



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES  
AVANZADOS, S.C.**

**POSGRADO**

**OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS DE  
POLIANILINA CON APLICACIÓN POTENCIAL EN  
LA DETECCIÓN DE COLESTEROL**

**Tesis como requisito para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia de Materiales presenta:**

**I.Q. Carmen Lucia Medrano Pesqueira**

**Dra. Teresa del Castillo Castro**

**Directora de Tesis**

## DEDICATORIA

A mis padres  
con cariño y agradecimiento por su apoyo brindado

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por brindarme esta experiencia del saber.

A mis padres Alejandro y María Dolores, familia y amigos.

A mi directora de tesis Dra. Teresa del Castillo Castro.

A los miembros del jurado; Dr. Erasto Armando Zaragoza Contreras, Dr. Sergio Gabriel Flores Gallardo y Dr. Mario Enrique Álvarez Ramos.

Al Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C. En especial al Dr. José Alberto Duarte Moller.

A la Universidad de Sonora, al Depto. de Investigación en Polímeros y Materiales, al Dr. Enrique Fco. Velázquez Contreras; al Depto. de Física, a su personal docente y compañeros por permitirme realizar este trabajo.

A la Universidad de Auckland por disponibilidad y buen ambiente brindado, al Polymer Electronics Research Centre (PERC), a la Prof. Jadranka Travas-Sejdic y al Prof. Paul Kilmartin por permitirme ampliar mis conocimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vi
I. RESUMEN.....	1
1.1 SUMMARY .....	2
II. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 HIPÓTESIS .....	6
2.2 JUSTIFICACIÓN .....	6
2.3 OBJETIVOS .....	7
2.3.1 General.....	7
2.3.2 Particulares.....	7
III. ANTECEDENTES .....	8
3.1 Polímeros electroconductores .....	8
3.2 Polianilina.....	10
3.3 Enzimas.....	17
3.4 Colesterol oxidasa.....	26
3.5 Colesterol .....	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
4.1 Reactivos.....	34
4.2 Síntesis de PANI .....	35
4.3 Depósito de PANI sobre PMMA (PMMA/PANI).....	36
4.4 Inmovilización de COx sobre PANI (PMMA/ PANI-Glu-Cox).....	37
4.5 Estudios de Caracterización.....	37
4.6 Evaluación de la actividad de la enzima en función del pH, la temperatura y el tiempo .....	39
4.7 Determinación de la cinética de Michaelis-Menten de la COx inmovilizada	40

4.8 Análisis de las propiedades ópticas de la PANI en función de la concentración de colesterol .....	41
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
5.1 Caracterización del Sistema PMMA/PANI.....	42
5.2 Espectroscopia de FTIR .....	45
5.3 Espectroscopia de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-vis).....	46
5.4 Espectroscopia de Fotoelectrones Emitidos por Rayos-X (XPS) .....	47
5.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	51
5.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	53
5.7 Elipsometría espectroscópica.....	55
5.8 Efecto del pH.....	55
5.9 Efecto de la temperatura .....	56
5.10 Estabilidad en el tiempo.....	57
5.11 Determinación de la cinética de Michaelis-Menten de la COx inmovilizada .....	58
5.12 Análisis de las propiedades ópticas de la PANI en función de la concentración de colesterol .....	60
VI. CONCLUSIONES.....	64
VII. RECOMENDACIONES .....	65
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del sistema PMMA/PANI-Glu-COx. ....	5
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la polianilina. ....	10
<b>Figura 3.</b> Desprotonación de la polianilina (emeraldina sal) en un medio alcalino a emeraldina base. A <sup>-</sup> es un ión arbitrario (ejemplo: cloruro). ....	13
<b>Figura 4.</b> Espectro de UV-vis-IRC de la PANI en sus formas de emeraldina base (EB) y de emeraldina sal (ES).....	14
<b>Figura 5.</b> Reacción del colesterol y la colesterol oxidasa .....	26
<b>Figura 6.</b> Estructura del colesterol .....	28
<b>Figura 7.</b> Emulsión, digestión y absorción del colesterol incorporado en la dieta. CNE= colesterol no esterificado, CE= colesterol esterificado.....	31
<b>Figura 8.</b> Reacciones para la determinación de colesterol por el método enzimático colorimétrico.....	32
<b>Figura 9.</b> Reacción propuesta para la inmovilización de la enzima. ....	37
<b>Figura 10.</b> Reacciones para la evaluación de la actividad relativa de la enzima COx. 40	
<b>Figura 11.</b> Comparación de la absorbancia de las películas de PANI a distintas velocidades de depósito de la solución. (Las velocidades corresponden a los valores promedios alcanzados en cada intervalo de giro).....	42
<b>Figura 12.</b> Comparación de la absorbancia de las películas de PANI a distintas concentraciones de la solución. ....	43
<b>Figura 13.</b> Comparación de la absorbancia de las películas de PANI con la solución almacenada a distintas temperaturas.....	44
<b>Figura 14.</b> Espectro FTIR de los sistemas PMMA/PANI, PMMA/PANI-Glu-COx y PMMA/COx. ....	45
<b>Figura 15.</b> Espectro de absorción de las películas de a) PANI, b) PANI-Glu y c) PANI-Glu-COx.....	47
<b>Figura 16.</b> Espectro de XPS de a) sustrato PMMA, b) sistema PMMA/PANI, c) sistema PMMA/PANI-Glu y d) sistema PMMA/PANI-Glu-COx.....	48

