current produced during electron transfer. Lateral flow microfluidic biofuel cells were constructed and electrochemically characterized by means of open circuit potential (OCV) techniques, discharge curves, chronoamperometry to obtain the polarization curves of the cell and evaluate its behavior in the presence of cholesterol at different concentrations. It was possible to obtain a good detection of cholesterol using synthetic solutions, as well as a good power density by the microfluidic device using the electrode developed as bioanode.

Keywords: Cholesterol oxidase, cholesterol, microfluidic biofuel cell, biosensor.

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo a mi familia, como muestra de mi inmensa gratitud y aprecio al sacrificio que ellos hicieron para poder darme la oportunidad de tener una carrera universitaria, que no solamente tuvo significado en mi transigencia académica, sino también en lo personal y profesional, este pequeño logro es también vuestro. A mis asesores de tesis dedico este proyecto en agradecimiento de haberme dado la oportunidad de contar con su guía académica a lo largo de mi carrera, estoy en deuda con ustedes y llevaré conmigo todas las enseñanzas y aprendizajes que cada uno de ustedes inculco en mí formación profesional y académica.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por estar presentes en todo momento durante el proceso de mi formación académica, siendo mi motor y mi mayor motivación.

Al Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa, a la Dra. Alejandra Álvarez López, la Dra. Vanessa Vallejo Becerra y el Dr. Andrés Déctor Espinoza; agradezco su confianza que depositaron en mí, la fé y paciencia que me brindaron a lo largo de este proyecto significó una oportunidad de crecimiento no solamente académico, sino también profesional y personal.

A mis colegas de laboratorio, Ing. Julio César López Rivas, Ing. Cristian Eduardo Flores Arreola e Ing. Luis Alberto Estrada Jiménez, su amistad significó su contribución a este trabajo, que no solamente forjaron lazos de compañerismo en el laboratorio, sino de amistad en la vida, seremos débiles por el tiempo, pero siempre fuertes en voluntad, ¡que prosiga el poderoso drama y que nosotros podemos contribuir con un verso, Carpe Díem!

RESUMEN	3
SUMMARY	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	1210
1. INTRODUCCIÓN	1312
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1615
3. JUSTIFICACIÓN	1716
4. ANTECEDENTES	1817
4.1. COLESTEROL.....	1817
4.2. ENZIMAS	2019
4.2.1. BUENAS PRÁCTICAS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA	2120
4.2.2. ENSAMBLAMIENTO DE MEZCLAS DE ENSAYO ENZIMÁTICO.....	2120
4.2.3. CONSIDERACIONES DE PH Y FUERZA IÓNICA	2221
4.2.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	2221
4.2.5. CINÉTICA DE REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS DE UN SOLO SUSTRATO	2322
4.2.6. EL GRAFICO LINEWEAVER-BURK.....	2524
4.3. COLESTEROL OXIDASA	2625
4.4. BIOSENSORES	2826
4.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES	2928
4.5. CELDAS DE BIOCOMBUSTIBLE MICROFLUÍDICAS	3029
4.5.1. CELDAS DE BIOCOMBUSTIBLE MICROFLUÍDICAS ENZIMÁTICAS	3230
4.5.2. ESTRUCTURA DE MATERIALES PARA LOS ELECTRODOS DE LA CELDA MICROFLUÍDICA.....	3432
4.5.3. CELDAS DE BIOCOMBUSTIBLE MICROFLUÍDICAS ENZIMÁTICAS CONSTRUIDAS EN PAPEL.....	3533
4.5.4. PROCESO ENZIMÁTICO DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN LAS CELDAS DE BIOCOMBUSTIBLE MICROFLUÍDICAS ENZIMÁTICAS CONSTRUIDAS EN PAPEL	3634
4.6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICAS	3735
4.6.1. VOLTAMETRÍA CÍCLICA.....	3735
4.6.2. VOLTAMETRÍA DE PULSO DIFERENCIAL.....	4240
4.6.3. FUNDAMENTOS ELECTROQUÍMICOS DE LAS CELDAS MICROFLUÍDICAS DE BIOCOMBUSTIBLE	4543
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	4947
5.1. HIPÓTESIS	4947
5.2. OBJETIVO GENERAL.....	4947
5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4947
6. METODOLOGÍA	4948
6.1. FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBON DE PARED SIMPLE	4948
6.2. INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA COLESTEROL OXIDASA POR MEDIO DE ENLACES COVALENTES SOBRE LOS NANOTUBOS DE CARBON DE PARED SIMPLE	5048
6.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COLESTEROL OXIDASA INMOVILIZADA Y EN ESTADO LIBRE	5150
6.4. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN DE LA COX INMOVILIZADA	5251
6.5. PREPARACIÓN DE TINTAS CATALÍTICAS	5352
6.6. PRUEBAS ELECTROQUÍMICAS DE TINTAS	5352
6.7. OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	5453
6.8. PRUEBAS ELECTROQUÍMICAS DE INTERFERENTES	5554
6.9. CONSTRUCCIÓN DE LA CELDA DE BIOCOMBUSTIBLE EN PAPEL.....	5554
6.10. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA CELDA DE BIOCOMBUSTIBLE CONSTRUIDA EN PAPEL POR MEDIO DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS	5655
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5655
7.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COLESTEROL OXIDASA INMOVILIZADA Y EN ESTADO LIBRE EN FUNCIÓN DEL PH.....	5655

7.2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COLESTEROL OXIDASA INMOVILIZADA Y EN ESTADO LIBRE EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA	5857
7.3.	DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN DE LA ENZIMA COX INMOVILIZADA	5958
7.4.	DETECCIÓN DE COLESTEROL CON LA TINTA CATALÍTICA DE COX POR MEDIO DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS DE VC Y DPV	6160
7.5.	PRUEBAS DE INTERFERENTES DE LA TINTA CATALÍTICA DE COX POR MEDIO DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS DE VC Y DPV	6766
7.6.	OBTENCIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) A PARTIR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE VC	7274
7.7.	PRUEBAS ELECTROQUÍMICAS DE LA TINTA DE COX EN FUNCIÓN DEL PH.....	7573
7.8.	FABRICACIÓN DE ELECTRODOS DECORADOS CON TINTAS CATALÍTICAS DE COX Y PT PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN UNA CELDA DE BIOCOMBUSTIBLE MICROFLUÍDICA DE PAPEL	7875
7.9.	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA CELDA DE BIOCOMBUSTIBLE MICROFLUÍDICAS DE PAPEL POR TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS DE OCV Y CRONOAMPEROMETRÍA	7976
8.	CONCLUSIONES.....	8480
9.	MEJORAS A FUTURO.....	8682
10.	REFERENCIAS.....	8682

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del colesterol (Nelson & Cox et al., 2005).	1920
Figura 2. Gráfica de v_0 contra $[S_0]$ de la ecuación de Michaelis-Menten, para reacciones catalizadas por enzimas de un solo sustrato (Albery & Knowles, 1976).	2425
Figura 3. Gráfica del modelo de Lineweaver-Burk (Marangoni et al., 2002).	2627
Figura 4. Reacción catalizada por la enzima colesterol oxidasa, mostrando al colesterol como sustrato, el producto 4-colesten-3-ona y el intermedio formado después de la oxidación y antes de la isomerización 5-colesten-3-ona. El cofactor FAD permanece unida a la enzima y es reoxidada en la semireacción oxidativa por medio del dióxido para pasar a ser peróxido (Buckland, Lilly & Dunnill, 1976).	2728
Figura 5. Esquema general de los biosensores. (A) Biosensores de detección directa donde el elemento de reconocimiento está libre, (B) detección indirecta utilizando un ensayo "sándwich" en el que el analito es detectado por una molécula etiquetada. Los biosensores de detección directa son más simples y rápidos, pero normalmente producen un límite de detección más alto en comparación con los sistemas de detección indirecta.	2930
Figura 6. A) Representación esquemática de los componentes principales de una celda de combustible, B) representación del límite de triple fase de un conductor eléctrico en contacto con un electrolito mostrando el movimiento de protones desde el TPB hasta el ánodo a través del electrolito, y el movimiento de electrones hacia el cátodo (Ghangrekar, Erable & Duteanu, 1999).	3132
Figura 7. Celda de combustible microfluídicas con enzimas inmovilizadas directamente sobre la superficie de los electrodos (ánodo y cátodo) (Togo & Takamura, 2008).	33
Figura 8. Representaciones esquemáticas de las técnicas de inmovilización de enzimas sobre electrodos. A) Enzima absorbida electrostáticamente en una matriz insoluble; B) Enzima inmovilizada por enlaces covalentes; C) Enzima inmovilizada por medio de cross-linking a un polímero; D) Enzima confinada dentro de una membrana semipermeable (Chaplin <i>et al.</i> , 2014).	3334
Figura 9. Representaciones esquemáticas de los diferentes procesos de transferencia de electrones. A) Transferencia directa de electrones (DET); B) Transferencia mediada de electrones (MET), entre el sitio activo de la enzima y el electrodo durante el proceso de oxidación de un sustrato (Neto & Andrade, 2013).	37
Figura 10. Celda electroquímica con tres electrodos, a) electrodo de referencia, b) electrodo de trabajo y c) electrodo auxiliar (Kissinger & Heineman, 1996).	38
Figura 11. Oxidación del colesterol por la enzima colesterol oxidasa (y el mediador de ferroceno), mediante Transferencia directa de electrones (1 & 2); y Transferencia mediada de electrones (3 & 4). Los números indican las especies interactuando con el electrodo: 1) enzima/electrodo, 2) sustrato/enzima/electrodo, 3) mediador/electrodo, 4) sustrato/enzima/mediador/electrodo (Lim & Palmore, 2007).	39
Figura 12. Voltametría cíclica a) Transferencia directa de electrones enzima/electrodo, Curva 1) colesterol/enzima/electrodo, Curva 2) CV en un electrodo simple. B) Transferencia mediada de electrones, Curva 3) colesterol/enzima/mediador/electrodo, Curva 4) saturación de colesterol (Lim & Palmore, 2007).	40
Figura 13. Voltamperometría cíclica, curva de potencial-corriente a diferentes tasas de escaneo (Frumkin, Petrii & Damaskin, 1980).	41

Figura 14. Pulso de voltaje resultante del comportamiento corriente-tiempo: I_c – corriente de carga, I_f – corriente faradaica, I_t – corriente total, t_1 – pulso aplicado y t_2 – tiempo en que empieza la medición de corriente, (Brett & Brett, 2003).	42
Figura 15. Representación esquemática de la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) (Koryta, Dvorak & Kavan, 1993).	44
Figura 16. Esquema general de ánodo y cátodo probado por separado en una configuración convencional de tres electrodos que muestra la operación voltaje-corriente. El voltaje de operación de una celda de combustible tiene un límite superior dictado por la diferencia de potencial entre el oxidante y el reductor, y la diferencia de potencial entre el donador de electrones final y el aceptor inicial en los electrones (Minteer, Luckarift & Atanassov, 2014).	46
Figura 17. Curvas generales de polarización celular como resultado de la suma de las polarizaciones de ánodo y cátodo. A) Curva de polarización de una celda de biocombustible con las mayores pérdidas de voltaje de celda, y el rango aproximado de densidad de corriente en el que se producen estas pérdidas. B) Curva de potencia, resultado del producto de la integral de voltaje y la corriente (Eibl <i>et al.</i> , 2014).	48
Figura 18. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima colesterol oxidasa en estado libre e inmovilizada sobre nanotubos de carbono de pared simple.	5859
Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la enzima colesterol oxidasa en estado libre e inmovilizada sobre nanotubos de carbono de pared simple.	5960
Figura 20. Actividad enzimática de la enzima COx inmovilizada en función de la concentración del sustrato.	6064
Figura 21. Gráfica Lineweaver-Burk de la velocidad de reacción de la enzima COx en función de la concentración del colesterol.	6162
Figura 22. Voltamperogramas del electrodo de carbon vítro decorado con COx inmovilizada, sumergido en colesterol con y sin mediador.	6465
Figura 23. Voltamperogramas del electrodo de carbon vítro decorado con COx inmovilizada, sumergido en diferentes concentraciones de colesterol con mediador.	6566
Figura 24. Pruebas de DPV del electrodo de carbon vítro decorado con COx inmovilizada, sumergido en diferentes concentraciones de colesterol con mediador.	6667
Figura 25. Estructura química del colesterol, posee 27 átomos de carbono, con 4 anillos unidos (el núcleo ciclo pentano perhidrofenantreno), dos de ellos están en los grupos angulares de las unidades de los anillos AB y CD, y ocho de ellos en la cadena periférica, con un grupo hidroxilo unido al átomo 3	6768
Figura 26. Voltamperograma de la enzima COx inmovilizada sobre el eletrodo de carbon vitreo, sumergido en diferentes soluciones catalíticas (Urea, Glucosa, Creatina, Creatinina, Sarcosina y Colesterol).	6869
Figura 27. DPV del electrodo de carbon vitreo decorado con la tinta de COx, sumergido en diferentes soluciones interferentes.	6970
Figura 28. Representación esquemática de la interacción entre una enzima y su sustrato, según el modelo de cerradura y llave. En el ejemplo ilustrado, el sustrato está unido en dos puntos, llevando al grupo reaccionante a la vecindad de dos sitios catalíticos diferentes, (BS = un sitio de unión en la enzima, C = un sitio catalítico, B = un grupo de unión en el sustrato y R = un grupo reactivo, es decir, un grupo que experimenta una reacción catalizada por la enzima) (Fersh <i>et al.</i> , 1991).	7074

Figura 29. Representación esquemática de la interacción entre una enzima y su sustrato, de acuerdo con el modelo de ajuste inducido (Khan & Sheets, 1997).....	<u>7172</u>
Figura 30. Picos de corriente máximos producto de la oxidación del colesterol por la tinta de COx depositada sobre el electrodo de carbon vitreo para la detección de colesterol. .	<u>7374</u>
Figura 31. A) VCs de la tinta de COx con la enzima en estado libre a diferentes condiciones de pH, B) VCs de la tinta de COx con la enzima inmovilizada sobre CNTs, bajo diferentes condiciones de pH.	<u>7776</u>
Figura 32. A) VCs de la tinta de COx con la enzima en estado libre a diferentes condiciones de pH, B) VCs de la tinta de COx con la enzima inmovilizada sobre CNTs, bajo diferentes condiciones de pH.	<u>7877</u>
Figura 33. Ensamble de los electrodos funcionalizados de COx y de Platino en una celda de biocombustible microfluídica hecha en papel.	<u>7978</u>
Figura 34. Curvas de polarización voltaje-intensidad y potencia-intensidad de la celda de biocombustible microfluídica construida en papel con electrodos funcionalizados con COx y Platino, con diferentes concentraciones de colesterol.	<u>8180</u>
Figura 35. Curvas cronoamperométricas de la celda de biocombustible microfluídica construida en papel con electrodos de COx, trabajando con diferentes concentraciones de colesterol.....	<u>8482</u>

Índice de tablas

Tabla 1. Soluciones preparadas para el estudio electroquímico de la tinta de COx en el analito de interés.....	<u>5355</u>
Tabla 2. Soluciones preparadas bajo diferentes de pH para el estudio electroquímico de la tinta de COx en estado libre e inmovilizada.....	<u>5455</u>
Tabla 3. Soluciones de los interferentes empleados para evaluar la especificidad de la enzima COx en la tinta catalítica, al ser depositada sobre el electrodo de carbón vítreo.....	<u>5556</u>
Tabla 4. Soluciones de colesterol a diferentes concentraciones empleadas para realizar las pruebas de OCV y de cronoamperometría de la celda de biocombustible microfluídica.....	<u>5657</u>
Tabla 5. Comparación de las características de biosensores basados en la enzima Colesterol Oxidasa.....	<u>7475</u>
Tabla 6. Comparación de las características de diferentes celdas de biocombustible microfluídicas basadas en enzimas.....	<u>8182</u>

1. Introducción

Alrededor de 37 millones de personas en el mundo sufren alguna enfermedad o evento cardiovascular, y aproximadamente 17 millones de personas mueren por esta causa. En México, este grupo de enfermedades constituye un problema de salud pública, pues las enfermedades del corazón representan la primera causa de muerte al año, con cerca de 70,000 defunciones por este motivo, y 26,000 por enfermedades cerebro vasculares(Instituto Nacional de Cardiología *et al.*, 2020).

De acuerdo con datos estadísticos, en el 2020 se registraron poco más de 150 000 decesos por enfermedades cardiovasculares, en lo que refiere a México, 9.1 millones de personas padecen diabetes (6.3 millones fueron diagnosticados ya con esta enfermedad, casi 3 millones desconocen que la padecen); alrededor del 25% de la población mexicana padece hipertensión y un porcentaje de ellos no la tiene bajo control médico. Se sugiere que quienes padezcan alguna enfermedad cardiovascular mantengan un nivel de colesterol más bajo que una persona normal que no presenten alguna de éstas enfermedades crónicas degenerativas (NeoHealth *et al.*, 2020).

Es por eso que la cuantificación del colesterol total presente en la sangre es de suma importancia, ya que el tener niveles elevados del mismo está directamente relacionado con el desarrollo de enfermedades como diabetes mellitus, nefrosis, mixedema e ictericia obstructiva. Por otro lado, el tener niveles bajos de colesterol en el organismo, puede tener repercusiones como hipotiroidismo, anemia y síndromes de mala absorción(Ahmadalinezhad & Chen, 2011).

En años anteriores, los niveles de colesterol se determinaban mediante distintos métodos, los cuales presentaban ciertas desventajas tomando en cuenta el tiempo y dinero que éstos requerían para llevarse a cabo. Uno de éstos métodos tradicionales es el método espectrofotométrico no enzimático de Liebermann-Burchard; en el cual se mide la absorción de luz de los compuestos coloreados a partir del analito, el colesterol reacciona con anhídrido acético y con ácido sulfúrico generando un ión pentaenílico con un máximo de absorción de 620 nm (Arranz, Esteban & Palacios, 2015).

Existen otros métodos reportados que pertenecen a la categoría de cromatografía líquida-gaseosa y cromatografía líquida de alta eficacia. Aunque ambos métodos ofrecen una mayor selectividad que los métodos no enzimáticos, no son buenos candidatos por ser pruebas de alto costo y de detección rápida(Blomhoff *et al.*, 2020).

Hoy en día los métodos de cuantificación enzimáticos han sobresalido del resto de los demás métodos tradicionales debido a que las enzimas poseen grado elevado de especificidad respecto a sus sustratos y tienen la capacidad de llevar a cabo sus funciones catalíticas en condiciones moderadas de pH y temperatura. Aunado a esto, los métodos enzimáticos son de menor costo y de un nivel de respuesta más rápido en comparación con los métodos antes descritos(Nelson & Cox, 2008).

Las enzimas que aceptan al colesterol como sustrato poseen un sitio de unión específico al mismo, y son proteínas candidatas potenciales para medir el colesterol en cantidades o para detectar el colesterol presente en membranas y células. La colesterol oxidasa (COx), pertenece a la familia de las oxidasas, y han sido usadas en los últimos años para medir las concentraciones de colesterol o para obtener información sobre la distribución de colesterol a nivel celular(Lee, Fuda & Negishi, 2003).

La COx convierte al colesterol y al oxígeno en los productos 4-colesten-3-ona y en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser cuantificado por espectrofotometría mediante reacciones oxidativas en la presencia de la enzima peroxidasa. Sin embargo, las enzimas presentan baja estabilidad en soluciones por lo que requieren ser inmovilizadas para obtener una mejor estabilidad y que puedan ser reutilizadas. Actualmente, la enzima colesterol oxidasa al ser inmovilizada ha sido empleada para la fabricación de biosensores de colesterol(McLachlan, Wotherspoon & Ansel, 2000).

Los biosensores son dispositivos compuestos por un elemento de reconocimiento de origen biológico, y un transductor cuya función es la de convertir información química en una señal analíticamente cuantificable(Siquiera, Caseli & Crespilho, 2010). Éstos dispositivos tienen un amplio campo de aplicación, como son el diagnóstico clínico de enfermedades(Sing, Solanki & Pandey, 2006), el monitoreo de bioprocesos(González, Iglesias & Ruíz, 2005), en la industria alimenticia(Kilmartin, Martinez & Bartletts, 2008). y el monitoreo ambiental(Malhotra, Chaubey & Singh, 2006).

Debido a la creciente demanda hacia la fabricación y diseño de dispositivos médicos que sean capaces de realizar un diagnóstico preciso, rápido y de bajo coste; los biosensores parecen ser las alternativas óptimas para hacer frente a las demandas de dispositivos clínicos. No obstante, estos dispositivos tienen de igual manera ciertas desventajas, al ser dispositivos electro médicos son dependientes de fuentes de energía externas, como pilas galvánicas, conexión directa a tomas de corriente eléctrica lo cual imposibilita su traslado a otros lados o bien, trae consigo repercusiones negativas a nivel ambiental al hacer uso de pilas desechables.

Es por eso que los últimos avances de la electroquímica en el estudio de las reacciones oxido-reductoras ha permitido desarrollar celdas de combustible electroquímicas, dichos mecanismos pueden ser implantados en dispositivos de bajo consumo, como lo son los biosensores, haciéndolos capaces de producir su propia energía y así eliminar su dependencia a fuentes de energía externas.

Las celdas de combustible electroquímicas son dispositivos capaces de convertir la energía química producida por las reacciones de óxido-reducción en energía eléctrica. Está compuesta de dos electrodos, un ánodo que facilita la oxidación electroquímica de cualquier compuesto orgánico como colesterol, glucosa o urea; y un cátodo que promueve la reducción del oxígeno presente en el medio (Ramani *et al.*, 2006).

Aunque es apenas una tecnología joven, una subcategoría de las celdas de combustible electroquímicas ha emergido en los últimos años, y son las celdas de combustible enzimáticas, que son dispositivos donde las enzimas han sido inmovilizadas directamente sobre los electrodos (Togo, Takamura & Asai, 2008), siendo al mismo tiempo microfluídicas, aptas para ser aplicadas en dispositivos implantables portátiles o no microfluídicos portátiles (Beneyton, Wijaya & Griffiths, 2013).

En el presente trabajo se realizó la caracterización de electrodos enzimáticos, utilizando las enzimas de colesterol oxidasa y esterasa para ser implementados en la detección de colesterol; una vez caracterizados se construyeron las celdas de combustible microfluídicas de flujo lateral, donde, a partir de la oxidación del colesterol se generó un potencial eléctrico el cuál puede ser utilizado para la fabricación de biosensores autoalimentables de colesterol.

2. Planteamiento del Problema

De acuerdo con los últimos estudios estadísticos realizados por el Inegi en 2019, la obesidad causa la muerte de más de 200 mil personas al año en México, de éstas 80 mil son por diabetes, y más de 100 mil por enfermedades cardiovasculares. El principal factor asociado a estas muertes son los altos niveles de azúcares, colesterol y sodio en la sangre proveniente de los productos alimenticios que exceden en estos compuestos dañinos para la salud (Instituto Nacional de Estadística y Geografía *et al.*, 2019). Se estima que alrededor de 40 mil personas mueren por consumo de éstos alimentos altos en colesterol, de éste total 23 mil (57%) son por diabetes, 13 mil 517 (33%) por enfermedades cardiovasculares y 144 (<1%) por diferentes tipos de cáncer asociados a la obesidad (Braverman-Bronstein, Camacho & Zepeda, 2019).

Es por eso que la cuantificación del colesterol presente en la sangre es de gran interés pues un nivel alto está directamente relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que pueden culminar en consecuencias fatales para las personas que no tienen un control constante sobre los niveles de colesterol presentes en su organismo (Almadalinezhad & Chen, 2019).

Actualmente, gran parte de las pruebas para la estimación de los niveles de colesterol implican la toma de una muestra sanguínea y su posterior envío a laboratorios de análisis clínico, dicho análisis debe ser llevado a cabo por personal especializado e implica el empleo instrumental a gran escala, consumiendo tiempo y dinero. Esto imposibilita la determinación de los niveles de colesterol de forma inmediata y sobre todo, en consultorios médicos que carezcan del instrumental médico necesario o en los mismos domicilios de los pacientes (Barhaam, Gobel & Kellner, 1994).

Ante la creciente tasa de mortalidad derivado de enfermedades cardiovasculares, no solo el sector médico, sino también la población en general demanda el desarrollo de nuevos y mejores dispositivos para el diagnóstico de los niveles de colesterol que sean portables, económicos, precisos, selectivos y además, autoalimentables para así eliminar su dependencia de fuentes de energía externas y contaminantes.

3. Justificación

Los biosensores tienen varias ventajas potenciales sobre otros métodos de biodetección, como lo son una mayor velocidad y flexibilidad del ensayo. El análisis rápido y en tiempo real puede ser de gran ayuda, ya que puede proporcionar información de forma interactiva e inmediata. Otra de las ventajas de los biosensores, es que permiten en análisis de distintas muestras biológicas, automatización y reducción de costos de prueba. Un ejemplo significativo es su aplicación para facilitar la detección de cáncer y otras enfermedades mejorando la detección temprana y por tanto, mejorando el pronóstico. Tal tecnología puede ser extremadamente útil para la prestación de servicios de salud a las poblaciones desatendidas y los entornos comunitarios que carecen del personal e instrumental médico necesarios para llevar a cabo consultas de diagnóstico tempranas(IUPAC compendium of chemical terminology *et al.*, 1997).

Los biosensores se pueden emplear realizar dichas pruebas en el punto de atención lo que permite realizar un análisis molecular de última generación sin la necesidad de un laboratorio especializado(Clark & Lyons, 1962).

El mecanismo de detección de los biosensores se basa en la unión y posterior reacción de catálisis del sustrato específico de cada componente biológico(Arya, Datta & Malhotra, 2008). El seguimiento de la reacción se puede realizar mediante la detección de la formación de alguno de los productos o de la desaparición de uno de los reactivos de partida(Wong & Chen, 2008). Dentro de ésta categoría se encuentran los biosensores enzimáticos, siendo las enzimas el componente biológico más utilizado, debido a su elevada selectividad, siendo muy específicas tanto para el tipo de reacción que catalizan como para el sustrato involucrado en dicha reacción(Rassaei, Olthuis & Tsujimura, 2014). Entre las enzimas más empleadas con mayor frecuencia se encuentran la glucosa oxidasa (GOx), la colesterol oxidasa (COx), lactato oxidasa (LOx), y la acetilcolinesterasa (AChE), las cuales han sido utilizadas en la fabricación de biosensores para la determinación de glucosa, lactato, colesterol y acetilcolina, respectivamente, para su aplicación en análisis clínicos y alimentarios(Pohanka *et al.*, 2013).

La colesterol oxidasa, gracias a sus propiedades enzimáticas es candidato potencial para la determinación de los niveles de colesterol sérico con el propósito evaluar una gran variedad de enfermedades incluida la hipercolesterolemia, enfermedades coronarias, trastornos

lipídicos para estimar el riesgo de incidencia de una trombosis o un infarto de miocardio(Basu, Chattopadhyay & Vidal, 2007).

Ante la incesante demanda de dispositivos portátiles para diagnóstico de colesterol en sangre y que sean capaces de funcionar por largas horas sin necesidad de recargarse ha surgido una nueva tecnología para el desarrollo de fuentes de energía miniaturizadas. En los últimos 50 años, las celdas microfluídicas han sido consideradas como posibles fuentes de energía alternas para distintas aplicaciones que van desde dispositivos computacionales portátiles hasta biosensores integrados para realizar pruebas de diagnóstico *in situ*.

Existen 2 tipos de celdas de combustible biológicas: las microbianas y las enzimáticas, su uso depende de los biocatalizadores utilizados. Las celdas microbianas utilizan microorganismos mientras que las enzimáticas gestionan enzimas aisladas y purificadas. Las celdas enzimáticas presentan una gran serie de ventajas sobre las microbianas, ya que tienen rendimientos de densidades de potencia más altos que las microbianas, lo que las hace más atractivas para la alimentación de pequeños dispositivos electrónicos(Minteer Liaw & Cooney, 2007).

4. Antecedentes

4.1. Colesterol

El colest-5-en-3 β -ol, comúnmente llamado colesterol, es el miembro más abundante y conocido de la familia de los esteroides, producido por el hígado y también por la mayoría de las células del cuerpo. También es el mayor constituyente de la membrana plasmática en la mayoría de las células eucariotas, donde cumple varias funciones(Burger *et al.*, 2000).

Pequeños portadores llamados lipoproteínas transportan el colesterol a través de la sangre, el colesterol también es usado por varias células del cuerpo para diferentes funciones bioquímicas, como:

- Regula la fluidez de la membrana, aumenta el espesor de la membrana, establece la barrera de permeabilidad de la membrana, modula la actividad de varias proteínas de la membrana y es el precursor de las hormonas esteroideas y ácidos biliares.
- Ayuda a las células a resistir los cambios de temperatura y protege las fibras nerviosas.

- Parte importante en la formación de hormonas sexuales.
- Contribuye a que el metabolismo celular se dé de forma eficiente, por ejemplo, es vital para la producción de vitaminas en el cuerpo humano (Brown *et al.*, 1997).

La estructura química del colesterol posee 27 átomos de carbono, con 4 anillos unidos (el núcleo ciclo pentano perhidrofenantreno), dos de ellos están en los grupos angulares de las unidades de los anillos AB y CD, y ocho de ellos en la cadena periférica, con un grupo hidroxilo unido al átomo 3, tal como se muestra en la figura 1 (Nelson & Cox, 2001).

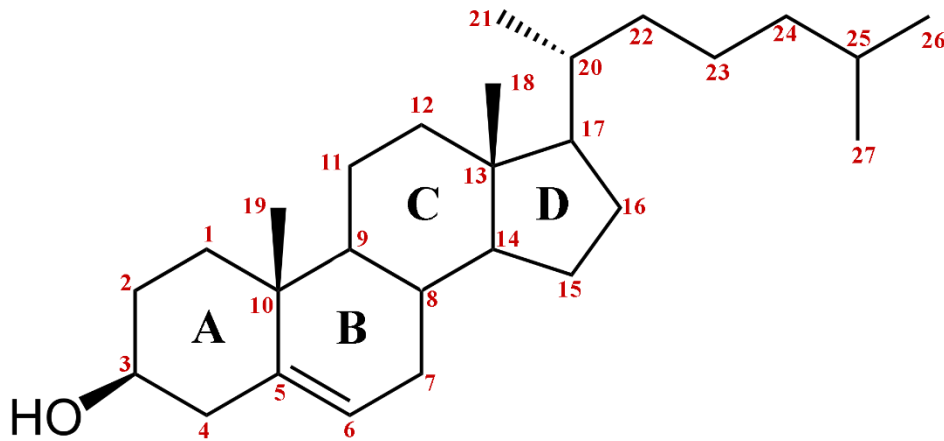


Figura 1. Estructura química del colesterol (Nelson & Cox *et al.*, 2005).

Es un lípido muy conocido, debido a la correlación que presenta entre sus niveles altos en la sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares en el organismo.

El colesterol es el principal esteral encontrado en los mamíferos, sin embargo, una excesiva cantidad de éste puede ser dañino para el organismo. Múltiples estudios realizados han demostrado la relación que existe entre el nivel de colesterol presente en la sangre con la morbi-mortalidad coronaria en los pacientes de alto riesgo y que tanto la concentración de los lípidos como de las lipoproteínas circulantes tiene una distribución continua en una determinada población (Bloch *et al.*, 2002).

Un suero normal en la sangre contiene menos de 52 mM (200mg/dl^{-1}) de colesterol, mientras que en el plasma las lipoproteínas contienen colesterol y alrededor de un 70% es esterificado por los ácidos grasos (Pollegioni, Piubelli & Molla, 2009). En nuestro organismo el colesterol está presente en dos formas, libre (30%) y esterificado (70%), y puede proceder

de la dieta (origen exógeno) o ser sintetizado por nuestras células (origen endógeno). El ser humano absorbe con facilidad el colesterol contenido en los alimentos. Una persona cuya dieta está constituida por carne, leche, huevos, etc; ingiere aproximadamente 500 a 1000 mg de colesterol por día(Díaz & Juárez, 2007).

El colesterol se transporta a través del torrente sanguíneo de unos complejos macromoleculares conocidos como lipoproteínas, pues su carácter hidrofóbico hace que sea de naturaleza insoluble en la sangre. Las lipoproteínas están conformadas principalmente por lípidos y proteínas, clasificadas en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (National Center for Biotechnology Information *et al.*, 2017).

Las lipoproteínas de baja densidad transportan el colesterol desde el hígado hasta los tejidos la mayor parte del colesterol, tanto el fabricado por el propio hígado (endógeno), como el obtenido por la alimentación (exógeno), además de transportar también parte de los triglicéridos y fosfolípidos. Las lipoproteínas de alta densidad transportan el colesterol sobrante hasta el hígado para que sea degradado y después expulsado a través de la bilis. Aproximadamente entre el 60% y el 80% del colesterol total es transportado por las lipoproteínas LDL, y entre el 15% y el 20% por las HDL (Murray, Robert & Mayes, 1997).

4.2. Enzimas

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de procesos biológicos muy potentes, (aumentan la velocidad de reacción), y altamente selectivos, tanto en el sustrato como en la reacción. La función de una enzima se centra en disminuir la energía de activación para facilitar que una reacción química tenga lugar. La cantidad y la calidad de enzima son dos parámetros críticos que definen su aplicación y su tiempo de uso. Procesos de escala industrial requieren toneladas de enzimas crudas, mientras para su uso clínico demanda enzimas en su estado puro sin agentes contaminantes. Entre los factores más importantes que afectan la actividad de una enzima se encuentran la concentración de la enzima, la temperatura y el pH(Montoya *et al.*, 2002).

Sin embargo, muchas enzimas son solubles en agua, en su estado puro, y por lo tanto no pueden durar mucho tiempo en este estado debido a la inestabilidad que trae consigo. La inmovilización es una manera de asegurar una larga vida de la enzima. Además, una enzima

inmovilizada puede ser recuperada fácilmente para usarse de nuevo, y esto es de suma importancia si se trata con enzimas costosas.

Las características de la matriz de inmovilización son críticas al momento de determinar el rendimiento de la enzima inmovilizada. Las propiedades físicas como la fuerza mecánica, el tamaño de partícula y el aumento de volumen, son las que deciden las condiciones técnicas en las que el sistema será usado. La elección del método de inmovilización depende del tipo de enzima y de la naturaleza de la aplicación en cuestión. La inmovilización por confinamiento no covalente, como atrapamiento físico, microencapsulación, o absorción electrostática, a veces pueden conducir a la lixiviación de enzimas durante la operación. Por otro lado, el anclaje covalente de enzimas requiere de reactivos de reticulación bifuncionales y la creación de grupos funcionales adecuados en la superficie de la enzima (Suman & Pundir, 2003).

Se espera que la especificidad hacia el sustrato y el potencial de catálisis no se vean afectados durante la inmovilización. El cambio del microambiente puede mejorar la estabilidad de la enzima hacia la temperatura y el pH. El pH óptimo para una enzima inmovilizada puede cambiar por una variación de 2 unidades en el pH, debido a los efectos en el microambiente (Malhotra & Chaubey, 2003).

El rendimiento cinético de una enzima inmovilizada puede diferir significativamente de la enzima en estado libre. Ambas, la velocidad máxima, y la constante de Michaelis-Menten tal vez se vean afectadas (Summer *et al.*, 2002).

4.2.1. Buenas prácticas de cinética enzimática

Generar datos confiables del rendimiento de la actividad enzimática requiere de un diseño experimental limpio y buenas prácticas de cinética enzimática, como el ensamblamiento de mezclas de ensayo enzimático, las consideraciones de pH y fuerza iónica de las soluciones.

4.2.2. Ensamblamiento de mezclas de ensayo enzimático

La velocidad de reacción enzimática depende de la concentración de reactivo $[S]$, pH y la fuerza iónica. Por lo tanto, las mediciones deben comenzar con una definición precisa de varias concentraciones implicadas. Una buena calidad del agua (destilada o desionizada), son siempre utilizadas para realizar ensayos enzimáticos. Muchas disoluciones son preparadas en agua y varios componentes de ensayo no son solubles en agua. Por lo tanto, tienen que ser

añadidos como soluciones en solventes orgánicos. En estos casos es necesario tomar controles adecuados para verificar si el solvente afecta la actividad enzimática o el método de ensayo enzimático (Selwyn *et al.*, 1965).

4.2.3. Consideraciones de pH y fuerza iónica

La actividad enzimática es profundamente afectada por el pH, las especies usadas en el buffer, la fuerza iónica y la constante de dieléctrica de la solución. Las reacciones catalizadas por enzimas casi siempre implican grupos ionizables en la enzima o en el sustrato. Como la transferencia de electrones es crucial, mantener un pH bien definido es de suma importancia en los ensayos enzimáticos (Tipton, Armstrong & Bakker *et al.*, 2014).

La mayoría de las enzimas muestran una curva de actividad de pH en forma de campana, con una actividad máxima alrededor de un pH neutro. Sin embargo, hay enzimas con un pH óptimo extremo, en rango del pH ácido, como la pepsina y la arginasa. La disminución de la actividad en cualquier valor del rango del pH óptimo puede ser resultado de: a) la inestabilidad de la enzima y/o b) cambios en los parámetros cinéticos de la enzima. Es importante saber si los efectos del pH sobre la actividad enzimática son reversibles o irreversibles, que puedan dar lugar a la inactivación de la enzima.

La estabilidad de la enzima en el pH puede ser evaluada incubándola en diferentes valores de pH (con y sin sustrato), antes de reajustar a un pH donde se sabe que la enzima es estable. Posteriormente la actividad enzimática remanente en estas muestras se puede determinar mediante ensayos enzimáticos estándar (Winget, Winter & Good, 1966).

La fuerza y la elección del tampón seleccionado debe tomar en cuenta el rango de pH requerido y la naturaleza de la reacción, se necesita de un buffer lo suficientemente fuerte para mantener el pH en reacciones que producen o consumen protones de hidrógeno (como la ureasa, la glucosa oxidasa, colesterol oxidasa, etc). Los buffers se preparan disolviendo el componente tampón en un volumen pequeño, ajustando el pH hasta conseguir el adecuado (Winget, Winter & Good, 1966).

4.2.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Como cualquier proteína, una enzima puede sufrir desnaturalización a temperaturas más elevadas. Más allá de una temperatura particular, la velocidad de la reacción catalizada comienza a disminuir debido a la inactivación del catalizador. Por lo tanto, la temperatura

óptima es una expresión conveniente sin significación absoluta, sugiere aspectos importantes sobre la estabilidad térmica de la enzima. A una temperatura óptima, la actividad enzimática y las tasas de activación compiten, lo que conlleva a un máximo de actividad enzimática, por consiguiente, la temperatura óptima es consecuencia de estos dos procesos en competencia. La temperatura óptima de una enzima puede variar, dependiendo de la presencia de estabilizadores. Los ensayos enzimáticos deben llevarse a cabo a una temperatura que sea conveniente, esto contribuye a tener una buena actividad enzimática y a la no desnaturalización de la enzima. La mayor parte de los ensayos enzimáticos se realizan a temperaturas estándar de 25°C a 30 °C. Sin embargo, en algunas especies de enzimas se requieren de temperaturas más altas (Selwyn *et al.*, 1965).

Las temperaturas de ensayo enzimático se mantienen normalmente, una vez llevado a cabo la reacción en baños de agua caliente. El equilibrio de la temperatura toma tiempo y depende de la temperatura inicial de la mezcla y de la naturaleza del recipiente de reacción utilizado. Con frecuencia, por razones de estabilidad, la enzima se almacena en temperaturas considerablemente bajas. Agregar un componente tan frío puede provocar una caída en la temperatura efectiva del ensayo y, por lo tanto, una velocidad de reacción más lenta. Debe darse el tiempo adecuado en tales casos para que la mezcla de ensayo alcance la temperatura requerida (Tipton, Armstrong & Bakker, 2014).

4.2.5. Cinética de reacciones catalizadas por enzimas de un solo sustrato

Un primer intento de capturar la cinética de la catálisis enzimática fue realizado por Victor Henri, en 1903, y esto fue posteriormente desarrollado por Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913. La ecuación de velocidad, así descrita es una ecuación fundamental de la cinética enzimática y se conoce con el nombre de la ecuación de Michaelis–Menten (Ec 1):

$$v_o = \frac{V_{max}[S_o]}{K_m + [S]}$$

Ec 1. Modelo matemático de Michaelis-Menten

Una gráfica de v_o contra $[S_o]$ tendrá la forma de una hipérbola rectangular (Figura 2), de acuerdo con los resultados experimentales de varias reacciones catalizadas por enzimas (Albery & Knowles *et al.*, 1976).

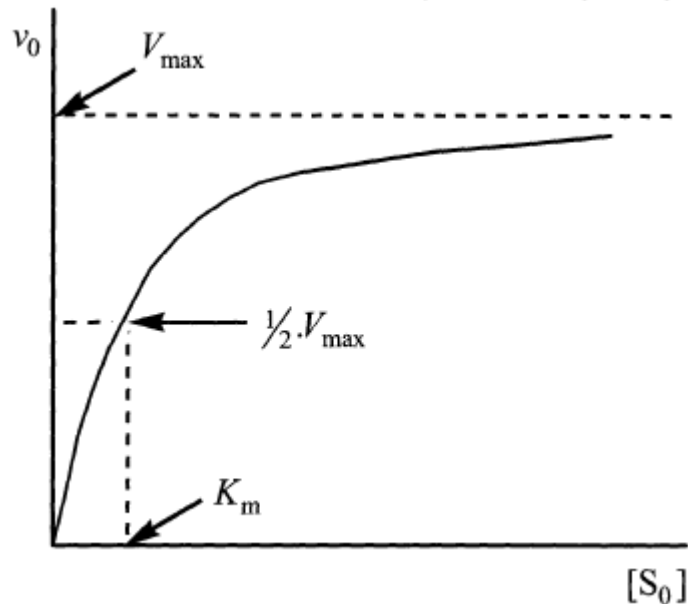


Figura 2. Gráfica de v_0 contra $[S_0]$ de la ecuación de Michaelis-Menten, para reacciones catalizadas por enzimas de un solo sustrato (Albery & Knowles, 1976).

Una ecuación de velocidad proporciona la dependencia de la tasa de concentración hacia los reactivos. Las ecuaciones de velocidad están en el corazón de cualquier estudio de cinética, ya que nos ayudan a describir el sistema en un formalismo matemático. Esto aplica de igual manera para la catálisis enzimática. La descripción matemática compacta de la cinética de reacción tiene un doble propósito, la descripción cualitativa del sistema, y la evaluación cuantitativa de las constantes de velocidad (Bisswanger *et al.*, 2002).

Se ha encontrado que la ecuación de Michaelis-Menten al igual que las constantes V_{max} y K_m , son aplicables a una gran variedad de reacciones catalizadas por enzimas. El valor de V_{max} varía con la concentración total de enzima presente, no obstante, K_m es independiente de la concentración de la enzima y esto es característico del sistema que se estudia. Puede ser así utilizado para identificar una enzima en particular. En la mayoría de los casos, los valores de K_m pueden variar en un rango de 10^{-2} hasta 10^{-6} molar. En el sistema Michaelis-Menten K_m nos da un indicativo de la afinidad de la enzima por el sustrato, un valor bajo de K_m indica una alta afinidad de la enzima por el sustrato, mientras que un alto valor de K_m indica una baja afinidad (Cornish-Bowden *et al.*, 1995).

Debe tenerse en cuenta que las constantes cinéticas de la ecuación de Michaelis-Menten se determinan en soluciones purificadas por experimentos de laboratorio *in vitro*, usualmente

en el pH óptimo de la enzima en investigación. Esto no es necesariamente el mismo pH que en experimentos in vivo, en el organismo vivo donde la enzima funciona, ya que muchas enzimas se encuentran en el mismo ambiente y no todas tendrán un pH óptimo idéntico, aunque por supuesto, todas deben tener alguna actividad al pH fisiológico. Del mismo modo, la temperatura a la que se lleva a cabo el experimento in vitro puede no ser la temperatura in vivo. Además, los experimentos de estado estacionario, generalmente se realizan a bajas concentraciones de enzima que las realizadas in vivo (Gutfreund *et al.*, 1995).

Aún más importante, algunos factores ausentes de los experimentos realizados in vitro pueden contribuir en la acción de la enzima in vivo, así, a pesar de la utilidad de los estudios cinéticos in vitro, no se puede suponer que determinan exactamente cómo se comporta la enzima en un organismo vivo (Gutfreund *et al.*, 1995).

Desde un punto de vista práctico, el conocimiento de la constante K_m de una enzima es invaluable cuando se realizan ensayos enzimáticos, y estos deben realizarse con la enzima completamente saturada de sustrato. De la ecuación de Michaelis-Menten, la saturación se aproxima tangencialmente y solo se logra a concentraciones que tienden al infinito. Sin embargo, si se conoce la constante K_m , la ecuación permite calcular la concentración inicial del sustrato, que, para propósitos prácticos puede considerarse como la saturación de la enzima (Gutfreund *et al.*, 1999).

4.2.6. El grafico Lineweaver-Burk

La gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten de v_o contra $[S_o]$ (figura 2), es insatisfactoria como medio para calcular V_{max} y K_m . Hans Lineweaver y Dean Burk en 1934 superaron este problema sin hacer cualquier nueva suposición (Marangoni *et al.*, 2002). Simplemente tomaron la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1), y la invirtieron:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{[S_o] + K_m}{V_{max}[S_o]} = \frac{[S_o]}{V_{max}[S_o]} + \frac{K_m}{V_{max}[S_o]}$$

$$\therefore \frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S_o]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Ec 2. La ecuación del grafico de Lineweaver-Burk.

Esto es de la forma de $y = mx + c$, la cual pertenece a la ecuación de una línea recta, un gráfico de y contra x , con una pendiente m , que intercepta a c en el eje y .

Una gráfica de $\frac{1}{v_0}$ contra $\frac{1}{[S_0]}$ (la gráfica del modelo de Lineweaver-Burk) para sistemas que obedecen la ecuación de Michaelis-Menten, se muestra en la figura 3. La gráfica, al ser lineal, puede ser extrapolada, incluso si no se ha realizado ningún experimento a una concentración de sustrato saturante, y partir del gráfico, los valores de K_m y V_{max} se pueden determinar como se muestra en la figura 3 (Marangoni *et al.*, 2002).

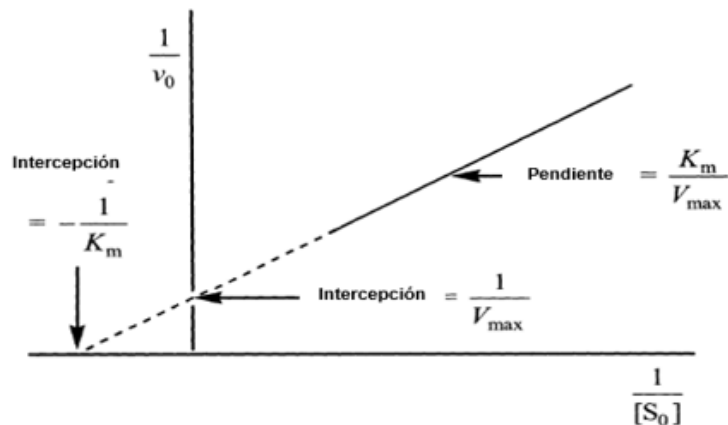


Figura 3. Gráfica del modelo de Lineweaver-Burk (Marangoni *et al.*, 2002).

4.3. Colesterol Oxidasa

La colesterol oxidasa es una flavo enzima, la cual contienen dinucleótido flavina-adenina (FAD) que cataliza de deshidrogenación del grupo hidroxilo ubicado en el carbono 3 de la molécula de colesterol. Es, por lo tanto, miembro de un alcohol deshidrogenasa/oxidasa perteneciente a la familia glucosa-metanol-colina-oxido-reductasa (Arya, Datta & Malhotra, 2008). Esta enzima cataliza tres conversiones químicas, tal y como se muestra en la figura 4.

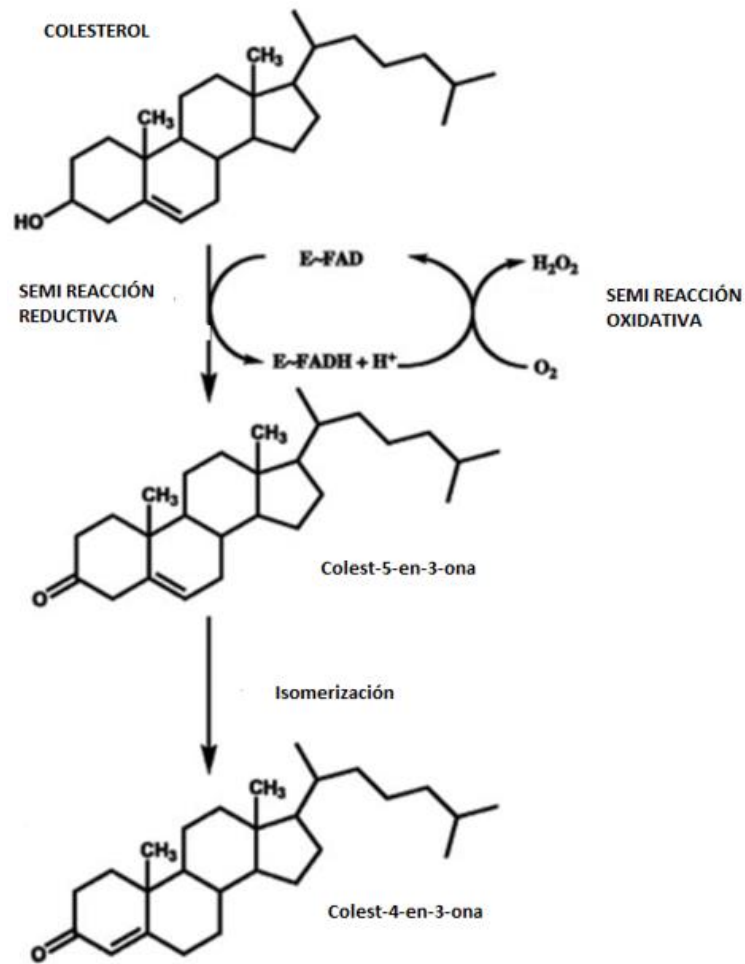


Figura 4. Reacción catalizada por la enzima colesterol oxidasa, mostrando al colesterol como sustrato, el producto 4-colesten-3-ona y el intermedio formado después de la oxidación y antes de la isomerización 5-colesten-3-ona. El cofactor FAD permanece unida a la enzima y es reoxidada en la semirreacción oxidativa por medio del dióxido para pasar a ser peróxido (Buckland, Lilly & Dunnill, 1976).

En el primer paso de la reacción, se le conoce como semirreacción reductora, el grupo 3β -hidroxilo del sistema de anillo esteroide se oxida a la correspondiente cetona. La clave de esta conversión es el cofactor FAD que se reduce durante el proceso. En el segundo paso, la enzima cataliza la isomerización del doble enlace en el sistema de anillo de esteroides oxidados de la posición Δ^5 -6 a la posición Δ^4 -5 para obtener el producto esteroide final, colest-4-en-3-ona. En el paso final de la enzima, llamada semirreacción oxidativa, el cofactor reducido FAD reacciona junto con el dióxido y por lo tanto se reoxida, mientras que el oxígeno se reduce a peróxido (Buckland, Lilly & Dunnill, 1976).

La colesterol oxidasa tiene muchas aplicaciones comerciales. Estudios iniciales en la enzima se centran en su uso para la determinación de colesterol en suero sanguíneo mediante un ensayo de tres enzimas, colesterol oxidasa y peroxidasa (Richmond *et al.*, 1965).

4.4. Biosensores

Un biosensor está definido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), como “un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células completas para detectar compuestos químicos generalmente señales eléctricas, térmicas u ópticas, todos los biosensores están basados en 2 sistemas:

1. Elemento de reconocimiento biológico (ligando), que facilita la unión específica o bioquímica con el analito.
2. Unidad de conversión de señal, el transductor (IUPAC compendium of chemical terminology *et al.*, 1997).

El componente de reconocimiento biológico de los biosensores suele estar constituido por biomoléculas como enzimas, anticuerpos o ácidos nucleicos, donde estos elementos se caracterizan por una elevada selectividad hacia un sustrato determinado.

Los elementos de transducción que se pueden utilizar en la fabricación de un biosensor abarcan una enorme variedad de materiales, sustancias y compuestos, como, por ejemplo, se emplean electrodos modificados o no con especies electroquímicamente activas en biosensores electroquímicos, semiconductores en biosensores térmicos o colorantes y complejos luminiscentes en biosensores ópticos (Ispas, Crivat & Andreescu, 2012).

Las principales ventajas de los biosensores son:

Análisis en tiempo real: los biosensores directos como aquellos que emplean resonancia de superficie, permiten una detección rápida o en tiempo real sin etiquetas y proporciona casi información inmediata. Esto permite que las instalaciones realicen medidas correctivas antes de que un producto sea procesado o liberado para el consumo.

Capacidades de detección en el punto de atención: los biosensores se pueden utilizar para realizar pruebas en el punto de atención. Esto permite el análisis molecular de última generación sin necesidad de un laboratorio.

Análisis de flujo continuo: muchos biosensores están diseñados para permitir el análisis de líquidos a granel. En tales biosensores, el analito objetivo se inyecta en el sensor usando un flujo continuo inmovilizado en una celda o columna, mejorando así la eficiencia del analito vinculante al sensor permitiendo la monitorización continua.

Miniaturización: cada vez más, los biosensores se miniaturizan para incorporarlos a equipos para una amplia variedad de aplicaciones, incluida la alimentación y los productos lácteos, análisis y monitoreo agrícola-ambiental, y detección in vivo de enfermedades y afecciones (Clark & Lyons, 1962).

4.4.1. Clasificación de los biosensores

En general, los biosensores pueden ser divididos en dos grupos: sensores de reconocimiento directo en donde la interacción biológica se mide directamente y sensores de detección indirecta, que se basan en elementos secundarios (a menudo catalíticos), como enzimas o etiquetas fluorescentes para mediciones. En la figura 5 se aprecia los dos tipos de biosensores.