<b>Figura 17.</b> Espectro cercano XPS de N 1s para a) la superficie PANI, b) PANI después de inmovilizar la COx. ....	51
<b>Figura 18.</b> Imágenes de AFM de a) PMMA, b) PMMA/PANI, c) PMMA/PANI-Glu-COx. ....	53
<b>Figura 19.</b> Imágenes de SEM de a) PMMA/PANI, b) PMMA/PANI-Glu, c) PMMA/PANI-Glu-COx. ....	54
<b>Figura 20.</b> Absorbancia de la solución de <i>o</i> -dianiasidina en función del pH. ....	56
<b>Figura 21.</b> Absorbancia de la solución de <i>o</i> -dianiasidina en función de la temperatura. ....	57
<b>Figura 22.</b> Actividad de la enzima inmovilizada en función del tiempo. ....	58
<b>Figura 23.</b> Absorbancia de la solución de <i>o</i> -dianisidina en función de la concentración de colesterol. ....	59
<b>Figura 24.</b> Gráfica Lineweaver-Burke de la absorbancia de la solución de <i>o</i> -dianisidina en función de la concentración de colesterol. ....	60
<b>Figura 25.</b> Tendencia de la absorbancia de la plataforma biosensible tras la adición de la solución de colesterol. Las flechas representan cuando se añadió la solución de sustrato. ....	61
<b>Figura 26.</b> Principio fundamental de la capacidad de detección de la película de PANI durante la exposición del colesterol. ....	62
<b>Figura 27.</b> Cambio de la absorbancia de la plataforma biosensible como función de la concentración de colesterol. ....	63

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cambios típicos de propiedades al modificar los polímeros conductores entre los estados oxidado y reducido mediante estimulación eléctrica y sus aplicaciones potenciales .....	9
<b>Tabla 2.</b> Concentración atómica del barrido de XPS de a) sustrato PMMA, b) sistema PMMA/PANI, c) sistema PMMA/PANI-Glu y d) sistema PMMA/PANI-Glu-COx.	48

## I. RESUMEN

La polianilina (PANI) es un polímero electroconductor que ha sido incorporado en una variedad de sensores químicos y biológicos. La versatilidad de la PANI reside en la inherente habilidad de experimentar interacciones moleculares con el analito y el hecho que de dichas interacciones pueden inducir cambios en sus propiedades eléctricas, ópticas y morfológicas. En este trabajo, una plataforma biosensible para la detección del colesterol se preparó mediante el depósito de PANI en un soporte de poli (metil metacrilato) (PMMA) por la técnica de recubrimiento por giro y la subsecuente inmovilización covalente de la enzima colesterol oxidasa (COx) en la superficie de la película de PANI. Las propiedades ópticas de las películas de PANI se estudiaron en función de la concentración y la temperatura de la solución polimérica, y también de la velocidad de giro de la técnica de deposición. El proceso de inmovilización de la enzima se analizó por espectroscopia de FTIR y de absorción espectroscópica UV-vis, espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X, microscopía electrónica de barrido, y microscopía de fuerza atómica y mediciones elipsométricas. La actividad relativa de la enzima inmovilizada se determinó en función del pH y la temperatura por mediciones ópticas. Las condiciones óptimas se obtuvieron a pH= 6.0 y en el intervalo de temperatura de 30 a 35 °C. La constante aparente de Michaelis-Menten para la enzima inmovilizada fue  $K_M = 57.21 \text{ mg dl}^{-1}$ . Se determinó por medio de espectroscopia de UV-vis los cambios de absorbancia de la plataforma biosensible frente a soluciones de colesterol libre de diferentes concentraciones. La respuesta crómica obtenida evidenció la potencialidad de la PANI neutra en la detección de colesterol en concentraciones equivalentes a las presentes en suero sanguíneo.

## 1.1 SUMMARY

Polyaniline (PANI) is an electroconductive polymer that has been incorporated into a variety of chemical and biological sensors. The versatility of PANI resides in the inherent ability to undergo molecular interactions with the analytic substance and the fact that such interactions can induce changes in their electrical, optical and morphological properties. In this work, a biosensing platform for cholesterol detection was accomplished by the spin-coating deposition of PANI on poly (methyl methacrylate) (PMMA) support and the subsequent covalent immobilization of cholesterol oxidase (ChOx) onto PANI film surface. The thickness and optical properties of PANI films were correlated with the concentration and temperature of polymeric solution and also, to the spin speed of the deposition technique. The enzyme immobilization process was analyzed by FTIR spectroscopy, UV-vis absorption spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, Scanning Electronic Microscopy, Atomic Force Microscopy and ellipsometric measurements. The relative activity of immobilized ChOx was determined as function of pH and temperature by optical measurements. The optimal conditions were found to be at pH=6.0 and a temperature range of 30°C-35 °C. The apparent constant of Michaelis-Menten for the immobilized enzyme was  $K_M = 57.21 \text{ mg dl}^{-1}$ . The absorbance changes of the biosensing platform exposed to different concentrations of cholesterol solutions were measured by UV-vis spectroscopy. The chromic response obtained showed the potential of the neutral PANI detecting cholesterol concentrations equivalent to those present in blood serum.

## II. INTRODUCCIÓN

Una gran cantidad de investigación se ha llevado a cabo en el campo de los polímeros electroconductores desde 1977 cuando se descubrió que el polímero conjugado de poliacetileno conducía electricidad mediante el dopaje con halógeno. Con el Premio Nobel en Química del año 2000 fue reconocido el descubrimiento de los polímeros conductores y sus 25 años de progreso en este campo. En los últimos años, ha habido un creciente interés en la investigación de los polímeros conductores donde se combinan las ventajas de conductores orgánicos con sistemas estructuralmente pequeños y por lo tanto crean propiedades fisicoquímicas interesantes y aplicaciones potencialmente útiles como son en sensores, biosensores, recubrimientos, catalizadores, etc. (Huang, 2006).

La polianilina (PANI) se considera como un interesante polímero conductor debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, moleculares y por su aplicación en actuadores, músculos artificiales, celdas solares, blindaje electrónico, equipos electroquímicos (Brazdžiuvienė, et al., 2007), protección contra la corrosión (De Souza, 2007), baterías recargables (Ghanbari, et al., 2007) y la fabricación de sensores bio/gas. Esto se atribuye a su excelente conductividad, amplificación de señal, alta estabilidad térmica y química, así como su bajo costo. Por otra parte, la síntesis sencilla de la PANI en las geometrías deseadas ha conducido a su aplicación en los biosensores (Barik, et al., 2010).

En la vida moderna los sensores y biosensores se han vuelto indispensables, no sólo por la necesidad de controlar productos y procesos a través de la detección de analitos con alta precisión, sino también para cumplir los estrictos requisitos de los sistemas de control que llevan a cabo muchas actividades automáticamente (Siqueira Jr., et al., 2010).

Los biosensores son dispositivos que se componen de un elemento biológicamente sensible y un transductor para transformar la información química en una señal analíticamente cuantificable (Vo-Dinh y Cullum, 2000).

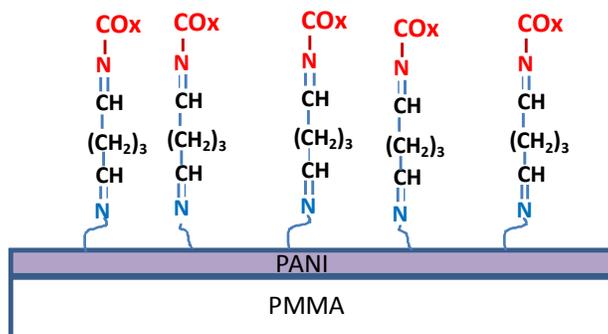
Las enzimas son también conocidas como materiales biológicos sensibles en el desarrollo de biosensores debido a su especificidad. Además el papel de las enzimas en el diagnóstico clínico ha sido conocido hace varios años. Las enzimas presentan una baja estabilidad en las soluciones por lo que se ha tratado de estabilizarlas por el método de inmovilización. En la fase inmovilizada, las enzimas obtienen una excelente estabilidad y pueden ser reutilizadas. Numerosas técnicas de inmovilización vía enlaces covalentes (Suman y Pundir, 2003), adsorción física (Poghossian, et al., 2001), entrecruzamiento (Ricci, et al., 2003), encapsulamiento (Kumar, et al., 2000) y atrapamiento (Godoy, et al., 2005) se conocen para la estabilización de enzimas y se aplican en el desarrollo de dispositivos biosensibles. La matriz o soporte elegido para la inmovilización depende de la naturaleza de la biomolécula y el método de inmovilización. Un gran número de matrices como las películas poliméricas y membranas, geles, películas Langmuir-Blodgett, carbón, grafito, diaforasa y polímeros electroconductores, entre otros han sido usadas para la inmovilización de las biomoléculas/enzimas en el desarrollo de varios tipos de biosensores (Malhotra y Chaubey, 2003).

En 1956, el Profesor Clark introdujo el concepto de biosensor con la publicación de su trabajo del electrodo de oxígeno (Clark, 1956). Más tarde, en 1962 describió un experimento en donde la glucosa oxidasa era atrapada en un electrodo de oxígeno midiendo la concentración de glucosa mediante el monitoreo de una señal amperométrica (Clark y Lyons, 1962).

Los biosensores son dispositivos que tienen aplicación en distintos campos como son el diagnóstico clínico (Singh, et al., 2006), el monitoreo de bioprocesos (González Rumayor, et al., 2005), la industria alimenticia (Kilmartin, et al., 2008) y el monitoreo ambiental (Malhotra, et al., 2006). Una actividad fundamental para el diagnóstico y la prevención de trastornos clínicos como enfermedades cardíacas, aterosclerosis, hipertensión, trombosis cerebral, enfermedades coronarias y periférica vasculares lo constituye la estimación del colesterol teniendo en cuenta la correlación entre el colesterol total en el cuerpo humano y las enfermedades cardíacas (Khan, et al., 2009; Solanki, et al., 2007).