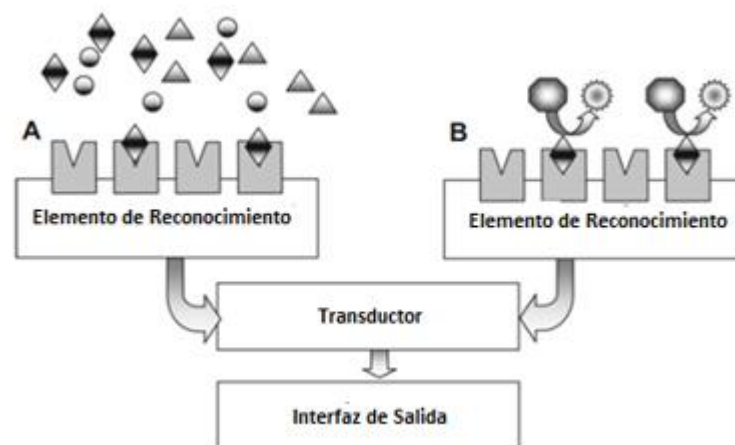


Figura 5. Esquema general de los biosensores. (A) Biosensores de detección directa donde el elemento de reconocimiento está libre, (B) detección indirecta utilizando un ensayo "sándwich" en el que el analito es detectado por una molécula etiquetada. Los biosensores de detección directa son más simples y rápidos, pero normalmente producen un límite de detección más alto en comparación con los sistemas de detección indirecta.

Biosensores de detección directa sin etiquetas

Los biosensores de detección directa, en los que la interacción biológica se mide directamente en tiempo real, típicamente usan ligandos no catalíticos tales como receptores celulares o anticuerpos. Estos detectores típicamente miden cambios físicos directamente como pueden ser cambios ópticos, mecánicos, o eléctricos; inducidos por una interacción biológica y que no requieren etiquetas adicionales (moléculas) para la detección. Los biosensores de detección directa más comunes son los ópticos que incluyen ondas evanescentes generadas cuando un rayo de luz incide sobre una superficie en un ángulo que produce una reflexión total. Los biosensores de ondas evanescentes más comunes son sensores de resonancia de superficie de plasmón (SPR) o de espejo resonante.

Biosensores de detección indirecta basados en etiquetas

Los biosensores de detección indirecta se basan en elementos secundarios para la detección y utilizan un etiquetado o elementos catalíticos como enzimas. Ejemplos de tales elementos secundarios son las enzimas fosfatasa alcalina y anticuerpos marcados con fluorescencia que mejoran la detección. A diferencia de los sensores directos, que miden directamente los cambios inducidos por factores biológicos y están libres sin etiquetas, los sensores indirectos requieren de una molécula etiquetada unida a la molécula objetivo.

Los transductores electroquímicos utilizados para este tipo de biosensores miden la oxidación y reducción de una especie orgánica, como colesterol, glucosa o urea. Varios tipos de sensores electroquímicos han sido desarrollados incluyendo los dispositivos amperométricos, los cuales detectan los iones presentes en una solución basados en los cambios de corriente producidos por la oxido-reducción de un analito.

4.5. Celdas de Biocombustible Microfluídicas

Las celdas de combustible son dispositivos electroquímicos que convierten la energía química a energía eléctrica. Un electrodo (ánodo) facilita la oxidación electroquímica de un compuesto orgánico, mientras que otro electrodo (cátodo) promueve la reducción de un oxidante (Ramani *et al.*, 2006). La oxidación libera electrones que viajan hacia el cátodo a través de un circuito externo y así realizar el trabajo eléctrico para completar la reacción de reducción una vez llegando al cátodo. Un catalizador como el platino, se utiliza muy a

menudo para acelerar las reacciones en los electrodos (Bullen, Arnot & Lakeman, 2006). El circuito se completa gracias al movimiento de una carga compensante a través del electrolito casi siempre en forma de iones positivos. El electrolito también sirve como un separador eficaz de las reacciones de la celda, entre el ánodo y el cátodo, ya que evita la mezcla de electrolitos o combustibles de los compartimentos anódico y catódico (Marrero, Gálvez & Canales, 2010). La región de contacto del electrolito, el electrodo y el combustible se llama límite de triple fase (TPB) y es donde tienen lugar reacciones electroquímicas de la celda de combustible.

Por lo tanto, para que una pila de combustible tenga un alto rendimiento, los electrodos deben tener un área de TPB grande. Por esta razón, las celdas de combustible son porosas, para garantizar el acceso del combustible a los sitios activos de los electrodos y así asegurar un flujo de corriente con pérdidas mínimas para aumentar el rendimiento de la celda (Ghangrekar, Erable & Duteanu, 1999). La estructura básica de una celda de combustible se muestra en la figura 6.

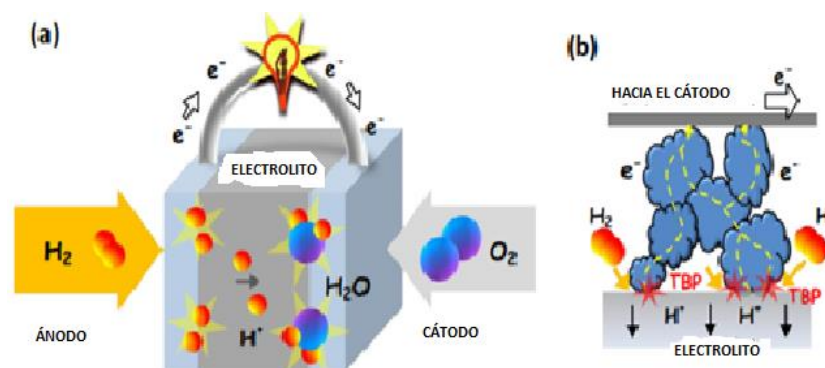


Figura 6. A) Representación esquemática de los componentes principales de una celda de combustible, B) representación del límite de triple fase de un conductor eléctrico en contacto con un electrolito mostrando el movimiento de protones desde el TPB hasta el ánodo a través del electrolito, y el movimiento de electrones hacia el cátodo (Ghangrekar, Erable & Duteanu, 1999).

Las celdas de combustible biológicas (BFC), han mostrado ser tendencia en los últimos años, debido a sus ventajas únicas sobre las pilas de combustible convencionales basadas en metales. En estas pilas de combustible, los metales se reemplazan por componentes biológicos como bacterias o enzimas, que son extremadamente rentables. Además, se consideran más respetuosas con el medio ambiente en comparación con las pilas convencionales. En este sentido, la sustancia combustible se puede seleccionar de una gran

variedad de fuentes orgánicas, ya que existen una gran cantidad de reacciones que pueden ser promovidas con la catálisis adecuada. Otra ventaja de estas celdas de biocombustible es que pueden trabajar bajo condiciones de temperatura y presión atmosférica ambiente, lo que hace a estos dispositivos aún más fáciles de operar.

4.5.1. Celdas de biocombustible microfluídicas enzimáticas

En las celdas de combustible enzimáticas, combustibles orgánicos como la glucosa, urea o colesterol, en conjunto con el oxígeno son convertidas en electrones, CO₂ y/o subproductos de combustibles oxidados (Lee *et al.*, 2010). Aunque son dispositivos en parte costosos debido a las enzimas que emplean, poseen una elevada especificidad hacia los diferentes sustratos a los cuales son puestas en reacción.

Este tipo de celdas está constituida por bioelectrodos, en los cuales las enzimas han sido inmovilizadas o ligadas directamente sobre la superficie del electrodo, tal como se muestra en la figura 7, y al mismo tiempo siguen siendo microfluídicas, aptas para ser aplicadas en dispositivos portátiles implantables (Togo & Takamura *et al.*, 2008).

La inmovilización de enzimas es el proceso mediante el cual se restringen ya sea parcial o totalmente los grados de libertad de una enzima, por medio de la unión o adhesión a un soporte. Para poder realizar la integración del componente biológico y del transductor en el biosensor, es necesario llevar a cabo la inmovilización del componente biológico en un soporte sólido, que le confiere a las biomoléculas o enzimas la capacidad de ser reutilizadas con la menor pérdida de actividad biológica posible, así como restringir la intervención de otros reactivos y productos en la reacción catalítica (Taylor *et al.*, 1991).

Debido a sus excelentes propiedades eléctricas y mecánicas, así como su elevada área superficial y la alta posibilidad de generar grupos funcionales compatibles con la enzima en su superficie, los CNTs ofrecen nuevas oportunidades y capacidades en comparación a las de los materiales existentes utilizados para la inmovilización de enzimas (Vashist *et al.*, 2011).

La inmovilización de biomoléculas mediante enlaces covalentes es uno de los métodos más empleados debido a que los enlaces covalentes generalmente proporcionan la unión más fuerte entre el soporte y la biomolécula, reduciendo considerablemente el desprendimiento

de la misma, y además, ésta técnica presenta una amplia versatilidad debido a la gran cantidad de reactivos disponibles con distintas propiedades de solubilidad, reactividad y estabilidad, que pueden dar a lugar a la formación de enlaces covalentes (Mohamad, Marzuki, Buang & Huyop., 2015).

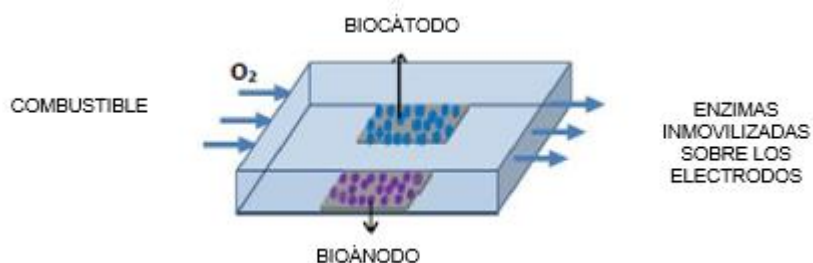


Figura 7. Celda de combustible microfluídica con enzimas inmovilizadas directamente sobre la superficie de los electrodos (ánodo y cátodo) (Togo & Takamura, 2008).

Por medio de la inmovilización de la enzima directamente sobre la superficie del electrodo la eficiencia de la celda se mejora en gran medida debido a que los electrones se desplazarán más fácilmente hacia la misma superficie del electrodo. Existen cuatro técnicas para la inmovilización en enzimas sobre electrodos, a) por absorción, b) por enlaces covalentes, c) atrapamiento y d) confinamiento de membranas, los cuales son representados en la figura 8 (Chaplin *et al.*, 2014).

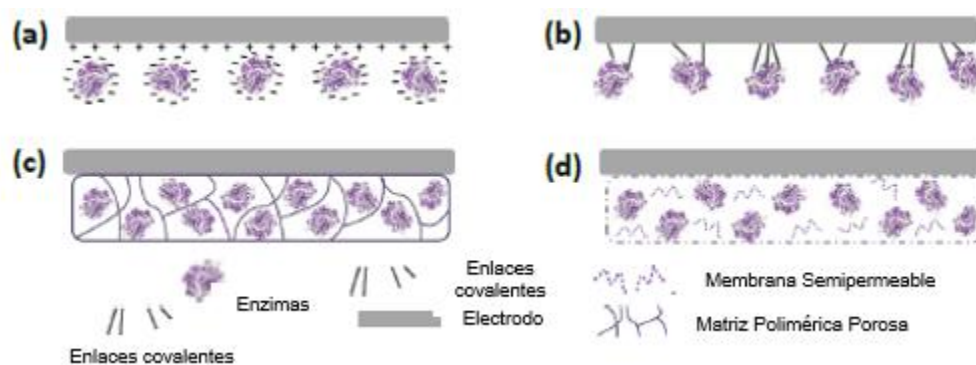


Figura 8. Representaciones esquemáticas de las técnicas de inmovilización de enzimas sobre electrodos. A) Enzima absorbida electrostáticamente en una matriz insoluble; B) Enzima inmovilizada por enlaces covalentes; C) Enzima inmovilizada por medio de cross-linking a un polímero; D) Enzima confinada dentro de una membrana semipermeable (Chaplin *et al.*, 2014).

4.5.2. Estructura de materiales para los electrodos de la celda microfluídica

Además de la mejora de la vida útil de la enzima mediante las diferentes técnicas de inmovilización enzimática, otro desafío importante en las celdas microfluídicas basadas en enzimas es optimizar su limitada transferencia de electrones a electrodos sólidos (Kim, Jia & Wang *et al.*, 2006). Los electrodos representan una de las partes más importantes de las celdas microfluídicas basadas en enzimas, la selección del material adecuado del cuál estarán compuestos es crítico debido a que el rendimiento de la celda puede variar en función de ello (Attanasov, Apblett & Banta *et al.*, 2007).

Idealmente los electrodos deben tener una elevada conductividad eléctrica, proveer una superficie estable a las enzimas, tener una excelente relación superficie-volumen para permitir una alta carga enzimática y tener un tamaño de poro lo suficientemente grande para así facilitar el transporte eficiente de combustibles y oxidantes (Minteer, Atanassov & Johnson *et al.*, 2012).

De los materiales conductores más empleados para las celdas microfluídicas enzimáticas son aquellos a base de carbono, debido a que poseen las interfaces más estables para las transferencias de electrones biomoleculares. Su uso es muy amplio debido a su bajo costo, funcionamiento eficiente de ventana de potencial, bajas corrientes parásitas y gran superficie activa (Pant, Diels & Vanbroekhoven *et al.*, 2012).

Sin embargo, son difíciles de moldear para su aplicación en el desarrollo de electrodos para celdas de combustibles microfluídicas enzimáticas, por otro lado, el aumento de la rugosidad de un electrodo por la adicción de nanomateriales de carbono como los CNTs ha tenido un gran impacto en el desarrollo de celdas microfluídicas debido a que está directamente relacionado con la mejora de la actividad enzimática (Armstrong & Hirst *et al.*, 2011).

Diversos materiales de carbón son comerciales, entre ellos destacan en papel de fibra de carbono que en muchas ocasiones es combinado con CNTs para incrementar su conductividad y al mismo tiempo su superficie activa (Holzinger, Goff & Cosnier *et al.*, 2012).

4.5.3. Celdas de biocombustible microfluídicas enzimáticas construidas en papel

Se ha demostrado que las celdas de combustible microfluídicas construidas en vidrio o plástico, se pueden fabricar fácilmente usando técnicas rápidas de creación de prototipos, de igual manera son fáciles de operar, siempre y cuando un sistema de presión externa se acople al dispositivo para mantener a los reactivos en movimiento (Song, Penmatsa & Wang *et al.*, 2011).

Sin embargo, la necesidad de un sistema de bombeo externo se ha superado recientemente con la aparición de dispositivos microfluídicos construidos en papel. El papel posee la capacidad de absorber fluidos a través de la acción capilar, lo que permite el transporte pasivo de líquidos (Liana, Raguse & Gooding *et al.*, 2012):

La construcción de celdas de combustible microfluídicas en papel tiene muchas ventajas, entre ellas destacan que el papel presenta buena compatibilidad con un gran número de sustancias químicas y bioquímicas, al mismo tiempo es un excelente medio para establecer un flujo laminar, lo que permite el confinamiento de líquidos en regiones específicas (Cate, Adkins & Mettakoonpitak *et al.*, 2014). Otra ventaja de estos dispositivos construidos en papel es que pueden proporcionar resultados semicuantitativos de una medición, ya que es posible estimar la cantidad de analito presente en una muestra por técnicas colorimétricas (Wang, Li & Lu *et al.*, 2014).

El papel se ha utilizado ampliamente por muchos años como sustrato para desarrollar dispositivos de diagnóstico en el punto de atención (*point of care POC*) (Wang, Li & Lu *et al.*, 2014). Los dispositivos de diagnóstico POC más ampliamente utilizados, son las tiras reactivas de papel, como tiras reactivas para análisis de orina e inmunoensayos de flujo lateral, como pruebas de embarazo (Von Lode *et al.*, 2005). La idea de desarrollar lectores desechables de bajo costo y la búsqueda de nuevas fuentes de energía que puedan satisfacer los requerimientos de estos dispositivos como una alta densidad de potencia, bajo costo de producción, mínimo impacto ambiental y disponibilidad, ha atraído la atención de la tecnología de celdas de biocombustible microfluídicas. Las celdas de combustible microfluídicas parecen ser las fuentes de energía más adecuadas para los sistemas de sensado debido al uso de biocombustibles (Nguyen, Fraiwan & Choi *et al.*, 2014).

4.5.4. Proceso enzimático de transferencia de electrones en las celdas de biocombustible microfluídicas enzimáticas construidas en papel

Una problemática clave en el desarrollo de celdas de biocombustibles enzimáticas es el hecho de asegurar una transferencia de electrones entre la enzima, que oxida o reduce una molécula en particular, y el electrodo, que es el responsable de coleccionar o suministrar electrones desde o hacia las reacciones catalíticas. Cuando las enzimas son capaces de realizar la transferencia de electrones directamente hacia la superficie del electrodo, el proceso se conoce como Transferencia Directa de Electrones (DET) (Ivanov, Vidakovic & Sundmacher *et al.*, 2009).

Las enzimas son proteínas con estructuras tridimensionales, por lo tanto, en ocasiones su sitio activo, que es el lugar donde ocurre la transferencia de electrones con el combustible y el oxidante, se encuentra adentrado profundamente en la misma enzima dando lugar a una transferencia ineficiente de electrones entre el centro redox de la enzima y el soporte conductivo del electrodo. Es por eso que moléculas de bajo peso molecular, conocidas como mediadores, son introducidas en el sistema, para brincar la barrera cinética de transferencia de electrones (Minteer, Liaw & Cooney *et al.*, 2007).

El uso de mediadores da como resultado un incremento significativo en la tasa de transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo (Calabrese, Gallaway & Atanassov *et al.*, 2009). Este proceso se le conoce como Transferencia Mediada de Electrones (MET) (Shukla, Suresh & Berchmans *et al.*, 2004).

Sin embargo, aunque la fabricación de bioelectrodos suele ser más compleja, dado que requiere más especies adicionales, existe una mayor preferencia hacia una transferencia mediada que a una directa, porque se generan mayores potencias de salida que en un mecanismo directo (Neto & Andrade *et al.*, 2013). En la figura 9 se puede apreciar ambos procesos enzimáticos de transferencia de electrones.

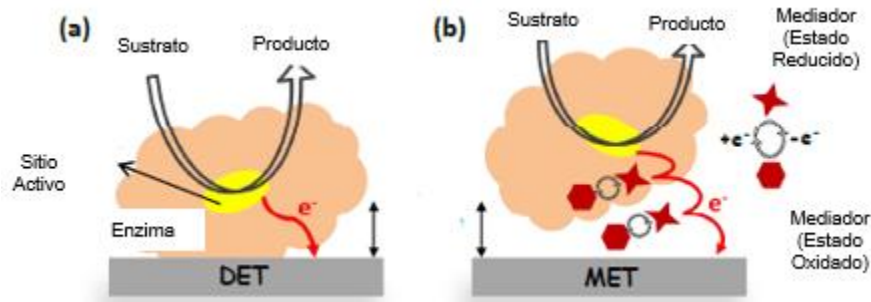


Figura 9. Representaciones esquemáticas de los diferentes procesos de transferencia de electrones. A) Transferencia directa de electrones (DET); B) Transferencia mediada de electrones (MET), entre el sitio activo de la enzima y el electrodo durante el proceso de oxidación de un sustrato (Neto & Andrade, 2013).

4.6. Técnicas de Caracterización Electroquímicas

4.6.1. Voltametría cíclica

La voltametría cíclica (CV), es una técnica electroquímica rápida y sencilla para evaluar el desempeño de una pila de combustible, ya que caracteriza los procesos que ocurren en sus electrodos con materia enzimática (Nicholson *et al.*, 1965). La configuración más común empleada para este tipo de prueba electroquímicas consiste en una celda de tres electrodos, todos conectados a un potenciostato (Figura 10). El electrodo de referencia es típicamente de calomel saturado (ECS), electrodo de sulfato mercurioso (ESM) o un electrodo de Ag/AgCl, los cuales son frecuentemente aislados de la solución por un puente salino o un capilar con una membrana porosa para evitar la contaminación del electrodo. El electrodo auxiliar es usualmente un alambre de platino (Pt) o una barra de grafito. Como electrodo de trabajo se han empleado diferentes materiales, por ejemplo, placas de oro (Au), Pt, carbono vítreo, electrodos de pasta de carbono, entre otros (Kissinger & Heineman *et al.*, 1996).



Figura 10. Celda electroquímica con tres electrodos, a) electrodo de referencia, b) electrodo de trabajo y c) electrodo auxiliar (Kissinger & Heineman, 1996).

La VC consiste en ciclar el potencial de un electrodo, el cual está sumergido en una solución electrolítica, y mide la corriente resultante. El potencial del electrodo de trabajo está controlado contra el electrodo de referencia. El potencial aplicado a través de estos dos electrodos puede ser considerado como una señal de excitación (Allen *et al.*, 1980).

La VC requiere un generador de ondas para producir la señal de excitación, un potencióstato para aplicar esta señal en una celda electroquímica, la aplicación de un voltaje que genera como respuesta una corriente eléctrica y un graficador XY que muestra el voltamperograma. El potencióstato asegura que el potencial del electrodo de trabajo no sea afectado por la reacción. El potencióstato aplica el potencial deseado entre el electrodo de trabajo y el de referencia; en el electrodo de trabajo se lleva a cabo la reacción de interés. La corriente requerida para efectuar la electrolisis en el electrodo de trabajo es proporcionada por el electrodo auxiliar. Este electrodo previene el paso de corrientes altas a través del electrodo de referencia para mantener su potencial constante (Nekrassova, Hyde & Compton *et al.*, 2004).

Se pueden obtener diferentes formas de voltamperogramas mientras se trabaja con bioelectrodos, dependiendo de si la enzima está interactuando con el electrodo por el mecanismo de transferencia directa de electrones (DET), o el mediador es el responsable de realizar dicho acarreo de electrones hacia el soporte conductivo, (MET) (Armstrong, Hill & Walton *et al.*, 1988).

En la figura 11 se muestran los tipos de reacciones de transferencia de electrones para el caso específico de oxidación de colesterol por la enzima colesterol oxidasa cuando se asiste mediante la ayuda de un mediador de ferroceno. De igual manera, los mecanismos DET y MET se dividen acorde a las especies que interactúan con el electrodo, el caso 1 es enzima/electrodo, 2) colesterol/enzima/electrodo por DET, 3) mediador/electrodo y 4) colesterol/enzima/mediador/electrodo por MET (Lim & Palmore *et al.*, 2007).

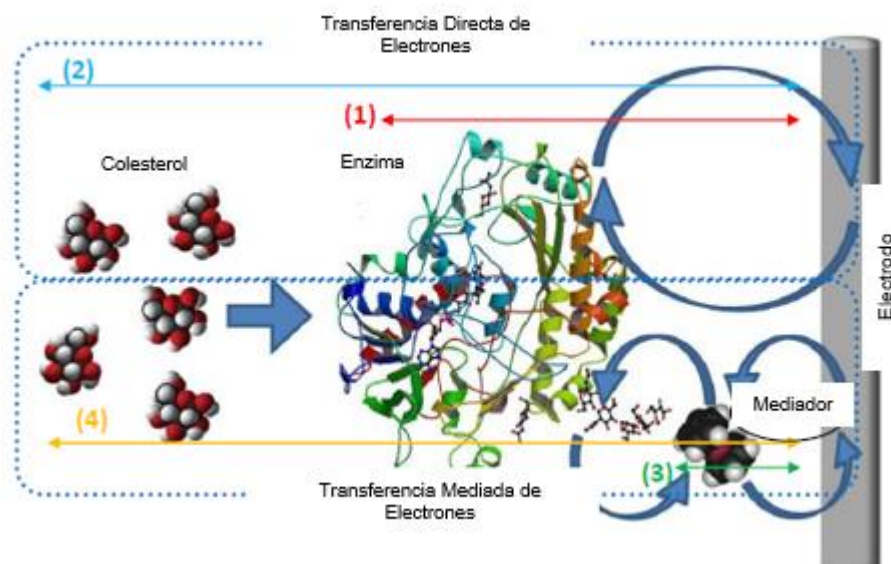


Figura 11. Oxidación del colesterol por la enzima colesterol oxidasa (y el mediador de ferroceno), mediante Transferencia directa de electrones (1 & 2); y Transferencia mediada de electrones (3 & 4). Los números indican las especies interactuando con el electrodo: 1) enzima/electrodo, 2) sustrato/enzima/electrodo, 3) mediador/electrodo, 4) sustrato/enzima/mediador/electrodo (Lim & Palmore, 2007).

Las CVs de las diferentes interacciones que ocurren en el electrodo se representan en la figura 12, cada número corresponde a una reacción en específico. Se puede apreciar los voltamperogramas generalmente caracterizados por dos picos de corriente en dos diferentes posiciones de potencial, correspondientes a las reacciones de oxidación y reducción. Para el caso de la transferencia directa de electrones (figura 9 (a)), dos curvas distintas pueden ser apreciadas, la primera curva caracterizada de color rojo representa a la enzima COx intercambiando electrones directamente con la superficie del electrodo, curva 1. Dos picos correspondientes a la oxidación del sitio activo de la enzima COx (FAD/FADH₂) pueden ser apreciados. En la curva 2, el colesterol se encuentra en la solución electrolítica, y la CV muestra un cambio que corresponde a aumento en la salida de corriente que corresponde a la

oxidación del colesterol, sin embargo, la magnitud de la corriente no es muy grande debido a la dificultad de la enzima COx de llevar a cabo una transferencia directa de electrones hacia el electrodo (Lim & Palmore *et al.*, 2007).

Finalmente, la figura 12 b), muestra las curvas de voltametría cíclica comúnmente obtenidas a partir de una Transferencia mediada de electrones, la curva 3 muestra un voltamperograma típico de un mediador idealmente reversible con picos de oxidación y reducción perfectamente definidos. En la curva 4, se puede observar un aumento en la corriente de oxidación proporcional a la concentración de colesterol, esto ocurre cuando la enzima está trabajando a su mejor velocidad catalítica, es a partir de aquí que el potencial (E_{pa}) donde la oxidación ocurre puede ser extraído fácilmente, al igual que la corriente de oxidación (I_{pa}) (Lim & Palmore *et al.*, 2007).

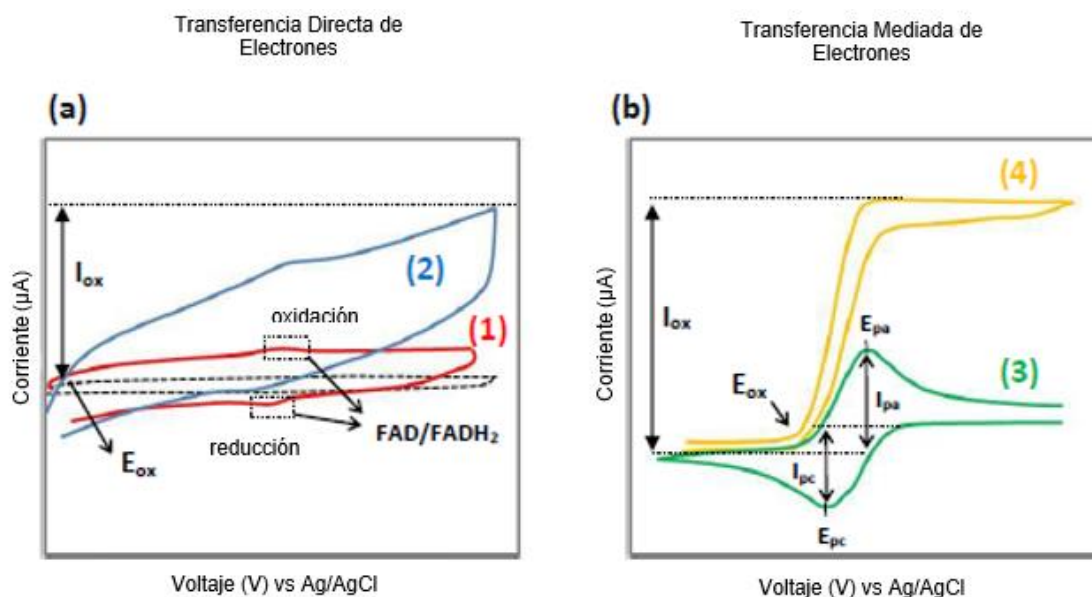


Figura 12. Voltametría cíclica a) Transferencia directa de electrones enzima/electrodo, Curva 1) colesterol/enzima/electrodo, Curva 2) CV en un electrodo simple. B) Transferencia mediada de electrones, Curva 3) colesterol/enzima/mediador/electrodo, Curva 4) saturación de colesterol (Lim & Palmore, 2007).

Si en un experimento de VC, está presente en la solución solo la forma reducida de un compuesto se elige un potencial de escaneo positivo para el primer ciclo, comenzando a partir de un valor en el que no se produce la oxidación. A medida que el potencial aplicado se aproxima al potencial formal característico (E_{ox}) del proceso redox, una corriente anódica aparece que comienza a aumentar (I_{pa}) que alcanza un pico máximo, el cual, después

comienza a decrecer debido al agotamiento de las especies electroactivas en la superficie del electrodo. Posterior a la inversión del potencial de escaneo, las especies oxidadas en la superficie del electrodo pueden regresar su estado reducido nuevamente, dando como resultado un pico catódico (I_{pc}), tal y como se muestra en la figura 13 (Frumkin, Petrii & Damaskin *et al.*, 1980).

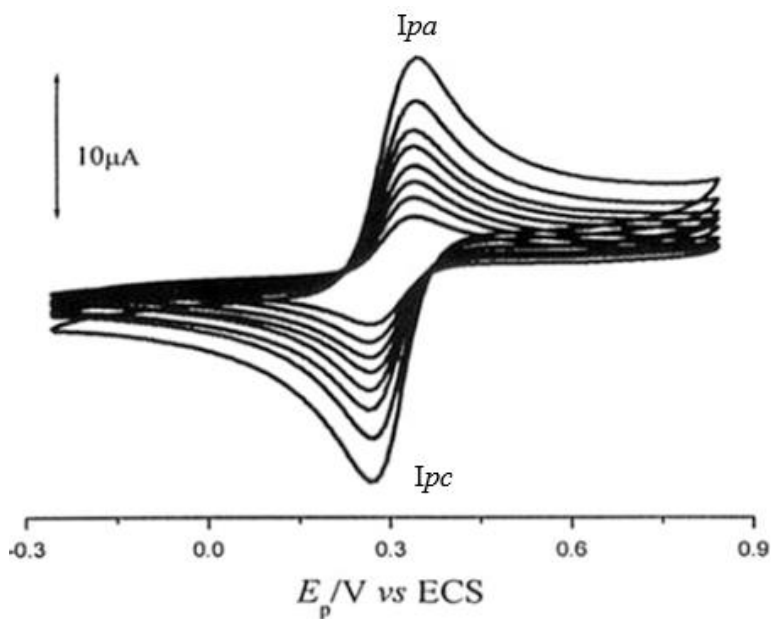


Figura 13. Voltamperometría cíclica, curva de potencial-corriente a diferentes tasas de escaneo (Frumkin, Petrii & Damaskin, 1980).

Los parámetros importantes en una CV son las magnitudes de los picos máximos de corriente, I_{pa} e I_{pc} , así como los potenciales a los que estos suceden, E_{pa} y E_{pc} . La medición precisa de los valores de las corrientes máximas representa quizás, la mayor dificultad al momento de analizar un voltamperograma (Frumkin, Petrii & Damaskin *et al.*, 1980).

Una de las aplicaciones más importantes de la CV es para el diagnóstico cualitativo de reacciones químicas acopladas, que preceden o suceden en procesos redox de compuestos orgánicos e inorgánicos. También se puede emplear para aclarar y comprender los mecanismos redox de muchas moléculas biológicamente importantes y compuestos farmacéuticamente activos. Algunos investigadores prefieren usar la CV para la determinación cualitativa de compuestos. El límite de detección (LOD), en la CV se rige por la relación entre la corriente faradaica y la corriente capacitiva de carga. Los límites de detección de la CV usualmente están a los $10 \mu M$ (Smyth & Vas *et al.*, 1992).

4.6.2. Voltametría de pulso diferencial

Se ha desarrollado una variedad de técnicas electroquímicas de pulso que hacen uso de las capacidades de adquisición de datos de la instrumentación moderna. El potencial de paso es la base de la voltametría de pulso, que comprenden la aplicación de combinaciones de potenciales de paso al electrodo (Kissinger & Heineman *et al.*, 1996).

Las técnicas de voltamperometría de pulso permiten mejorar los límites de detección en los métodos electroanalíticos. Incrementando sustancialmente la relación entre las corrientes faradaicas y las no faradaicas, al igual que la sensibilidad, las técnicas de pulso permiten la cuantificación de concentraciones que rondan alrededor de los $10^{-8}M$, y con los parámetros elegidos correctamente la corriente medida corresponderá únicamente a la corriente faradaica, tal y como se muestra en la figura 14 (Brett & Brett *et al.*, 2003). En electrodos sólidos hay una ventaja adicional de discriminación contra el bloqueo de la reacción de electrodo por absorción. Algunos parámetros importantes en las técnicas de pulso son:

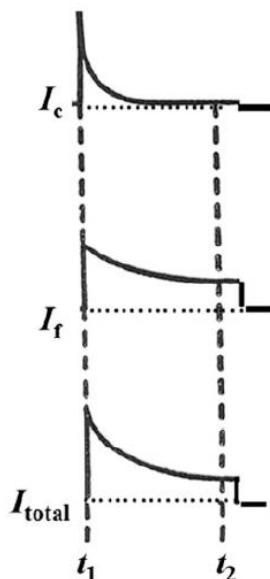


Figura 14. Pulso de voltaje resultante del comportamiento corriente-tiempo: I_c – corriente de carga I_f – corriente faradaica I_t – corriente total t_1 – pulso aplicado t_2 – tiempo en que empieza la medición de corriente, (Brett & Brett, 2003).

- Amplitud de pulso ($\Delta E \sim 5 - 200mV$)
- Ancho de pulso ($t \sim 5 - 50ms$)
- Periodo de muestreo ($4 - 15ms$)
- Periodo de pulso ($\tau \sim 0.5 - 5s$)

La amplitud de pulso es la altura del pulso potencial y el ancho de pulso es su duración, mientras que el periodo de muestreo es el periodo de tiempo cercano al final del pulso durante el cual se mide la corriente. Para algunas técnicas de pulso también se debe especificar el periodo de pulso, que es el tiempo requerido para un ciclo completo.

Para aumentar la sensibilidad y la velocidad, muchas formas de modulación de potencial se han empleado a lo largo de los años, el más común es la voltametría de pulso diferencial (DPV). La técnica de DPV fue propuesta por Barker y Gardner con la finalidad de permitir la detección compuestos electroquímicamente activos con límites de detección y cuantificación muy bajos (Barker & Gardner *et al.*, 1960).

La DVP es una de las técnicas electroquímicas más sensibles, porque la corriente de carga es fuertemente discriminada con respecto a la corriente faradaica, y la proporción de la corriente faradaica a la de carga es muy grande. Una respuesta más clara puede ser vista en electrodos sólidos, especialmente si envuelve compuestos orgánicos o farmacéuticos, permitiendo la detección de analitos presentes en la solución a concentraciones por debajo de los 10^{-8} M, la mayor sensibilidad de la DPV se debe principalmente a al muestreo de la corriente con pequeños pulsos de altura constante (Osteryoung & Schreiner *et al.*, 1988).

En el potencial de la DPV, los pulsos de pequeña amplitud son superpuestos a un potencial base cambiante. La minimización de la corriente de carga se logra mediante el muestreo doble de la corriente, antes y después de aplicar el pulso. Como consecuencia de este doble muestreo es que los picos de corrientes de la DPV se encuentran mayormente definidos y son directamente proporcionales a la concentración de la especie electroactiva, tal y como se aprecia en la figura 15 (Koryta, Dvorak & Kavan *et al.*, 1993).

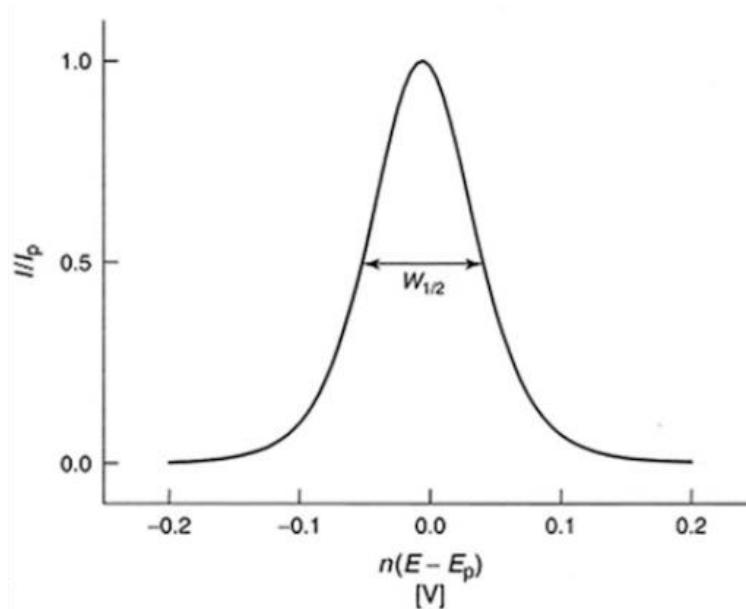


Figura 15. Representación esquemática de la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) (Koryta, Dvorak & Kavan, 1993).

El pico de corriente máxima I_p es directamente proporcional a la concentración de la especie electroactiva, como se describe en la siguiente ecuación:

$$I_p = \frac{nFAD^{\frac{1}{2}}C}{\sqrt{\pi}t_m} \left(\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right)$$

Ec 3. Ecuación de pico de corriente máximo en una DPV.

donde, $\sigma = \exp(nF\Delta E_p/2RT)$, y ΔE es la amplitud de pulso. A medida que ΔE aumenta, el cociente $\left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma}\right)$ aumenta y finalmente alcanza la unidad, pero tal vez la resolución sea peor.

La selección de la amplitud de pulso y la tasa de escaneo potencial usualmente requiere un intercambio entre la sensibilidad, resolución y velocidad, por lo tanto, debe hacerse de acuerdo con la teoría. Las amplitudes de pulso demasiado grandes pueden conducir a picos de corriente más amplios, el ancho de pulso t_m generalmente se establece en aproximadamente 50ms, mientras que las amplitudes de pulso se ajustan entre los 25-50mV, junto con una tasa de escaneo de 50mV/s (Greef, Peat & Pletcher *et al.*, 1990).

La forma del pico de la DVP, al igual que la magnitud de la corriente, están fuertemente influenciadas por pasos electroquímicos, involucrados en el proceso del electrodo. Esto

puede tener implicaciones importantes en las aplicaciones electro analíticas de compuestos activos.

Los sistemas irreversibles tienen picos de corriente mas bajos y mas amplios, a una menor sensibilidad y resolución, en comparación a los sistemas reversibles. El ancho del pico en conjunto con la mitad de la altura, $W_{1/2}$, pueden dar una indicación de la reversibilidad de la reacción del electrodo, la cual es:

$$W_{1/2} = 90.4/n \text{ mV}$$

para una reacción reversible. El ancho de pico mínimo para una reacción reversible de un electrón es de 90.4 mV, y para una reacción reversible de dos electrones, es de 42.5 mV, por lo tanto, el valor para $W_{1/2}$ deber ser menor a los 90 mV y muestra la transferencia de al menos dos electrones. Tomando todo en consideración la mejora en la sensibilidad y resolución a partir de la DPV, se puede obtener información sobre la forma química del analito, así como datos de la oxidación y formación de compuestos (Zoski *et al.*, 2007).

4.6.3. Fundamentos electroquímicos de las celdas microfluídicas de biocombustible

El rendimiento de cualquier celda microfluídica puede ser evaluado en términos del *voltaje de circuito abierto (OCV)*, las curvas de polarización voltaje-intensidad y potencias-intensidad.

Voltaje de circuito abierto, (OCV); es el potencial en el que ninguna carga es aplicada en la celda microfluídica, luego entonces se convierte en la salida máxima de voltaje. El *OCV* estima el desempeño de la celda a partir del voltaje generado por las mismas reacciones electroquímicas que ocurren en la celda, pero no brinda información acerca de los procesos electroquímicos que ocurren en la celda (Minteer, Luckarift & Atanassov *et al.*, 2014). El valor del *OCV* puede ser determinado como la diferencia en el potencial electroquímico entre los potenciales de media celda del ánodo y el cátodo, $E_{\text{cátodo}} - E_{\text{ánodo}}$, cuando éste es medido en una configuración de tres electrodos, como se puede apreciar en la figura 16.

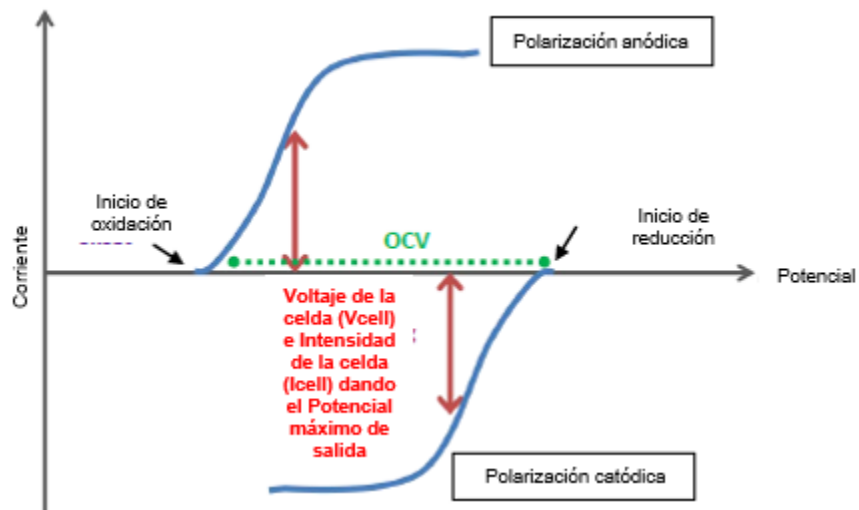


Figura 16. Esquema general de ánodo y cátodo probado por separado en una configuración convencional de tres electrodos que muestra la operación voltaje-corriente. El voltaje de operación de una celda de combustible tiene un límite superior dictado por la diferencia de potencial entre el oxidante y el reductor, y la diferencia de potencial entre el donador de electrones final y el aceptor inicial en los electrones (Minteer, Luckarift & Atanassov, 2014).

Curvas de polarización Voltaje-Intensidad; la curva de polarización se obtiene escaneando su salida de corriente o de voltaje bajo una carga variable. Como resultado, se obtiene un potencial en función de la corriente, tal y como se muestra en la figura 11 (a). La pendiente de una curva I-V se debe a diferentes pérdidas de potencial relacionadas con los componentes de la celda de combustible. El voltaje de una celda de combustible puede ser determinado de la siguiente manera:

$$V_{celda} = \Delta E_{celda} - \eta_{ohm} - \eta_{act} - \eta_{conc}$$

Ec 4. Ecuación para calcular el voltaje de una celda.

Donde el ΔE_{celda} representa el potencial termodinámico ideal entre la celda de combustible, mientras que η_{ohm} , η_{act} y η_{conc} , corresponden a las pérdidas por activación óhmica y transporte de masas respectivamente (Meredith & Minteer *et al.*, 2012). En la práctica el V_{celda} puede ser ligeramente menor al ΔE_{celda} debido a diversas pérdidas de voltaje. Estos factores limitantes contribuyen a la disminución del rendimiento, descrito de la siguiente manera:

η_{act} , pérdidas de activación o también conocidas como pérdidas de transferencia de carga son causadas por una lenta cinética de reacción en los electrodos. Eligiendo el electrocatalizador apropiado e incrementando el área activa de los electrodos son métodos clave para minimizar estas limitaciones. La elección de los medios electrolíticos y el pH también puede influir en la cinética del electrodo.

η_{ohm} o pérdidas óhmicas, son el resultado de la resistencia de transferencia de carga iónica en el electrolito ($R_{electrolito}$) y la resistencia eléctrica en los electrodos ($R_{externo}$), y dichas resistencias deben ser minimizadas para sistema eficiente de celda de combustible. Las corrientes co-laminares deben tener una conductividad iónica relativamente alta para facilitar una buena transferencia de cargas iónicas entre los electrodos y a su vez, cerrar el circuito eléctrico (Kjeang *et al.*, 2014).

η_{conc} o pérdidas de concentración, ocurren a altas densidades de corriente, estas pérdidas dominan como consecuencias de dos factores principales; 1) la formación de una zona de agotamiento en los electrodos, y 2), la mezcla difusional cruzada de dos flujos (δ_{mezcla});

- 1) La zona de agotamiento es el resultado del consumo de combustible y oxidante sobre el electrodo correspondiente, mientras las reacciones de oxidación y reducción ocurren (Shaegh *et al.*, 2010). Ocurre a lo largo del microcanal y puede ser originado por una lenta reposición de reactivos sobre los electrodos (Yang, Ghobadian & Goodrich *et al.*, 2013).
- 2) La mezcla de difusión cruzada a través del límite líquido-líquido ocurre a lo largo del ancho del microcanal, conduciendo a una reducción en las concentraciones de los flujos combustible/oxidante (Kjeang, Djilali & Sinton *et al.*, 2009).

Ambos fenómenos se pueden reducir, aumentando la velocidad de flujo de los reactivos y/o sus concentraciones. Aparte de esto, se sabe que el rendimiento de celda microfluídica de flujo lateral sin membrana laminar, funcionando con O_2 disuelto, estará limitado por el lado del cátodo. Esto es porque la concentración de oxígeno en medios acuosos es menor, debido a su baja solubilidad en electrolitos basados en agua.

El acceso de más oxígeno a la celda se puede lograr mediante un sistema de respiración de O_2 en el cátodo, de hecho la concentración del oxígeno en el aire es de 10mM, con una

difusión de $0.2\text{cm}^2/\text{s}$, cuatro veces mayor que en un medio acuoso (Mousavi, Nguyen & Chan *et al.*, 2011).

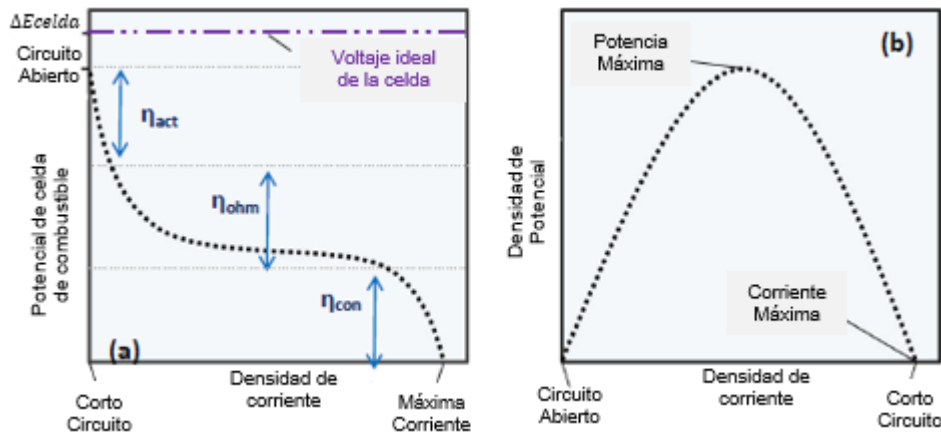


Figura 17. Curvas generales de polarización celular como resultado de la suma de las polarizaciones de ánodo y cátodo. A) Curva de polarización de una celda de biocombustible con las mayores pérdidas de voltaje de celda, y el rango aproximado de densidad de corriente en el que se producen estas pérdidas. B) Curva de potencia, resultado del producto de la integral de voltaje y la corriente (Eibl *et al.*, 2014).

Curva de polarización Potencia-Intensidad; la curva de potencia es una medida general del nivel de rendimiento del dispositivo, y se obtiene multiplicando el voltaje de la celda por la densidad de corriente:

$$P_{celda} = V_{celda} * I$$

Ec 5. Ecuación para calcular la potencia generada por una celda.

La mayoría de las veces la potencia se expresa como densidad de potencia para dar un valor comparable con otros electrodos usando diferentes áreas activas. Se obtiene normalizando la potencia con respecto al área del electrodo de la sección transversal (A):

$$Densidad\ de\ Potencia = \frac{P_{celda}}{A}$$

Ec 6. Modelo para calcular la densidad de potencia generada en el electrodo de la celda.

La figura 11 muestra el perfil característico de la densidad de potencia en función de la densidad de corriente. La curva esta definida por el voltaje de circuito abierto y corto circuito, permitiendo así determinar la densidad máxima de potencia que la celda de combustible es capaz de generar, y a su vez, el potencial en que esto ocurre. Las salidas usuales de energía

para las celdas de combustible están en el rango de cientos de miles de microwatts por centímetro cúbico, en voltajes de 0.5-0.2 V (Eibl *et al.*, 2014).

5. Hipótesis y Objetivos

5.1. Hipótesis

La inmovilización de la colesterol oxidasa en nanotubos de carbón multi-pared proporcionará una gran estabilidad y retención de la actividad de la enzima y ayudará a una buena transferencia de electrones para poder ser aplicado en biosensores auto-alimentables.

5.2. Objetivo General

Desarrollar electrodos basados en la enzima de colesterol oxidasa para aplicación en dispositivos biomédicos autoalimentables para detección de colesterol.

5.3. Objetivos Específicos

- Funcionalizar nanotubos de carbono multipared (MWCTN).
- Inmovilizar las enzimas colesterol oxidasa sobre los nanotubos de carbono multi-pared.
- Realizar los ensayos enzimáticos de colesterol oxidasa en estado libre e inmovilizada, para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis y Menten.
- Determinar los parámetros de actividad enzimática ideales para las enzimas colesterol oxidasa a partir de las constantes de cinética enzimática de Michaelis y Menten.
- Realizar pruebas electroquímicas utilizando el electrodo desarrollado para detección de colesterol.
- Obtener la curva de calibración del sensor a partir de las pruebas electroquímicas.
- Caracterizar electrodos de carbono con tintas catalíticas de las enzimas colesterol oxidasa y esterasa.
- Evaluar el electrodo desarrollado en celdas de combustible microfluídicas de flujo lateral.

6. Metodología

6.1. Funcionalización de Nanotubos de Carbono de Pared Simple

Una nueva alternativa en la fabricación de biosensores es el uso potencial de nanotubos de carbono, que han sido empleados como soporte o sustrato sobre los que se deposita (o

inmoviliza) el componente biológico (enzima). Se ha reportado que posee excelentes propiedades electrocatalíticas como altas velocidades de transferencia de electrones (Cheng *et al.*, 2010). Para el desarrollo de biosensores se han empleado microelectrodos de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs, por sus siglas en inglés) (Hrapovic *et al.*, 2004) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) lo que proporciona una buena sensibilidad para la detección de colesterol, resaltando el papel de la funcionalización. La funcionalización de nanotubos de carbono es el proceso por el cual se genera superficies activas mediante la incorporación de grupos funcionales superficiales que son afines a un componente biológico de reconocimiento, como lo son las enzimas. Con ellos se logra incrementar significativamente la reactividad química, lo cual a su vez aumenta su capacidad para combinarse con otros materiales, dispersabilidad y procesabilidad (Martínez *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2007; Wepasnik *et al.*, 2011).

La funcionalización se efectuó por medio de la oxidación ácida, empleando agentes oxidantes en fase líquida como el ácido sulfúrico (H₂SO₄) y el ácido nítrico (HNO₃), para generar los grupos funcionales –OH, –C=O y –COOH en la superficie de los nanotubos de carbono (Ye *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003).

Este procedimiento consistió en la dispersión de 0.3g de MWCNTs en 80mL de una mezcla de 35mL de HNO₃ a 0.8 M, en conjunto con 35mL de H₂SO₄ a 0.8 M respectivamente. Los MWCNTs se dispersaron mediante agitación magnética en esta mezcla de ácidos durante 15 min a 60°C, seguido de 2 h de dispersión en un baño ultrasónico. Los MWCNTs tratados se lavaron y filtraron con abundante agua destilada y se secaron a 100°C durante 12 horas.

6.2. Inmovilización de la enzima Colesterol Oxidasa por medio de enlaces covalentes sobre los nanotubos de carbón de pared simple

Se realizó la inmovilización de la enzima colesterol oxidasa en los CNTs a través de enlaces covalentes para poder controlar la ubicación de la biomolécula y al mismo tiempo mejorar su estabilidad, accesibilidad y selectividad. Para llevar a cabo esta unión covalente es necesario oxidar los CNTs, donde se producirá una reacción de amidación (diimida) para el acoplamiento directo entre el ácido carboxílico y la enzima, empleando N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC o EDC) y/o N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) como agentes de acoplamiento (Bogner *et al.*, 2010; Deeken *et al.*, 2011).

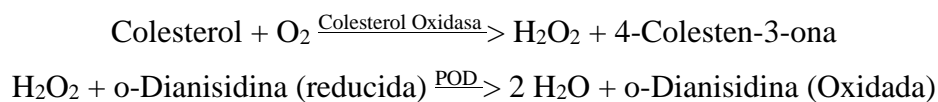
En esta reacción los grupos carboxílicos de los CNTs, productos de la funcionalización, se convirtieron primero a ésteres activos a través de la activación de la diimida y después que los ésteres se activaron, se hicieron reaccionar con los grupos amina de la enzima para generar así una unión covalente.

6.3. Evaluación de la actividad enzimática de la enzima Colesterol Oxidasa inmovilizada y en estado libre

Entre los factores más importantes que afectar la actividad de una enzima se encuentran la concentración de la enzima, la concentración de sustrato, el pH y la temperatura (Montoya *et al.*, 2008).

Una vez inmovilizada la enzima, se procedió a evaluar su actividad enzimática en función de los cambios de pH y temperatura siguiendo el protocolo de ensayo de enzimático estandarizado por Sigma-Aldrich®.

El ensayo enzimático se realizó por medio de la siguiente reacción:



Los reactivos que se emplearon fue una solución de búfer de fosfatos con una concentración de 0.1 mM de pH 7 a temperatura ambiente, además de una solución de o-dianisidina con una concentración de 10 mg/mL. Se preparó una solución de colesterol disolviendo 500 mg de colesterol en 10 mL de Triton X-100, se calentó hasta que la solución se clarificó, consecuentemente se añadieron 90 mL de agua desionizada a 70° C y se agitaró por 10 minutos hasta que los reactivos en su totalidad fueron disueltos, es posible que la solución se haya tornado a un color gris claro, esto nos indicó que la solución de colesterol estaba lista para emplearse en el ensayo enzimático.