Algunos reportes en la investigación para la detección del colesterol han publicado la inmovilización covalente de la enzima colesterol oxidasa en superficies de PANI. Malhotra y colaboradores inmovilizaron la colesterol oxidasa (COx) y la colesterol esterasa (CE) en superficies de PANI (Singh, et al., 2006). En otro enfoque, Wisitsoraat y colaboradores desarrollaron una biosonda basada en nanotubos de carbono alineados verticalmente (CNTs) y PANI sintetizada electroquímicamente junto con las enzimas COx, CE y peroxidasa (POD) (Wisitsoraat, et al., 2009).

Teniendo como fundamento los antecedentes descritos, en el presente trabajo se construye un nuevo sistema para la cuantificación de colesterol libre, constituido por la enzima COx como receptor biológico inmovilizada covalentemente sobre una película de PANI neutra depositada sobre un sustrato polimérico de poli(metilmacrilato) (PMMA) (Figura 1). La naturaleza polimérica de los constituyentes facilitará la manipulación del mismo, así como sus propiedades ópticas permitirán la aplicación del sistema en la detección de colesterol libre mediante métodos ópticos.



**Figura 1.** Esquema del sistema PMMA/PANI-Glu-COx.

Para el depósito de la película de PANI se utiliza la técnica de recubrimiento por giro. Esta técnica constituye una de las formas más simples para obtener recubrimientos uniformes y de alta calidad sobre sustratos planos, reportándose su aplicación en recubrimientos de pantallas planas (Östergård, et al., 1997), en la grabación de plantillas en microcircuitos (Chowdhury, et al., 2001), en la

fabricación de discos compactos y dispositivos electroluminiscentes (Chowdhury, et al., 1998), entre otros usos.

A diferencia de los trabajos reportados, la metodología que se propone para la detección de colesterol suprime el uso de la enzima peroxidasa. Lo anterior significa una disminución significativa en el costo del análisis, teniendo en cuenta el precio alto de las enzimas y las condiciones estrictas bajo las que deben ser almacenadas para mantener su actividad. Adicionalmente, la integración del receptor biológico al material transductor reduce la manipulación de reactivos, lo que simplifica el método típico de cuantificación de colesterol.

## **2.1 HIPÓTESIS**

Mediante el uso del método de inmovilización de enzimas es posible la construcción de un biosensor utilizando la polianilina como un transductor, suprimiendo el consumo de la enzima peroxidasa, la cual es utilizada en el método tradicional ya existente para la detección de colesterol.

## **2.2 JUSTIFICACIÓN**

A través del método óptico y la utilización de un biosensor inmovilizándose únicamente la enzima colesterol oxidasa, es factible la cuantificación de colesterol sin la enzima peroxidasa, logrando así un manejo fácil y un uso sencillo.

## **2.3 OBJETIVOS**

### **2.3.1 General**

Construir un sistema que integre la colesterol oxidasa inmovilizada covalentemente sobre polianilina depositada en un sustrato polimérico y evaluar su aplicación potencial en la cuantificación de colesterol.

### **2.3.2 Particulares**

- Optimizar la deposición de películas de polianilina sobre sustratos de poli (metil metacrilato) por la técnica de recubrimiento por giro.
- Inmovilizar covalentemente la enzima colesterol oxidasa sobre la película de polianilina.
- Analizar el efecto del pH, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, sobre la actividad de la enzima.
- Evaluar la funcionalidad del sistema en la cuantificación de colesterol libre mediante métodos ópticos.
- Evaluar la afinidad sustrato-enzima mediante la aplicación de la cinética de *Michaelis-Menten*.
- Estudiar el efecto de interferencias sobre el método de cuantificación de colesterol.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Polímeros electroconductores

Recientemente los polímeros electroconductores han sido aplicados como biosensores por su capacidad de funcionar como matrices de inmovilización de especies de reconocimiento biológico y de participar en sistemas de reducción-oxidación (redox) para el transporte de una carga eléctrica (Singh, et al., 2006).

En 1977, fue reportado el primer polímero orgánico conductor intrínseco, el poliacetileno dopado, incrementándose el interés en los polímeros conductores. Estos polímeros son una clase distinta de los materiales compuestos de matriz polimérica y propiedades electroconductoras, los cuales son simplemente una mezcla física de un polímero no conductor con un material conductor como un metal o polvo de carbono. Inicialmente, estos polímeros conductores intrínsecos no eran procesables ni estables en el aire. Sin embargo, las últimas generaciones de éstos se pueden obtener en polvos, películas y fibras a partir de una amplia variedad de solventes, siendo estables en el aire. Algunas de estas formas de los polímeros conductores intrínsecos pueden mezclarse en los polímeros tradicionales para formar mezclas conductoras eléctricamente (Rupprecht, 1999).

También son llamados materiales inteligentes y se definen como un material capaz de reconocer estímulos apropiados en condiciones ambientales, procesando la información obtenida del estímulo y respondiendo de una manera adecuada en tiempo y forma. Los sistemas y estructuras de materiales inteligentes reconocen los estímulos, procesan la información, convierten o almacenan energía, y luego actúan o generan una respuesta. Los polímeros conductores son sensibles a numerosos estímulos y pueden generar una respuesta. Adicionalmente, pueden almacenar información y energía y son capaces de generar distintas funciones. Por lo tanto, en todo el mundo se construyen y se mejoran estos sistemas por diversos grupos de investigación, así como por empresas. Su ventaja y practicidad única radica en la posibilidad de manipular sus propiedades *in situ* usando estímulos apropiados (Tabla 1) (Wallace, et al., 2009).