La solución de colesterol oxidasa se preparó con una concentración de 0.1 – 0.2 unidades/mL en frío.

La solución cóctel se preparó mezclando 40 mL de la solución de búfer de fosfatos con 0.50 mL de la solución de o-dianisidina.

Se llevó a cabo el ensayo enzimático por el método de triplicado de muestras, es decir, se mezclaron 2.70 mL de la solución cóctel, con 0.10 mL de la solución de colesterol y 0.10 mL

de la solución de colesterol oxidasa, repitiendo esta mezcla de soluciones en 3 tubos diferentes. Para evaluar el efecto de la temperatura, se mezclaron los reactivos previamente descritos, pero variando la temperatura, comenzando a una temperatura de 15 ° C, con incrementos de 10 unidades hasta los 65°C. Con respecto a los cambios de pH, éste se efectuó modificando el pH de la solución de búfer de fosfatos que forma parte del cóctel, se comenzó con un pH de 4.5, con incrementos de 0.5 unidades hasta llegar a un pH de 9.

Para realizar las mediciones de cinética enzimática se relacionó el cambio en la absorbancia en la o-dianisidina al reaccionar con el peróxido provocando un cambio colorimétrico. Las pruebas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro ajustando una longitud de onda de 560 nm para las tres muestras que se prepararon, en función de los cambios de pH y temperatura.

Se estimó el efecto del cambio del pH y la temperatura en la actividad enzimática de cada una de las muestras por medio de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml de enzima}} = \frac{\Delta \text{Absorbancia de la muestra} - \Delta \text{Absorbancia del blanco} * 3.0 * df}{7.5 * 0.10}$$

Donde:

3.0 = volumen total de cada una de las muestras en mL.

df = coeficiente de dilución.

7.5 = Coeficiente de extinción milimolar de la o-dianisidina oxidada.

0.10 = volumen en mL de enzima empleada.

6.4. Determinación de la cinética de Michaelis-Menten de la COx inmovilizada

El estudio de la cinética de Michaelis-Menten de la enzima COx inmovilizada sobre los CNTS se realizó bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura bajo las cuales trabaja la enzima. Las soluciones de colesterol, de POD, o-dianisidina y búfer de fosfatos se colocaron a la temperatura óptima de trabajo, y empleando el mismo método propuesto por Sigma-Aldrich®, se determinó la absorbancia de la solución del cromóforo a distintas concentraciones de colesterol. Los datos experimentales obtenidos de la absorbancia en función de las diferentes concentraciones de colesterol se graficaron siguiendo el modelo de

Lineweaver-Burk, a partir de aquí, se determinaron las constantes de Michaelis-Menten, a partir de las cuales se valoró la afinidad de la enzima COx hacia el colesterol.

6.5. Preparación de tintas catalíticas

Se desarrollaron dos tintas catalíticas, una para el ánodo y otra para el cátodo de la celda de biocombustible construida en papel.

La tinta catalítica del ánodo contiene a la enzima colesterol oxidasa inmovilizada sobre MWCNTs, y se preparó 1.5 mL. El proceso de preparación de esta tinta consistió en disolver 50 μ L de la solución de COx, 10 mg de Carbon Vulcan, 10 mg de Bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) y 10 mg de MWCNTs funcionalizados en 1.342 mL de agua desionizada con 0.1566 mL de Nafion, posteriormente se agitó por 10 minutos hasta que la tinta se hizo completamente homogénea.

Por otra parte, la tinta catalítica del cátodo se preparó disolviendo 11.194 mg porcentaje mejor de Carbon Vulcan y Platino respectivamente en 1.343 mL de alcohol isopropílico y 0.1566 mL de Nafion, posteriormente se agitó la solución por 20 minutos hasta que adquirió una consistencia totalmente homogénea.

6.6. Pruebas electroquímicas de tintas

Se emplearon las técnicas electroquímicas de voltametría cíclica (VC) y voltametría de pulso diferencial (DPV) usando el equipo de Gamry Instruments Reference 3000. Se hizo uso de la tinta catalítica del ánodo la cual contenía a la enzima Colesterol Oxidasa inmovilizada sobre CNTs para evaluar su eficiencia bajo diferentes concentraciones de colesterol, agregando 50 μ L de una solución 1mM de ferrocianuro que fungió la función de mediador.

Para evaluar la viabilidad del uso de mediadores en las pruebas electroquímicas de VC, se realizó una prueba de voltametría cíclica con y sin mediador, para poder visualizar el cambio en los picos de corriente producidos a partir de la oxidación del colesterol.

Se depositó 2 μ L de la tinta de COx sobre el sitio activo del electrodo de trabajo de carbón vítreo y se removió para cada prueba de VC aplicada a cada una de las diferentes concentraciones de colesterol. Las concentraciones de colesterol empleadas para este estudio se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Soluciones preparadas para el estudio electroquímico de la tinta de COx en el analito de interés.

Reactivo	Concentración						
	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Tinta COx							
Colesterol	5000	2500	1250	625	312	156	78
	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl

De igual manera se llevaron cabo pruebas electroquímicas de VC y DPV de la tinta catalítica de COx tanto en estado libre como inmovilizada sobre CNTs, depositando 2 μ L de la tinta sobre la superficie activa del carbón vítreo, sumergido en una solución 7mM de colesterol, pero a diferentes condiciones de pH, el valor del pH se manipuló usando soluciones de HCL y NaOH para aumentar o disminuir el pH, los valores de pH empleados para esta serie de pruebas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Soluciones preparadas bajo diferentes de pH para el estudio electroquímico de la tinta de COx en estado libre e inmovilizada.

Reactivo	pH					
Colesterol	6	6.5	7	7.5	8	8.5

Tanto las pruebas de VC y DPV se llevaron a cabo en una celda convencional de tres electrodos, usando como electrodo de trabajo un electrodo de carbón vítreo, de referencia un electrodo de Ag/AgCl y finalmente un electrodo auxiliar de grafito. Las VCs se realizaron en un rango de potencial de -0.3 a 0.5 V, con una velocidad de barrido de 20mV/s, mientras que para las DPVs la tasa de escaneo fue de 20mV/s de -0.3 a 0.55 V.

6.7. Obtención de la curva de calibración

La curva de calibración y los límites de detección (LOD), se determinaron por medio de las CVs aplicadas a diferentes concentraciones de colesterol, desde 0.1 mM hasta 9mM, con incrementos de 1 unidad. Una vez obtenidos los voltamperogramas se identificaron los picos de oxidación de cada una de las concentraciones y se graficaron aparte, debido a que que estos picos de corriente tienen un comportamiento lineal fue posible aplicar técnicas de regresión lineal y obtener así la ecuación de la recta, de los cuales se extrajeron los valores numéricos de la pendiente y de la ordenada al origen para calcular los límites de detección y su vez, el porcentaje de error de la curva de calibración.

6.8. Pruebas electroquímicas de interferentes

Para estas pruebas se emplearon las técnicas electroquímicas de VC y DPV con la finalidad de evaluar la especificidad de la tinta catalítica compuesta de la enzima COx hacia el colesterol, al ser sumergida en diferentes soluciones de diferentes analitos ajenos al colesterol. Analitos utilizados: Urea, Glucosa, Creatina, Creatinina y Sarcosina, las concentraciones de cada una de ellas se muestran en la tabla 3; las concentraciones son iguales a las que se encuentran en el suero humano.

Tabla 3. Soluciones de los interferentes empleados para evaluar la especificidad de la enzima COx en la tinta catalítica, al ser depositada sobre el electrodo de carbón vítreo

Solución	Concentración				
Interferente	Urea 40mg/dl	Glucosa 7.8 mM	Creatina 50µM	Creatinina 85.4 µM	Sarcosina 12 µM
No Interferente (Colesterol)	200mg/dl				

6.9. Construcción de la celda de biocombustible en papel

Para la construcción de la celda de biocombustible en papel se empleó el modelo construcción tipo sándwich, en el cual, el ánodo y el cátodo se encuentran separados por una tira de papel filtro tipo Watman, con tamaño de poro 8.

El proceso de fabricación de los electrodos (ánodo y cátodo) consiste en la disposición de las tintas catalíticas de COx y platino sobre electrodos de papel Toray, por medio de un aerógrafo, cada uno de los electrodos tiene dimensiones de 0.5 cm de ancho por 1 cm de largo, la tinta depositada sobre el electrodo solo debe cubrir la mitad del área del electrodo.

Una vez concluida la fabricación de los electrodos, se procedió al diseño el micro canal de papel filtro, el cual conforma el cuerpo de la celda de biocombustible. Ambos electrodos fueron fijados sobre el cuerpo de la tira de papel filtro con cinta adhesiva, no obstante, el electrodo de platino se fijó únicamente de los bordes laterales con la finalidad de que el área que fue decorada con la tinta catalítica de platino fuera capaz de reducir el oxígeno que se encuentra en el ambiente.

6.10. Evaluación del rendimiento de la celda de biocombustible construida en papel por medio de técnicas electroquímicas

Una vez construidas las celdas de biocombustible microfluídicas en papel, se procedió a evaluar su rendimiento por medio de técnicas electroquímicas, las cuales consistieron en aplicar pruebas de OCV para la obtención de las curvas de polarización voltaje-intensidad y potencia-intensidad que a su vez nos permitieron evaluar el rendimiento de la celda.

Para las pruebas electroquímicas de OCV, se conectó cada uno de los electrodos de la celda de biocombustible microfluídica a las terminales del equipo de Gamry Instruments Reference 3000. Posteriormente se depositó sobre la celda diferentes muestras de colesterol de diferentes concentraciones, las cuales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Soluciones de colesterol a diferentes concentraciones empleadas para realizar las pruebas de OCV y de cronoamperometría de la celda de biocombustible microfluídica.

Reactivo	Concentración							
Colesterol	0.5 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	6 mM	7 mM	8 mM

Finalmente, para evaluar la estabilidad de la celda de biocombustible construida en papel a través del tiempo y que sucede el proceso de agotamiento de reactivos sobre la superficie de los electrodos una vez depositada las muestras de colesterol de la tabla 5, se llevaron a cabo pruebas de cronoamperometría, la cual consiste en la medición de la corriente eléctrica generada por la celda en un periodo de tiempo definido, para fines prácticos se estableció un lapso de 300 segundos.

7. Resultados y discusión

7.1. Evaluación de la actividad enzimática de la enzima Colesterol Oxidasa inmovilizada y en estado libre en función del pH

La importancia de la evaluación de la actividad enzimática de la colesterol oxidasa en su estado libre e inmovilizada, radica en que nos puede brindar indicios de la efectividad del proceso de inmovilización de la enzima al someterla a distintas condiciones ambientales de pH y temperatura.

Las propiedades catalíticas y bioquímicas de una enzima son a menudo afectadas por la misma matriz de inmovilización, o bien, por los métodos empleados para llevar a cabo el

proceso de inmovilización. El cambio en el pH óptimo de la COx inmovilizada puede llegar a variar de una a dos unidades con respecto a su estado libre (Belitz *et al.*, 2009).

La figura 18 muestra la actividad enzimática de la enzima COx inmovilizada en función del pH, se puede apreciar que la actividad enzimática aumentó drásticamente un 37.5% del pH 6.5 al 7, en el que se obtuvo la respuesta óptima de la enzima. Esto se debe entre varios factores a que el proceso de inmovilización de la enzima COx por enlace covalente confiere cierta movilidad y flexibilidad conformacional, es decir, si la distancia con la matriz de inmovilización (MWCNTs) es adecuada, la enzima tendrá ciertos grados de movimiento y podrá adoptar la orientación y la conformación espacial adecuadas para optimizar su actividad biológica (Mohammad, Marzuki & Buang *et al.*, 2015).

Así mismo, dicho incremento en la actividad catalítica de la enzima se puede atribuir a las técnicas modificación superficial de las moléculas empleadas para la inmovilización mejoran tanto la retención de la actividad como la estabilidad de la biomolécula inmovilizada. Entre dichas metodologías destacan la introducción de grupos polares o apolares, pertenecientes o no a un determinado espaciador, para adecuar el microambiente a las necesidades de la enzima, la modificación de los grupos funcionales de la biomolécula para incrementar o disminuir su reactividad (Hermanson *et al.*, 2013).

En un pH más alto la actividad enzimática decrece un 43.75% de un pH de 7 a 7.5, en contraste, la COx presenta una actividad óptima a pH 7 y también conserva la mayor parte de su actividad óptima en un amplio rango de pH (Akkaya *et al.*, 2009). El desplazamiento del pH óptimo que ocurre para la COx se debe a las interacciones secundarias entre la enzima y la matriz, la matriz posee grupos funcionales capaces de establecer interacciones secundarias adicionales a las del enlace covalente, lo cual puede modificar la distribución de cargas en la superficie exterior de la COx interfiriendo con el comportamiento frente al pH de la enzima (Emergui *et al.*, 2006).

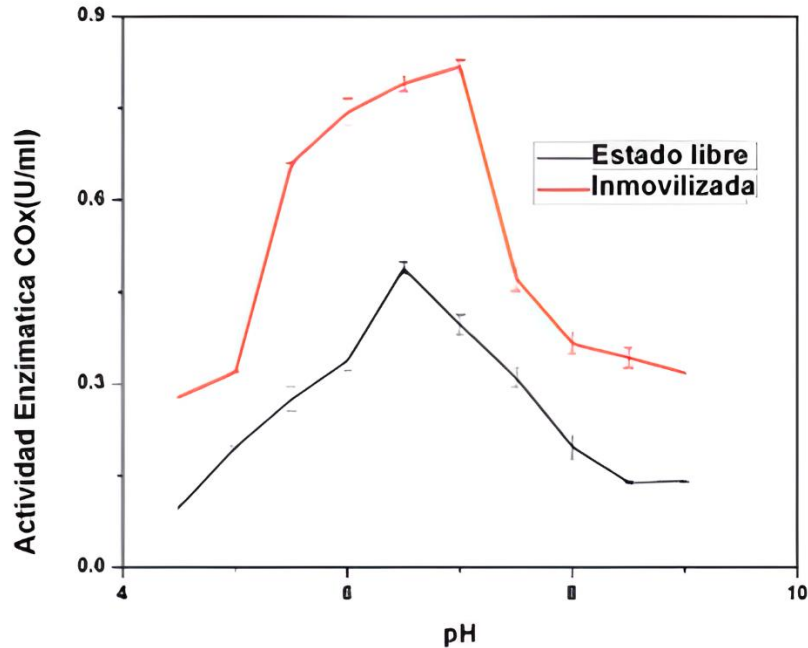


Figura 18. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima colesterol oxidasa en estado libre e inmovilizada sobre nanotubos de carbono de pared simple.

7.2. Evaluación de la actividad enzimática de la enzima Colesterol Oxidasa inmovilizada y en estado libre en función de la temperatura

El perfil de temperatura-actividad enzimática de la enzima en estado libre e inmovilizada se puede observar en la figura 19, la cual muestra un comportamiento creciente de la actividad enzimática de la COx hasta llegar a un punto máximo, esto se debe principalmente a que la velocidad de las reacciones químicas de una enzima a menudo se ven afectadas directamente por la temperatura y normalmente la tasa se duplica por cada aumento de 10° C en la temperatura (Selwyn *et al.*, 1965).

La temperatura a la que la enzima alcanza su tasa máxima de actividad enzimática es a los 55°C, lo cual es deseable para fines prácticos; esto se atribuye principalmente a que la estabilidad térmica de una enzima surge debido a la protección de un ligando o de un agente estabilizador (Tipton, Armstrong & Bakker, 2014), en este caso en particular, la matriz de MWCTNs empleada para la inmovilización de la enzima COx provee a la enzima un medio de protección a los procesos de desnaturalización, ya que los nanotubos de carbono multipared son muy estables térmicamente, siendo aún más estables a 2800°C en el vacío y a 750°C en aire (Collins & Avouris *et al.*, 2000).

Sin embargo, más allá de los 55°C la actividad enzimática decrece en un 12.85% estando la enzima inmovilizada, y un 65.9% en estado libre, lo que puede ser atribuido al inicio de los procesos de desnaturalización de la enzima, porque como cualquier otra proteína, la enzima experimenta procesos de desnaturalización a temperaturas más altas a las óptimas, más allá de una temperatura particular, la tasa de reacción catalizada por enzimas comienza a disminuir por la inactivación del catalizador (Selwyn *et al.*, 1965).

A la temperatura óptima, las tasas de actividad enzimática e inactivación compiten, dando lugar a un punto máximo en la curva (), por lo tanto, la temperatura óptima de la enzima COx es de 55° C, en adición, se ha reportado en la literatura que las condiciones óptimas de temperatura para la COx son a los 50°C (Wang & Wei *et al.*, 2015).

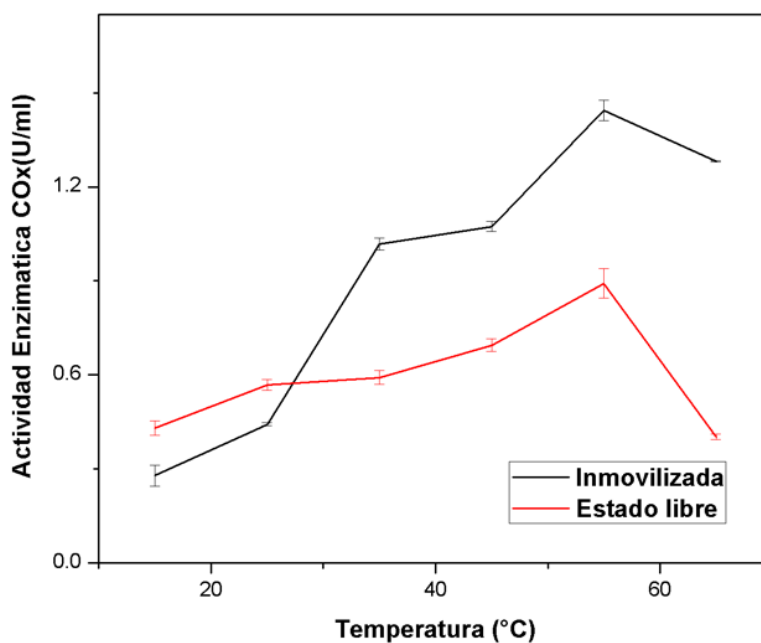


Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la enzima colesterol oxidasa en estado libre e inmovilizada sobre nanotubos de carbono de pared simple.

7.3. Determinación de la cinética de Michaelis-Menten de la enzima COx inmovilizada

Una vez determinados las condiciones óptimas de pH y temperatura de para la COx inmovilizada, las constantes de Michaelis-Menten fueron obtenidas mediante la técnica espectrofotométrica. Las reacciones bioquímicas de la enzima se llevaron a cabo bajo las

condiciones de 55°C, a un pH de 7, las pruebas de absorbancia de la o-dianisidina en estado oxidado se monitorearon en función de la concentración de colesterol.

La figura 20 representa de la actividad enzimática a partir de la absorbancia registrada durante del ensayo enzimático de la COx inmovilizada en diferentes concentraciones de colesterol, de 4mM a 8mM.

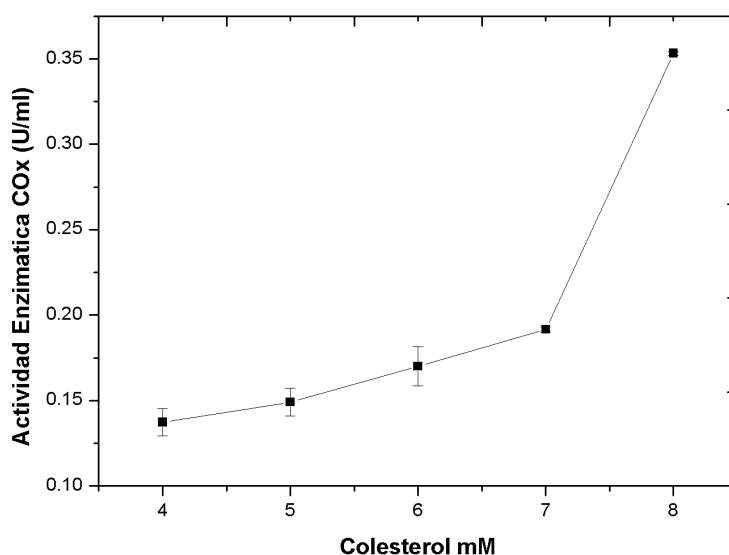


Figura 20. Actividad enzimática de la enzima COx inmovilizada en función de la concentración del sustrato.

Los parámetros de Michaelis-Menten se (K_m y V_{max}), los cuales indican la cinética enzima-sustrato, se calcularon mediante el diagrama de Lineweaver-Burk (figura 21), el cual consiste en un gráfico que muestra la inversa de la velocidad de reacción de la enzima COx en función del inverso de la concentración del sustrato (colesterol), cuyo comportamiento se asemeja al de una función lineal, por lo que al extraer la ecuación de la recta podemos calcular los valores de (K_m y V_{max}), por medio de la ecuación 2:

$$\therefore \frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S_o]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Ec 2. La ecuación del grafico de Lineweaver-Burk.

Los parámetros calculados por medio del gráfico de Lineweaver-Burk fueron $V_{max} = 0.087 \text{ AU}$, mientras que $K_m = 160.208 \text{ mM}$, el valor de K_m provee información relevante acerca de la especificidad de la enzima. La relación del valor de K_m con la especificidad de una enzima ha sido denominada la constante de especificidad porque describe la velocidad relativa del sustrato compitiendo por el sitio activo de la enzima (Koshland *et al.*, 2002).

En la mayoría de los casos, los valores de K_m pueden variar en un rango de 10^{-2} hasta 10^{-6} molar. En el sistema Michaelis-Menten K_m nos da un indicativo de la afinidad de la enzima por el sustrato, un valor bajo de K_m indica una alta afinidad de la enzima por el sustrato, mientras que un alto valor de K_m indica una baja afinidad (Cornish-Bowden *et al.*, 1995).

El valor de K_m aumenta conforme la enzima demuestra mayor afinidad por el sustrato, o bien, muestra tasas catalíticas más altas. En general, entre mayor sea el valor de K_m , mejor es el rendimiento enzimático. Esto es cierto para enzima que trabajan sobre varios sustratos, pero también es válido para enzimas que trabajan sobre un sustrato en particular, es por eso que a K_m se le considera como la constante de rendimiento (Northrop *et al.*, 1998).

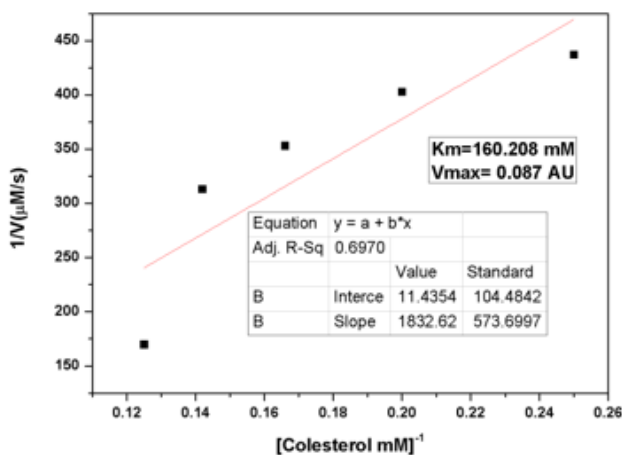


Figura 21. Gráfica Lineweaver-Burk de la velocidad de reacción de la enzima COx en función de la concentración del colesterol.

7.4. Detección de colesterol con la tinta catalítica de COx por medio de técnicas electroquímicas de VC y DPV

El área de electroquímica es una herramienta analítica útil para efectuar análisis cualitativos y cuantitativos, su utilidad no proviene de sólo de la elevada sensibilidad a pequeñas cantidades y a la sencillez de su instrumentación, sino también a que diversas técnicas

electroquímicas pueden ser empleadas para la detección y separación de especies iónicas (Greenlief *et al.*, 2009).

La voltamperometría cíclica (VC), es la técnica electroanalítica más versátil para el estudio de especies electroactivas, además su efectividad resulta en su capacidad para observar rápidamente los procesos redox sobre un amplio intervalo de potencial (Allen *et al.*, 1980).

Una vez encontradas las condiciones óptimas de pH y temperatura en las que la enzima COx alcanzaba su máxima actividad catalítica se procedió a preparar las tintas catalíticas especiales para la deposición en un electrodo de carbón vítreo con la finalidad de estudiar el comportamiento electroquímico y determinar el dominio de electroactividad de las tintas catalíticas preparadas por medio de VC.

Los electrodos con la tinta catalítica de COx se probaron en soluciones electrolíticas a diferentes concentraciones de colesterol, desde 5000 mg/dl hasta 78 mg/dl, teniendo decrementos del 50% cada una para medir la corriente resultante de la oxidación del colesterol en presencia de la enzima colesterol oxidasa inmovilizada sobre nanotubos de carbón.

La VC se caracteriza principalmente por la aplicación de una perturbación de potencial en forma de variación lineal con el tiempo, el registro de la respuesta a la perturbación, la corriente en función del potencial aplicado se denomina voltamperograma (Noel & Vasu *et al.*, 1990).

El voltamperograma de la figura 22 representa algunas interacciones que ocurren en la superficie activa del electrodo de carbón vítreo decorado con la tinta de COx, éstos gráficos están normalmente representados por dos picos de corriente, que corresponden a las reacciones de óxido y reducción de la solución electrolítica; el pico superior corresponde al proceso de oxidación del colesterol en dos fenómenos diferentes, por transferencia directa de electrones y transferencia mediada de electrones. Se utilizó como mediador ferroceno metanol para poder observar los picos de oxidación del mediador referentes a la transferencia de electrones generada por la reacción bioquímica de la enzima; el electrodo de trabajo con la enzima COx cataliza la oxidación del colesterol presente en el medio; el cofactor dinucleótido flavina-adenina FAD de la COx actúa como aceptor de electrones del colesterol,

y posteriormente es reducida a FADH₂, el cofactor FADH₂ es posteriormente oxidado por el aceptor final de electrones (un mediador o el mismo electrodo). Al aceptor natural de electrones de la COx es el oxígeno molecular, que es reducido a peróxido de hidrógeno H₂O₂, esto significa que en presencia de oxígeno atmosférico la enzima COx prioritariamente transferiría sus electrones directamente al oxígeno, siendo representado en un pico de corriente y resultando en la producción de peróxido de hidrógeno.

Puede ser apreciado en el gráfico de la figura 22 dos picos máximos superiores e inferiores que corresponden a la oxidación y reducción del sitio activo de la enzima COx, (FAD/FADH₂), lo cual indica que hay una interacción exitosa entre la tinta catalítica depositada sobre el electrodo de carbón vitreo y la presencia de colesterol en la solución electrolítica.

Sin embargo, la magnitud del pico de corriente del gráfico que representa las reacciones de óxido-reducción por transferencia directa de electrones (sin mediador) no es tan alta en comparación al gráfico que represente la transferencia de electrones en presencia de un mediador. Esto se debe a que en algunas ocasiones el sitio activo de la enzima no se encuentra disponible, dando lugar a una transferencia de electrones ineficiente entre el centro redox de la enzima y el electrodo de trabajo (Minteer & Liaw *et al.*, 2007). Es por esta razón que para disminuir la barrera de la cinética de transferencia de electrones se introdujeron especies redox de bajo peso molecular en el sistema, comúnmente conocidos como mediadores.

Por otro lado, en la reacción de óxido-reducción (con mediador) se observa una clara transferencia de electrones mediada, en el cual los mediadores son reducidos cuando atrapan a los electrones que provienen de la oxidación del colesterol en la enzima, y posteriormente son oxidados una vez que transportan dichos electrones al electrodo. Después de esto, están listos nuevamente para aceptar electrones de la enzima otra vez (Barton & Gallaway *et al.*, 2007), esto explica por qué dicho gráfico tiene picos de óxido - reducción más definidos y una magnitud de corriente de salida aún más alto.

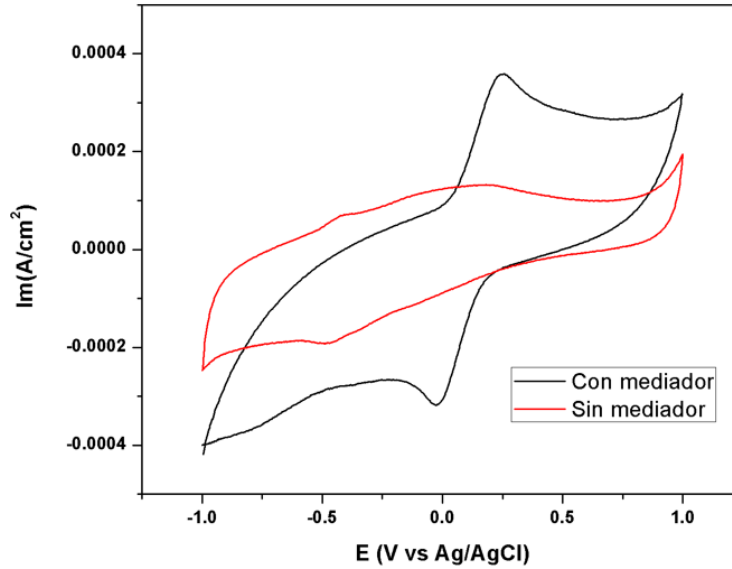


Figura 22. Voltamperogramas del electrodo de carbón vítreo decorado con COx inmovilizada, sumergido en colesterol con y sin mediador.

La figura 23 representa curvas de VC's en presencia de mediador, pero con diferentes concentraciones de colesterol. Como se puede observar, los picos de oxidación y reducción se van incrementando conforme se aumenta la concentración de colesterol y aparecen en un potencial de 0.23 V y 0.14 V vs Ag/AgCl respectivamente, característicos del colesterol, los límites de potenciales, los límites de oxidación y reducción permanecen prácticamente constantes, una obtenida esta respuesta electroquímica para la concentración más grande de 7mM se aplican el mismo procedimiento para el resto de las concentraciones. Un voltamperograma cíclico con una concentración 50% menor a la inicial, muestra sus picos de oxidación y reducción en 0.24 V y 0.16 V vs Ag/AgCl respectivamente, mientras que una concentración 97% menor de colesterol ubica sus picos redox en 0.21 V y 0.14 V vs Ag/AgCl, dicho esto, se puede decir que a medida que la concentración decrece los picos de oxidación y reducción se ven menos definidos y de menor altura.

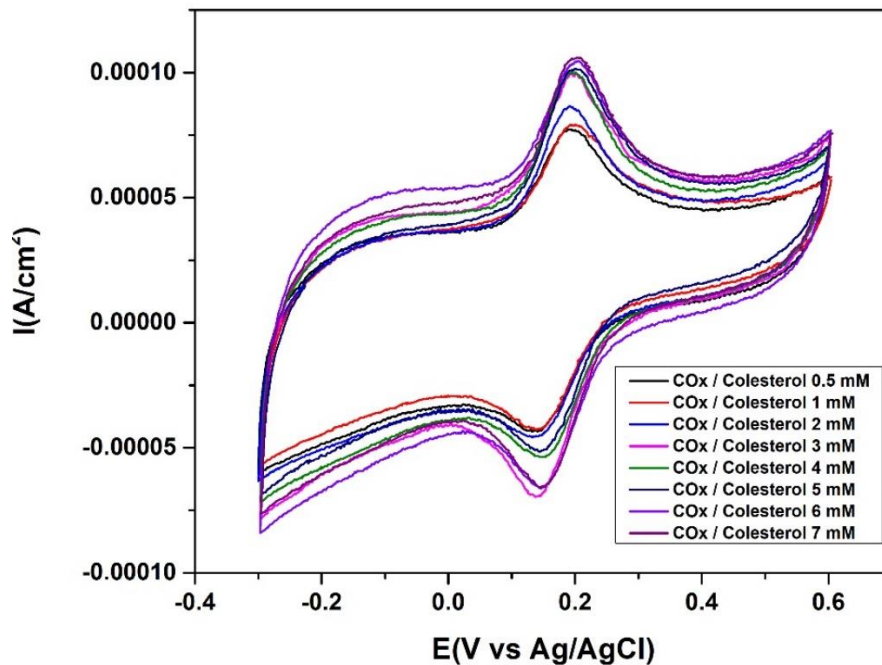


Figura 23. Voltamperogramas del electrodo de carbón vítreo decorado con COx inmovilizada, sumergido en diferentes concentraciones de colesterol con mediador.

Y es que uno de los parámetros de mayor importancia en éste voltamperograma son los picos de corrientes que van incrementando y que pueden ser descritos por la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 3):

$$i_p = \pm 0.4463nFAC \left(\frac{nFD}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}$$

Ec 3. Ecuación de Randles-Sevcik para la estimación de la magnitud de corriente en los picos de oxidación.

Donde, \pm indica si es un proceso reductivo u oxidativo, i_p es el pico de corriente (A), n es el número de electrones, F es la constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), R la constante universal de los gases ($8.314 \text{ V C K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), A es el área activa del electrodo de trabajo en (m^2), D es el coeficiente de difusión de las especies redox ($\text{m}^2 * \text{s}^{-1}$), C es la concentración de las especies de difusión redox ($\text{mol} * \text{m}^{-3}$), y $v^{\frac{1}{2}}$ la velocidad de barrido constante ($\text{V} * \text{s}^{-1}$). En consecuencia, se puede decir que la corriente es directamente proporcional a la concentración y aumenta con la raíz cuadrada de la velocidad, $v^{\frac{1}{2}}$ (Kissinger & Heineman *et al.*, 1983). He

de aquí que podemos deducir que conforme aumentamos la concentración del sustrato, la corriente también incrementará respectivamente, desde el punto de vista electroquímico, la enzima COx que se encuentra depositada sobre el electrodo liberará más electrones debido a la cantidad de sustrato que se encuentra en el medio, y por ende, dichos electrones serán registrados en los picos de corriente y de igual manera se puede estimar la concentración de la especie en reacción a partir de la corriente.

De igual manera se realizaron pruebas de detección por medio de técnicas de DPV a diferentes concentraciones de colesterol, desde 0.5 mM hasta 7 mM, tal y como se muestra en la figura 24.

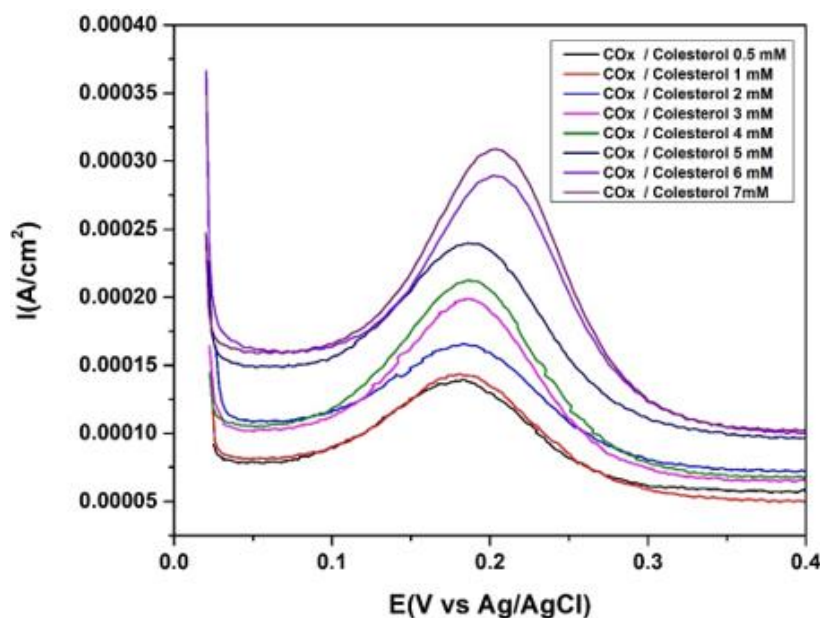


Figura 24. Pruebas de DPV del electrodo de carbón vítreo decorado con COx inmovilizada, sumergido en diferentes concentraciones de colesterol con mediador.

Se puede apreciar que el comportamiento de la respuesta de corriente producida por la oxidación de colesterol es similar al obtenido en las pruebas de VC, a mayor concentración, mayor es el pico de corriente obtenido, siendo éste de **309.15 μ A** a **0.20V**, mientras que el mínimo obtenido fue de **137.06 μ A** a **0.18 V**. Otra característica que destaca de ésta técnica de detección electroquímica es que los picos de corriente se encuentran mayormente

definidos, lo cual nos permite relacionar el ancho de pico de cada lectura de corriente con la concentración de colesterol por medio de la siguiente ecuación:

$$I_p = \frac{nFAD^{\frac{1}{2}}C}{\sqrt{\pi}t_m} \left(\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right)$$

Ec 3. Ecuación de pico de corriente máximo en una DPV.

7.5. Pruebas de interferentes de la tinta catalítica de COx por medio de técnicas electroquímicas de VC y DPV

Un rasgo característico de las enzimas es que son específicas en cuanto a su función sobre el sustrato. Algunas enzimas exhiben especificidad de grupo funcional, es decir, pueden actuar en grupos diferentes estrechamente relacionados, sustratos, para catalizar una reacción que involucra un grupo químico en particular. Sin embargo, otras enzimas actúan únicamente sobre un sustrato en particular, es cuando se dice que poseen especificidad absoluta.

En general, la enzima colesterol oxidasa muestra una amplia especificidad por sustratos de esteroides, siendo la principal característica la presencia de un grupo hidroxilo en configuración β , en el centro C3 del anillo esteroide A y la unión del anillo trans A-B, tal y como se muestra en la figura 25.

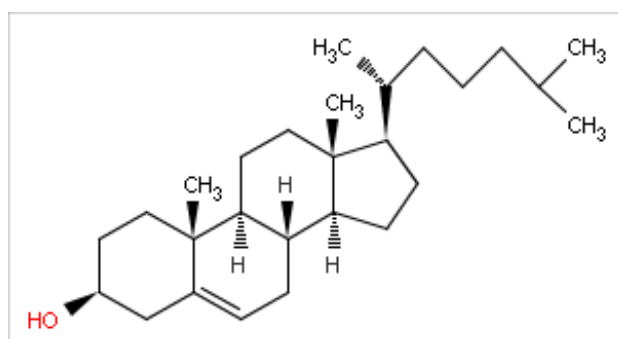


Figura 25. Estructura química del colesterol, posee 27 átomos de carbono, con 4 anillos unidos (el núcleo ciclo pentano perhidrofenantreno), dos de ellos están en los grupos angulares de las unidades de los anillos AB y CD, y ocho de ellos en la cadena periférica, con un grupo hidroxilo unido al átomo 3.

Por supuesto, todas las enzimas que aceptan al colesterol como sustrato poseen un sitio de unión específico al colesterol, y son candidatos potenciales para medir el colesterol en pequeñas cantidades o bien, en membranas o células.

Con la finalidad de demostrar la especificidad de la enzima COx, se llevó a cabo pruebas electroquímicas de interferentes para visualizar si la enzima catalizaba alguna reacción en contacto con diferentes sustratos ajenos al colesterol, y a su vez, demostrar la especificidad que ésta tiene hacia el colesterol.

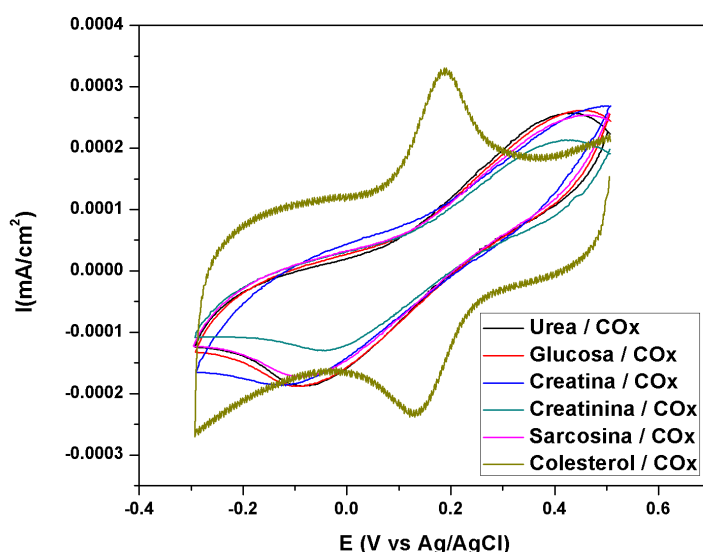


Figura 26. Voltamperograma de la enzima COx inmovilizada sobre el electrodo de carbón vítreo, sumergido en diferentes soluciones catalíticas (Urea, Glucosa, Creatina, Creatinina, Sarcosina y Colesterol).

El voltamperograma de la figura 26 representa algunas interacciones que ocurren en la superficie activa del electrodo de carbón vítreo decorado con la tinta de COx, en diferentes especies orgánicas, como urea, glucosa, creatina, creatinina, sarcosina y colesterol. Dos picos de corriente pueden ser apreciados en el voltamperograma de la prueba de interferentes, los cuales corresponden a las reacciones de óxido y reducción de las diferentes soluciones. Se puede observar que la diferencia en los picos de corriente generados entre el colesterol y las soluciones ajenas a éste es de una gran magnitud, el pico de corriente producido por la oxidación del colesterol al entrar en contacto con la enzima colesterol oxidasa es de $328 \mu A/cm^2$ a los $0.19 V$, mientras que los picos de corriente generados por las soluciones ajenas al sustrato específico de la enzima oscilan entre los 261 y los $211 \mu A/cm^2$ a $0.4 V$.

Por otro lado, la voltametría de pulso diferencial aplicado al electrodo de carbón vítreo decorado con la tinta de COx (figura 27), se realizó con la finalidad de visualizar la detección

de colesterol con una mejor resolución, donde efectivamente se puede apreciar la alta afinidad de la enzima por el sustrato o electrolito.

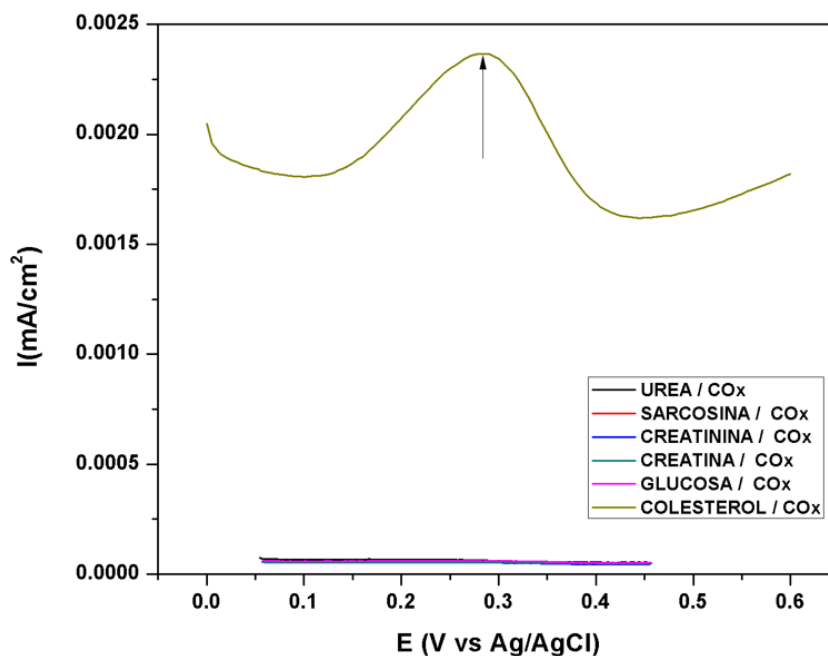


Figura 27. DPV del electrodo de carbón vitreo decorado con la tinta de COx, sumergido en diferentes soluciones interferentes.

En la figura 27 claramente resalta la capacidad discriminatoria de la enzima COx hacia otros sustratos ajenos al colesterol, puesto que la magnitud del pico máximo de corriente del colesterol es de **2.36 mA** a un potencial aproximado de **0.28 V**, mientras que los picos de corriente pertenecientes a los demás agentes en la solución son de apenas **60 pA** a un voltaje de **0.26 V**. El pico de corriente máxima I_p es directamente proporcional a la concentración de la especie electroactiva, sigue el comportamiento de la ec. 3.

Por lo tanto, la técnica DPV representa un medio alternativo para la detección de componentes orgánicos con límites de detección muy bajos.

A partir de estos fenómenos electroquímicos podemos describir la especificidad de la enzima COx. puesto que los picos de oxidación y reducción del sitio activo (FAD/FADH₂) de la enzima COx, cuando interactúa con el colesterol se encuentran más definidos que los picos generados por las diferentes soluciones de urea, glucosa, creatina, creatinina y sarcosina. Dichos fenómenos pueden ser explicados por las teorías de especificidad de Emil Fisher con

el modelo “Llave y Cerradura” y el modelo de “Ajuste Inducido” de Daniel Koshland (Berg, Tymoczko & Stryker *et al.*, 2006).

Emil Fisher sugiere que la especificidad enzimática implicaba la presencia de características estructurales complementarias entre la enzima y el sustrato, en donde el sustrato podría encajar en su sitio complementario en la enzima, como una llave encaja en una cerradura, tal y como se muestra en la figura 28. Esto es totalmente consistente con los aspectos más detallados de la estructura del sitio activo. De acuerdo con el modelo de “Llave y Cerradura”, todas las estructuras permanecen fijas durante todo el proceso de acoplamiento (Fersh *et al.*, 1991).

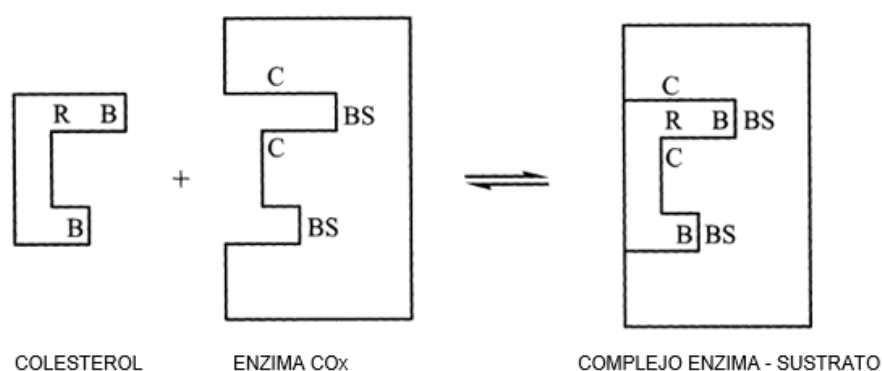


Figura 28. Representación esquemática de la interacción entre una enzima y su sustrato, según el modelo de cerradura y llave. En el ejemplo ilustrado, el sustrato está unido en dos puntos, llevando al grupo reaccionante a la vecindad de dos sitios catalíticos diferentes, (BS = un sitio de unión en la enzima, C = un sitio catalítico, B = un grupo de unión en el sustrato y R = un grupo reactivo, es decir, un grupo que experimenta una reacción catalizada por la enzima) (Fersh *et al.*, 1991).

Esto podría describir parte de la especificidad de la enzima COx hacia el colesterol, en donde el colesterol y la enzima tendrían una conformación estructural definida y afín, en donde únicamente el colesterol posee las características definidas por la enzima para que éste pueda acceder al sitio activo de la misma, es por eso que al entrar en contacto con otros sustratos como la glucosa o la sarcosina, sus conformaciones estructurales son totalmente diferentes a los establecidos por la enzima para que éstos puedan tener alguna interacción catalítica con su sitio activo.

Sin embargo, aunque la teoría de “Llave y Cerradura” explica muchas de las características de la especificidad de las enzimas, no toma en cuenta la conocida flexibilidad de las proteínas (Khan & Sheets *et al.*, 1997).

Daniel Koshland, en su teoría de “Ajuste Inducido”, sugirió que la estructura del sustrato puede ser complementario al sitio activo de la enzima en el complejo enzima – sustrato, pero no a la enzima en estado libre; un cambio conformacional ocurre en el sitio activo de la enzima durante la unión del sustrato, lo que resulta en la combinación requerida de estructuras, (Figura 29). La hipótesis del ajuste inducido esencialmente requiere que el sitio activo sea flexible y que el sustrato sea rígido, permitiendo a la enzima envolver a todo el sustrato, reuniendo así los correspondientes sitios catalíticos y los grupos de reacción. En algunos aspectos, la relación entre el sustrato y un sitio activo es similar a la que existe entre una mano y un guante, en cada interacción la estructura de un componente (sustrato o mano), permanece fijo y la forma del segundo componente (sitio activo o guante), cambia para volverse complementario del primero (Khan & Sheets *et al.*, 1997).

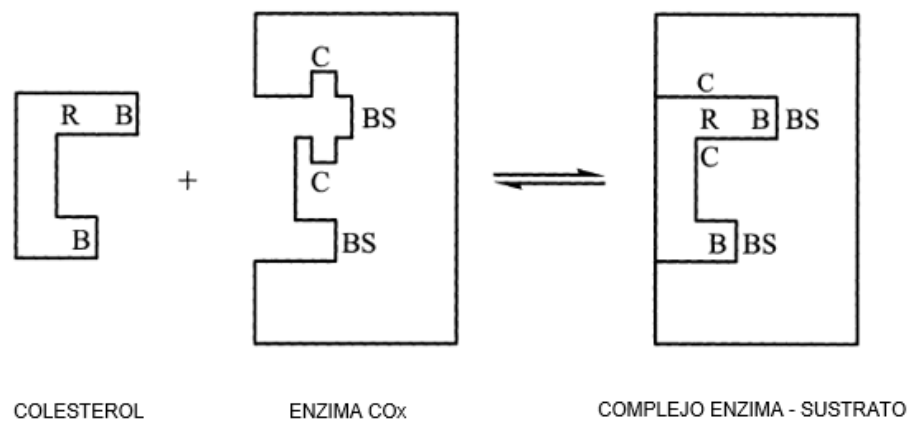


Figura 29. Representación esquemática de la interacción entre una enzima y su sustrato, de acuerdo con el modelo de ajuste inducido (Khan & Sheets, 1997).

Tal mecanismo podría ayudar a lograr un alto nivel de especificidad para la enzima. En el mecanismo de “Llave y Cerradura”, el sitio activo siempre está estructuralmente intacto, con los sitios activos catalíticos se encuentran libremente accesibles y alineados, por lo tanto, un grupo de reacción adecuado, ya sea o no parte de un sustrato unido adecuadamente, puede entrar en contacto con la región del sitio activo de la enzima y producir cierto grado de reacción (Lolis & Petsko *et al.*, 2004), es por eso que diferentes especies orgánicas como urea o la glucosa pueden llegar a tener contacto con el sitio activo de la enzima CO_x, pero su grado de reacción en mínimo en comparación a la del colesterol.

Por otro lado, en el mecanismo de “Ajuste Inducido”, diferentes componentes catalíticos podrían ser separados de la enzima en un margen considerable, minimizando el riesgo de una colisión fortuita de un grupo reactivo. También es posible que se bloquee el acceso a los grupos catalíticos de la enzima libre. Solo cuando el grupo de unión del sustrato es reconocido por el correspondiente sitio de la enzima y el proceso de unión procede, el cambio de estructura conformacional tiene lugar, lo que da lugar que todos los grupos relevantes en el sustrato y la enzima lleguen juntos al sitio activo. Desde luego, puede suceder que un grupo de unión similar desencadene un cambio conformacional en la enzima, sin embargo, no producirían ninguna reacción catalítica, a esto se le conoce como unión improductiva (Khan & Sheets *et al.*, 1997). Tal y como sucede con las especies que poseen un grupo funcional -OH, el cual puede ser reconocido por la enzima COx, pueden llegar a provocar un cambio en la estructura conformacional de en la enzima y desencadenar un ajuste inducido, sin embargo, su unión es improductiva, debido a la escasa actividad catalítica que éstos producirían en comparación al colesterol.

7.6. Obtención del límite de detección (LOD) a partir de la curva de calibración de VC

Se estimó el límite de detección de la enzima COx inmovilizada sobre CNTs por medio las pruebas de VC realizadas en diferentes concentraciones de colesterol, la figura 30, se puede observar, la curva de calibración obtenida a partir de los datos de la gráfica 23; la curva de calibración nos permite determinar la perfección y precisión de un ajuste lineal, dicho de otra manera, se puede relacionar con la precisión del modelo para la detección de colesterol, el valor obtenido de R fue de 0.87344, un valor de 1 para R se considera un ajuste lineal perfecto.

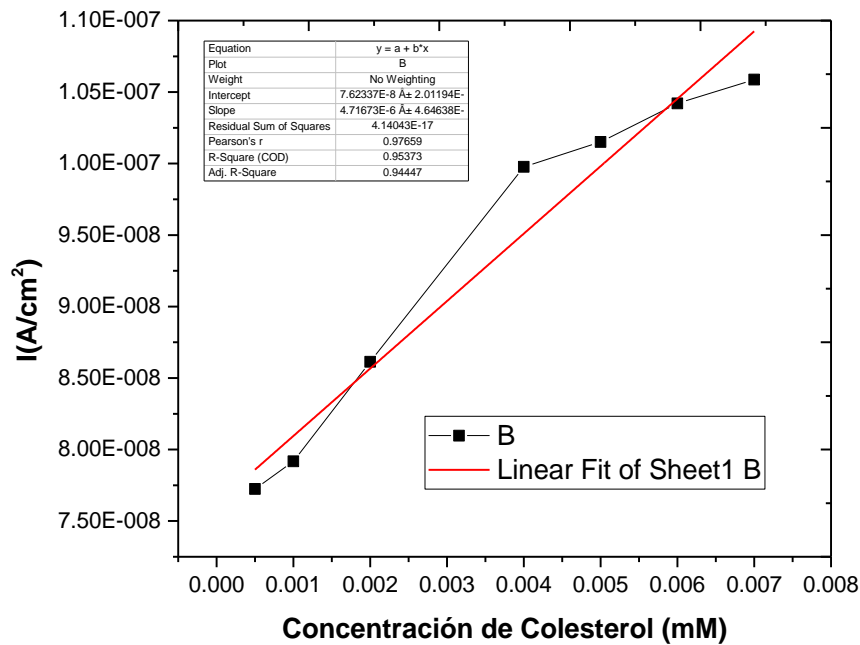


Figura 30. Picos de corriente máximos producto de la oxidación del colesterol por la tinta de COx depositada sobre el electrodo de carbón vitreo para la detección de colesterol.