**Tabla 1.** Cambios típicos de propiedades al modificar los polímeros conductores entre los estados oxidado y reducido mediante estimulación eléctrica y sus aplicaciones potenciales (Wallace, et al., 2009).

Propiedad	Cambio típico	Aplicación potencial
<b>Conductividad</b>	De $10^{-7}$ a $10^3$ S/cm	Componentes electrónicos, sensores
<b>Volumen</b>	10%	Actuadores electromecánicos
<b>Color</b>	300 nm cambio en la banda de absorbanca	Pantallas, ventanas inteligentes
<b>Mecánica</b>	Dúctil a transición frágil	-
<b>Permeabilidad iónica</b>	De 0 a $10^{-8}$ mol cm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> en solución	Membranas

Los polímeros conductores intrínsecos son a menudo una clase amplia de materiales procesables basados en polímeros dopados de conjugación  $\pi$ . Se caracterizan por su amplia conjugación en sus cadenas, lo que posibilita que en condiciones específicas, se cree un flujo de portadores de carga. Los electrones  $\pi$  de la doble ligadura pueden ser fácilmente removidos u otros electrones pueden ser adicionados para formar un ión, en este caso polimérico, por lo tanto, estos materiales pueden ser oxidados o reducidos con mayor facilidad que el resto de los poliméricos convencionales (Rupprecht, 1999).

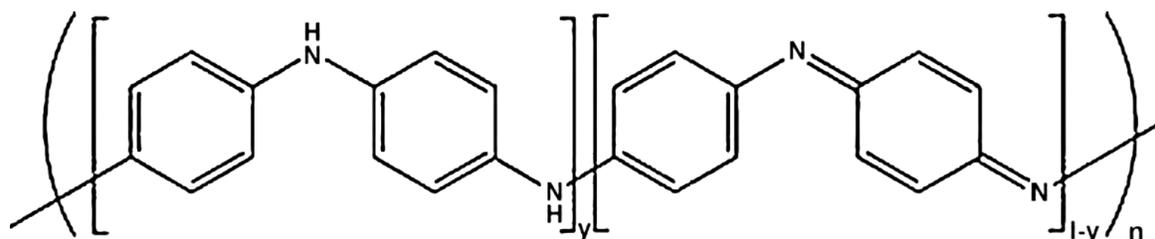
La oxidación o la reducción de la cadena polimérica se efectúa por agentes de transferencia de carga, esto es, aceptores o donadores de electrones, convirtiendo un polímero de aislante a conductor o semiconductor. La oxidación, llevada a cabo por una especie química, genera una cadena de polímero cargada positivamente con un anión asociado. De forma análoga, la reducción genera una carga negativa a lo largo de la cadena con un catión asociado. Este proceso se conoce como “dopaje” y las especies aniónicas o catiónicas incorporadas se identifican como “dopantes” (Rupprecht, 1999; Wallace, et al., 2009).

Los polímeros conductores de poliacetileno, polipirrol, politiofeno, poli-3-alquil-tiofeno, poli (p-fenileno) y de polianilina se consideran de los más importantes en este grupo. A su vez, el mecanismo de conductividad de estos polímeros puede ser descrito mediante la teoría de solitón, de bandas y la de modelos de saltos electrónicos (Emr y Yacynych, 1995).

De especial interés en la preparación de biosensores se considera la posibilidad que tienen los polímeros conductores de “encapsular”, “entrapar” o “incorporar” una enzima durante el crecimiento de sus cadenas (Vidal, et al., 2000). Además, se ha comprobado que estas matrices son idóneas para la dispersión de partículas metálicas. Estos materiales permiten un flujo de cargas electrónicas en la matriz del polímero durante los procesos electroquímicos jugando un papel importante en estos procesos (Tamer, et al., 2011; Miller, 1993).

### 3.2 Polianilina

La polianilina (PANI) es uno de los polímeros conductores más importantes siendo de gran interés científico y tecnológico. Es por ello que es altamente estudiada debido a su facilidad de síntesis, dopado y desdopado químico, bajo costo y excelente estabilidad ambiental. Está compuesto de unidades repetidas de anilina conectadas para formar una cadena de átomos alterados de nitrógeno y anillos bencénicos (Figura 2) (Eftekhari, 2010). Fue el primer polímero conductor que se comercializó ya que tiene aplicaciones que van desde baterías hasta biosensores (Tahir, et al., 2005).



**Figura 2.** Estructura química de la polianilina (Nemzer y Epstein, 2010).

La estructura de la polianilina puede ser clasificada en dependencia del grado de oxidación de los átomos de nitrógeno. Como se muestra en la Figura 2, las entidades básicas que forman estas unidades son unidades repetitivas de amina reducida que poseen dos anillos benzoicos denotados por el subíndice  $y$ , y las unidades de imina oxidada, con un anillo benzoico y un anillo quinoide  $[1-y]$ . Su estado general puede ser categorizado en una de tres clasificaciones: leucoemeraldina base (LB), donde  $[1-y]=0$ , la cual se encuentra completamente reducida presentando todas las unidades de repetición tipo aminas, emeraldina base (EB) ( $[1-y]=0.5$ ), en su forma más estable [ $y = 0.5$ ] se constituye por igual número de unidades oxidadas y reducidas obteniéndose una estructura de igual número de grupos amina y grupos imino y la pernigranilina base (PNB) ( $[1-y]=1$ ) en la cual todas las unidades están oxidadas y únicamente contiene grupos iminos. Adicionalmente, la forma conductora dopada, conocida como emeraldina sal (ES) se obtiene exponiendo el polímero de emeraldina base a un ácido inorgánico fuerte como el HCl o a un ácido orgánico fuerte como el ácido canforsulfónico o por pseudodopado con sales iónicas (Nemzer y Epstein, 2010; Masters, et al., 1991).

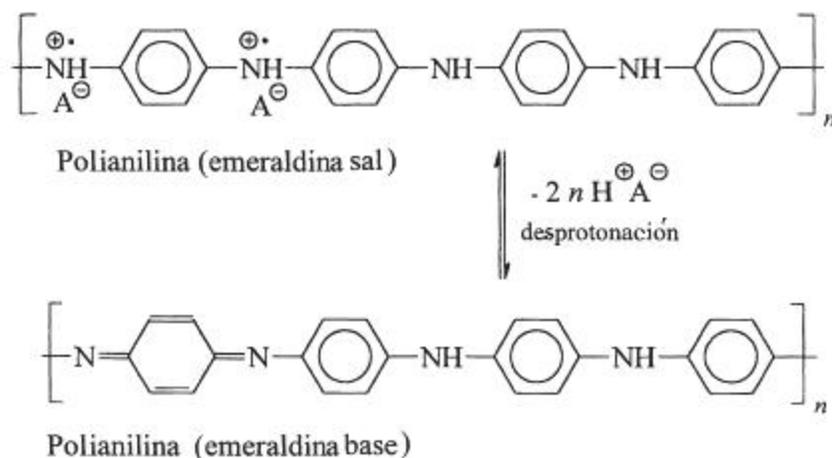
La mayoría de las síntesis son llevadas a cabo utilizando solución de clorhidrato de anilina o en una mezcla de un monómero de anilina y una solución de ácido clorhídrico. Con el fin de obtener una forma conductora de la PANI, se requieren tres pasos: 1) polimerización de la anilina en ácido clorhídrico, 2) tratamiento del producto obtenido para producir PANI en su estado no conductor, 3) sucesiva protonación con un ácido apropiado para formar una PANI sal conductora. Cada paso es un proceso separado y requiere procesos de purificación y filtración (Tahir, et al., 2005).

Las propiedades electromagnéticas y ópticas de la PANI dependen principalmente de su estado de oxidación y del grado de protonación. Es por ello que la emeraldina sal se puede producir por dopaje oxidativo de la LB o por la protonación de la EB mediante el dopaje con ácidos protónicos ( $H^+A^-$ ) siendo estos procesos reversibles (Eftekhari, 2010; Rupprecht, 1999).

La síntesis química típica de la PANI puede llevarse a cabo por oxidación directa utilizando un agente oxidante apropiado para generar un radical catiónico del monómero, el cual inicia la polimerización o por oxidación electroquímica sobre electrodos fabricados de distintos materiales, aplicando un potencial para generar un radical iónico que inicia el proceso de polimerización. La oxidación química se realiza utilizando HCl ó  $H_2SO_4$ , por lo general a un  $pH < 2$ , estas condiciones benefician la unión y obtención de un polímero sin ramificaciones o defectos en su estructura, lo que determina su conductividad eléctrica resultante. Algunos de los agentes oxidantes estudiados para la PANI son el dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) o el persulfato de amonio  $(NH_4)_2S_2O_8$  siendo este último el más utilizado por dar buenos resultados en la relación rendimiento/conductividad (Chandrasekhar, 1999; Faez, et al., 2000).

La síntesis de la anilina puede ser basada en una mezcla de soluciones acuosas de anilina hidroclicórica y persulfato de amonio. La polimerización química de la anilina por persulfato de amonio procede en sus etapas iniciales por un mecanismo similar al de una polimerización electroquímica. La primera etapa implica la formación del catión radical de la anilina, En el segundo paso, se produce el acoplamiento de cationes de los radicales *N* y *para* con una subsecuente rearomatización del dicatión p-aminodifenilamina (PADPA). Después éste es oxidado al dicatión diradical. Aunque el acoplamiento cabeza-cola es predominante (ejemplo: *N-para*), algunos acoplamientos en la posición *orto* también se producen, conduciendo los defectos en la conjugación en el polímero resultante. Cuando el agente oxidante es completamente consumido, la anilina en solución restante reduce la pernigranilina para formar la emeraldina sal la cual posee un color verde siendo el producto final. Los cambios de color durante la reacción reflejan los pasos descritos: durante el segundo paso la solución es de tono rosa debido al PADPA; durante el tercer paso la solución se vuelve de color azul oscuro debido a la formación de pernigranilina protonada, y en el paso final la emeraldina sal de color característico verde se precipita (Wallace, et al., 2009).

La PANI protonada (ejemplo: PANI hidroclicrica) se convierte a emeraldina base no conductora de color azul cuando es tratada con hidróxido de amonio como se muestra en la Figura 3.