El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto. Son posibles varios enfoques para determinar el límite de detección. A partir de la ecuación 4 se puede estimar el LOD de la plataforma de sensado:

$$LOD = \frac{3 \cdot \delta}{m}$$

Ec 4. Ecuación para el cálculo del límite de detección.

Donde δ corresponde a la desviación estándar de los datos, y m representa el valor de la pendiente, el cual fue posible extraer de la curva de calibración, a partir de la ecuación característica de la recta. El valor de LOD fue de **0.000619 mM (0.24 mg/dl)**, lo cual representa un valor aceptable para fines prácticos, puesto que la concentración del colesterol en el cuerpo humano es de **200mg/dl (52 mM)** (Pollegioni, Piubelli & Molla, 2009), por lo tanto, el uso de sistemas de detección electroquímicos, basados en enzimas inmovilizadas sobre electrodos de trabajo representa una alternativa viable para la estimación del colesterol presente en muestras biológicas. La tabla 5 muestra una comparación de los límites de

detección de biosensores basados en la inmovilización de la enzima COx sobre diferentes plataformas de inmovilización y el biosensor desarrollado en este proyecto.

Tabla 5. Comparación de las características de biosensores basados en la enzima Colesterol Oxidasa.

Artículo	Analito	Aplicación	Bioreceptor	Tipo de Muestra	Límite de detección	Prueba de interferentes	Referencias
A Cholesterol Biosensor Based on Entrapment of Cholesterol Oxidase in a Silicic Sol-Gel Matrix at a Prussian Blue Modified Electrode	Colesterol	Fabricación de un biosensor de colesterol por la inmovilización de la enzima COx en una matriz silícica sol-gel en la parte superior de un electrodo de carbon vítreo modificado con azul Prusia. Se basa en la detección de peróxido de hidrógeno producido por la COx a 0.05V.	Colesterol Oxidasa	Soluciones sintéticas de Colesterol en buffer de fosfatos 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 4×10^{-5} , 5×10^{-5} , mol/L.	1.2×10^{-7} mol/L	Si, el sensor fue selectivo aún en presencia de ácido láctico, cisteína y albumina.	(Wooterspoon, Ansell & Brooks, 2000)
Application of Conducting Poly(aniline-co-Pyrrole) Film to Cholesterol Biosensor	Colesterol	Desarrollo de un biosensor basado en la inmovilización de la enzima COx en películas de poli(anilina-co-pirrol), depositado sobre un electrodo de carbon vítreo para la estimación de colesterol con técnicas amperométricas.	Colesterol Oxidasa	Soluciones sintéticas de Colesterol en buffer de fosfatos 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4×10^{-3} , 5×10^{-3} , 6×10^{-3} , 7×10^{-3} , 8×10^{-3} , 9×10^{-3} , 10×10^{-3} , mol/L.	2.9×10^{-7} mol/L	Si, se encontró que los interferentes como ácido úrico, lactato y glucosa tienen un efecto casi nulo en la corriente.	(Sigh, Solanki & Pandey, 2006).
Carbon Nanotubes-Based Amperometric Cholesterol Biosensor	Colesterol	Se fabricó un sensor de colesterol amperométrico basado en nanotubos de carbono a través de	Colesterol Oxidasa	Soluciones sintéticas de Colesterol en buffer de fosfatos	2×10^{-3} , mol/L.	Si, los interferentes como ácido ascórbico, ácido úrico no alteran las	(Valentini, Amine & Orlanducci, 2004).

Fabricated Through Layer-by-Layer Technique		técnicas de capa por capa se depositó un polielectrolito catiónico poli (cloruro de dialildimetilamonio) y colesterol oxidasa (COx), en un electrodo de oro modificado con nanotubos de carbón de pared múltiple.		0.5×10^{-3} , 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4×10^{-3} , 5×10^{-3} , 6×10^{-3} , 7×10^{-3} , mol/L.		lecturas de corriente del colesterol.	
Development of Cholesterol Oxidase electrodes for their application on self-powered biosensors	Colestero 1	Se fabricó un biosensor amperométrico basado en la inmovilización covalente de COx sobre nanotubos de carbon de pared simple para su aplicación en el desarrollo de electrodos empleados en la fabricación de biosensores autoalimentables.	Colesterol	Soluciones sintéticas de Colesterol en buffer de fosfatos 0.5×10^{-3} , 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4×10^{-3} , 5×10^{-3} , 6×10^{-3} , 7×10^{-3} , mol/L.	Resultados reportados en este proyecto. 0.000656 mM.	Se realizó prueba de interferentes en soluciones de creatina, creatinina, urea, glucosa, lactato y sarcosina. Los interferentes no presentaron perturbaciones en las curvas de corriente generados por la oxidación de colesterol.	

7.7. Pruebas electroquímicas de la tinta de COx en función del pH

Se realizaron pruebas de VC y DPV de la tinta catalítica de COx depositada sobre un electrodo de carbón vitreo, sumergido a una concentración fija de colesterol de 8 mM bajo diferentes condiciones de pH. Los valores de pH usados para realizar estas pruebas electroquímicas se encuentran en el rango de 6 a 8.5, con incrementos de 0.5 unidades.

La importancia de evaluar la respuesta electroquímica de la tinta COx radica en que, para las reacciones de oxidación y reducción de especie orgánicas, la basicidad o acidez del medio

juega un papel importante en los valores del pH (Meites & Zuman *et al.*, 1983). Además de que la actividad enzimática es en la mayoría de los casos profundamente afectada por el pH y por las especies usadas en el buffer, es por eso, que las pruebas de VC y DPV se realizaron tanto en la enzima COx inmovilizada, como en su estado libre, para visualizar la respuesta del sistema de inmovilización ante los cambios de las condiciones del pH.

Como se puede apreciar en la figura 31, la respuesta del corriente producto de la oxidación del colesterol por la COx tanto en estado libre como inmovilizada muestra un comportamiento creciente. Para el caso de la enzima en estado libre (figura 31 a), a medida que se incrementan el valor del pH del medio la respuesta de la corriente decrece, siendo el pico anódico máximo (I_{pa}) **de 0.355 mA a 0.22 V**, en un pH de 6, esto se debe a que el pH puede afectar las curvas de i vs E , debido a que el equilibrio de una especie electroactiva depende del pH. Estos son los equilibrios de hidratación-deshidratación, donde la velocidad de deshidratación que da lugar a la forma reducible no hidratada, esta catalizada por un medio ácido, lo que da lugar a una corriente controlada por difusión en el rango del pH neutro 7. Los aumentos de corriente de con el aumento del nivel de acidez corresponden al aumento de la tasa de deshidratación catalizada por ácidos (Patriarche, Chareau & Vandelbanck *et al.*, 1979).

Por otro lado, para el caso de la enzima inmovilizada la respuesta difiere de su estado libre (figura 31 b), puesto que el valor de picos de corriente anódicos incrementa a medida que aumenta el valor del pH del medio, esto se debe a que la corriente creciente en el medio está controlada por la deshidratación catalizada por el ácido, por lo que a un pH superior a 7 u 8 la corriente aumenta debido a la deshidratación catalizada por una base (Patriarche, Chareau & Vandelbanck *et al.*, 1979). Como se puede observar el pico máximo anódico de corriente fue de **0.215 mA a 0.19 V**, en un pH de 8, más allá de éste valor de pH la respuesta de corriente comienza a decrecer, debido a las disociaciones de los grupos -OH de la forma hidratada (Zuman *et al.*, 1967).

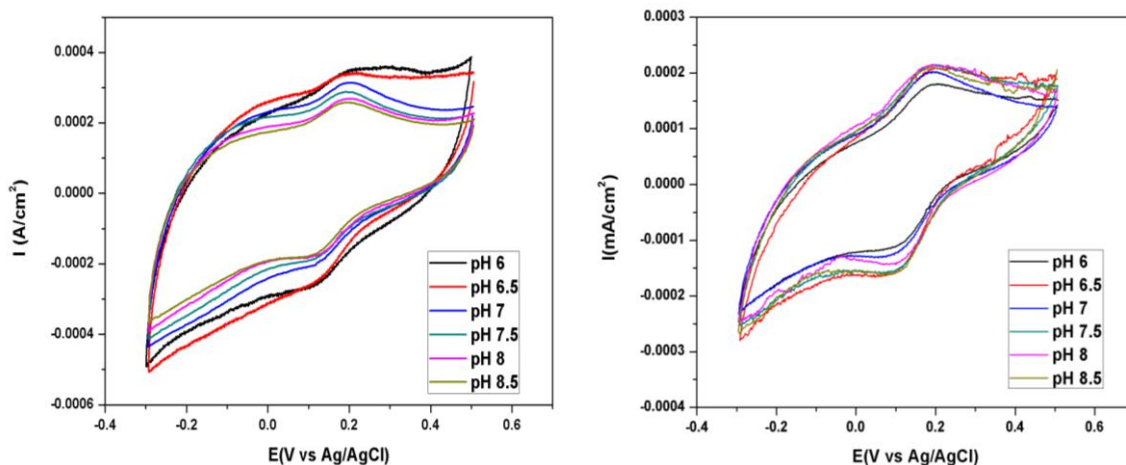


Figura 31. A) VCs de la tinta de COx con la enzima en estado libre a diferentes condiciones de pH, B) VCs de la tinta de COx con la enzima inmovilizada sobre CNTs, bajo diferentes condiciones de pH.

Finalmente se llevaron a cabo pruebas de DPVs a la misma tinta de COx depositada sobre un electrodo de carbón vítreo debido a que las técnicas de DPV pueden utilizarse para el análisis simultáneo de más de una especie electroactiva si los picos de potencial están suficientemente separados (normalmente al menos 0,15 V) (Wang *et al.*, 1985). En este caso en particular, en análisis de varias soluciones a diferentes valores de pH. Cuando los potenciales de pico difieren en menos de 0,15 V, los picos se superponen y es necesario un tratamiento de convolución. Por lo general, los picos separados por 50 mV pueden distinguirse de este modo. Gracias a ello, fue posible diferenciar el comportamiento de la corriente cuando la enzima se encuentra tanto en estado libre, (figura 32 a), como inmovilizada sobre CNTs (figura 32 b), tal como se puede apreciar, los picos de corriente están mejor definidos cuando la enzima se encuentra inmovilizada, lo cual significa una ventaja; debido a esto, son directamente proporcionales a la concentración de la especie electroactiva empleado empleando el ancho del pico(Koryta, Dvorak & Kavan *et al.*, 1993).

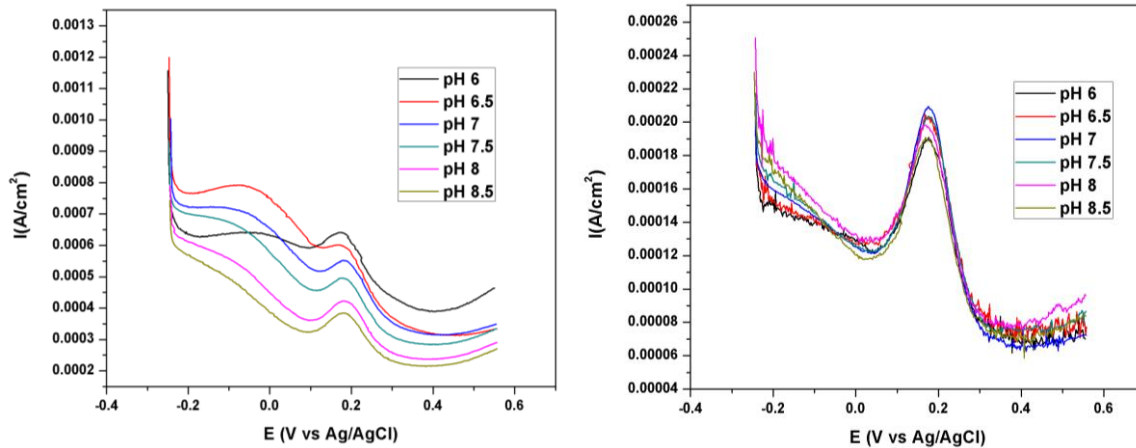


Figura 32. A) VCs de la tinta de COx con la enzima en estado libre a diferentes condiciones de pH, B) VCs de la tinta de COx con la enzima inmovilizada sobre CNTs, bajo diferentes condiciones de pH.

Sin embargo, es evidente que existe un decrecimiento en la respuesta de la corriente por parte de la enzima inmovilizada con respecto a su estado libre, dicho fenómeno se puede ser atribuido al inicio de los procesos de desnaturalización de la enzima, porque como cualquier otra proteína, la enzima experimenta procesos de desnaturalización durante el procedimiento de inmovilización (Selwyn *et al.*, 1965).

7.8. Fabricación de electrodos decorados con tintas catalíticas de COx y Pt para su implementación en una celda de biocombustible microfluídica de papel

Para la decoración o depósito de los electrodos de la celda con las tintas catalíticas previamente preparadas, 2 piezas de papel carbón de 10 mm^2 de área fueron modificados con $1 \mu\text{l}$ de cada tinta preparada, una con la enzima COx inmovilizada sobre CNTs; y otra de platino, dichas tintas fueron depositadas por medio de un aerógrafo, esto con la finalidad de modificar la mayor cantidad de área posible del electrodo por ambos lados y al mismo tiempo, optimizar la cantidad de tinta utilizada en cada uno de los electrodos.

Una vez que se obtiene los electrodos fueron ensamblados sobre una matriz de papel filtro Watman de poro número 5, con la finalidad de aprovechar los micro canales de su estructura para favorecer el desplazamiento por flujo lateral de la muestra y fue ensamblado siguiendo la técnica del sándwich (figura 33); el ánodo fue colocado por debajo de la tira de papel y el

cátodo por encima para así garantizar que ambos electrodos reaccionen con la muestra depositada sobre el papel.

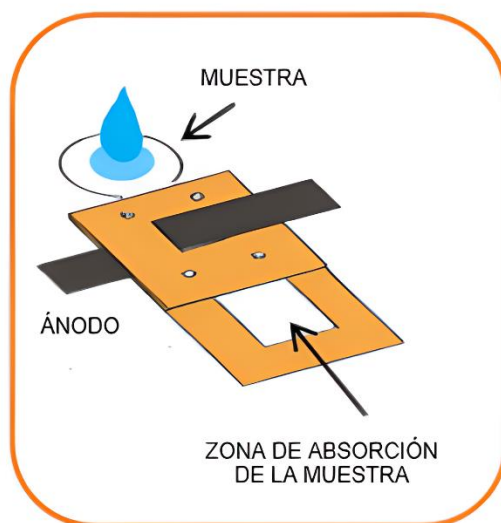


Figura 33. Ensamble de los electrodos funcionalizados de COx y de Platino en una celda de biocombustible microfluídica hecha en papel.

7.9. Evaluación del rendimiento de la celda de biocombustible microfluídicas de papel por técnicas electroquímicas de OCV y cronoamperometría

Posterior a la decoración y ensamblaje de los electrodos sobre la celda de biocombustible microfluídica, se procedió a evaluar el rendimiento de la celda se obtuvieron curvas circuito abierto (OCV), curvas de voltaje-intensidad y de polarización potencia-corriente.

La salida de potencial eléctrico de la celda de biocombustible microfluídica de papel fue estudiada bajo diferentes concentraciones de colesterol, iniciando desde una concentración inicial de 0.05 mM, hasta 8mM. Las curvas de polarización voltaje-intensidad y potencia-intensidad se muestra a continuación en la figura 34.

La curva de polarización potencia-densidad de corriente muestra las respuestas de salida de potencial eléctrico en función de la corriente eléctrica, y ésta a su vez está definida por los voltajes de circuito abierto y corto circuito, lo cual no permite determinar cuál es el máximo potencial eléctrico que la celda de biocombustible microfluídica es capaz de generar en el voltaje en el que éste ocurre (Minter, Luckarift & Atanassov *et al.*, 2014).

La máxima respuesta de potencial eléctrico como se puede observar en la figura 34 se obtuvo a los **0.65 V** y corresponde a **14.894 $\mu W/cm^2$** con una densidad de corriente máxima de **52.056 mA/cm²**.

Se puede apreciar de la misma manera en la gráfica, como la salida de potencial eléctrico se incrementa de **4.0665 $\mu W/cm^2$** hasta **4.946 $\mu W/cm^2$** , cuando la concentración de colesterol incrementa de 6 mM hasta 7 mM. Esto se debe principalmente a que la enzima incrementa su actividad catalítica y, por ende, existe una mayor transferencia de electrones cuando la cantidad de sustrato aumenta respectivamente. Otro punto importante es que el colesterol a concentraciones menores a los 100 mM en fluidos acuosos puede generar potenciales eléctricos ascendentes siempre y cuando la concentración no afecte la viscosidad de la muestra, debido a que el flujo volumétrico Q está relacionado con la viscosidad (μ) mediante la siguiente ecuación: (μ): $Q \sim \frac{1}{\mu}$, por consiguiente la velocidad de dispersión de la muestra a lo largo de los micro canales de la celda de papel microfluídica decrece, y por ende, la salida de potencial eléctrico también cuando la viscosidad es mayor.

Por otro lado, las curvas de voltaje-intensidad nos permite obtener el diferencial de potencial ó Voltaje de la celda (V_{cell}) en función de la corriente eléctrica (I). En la práctica práctica V_{cell} puede ser ligeramente menor al potencial termodinámico ideal (ΔE) debido a la pérdida de potenciales relacionadas con los componentes de la celda. Cómo se puede apreciar en la gráfica la celda produjo un voltaje de circuito abierto máximo de 0.67 V a una concentración de 8mM, mientras que el mínimo voltaje de circuito abierto fue de 0.22V a una concentración de 0.5 mM, a medida que decrece la concentración de colesterol en la muestra el voltaje de circuito también lo hace, esto se debe al fenómeno conocido como la formación de la zona de agotamiento, ligado a las pérdidas de concentración de sustrato (Kjeang, Djilali & Sinton *et al.*, 2009).

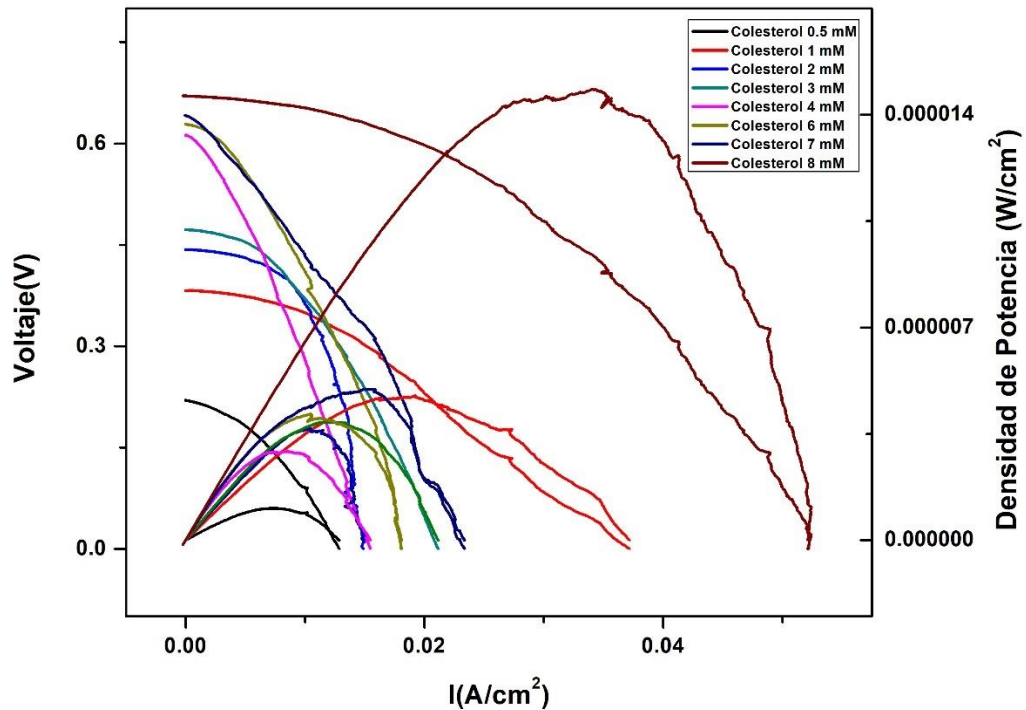


Figura 34. Curvas de polarización voltaje-intensidad y potencia-intensidad de la celda de biocombustible microfluídica construida en papel con electrodos funcionalizados con COx y Platino, con diferentes concentraciones de colesterol.

Para evaluar los resultados obtenidos en las pruebas de OCV y obtención de las curvas de polarización se comparó los resultados obtenidos en la celda de biocombustible microfluídica basada en la inmovilización de la enzima COx sobre electrodos de carbón con otras celdas de biocombustible, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Comparación de las características de diferentes celdas de biocombustible microfluídicas basadas en enzimas.

Ánodo	Anolito	Cátodo	Catolito	$I_{max}(\mu A/cm^2)$	$P_{max}(\mu W/cm^2)$	Referencia
GDH and Dp enzymes and the mediator PLL-VK3 with KB coated on gold	Glucosa y NAD ⁺ (dinucleótido de	Box adsorbed on KB on Au electrode	Oxígeno Saturado	160	70	(Togo et al., 2007).

	nicotinamida y adenina)					
GDH and Dp enzymes and the mediator PLL-VK3 and GDH with KB coated on gold	Glucosa y NAD+	PDMS coated Pt or Ag/AgCl	Oxígeno Saturado	130	20-32	(Togo et al., 2007).
GOx enzyme with SWCNTs on glass	Glucose & FEMOL	Laccase with SWCNTs on glass	Oxígeno Saturado	204	1.57	(Boneyton et al., 2013).
ChOx enzyme with SWCNTs	Cholesterol	Pt with SWCNTs	Oxígeno Saturado	1037.96	15	Resultados reportados en el presente trabajo

La simplicidad de operación de la celda de biocombustible microfluídica construida en papel nos revoca a la posibilidad poder hacer uso de fuentes de energía producto de la oxidación de componentes orgánicos. Recientemente, las celdas de combustible deberían beneficiarse de diferentes fuentes de combustible orgánicos para poder ser empleados como fuentes de alimentación de pequeños dispositivos electrónicos (Nolan *et al.*, 2011).

Finalmente, una de las técnicas electroquímicas empleadas para determinar la estabilidad de la celda de biocombustible microfluídica construida en papel con los electrodos de COx desarrollados, fue la cronoamperometría.

Con esta técnica se puede estudiar la dependencia resultante corriente-tiempo, y que el transporte de masa bajo esas condiciones únicamente ocurre por difusión, por lo tanto, la curva de corriente-tiempo refleja el cambio de gradiente de concentración en la superficie del electrodo donde se están ocurriendo las reacciones de óxido-reducción (Gilmartin *et al.*, 1992).

La figura 35 representa las respuestas de corriente obtenidas durante un periodo de tiempo de 300 segundos, con concentraciones de colesterol desde los 0.5 mM hasta los 9 mM. Como se puede observar, las curvas comienzan con un valor máximo de corriente que se atribuye a

un rápido consumo inicial de reactivos entre la actividad catalítica de la enzima COx y el sustrato, seguido de un decaimiento o pendiente en la curva, debido a la aparición de la capa de difusión que es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra que fue depositada en la celda de biocombustible microfluídica construida en papel.

La utilidad de éste tipo de estudio electroquímico radica en que se puede establecer el voltaje y el tiempo de duración del pulso de corriente que producirá el producto deseado (Fernández *et al.*, 1989); información que permite el diseño óptimo de una celda de biocombustible microfluídica, dado que nos interesa que la reacción de oxidación del colesterol en los electrodos de COx nos produzca una cantidad significativa de corriente por un tiempo considerable para poder ser empleado en el desarrollo de dispositivos autoalimentables de bajo consumo eléctrico.

Otro punto importante es este estudio es que podemos determinar la energía acumulada en cada una de las concentraciones de colesterol, integrando el área bajo la curva mediante la siguiente ecuación (Ec 5):

$$E = V \int_0^{tm} j(t) * dt$$

Ec 5. Ecuación para el cálculo de la energía acumulada en la celda.

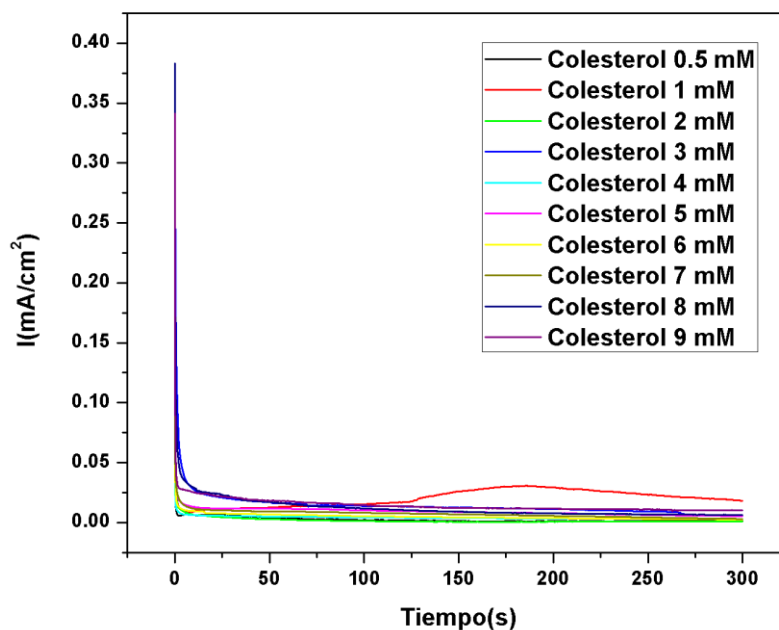


Figura 35. Curvas cronoamperométricas de la celda de biocombustible microfluídica construida en papel con electrodos de COx, trabajando con diferentes concentraciones de colesterol.

8. Conclusiones

En este proyecto se presenta la fabricación y evaluación del rendimiento de una celda de biocombustible microfluídica de papel con electrodos de colesterol oxidasa.

La inmovilización por enlace covalente de la COx sobre los CNTs restaba y aumentaba la mayor parte de la actividad enzimática, por lo que, la enzima no se desnaturalizaba durante el proceso de inmovilización lo que permitió su uso a temperaturas altas, debido a su estabilidad térmica puede emplearse en dispositivos clínicos, puesto que la enzima mostró estabilidad hasta una temperatura de 55°C .

Los electrodos se estudiaron por separado las reacciones que tienen lugar en el ánodo y cátodo por técnicas de voltametría cíclica, los potenciales oxidación y reducción recopilados de las pruebas de detección del colesterol en diferentes concentraciones nos permitió construir una curva de calibración con un valor $R^2 = 0.95$, lo que quiere decir que la precisión de la plataforma de sensado basado en enzimas inmovilizadas sobre CNTs es del 95%, lo cual para fines prácticos es importante, puesto que puede dicho sistema puede ser aplicado en el desarrollo de biosensores enzimáticos para la detección de colesterol.