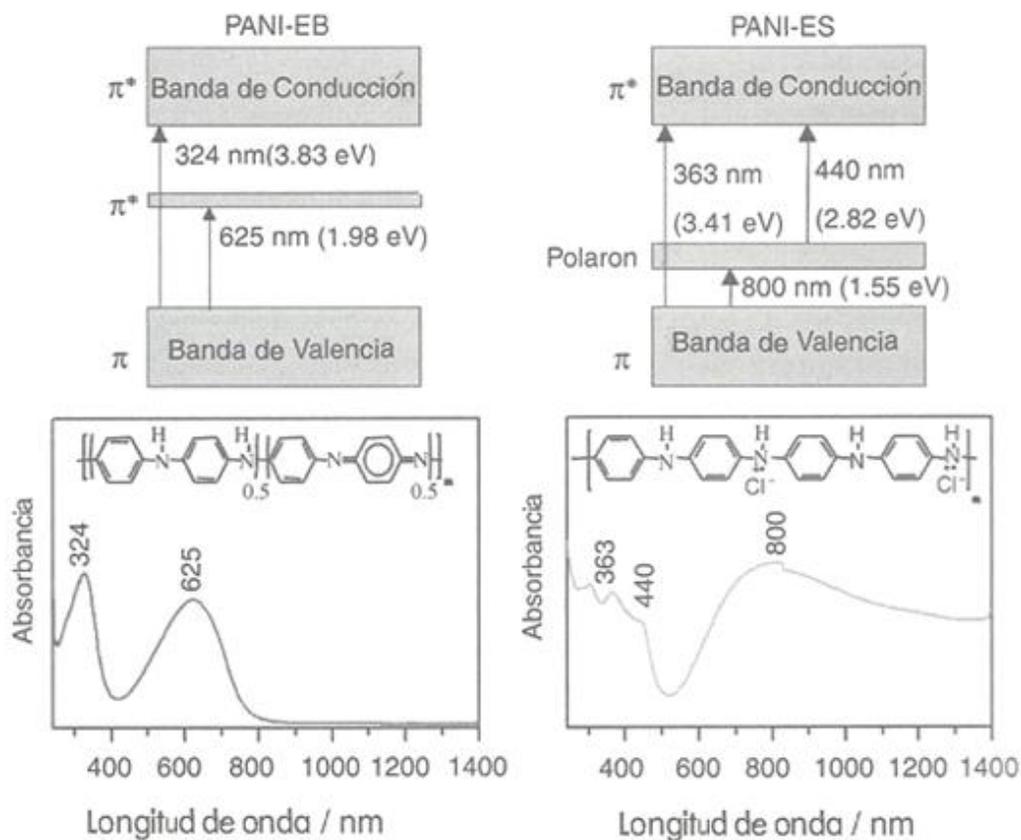


**Figura 3.** Desprotonación de la polianilina (emeraldina sal) en un medio alcalino a emeraldina base.  $\text{A}^-$  es un ión arbitrario (ejemplo: cloruro).

Una oxidación parcial en las cadenas del polímero de la PANI se representa en la Figura 3. El ácido clorhídrico es removido del clorhidrato de anilina después de la desprotonación con el hidróxido de amonio. La participación relativa de carbón y nitrógeno en la emeraldina base es mayor debido a un bajo contenido de cloro. Se puede observar remanentes de cloro en la emeraldina base después de la desprotonación, lo cual indica una sustitución parcial del anillo de benceno con cloro. La presencia de azufre en clorhidratos se debe en gran parte a los contraiones de sulfuro residuales producidos por la reducción del persulfato de amonio durante la polimerización (Stejskal y Gilbert, 2002).

Las propiedades ópticas de la polianilina dependen de sus estados de oxidación y de su posible dopaje; en la Figura 4 se muestra el espectro de absorción UV-vis-IRC de la PANI en su estado de EB y en su estado conductor de ES. En el caso de la EB, la banda a 324 nm corresponde a la transición  $\pi - \pi^*$  y la banda a 625 nm se asigna a la transición electrónica del anillo benzoide al quinoide. Una vez dopado, el reordenamiento de las cargas conlleva a la protonación principalmente de los nitrógenos quinoide, dando lugar a la

formación de estructuras polarónicas o cationes radicales. Por otro lado, los picos a 440 nm y la banda ancha que inicia a los 600 nm en el espectro de la ES se asignan a absorciones electrónicas de los segmentos polarónicos. Adicionalmente, cuando las cadenas del polímero electroconductor se encuentran en una conformación extendida, el espectro de absorción electrónico muestra una banda polarónica intensa y ancha que comienza desde los 900 nm y se extiende a la región del infrarrojo cercano (Eftekhari, 2010).



**Figura 4.** Espectro de UV-vis-IRC de la PANI en sus formas de emeraldina base (EB) y de emeraldina sal (ES) (Eftekhari, 2010).

La mayoría de los estudios recientes sobre la PANI se concentran en el control de las propiedades macromoleculares del polímero, tales como su conductividad, peso molecular y solubilidad en agua. Una forma de modificar las

propiedades de la PANI consiste en realizar su síntesis en ácidos diferentes. Ácidos inorgánicos como el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico así como ácidos orgánicos solubles en agua, han sido investigados con la expectativa de incrementar su conductividad y su solubilidad en agua. También se ha reportado que la temperatura a la cual se lleva a cabo la polimerización controla la estructura de la polianilina sintetizada. Cuando la polimerización de la anilina es llevada a cabo a una temperatura por debajo de los cero grados, se observa un incremento marcado en el peso molecular y en la cristalinidad (Tahir, et al., 2005).