Se evaluó la afinidad y especificidad de la enzima COx por medio las pruebas electroquímicas de interferentes y la determinación de los parámetros de cinética enzimática

de Michaelis-Menten. El valor obtenido de K_m fue de 160.208 mM , lo cual indica una afinidad de la enzima COx por el sustrato relativamente alta, dado que el rango de valores de K_m oscila entre 10^{-2} y 10^{-6} , y entre menor sea el valor de K_m , mayor será la afinidad. Por otro lado, la prueba electroquímica de interferentes evalúa si sustratos ajenos al colesterol representan rasgos de afinidad al sitio activo de la enzima, sin embargo, la especificidad de la enzima COx hacia el colesterol destaca debido a que la enzima no sufre ningún cambio conformacional en la estructura de su sitio activo al estar en contacto con especies ajenas al colesterol, la especificidad de la enzima COx hacia el colesterol es de un 78.37%. Esto supone una ventaja invaluable para el desarrollo de biosensores basados en enzimas, puesto que la alta especificidad de la COx hacia el analito fisiológicas la hace candidata potencial para la detección en muestras fisiológicas donde existen otros componentes orgánicos.

Finalmente, se ensamblaron los electrodos depositados con las tintas catalíticas de COx y Pt para la construcción de la celda de biocombustible microfluídica de papel, por medio de técnicas electroquímicas de OCV y cronoamperometría se obtuvo una primera aproximación exitosa de un dispositivo microfluídico con enzimas que fluyen en solución.

Se obtuvo un buen desempeño de la celda de biocombustible microfluídica de papel a partir de la oxidación de colesterol, la densidad de potencia obtenida en las pruebas de OCV fue de $140 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ a 0.035 V , mientras que en otros resultados experimentales reportados en la literatura fue de $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ a voltajes entre $0,5-0,2\text{V}$.

La celda de biocombustible basada en papel mostró estabilidad y un comportamiento de reacción continua durante casi 180 segundos en las pruebas de cronoamperometría, lo que puede influir en su aplicación como dispositivo de sensado, pues quiere decir que por al menos 3 minutos el dispositivo será capaz de generar una señal de corriente que puede ser empleada para alimentar un sistema de sensado y simultáneamente estimar los niveles de colesterol en la muestra.

La celda de biocombustible puede complementarse con los componentes electrónicos precisos para amplificar la corriente obtenida de las reacciones de oxidación y reducción, de modo que pueda emplearse como fuente principal de energía del biosensor al mismo tiempo que se determinan los niveles de colesterol en sangre.

Todas estas características sugieren que este trabajo presenta una buena opción para su aplicación en el desarrollo de una plataforma biosensora para la detección electroquímica del

colesterol y al mismo tiempo, una buena alternativa para la producción de energía a partir de reacciones químicas derivadas de la oxidación de combustibles orgánicos como el colesterol.

9. Mejoras a futuro

El trabajo futuro se centrará en simplificar el sistema en cuanto a costos de fabricación y mejora en la sensibilidad del sistema, con la finalidad de aumentar la densidad de potencia de la celda de combustible. Este se hará introduciendo cambios en el diseño y la arquitectura del sistema, como nuevos componentes amplificadores de corriente, y mejorando la calidad de nuestros bioelectrodos utilizando una composición alternativa de las tintas enzimáticas. Los métodos de creación rápida de prototipos, como los descritos en esta tesis aceleran el ciclo de desarrollo de los dispositivos y facilitan el proceso de optimización.

10. Referencias

A. C. Rafael., and R. Mario, Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins. In H. Walker, W. D. Hall, & J. Hurst, *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. (Butterworths, Boston, 1990).

Ahmadalinezhad, A. & Chen, A. High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. *Biosens. Bioelectron.* 26, 4508-4513 (2011).

Akkaya Berrin, Şahin Ferat, Demirel Gökhan, Tümtürk Hayrettin. 2009. Funtional polymeric supports for immobilization of cholesterol oxidase. *Biochemical Engineering Journal.* 43:333-337.

Albery WJ, Knowles JR (1976) Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry* 15:5631–5640.

Allen, B.J., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 1980, Canadá: John Wiley & Sons. analytical chemistry, vol 11. Marcel Dekker, New York, pp 141–289

Aquino Neto, S. and A.R. De Andrade, New energy sources: the enzymatic biofuel cell. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2013. **24**: p. 1891-1912.

Armstrong, F.A., H.A.O. Hill, and N.J. Walton, DIRECT ELECTROCHEMISTRY OF REDOX PROTEINS. *Accounts of Chemical Research*, 1988. **21**(11): p. 407-413.

Arranz, M., Esteban, M. & Palacios, M. Métodos recomendados para la determinación de la concentración de colesterol en suero o plasma y en otros especímenes biológicos. *Química Clínica* 13, 496-503 (1994).

Arya, S. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D., Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 2008, 23, (7), 1083-1100.

Atanassov, P., C. Apblett, S. Banta, S. Brozik, S.C. Barton, M. Cooney, B.Y. Liaw, S. Mukerjee, and S.D. Minteer, Enzymatic biofuel cells. *Interface-Electrochemical Society*, 2007. **16**(2): p. 28-31.

Barham, D. & Trinder. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97, 142-145 (1972).

Barker GC, Gardner AW (1960) *Z Anal Chem* 173:79–83.

Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*, 2014. 87(1): p. 19-41.

Based point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. 54: p. 585-597.

Basu, A.K., Chattopadhyay, P., Roychoudhuri, U., and Chakraborty, R., 2007, Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry* 70: 375–379.

Belitz, H.-D., Grosch Werner, Schiebele Peter. 2009. *Enzymes. Food Chemistry*. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, Alemania. Pp. 93-155.

Beneyton, T., I.P.M. Wijaya, C. Ben Salem, A.D. Griffiths, and V. Taly, Membraneless glucose/O₂ microfluidic biofuel cells using covalently bound enzymes. *Chemical Communications*, 2013. 49(11): p. 1094-1096.

Beneyton, T., I.P.M. Wijaya, C. Ben Salem, A.D. Griffiths, and V. Taly, Membraneless glucose/O₂ microfluidic biofuel cells using covalently bound enzymes. *Chemical Communications*, 2013. 49(11): p. 1094-1096.

Berg, J.M., Tymoczko, J. Land Stryer, L. (2006), *Biochemistry*, 6th edn., Freeman (Chapter 8). biological and electrochemical fuel cells: challenges and applications. *Physical Chemistry Biophys Acta* 105:193–195.

Bisswanger, H. (2002), *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, Wiley-VCR. Comish-

Bowden, A. (1995), *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 2nd edn., Portland.

Bloch K. Chronology of cholesterol Byosynthesis. The role of cholesterol in atherosclerosis: New Therapeutic Opportunities. In: Grundy S M and AG Beam, eds. Philadelphia: Hanley & Belfus, Inc.

Blomhoff, J. P. Serum colesterol determination by gas-liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 43, 257-265 (1973).

Bogner M., Schnaithmann M., Sägebarth J., Sandmaier H. *Procedia Engineering* 5: 1047–1050 (2010).

Braverman-Bronstein A, Camacho-García-Formentí D, Zepeda-Tello R, Cudhea F, Singh M, Dariush Mozaffarian D, Barrientos-Gutierrez T. Mortality attributable to sugar sweetened beverages consumption in Mexico: an update. *International Journal of Obesity*. 2019.

Brena, B.M. and F. Batista-Viera, *Immobilization of Enzymes*. 2006. p. 15-30.

Brett CMA, Oliveira-Brett AM (2003) Step and pulse techniques. In: Unwin P (ed) *Encyclopaedia of electrochemistry*. Wiley, Weinheim.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997; 89: 331-40.

Buckland, B.C., Lilly, M.D., and Dunnill, P., 1976, The kinetics of cholesterol oxidase synthesis by *Nocardia rhodocrous*. *Biotechnol. Bioeng.* 18: 601–62.

Bullen, R.A., T.C. Arnot, J.B. Lakeman, and F.C. Walsh, *Biofuel cells and their development*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006. 21(11): p. 2015-2045.

Burger et al., 2000; Pucadyil and Chattopadhyay, 2006.

C.W. Jones, in: J.H. Clark (Ed.), *Applications of hydrogen peroxide and derivatives*, RSC Clean Technology Monographs, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.

Calabrese Barton, S., J. Gallaway, and P. Atanassov, Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. *Chemical reviews*, 2004. **104**(10): p. 4867-4886.

Cate, D.M., J.A. Adkins, J. Mettakoonpitak, and C.S. Henry, Recent Developments in Paper-Chaplin, M. *Enzyme Technology. Methods of immobilisation*. 2014; Available from: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/immmethod.html>.

Chaubey Asha, Pande K.K., Malhotra B.D. 2003. Application of polyaniline/sol-gel derived tetraethylorthosilicate films to an amperometric lactate biosensor. *Analytical sciences*. 19:1477-1480.

Chemical Physics, 2013. **15**(34): p. 14147-14161.

Cheng T.M., Huang T.K., Lin H.K., Tung S.P., Chen Y.L., Lee C.Y., Chiu H.T. *Applied Materials and Interfaces* 10: 2773-2780 (2010).

Clark LC, Jr, Lyons C (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci* 102:29–45

Collins P.G., Avouris P. *Scientific American* 283: 62-69 (2000).

D. Marrero-López, M. Gálvez-Sánchez, J. Canales-Vázquez, C. Savaniu, and S.N. Savvin, Engineering of materials for solid oxide fuel cells and other energy and environmental applications. *Energy & Environmental Science*, 2010. 3(11): p. 1670-1681.

Dai, X., Nekrassova, O., Hyde, M. E., Compton, R. G., Anodic Stripping Voltammetry of Arsenic(III) Using Gold Nanoparticle-Modified Electrodes. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(19): p. 5924-5929.

Deeken C.R., Cozad M.J., Bachman S.L., Ramshaw B.J., Grant S.A. *Journal of Biomedical Materials Research A* 96: 584-594 (2011).

Díaz Zagoya Juan C., Juárez Oropeza Marco Antonio. 2007. Metabolismo del colesterol, lipoproteínas. *Bioquímica: un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida*. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores. Ciudad de México, D.F. México. Pp. 509-542.

Eibl, D. and R. Eibl, *Disposable Bioreactors II*. 2014: Springer Berlin Heidelberg.

Emregul Emel, Sungur Sibel, Akbulut Ural. 2006. Polyacrylamide- gelatine carrier system used for invertase immobilization. *Food Chemistry* 97:591-597.

Falk, M., C.W. Narváez Villarrubia, S. Babanova, P. Atanassov, and S. Shleev, Biofuel cells for biomedical applications: colonizing the animal kingdom. *ChemPhysChem*, 2013. **14**(10): p. 2045-2058.

Fersht, A.(1999), *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman (Chapters 7-9, 13).

Fessner, W.D., *Biocatalysis: From Discovery to Application*. 2000: Springer.

Fuel Cells and Figures of Merit, in *Enzymatic Fuel Cells*. 2014, John Wiley & Sons, Inc. p. 411.

Gilmartin M. A. T., Hart J. P., Birch B., Voltammetric and amperometric behavior of uric acid bare and surface-modified screen-printed electrodes: studies towards a disposable uric sensor, *Analyst*, **117** (1992) 1299.

González Fernández, José A., *Control de la corrosión y medida por técnicas electroquímicas*, Consejo Superior de investigaciones Científicas, Madrid, 1989.

González Rumayor Víctor, García Iglesias Esther, Ruiz Galán Olga, Gago Cabezas Lara. 2005. Introducción. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Madrid, España. Pp. 14-18.

Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5:467–477.

Greef R, Peat R, Peter LM, Pletcher D, Robinson J (1990) *Instrumental methods in electrochemistry*. Ellis Harwood Limited, New York.

Greenleaf, M., *Instrumental Methods of Analysis with Lab*. 2009, Columbia: University of Missouri. 76.

Grunwald, P., *Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications*. 2009: Imperial College Press.

Gutfreund, H. (1995), *Kinetics for the Life Sciences - Principles, Transmitters and Catalysts*, Cambridge University Press.

Gutfreund, H. (1999), Rapid-flow techniques and their contribution to enzymology, *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 457-460.

Hermanson, G. T., Chapter 14 - Microparticles and Nanoparticles. In *Bioconjugate Techniques* (Third edition), Academic Press: Boston, 2013; pp 549-587.

Hofmeyr J-H, Leyh TS, Kettner C, Raushel FM, Rohwer J, Schomburg D, Steinbeck C (2014) Standards for reporting enzyme data: the STRENDA Consortium: what it aims to do and why it should be helpful. *Perspect Sci* 1:131–137.

Hong C.E., Lee J.H., Kalappa P., Advani S.G. *Composites Science and Technology* 67: 1027-1034 (2007).

Hrapovic S., Liu Y., Male K.B., Luong J.H.T. *Analytical Chemistry* 76: 1083-1088 (2004).

Hu, J., S. Wang, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T.J. Lu, and F. Xu, *Advances in paper Inegi*. (2019). Características de las defunciones registradas en México en 2019. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2020/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>.

Instituto Nacional de Cardiología. (2020). Diez principales causas de mortalidad de julio a septiembre de 2020. [https://www .cardiologia.org.mx /transparencia/ transparencia_focalizada /estadisticas/](https://www.cardiologia.org.mx/transparencia/transparencia_focalizada/estadisticas/).

Ispas, C. R.; Crivat, G.; Andreescu, S., Review: Recent Developments in Enzyme-Based Biosensors for Biomedical Analysis. *Analytical Letters* 2012, 45, (2-3), 168-186.

IUPAC compendium of chemical terminology 2nd edn (1997). (1992) International Union of Pure and Applied Chemistry: Research Triangle Park, NC, U.S.

Ivanov, I., T. Vidaković-Koch, and K. Sundmacher, Recent advances in enzymatic fuel cells: experiments and modeling. *Energies*, 2010. 3(4): p. 803-846.

JO'M, Frumkin A, Petrii OA, Damaskin BB (1980) In: Bockris Conway BE, Yeager E (eds) *Comprehensive treatise in electrochemistry*, vol 1. Plenum, London, New York.

Khan, S. and Sheetz, M. P. (1997), Force effects on biochemical kinetics, *Annual Review of Biochemistry*, 66, 785-805.

Kilmartin Paul A., Martinez A., Bartlett P.N. 2008. Polyaniline-based microelectrodes for sensing ascorbic acid in beverages. *Current Applied physics*. 8:320-323.

Kim, J., H. Jia, and P. Wang, Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*, 2006. 24(3): p. 296-308.

Kim, J., H. Jia, and P. Wang, Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*, 2006. 24(3): p. 296-308.

Kissinger PT, Heineman WR (eds) (1996) *Laboratory techniques in electroanalytical chem*
Kissinger, P.T. and W.R. Heineman, *CYCLIC VOLTAMMETRY*. *Journal of Chemical Education*, 1983. 60(9): p. 702-706.

Kissinger, P.T. and W.R. Heineman, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. 1996, New York: Marcel Dekker, Inc.

Kjeang, E., *Microfluidic Fuel Cells and Batteries*. 2014: Springer.

Kjeang, E., N. Djilali, and D. Sinton, Microfluidic fuel cells: A review. *Journal of Power Sources*, 2009. 186(2): p. 353-369.

Koryta J, Dvorak J, Kavan L (eds) (1993) *Principles of electrochemistry*, 2nd edn. Wiley, New York.

Koshland DE Jr (2002) The application and usefulness of the ratio k_{cat}/K_M . *Bioorg Chem* 30:211–213.

Lee, J.w. and E. Kjeang, A perspective on microfluidic biofuel cells. *Biomicrofluidics*, 2010. 4(4): p. 041301.

Lee, K.A., Fuda, H., Lee, Y.C., Negishi, M., Strott, C.A., Pedersen, L.C., 2003, Crystal structure of human cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in the presence of pregnenolone and 3-phosphoadenosine-5-phosphate. Rationale for specificity differences between prototypical SULT2A1 and the SULT2BG1 isoforms. *J. Biol. Chem.* 278: 44593–44599.

Li B, Wang W, Wang FQ, Wei DZ. Cholesterol oxidase ChoL is a critical enzyme that catalyzes the conversion of diosgenin to 4-ene-3-keto steroids in *Streptomyces*

virginiae IBL-14. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;**85**:1831–1838. doi: 10.1007/s00253-009-2188-0

Liana, D.D., B. Raguse, J.J. Gooding, and E. Chow, Recent Advances in Paper-Based Sensors. *Sensors*, 2012. 12(9): p. 11505-11526.

Liaw, and M.J. Cooney, Enzyme-based biofuel cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007. 18(3): p. 228-234.

Lim, K.G. and G.T.R. Palmore, Microfluidic biofuel cells: The influence of electrode diffusion layer on performance. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **22**(6): p. 941-947.

Liu Y., Wang M., Zhao F., Xu Z., Dong S. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 984-988 (2005).

Lolis, E. and Petsko, G. A. (1990), Transition-state analogues in protein crystallography - probes of the structural source of enzyme catalysis, *Annual Review of Biochemistry*, **59**, 597-630.

M. Noel, K. I. Vasu, "Cyclic Voltammetry and the Frontiers of Electrochemistry", Aspect publications Ltd., London, 1990.

M.M. Ghangrekar, B. Erable, and N.M. Duteanu, Biological and Microbial Fuel Cells. *Comprehensive Renewable Energy*, Vol 4: Fuel Cells and Hydrogen Technology,,: p. 277-300.

MacLachlan, J., Wotherspoon, A.T., Ansell, R.O., Brooks, C.J., 2000, Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72: 169–195.

Malhotra Bansi D., Chaubey Asha, Singh S.P. 2006. Prospects of conducting polymers in biosensors. *Analytica Chimica Acta.* 578:59-74.

Marangoni, A. G. (2002), *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*, Wiley (Chapters 1-3, 6, 14-15).

Martínez M.T., Callejas M.A., Benito A.M., Cochet M., Seeger T., Ansón A., Schreiber J., Gordon C., Marhic C., Chauvet O., Fierro J.L.G., Maser W.K. *Carbon* 41: 2247-2256 (2003).

Meites L, Zuman P (eds) (1977–1983) *Handbook series in organic electrochemistry*, vols I–VI. CRC Press, Boca Raton, FL

Meredith, M.T. and S.D. Minteer, Biofuel Cells: Enhanced Enzymatic Bioelectrocatalysis. Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 5, 2012. **5**: p. 157-179.

Minteer, S.D., B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, Enzyme-based biofuel cells. Current Opinion in Biotechnology, 2007. 18(3): p. 228-234.

Minteer, S.D., B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, Enzyme-based biofuel cells. Current Opinion in Biotechnology, 2007. 18(3): p. 228-234.

Minteer, S.D., H.R. Luckarift, and P. Atanassov, Electrochemical Evaluation of Enzymatic

Minteer, S.D., H.R. Luckarift, and P. Atanassov, Electrochemical Evaluation of Enzymatic Fuel Cells and Figures of Merit, in Enzymatic Fuel Cells. 2014, John Wiley & Sons, Inc. p. 4- 11.

Minteer, S.D., P. Atanassov, H.R. Luckarift, and G.R. Johnson, New materials for biological fuel cells. Materials Today, 2012. **15**(4): p. 166-173.

Moehlenbrock, M.J. and S.D. Minteer, Extended lifetime biofuel cells. Chemical Society Reviews, 2008. 37(6): p. 1188-1196.

Mohamad, N. R.; Marzuki, N. H. C.; Buang, N. A.; Huyop, F.; Wahab, R. A., An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. Biotechnology & Biotechnological Equipment 2015, 29, (2), 205-220.

Mohamad, N. R.; Marzuki, N. H. C.; Buang, N. A.; Huyop, F.; Wahab, R. A., An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. Biotechnology & Biotechnological Equipment 2015, 29, (2), 205-220.

Montoya H.H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2da edición. Universidad de Antioquía, Colombia (2008).

~~Montoya H.H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2da edición. Universidad de Antioquía, Colombia (2008).~~

Mousavi Shaegh, S.A., N.-T. Nguyen, and S.H. Chan, A review on membraneless laminar flow-based fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011. **36**(9): p. 5675-5694. National Center of Biotechnology Information. (2017). What is cholesterol and how does arteriosclerosis develop?. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072511/>.

Nelson David L.; Cox Michael M. 2008. Lipid biosynthesis. *Lehninger principles of Biochemistry*. Editorial W.H. Freeman and Company. New York city. United States of America. Pp. 805-850.

NeoHealth. (2020). Las enfermedades cardiovasculares, principal causa de muerte en México y el mundo. <https://www.revistaneo.com/articles/2020/09/23/las-enfermedades-cardiovasculares-principal-causa-de-muerte-en-mexico-y-el>.

Nguyen, T.H., A. Fraiwan, and S. Choi, Paper-based batteries: A review. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014. 54: p. 640-649.

Nicholson, R.S., THEORY AND APPLICATION OF CYCLIC VOLTAMMETRY FOR MEASUREMENT OF ELECTRODE REACTION KINETICS. *Analytical Chemistry*, 1965. **37**(11): p. 1351-&.

Nolan-Neylan, F., Harvesting energy from soft drinks. *Chemistry World*, 2011. 8(4): p. 23-23.

Northrop DB (1998) On the meaning of K_m and V/K in enzyme kinetics. *J Chem Educ*
Osman, M.H., A.A. Shah, and F.C. Walsh, Recent progress and continuing challenges in biofuel cells. Part II: Microbial. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. 26(3): p. 953-963.

Osteryoung JG, Schreiner MM (1988) *Crit Rev Anal Chem* 19:S1–S27.

Pant, D., G. Van Bogaert, L. Diels, and K. Vanbroekhoven, A Comparative Assessment of Bioelectrochemical Systems and Enzymatic Fuel Cells. *Microbial Biotechnology: Energy and Environment*, 2012: p. 39.

Patriarche GJ, Chareau-Gosselin M, Vandenbalck JL, Zuman P (1979) Polarography and Pohanka, M., Cholinesterases in Biorecognition and Biosensors Construction: A Review. *Analytical Letters* 2013, 46, (12), 1849-1868.

Pollegioni Loredano, Piubelli Luciano, Molla Gianluca. 2009. Cholesterol oxidase: biotechnological applications. *The FEBS Journal*. 276:6857-6870. Press (Chapters 4, 11, 12).

[Ramani. \(2006\). Fuel Cells. www.electrochem.org/dl/interface/spr/spr06/spr06_p41-44.pdf.](http://www.electrochem.org/dl/interface/spr/spr06/spr06_p41-44.pdf)

Rassaei, L.; Olthuis, W.; Tsujimura, S.; Sudhölter, E. J. R.; van den Berg, A., Lactate biosensors: current status and outlook. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406, (1), 123-137.

related electroanalytical techniques in pharmacy and pharmacology. In: Bard AJ (ed) *Electrochemistry*, Richmond, W., 1976, Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous-flow analysis. *Clin. Chem.* 22: 1579–1588.

Robert K. Murray, Peter A. Mayes, Daryl K. Granner, et al. *Bioquímica de Harper*. Decimocuarta edición. Editorial Manual Moderno. México D.F. 1997.

S. Trasatti, in: J. Lipkowski, N. Ross (Eds.), *Transition Metal Oxides: Versatile Materials for Electrocatalysis*, VCH Publishers Inc., New York, 1994.

Selwyn MJ (1965) A simple test for enzyme inactivation of an enzyme during assay. *Biochim Biophys Acta* 105:193–195.

Selwyn MJ (1965) A simple test for enzyme inactivation of an enzyme during assay. *Biochim Biophys Acta* 105:193–195. Shukla, A.K., P. Suresh, S. Berchmans, and A. Rajendran, *Biological fuel cells and their applications*. *Current Science*, 2004. **87**(4): p. 455-468.

Singh Suman, Solanki Pratima R., Pandey M. K., Malhotra B. D. 2006. Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for applications to cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 568:126-132.

Siqueira Jr. José R., Caseli Luciano, Crespilho Frank N., Zucolotto Valtencir. 2010. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 25:1254-1263.

Smyth MR, Vas JG (1992) *Analytical voltammetry*, comprehensive analytical chemistry. Elsevier, Amsterdam.

Song, Y., V. Penmatsa, and C. Wang. Recent development of miniaturized enzymatic biofuel cell. in *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*. 2011.

Suman, C.S. Pundir. 2003. Co-immobilization of cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase onto alkylamine glass beads for measurement of total cholesterol in serum. *Current Applied Physics*. 3:129-133.

Sumner JB (1933) The chemical nature of enzymes. *Science* 78:335.

Taylor R.F. *Protein Immobilization: fundamentals and applications*, Marcel Dekker, New York (1991).

Tipton KF, Armstrong RN, Bakker BM, Bairoch A, Cornish-Bowden A, Halling PJ, Hofmeyr J-H, Leyh TS, Kettner C, Raushel FM, Rohwer J, Schomburg D, Steinbeck C (2014) Standards for reporting enzyme data: the STRENDA Consortium: what it aims to do and why it should be helpful. *Perspect Sci* 1:131–137.

Togo, M., A. Takamura, T. Asai, H. Kaji, and M. Nishizawa, An enzyme-based microfluidic biofuel cell using vitamin K3-mediated glucose oxidation. *Electrochimica Acta*, 2007. **52**(14): p. 4669-4674.

Togo, M., A. Takamura, T. Asai, H. Kaji, and M. Nishizawa, Structural studies of enzymebased microfluidic biofuel cells. *Journal of Power Sources*, 2008. 178(1): p. 53-58.

Togo, M., A. Takamura, T. Asai, H. Kaji, and M. Nishizawa, Structural studies of enzymebased microfluidic biofuel cells. *Journal of Power Sources*, 2008. 178(1): p. 53-58.

Vashist S.K., Zheng D., Al-Rubeaan K., Luong J.H.T., Sheu F.S. *Biotechnology Advances* 29: 169-188 (2011).

Vidal, J.C., Espuelas, J., and Castillo, J.R., 2004, Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor. *Anal. Biochem.* 333: 88–98.

Von Lode, P., Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clinical Biochemistry*, 2005. 38(7): p. 591-606.

Wang J (1985) *Stripping analysis. Principles, instrumentation and applications*. VCH, Weinheim, New York.

Wepasnick K.A., Smith B.A., Schrote K.E., Wilson H.K., Diegelmann S.R., Fairbrother D.H. *Carbon* 49: 24-36 (2011).

Wong, C. M.; Wong, K. H.; Chen, X. D., Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008, 78, (6), 927-938.

Yang, J., S. Ghobadian, P.J. Goodrich, R. Montazami, and N. Hashemi, Miniaturized Ye X.R, Chen L.H., Wang C., Aubuchon J.F., Chen I.C., Gapin A.I. *The Journal of Physical Chemistry B* 26: 12938-12942 (2006).

Zebda, A., L. Renaud, M. Cretin, C. Innocent, F. Pichot, R. Ferrigno, and S. Tingry, Electrochemical performance of a glucose/oxygen microfluidic biofuel cell. *Journal of Power Sources*, 2009. 193(2): p. 602-606.

Zhou, M., C. Chen, Y. Du, B. Li, D. Wen, S. Dong, and E. Wang, An IMP-Reset gate-based reusable and self-powered "smart" logic aptasensor on a microfluidic biofuel cell. *Lab on a Chip*, 2010. 10(21): p. 2932-2936.

Zoski CG (ed) (2007) *Handbook of electrochemistry*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam.

Zuman P (1967) *Substituent effects in organic polarography*. Plenum, New York