La PANI pertenece a la familia de los polímeros electroconductores siendo utilizada para varias aplicaciones en la electroquímica moderna debido a que presenta propiedades similares a la de algunos metales. Esto se debe tanto a la estabilidad de las películas de PANI producidas electroquímicamente y a sus interesantes propiedades electrocromáticas y conductoras (Bahmani, et al., 2010). Debido a esto, se ha logrado obtener una gran variedad de productos tales como baterías recargables (MacDiarmid, et al., 1987), actuadores electroquímicos (Kaneto, et al., 1995), membranas (Blinova, et al., 2007), componentes bioelectrónicos (Willner, et al., 2007) y electrónicos (Zhao, et al., 2007), supercapacitores electroquímicos (Sun, et al., 2008), recubrimientos anticorrosivos (Kalendová, et al., 2008) y antiestáticos (Soto-Oviedo, et al., 2006), materiales absorbentes de microondas (Makeiff y Huber, 2006), dispositivos de almacenamiento óptico (McCall, et al., 1991) y blindajes para interferencias electromagnéticas (Trivedi y Dhawan, 1993), entre otros.

La PANI es uno de los polímeros más prometedores y ampliamente estudiados en aplicaciones de sensibilidad química debido a los considerables cambios en la conductividad que se producen en sus películas a diferentes pHs. Se ha reportado su uso en muchos dispositivos para la detección de bacterias y otros organismos potencialmente dañinos (Muhammad-Tahir y Alocilja, 2003) así como en la estimación de glucosa (Nemzer y Epstein, 2010), creatinina (Shih y Huang, 1999), lactosa (Chaubey, et al., 2003), urea (Gupta, et al., 2010), amoniaco (Castrellon-Urbe, et al., 2009) y colesterol (Singh, et al., 2006; Wang y Mu, 1999; Khan, et al., 2009; Nemzer y Epstein, 2010) entre otros analitos. Las

razones que favorecen sus numerosas aplicaciones radican en su amplio rango de conductividad (dependiendo del dopado) y en la simplicidad con que es posible obtenerla en forma de películas (Stasyuk, et al., 2012). También es utilizada como material transductor en dispositivos de sensibilidad química o biosensores basándose en los cambios que experimentan sus propiedades eléctricas y/o ópticas cuando es expuesto al analito. Esta variación puede resultar de la alteración del transporte intercadena debido a: la absorción de moléculas del analito, la solvatación de las moléculas del dopante, la interrupción de la conjugación de las cadenas del polímero electroconductor que afecta la movilidad de los portadores de carga y/o por el cambio del número de portadores de carga debido a reacciones de intercambio con especies donadoras o aceptoras.

La PANI es ampliamente utilizada como matriz de biosensores los cuales se definen como dispositivos que constan de un elemento de reconocimiento biológico y un transductor (Vo-Dinh y Cullum, 2000) donde el elemento transductor convierte el evento de la unión analito-receptor en una señal óptica o eléctrica. La señal puede ser un cambio en la unidad de resonancia, las propiedades ópticas, de masa, de propiedades eléctricas, de pH, de calor, etc. (Sadana, 2003; y González, et al., 2005). Las características de funcionalidad deseables en un biosensor son: selectividad y alta sensibilidad, amplio intervalo de sensibilidad, linealidad de respuesta, reproducibilidad, corto tiempo de respuesta, tiempo de vida útil largo, bajo costo y reusabilidad (González, et al., 2005).

La PANI es uno de los polímeros más utilizados para la inmovilización de biomoléculas (Laska, et al., 1999). Distintas biomoléculas como enzimas, proteínas y DNA han sido inmovilizadas exitosamente en la PANI modificada mostrando un excelente rendimiento. Sin embargo, la PANI tiene baja electroactividad y conductividad en soluciones neutras debido a la transferencia lenta de electrones y la difusividad de las proteínas. Las actividades electroquímicas y electrocatalíticas de la PANI pueden aumentar enormemente si la PANI se combina con nanopartículas de oro (Tamer, et al., 2011). También se destacan las nanoestructuras de PANI las cuales se forman típicamente mediante

electrohilado, plantillas o autoensamblaje, en donde cada método tiene sus ventajas e inconvenientes (Laslau, et al., 2009).

En los últimos años, se ha reportado la construcción de diferentes tipos de dispositivos o biosensores para la determinación de colesterol libre y colesterol total. Singh y colaboradores realizaron la inmovilización de la COx sobre PANI sintetizada electroquímicamente sobre electrodos de vidrio recubiertos de ITO, utilizando una señal amperométrica cuantificaron el colesterol a concentraciones mínimas de 50 mg/dL (Singh, et al., 2006). Por otro lado, la COx se inmovilizó covalentemente sobre un copolímero de poli (anilina-co-pirrol) depositado electroquímicamente en un electrodo de vidrio recubierto de ITO, usando glutaraldehído como agente reticulante (Solanki, et al., 2007).

### **3.3 Enzimas**

Una gran parte de la historia de la bioquímica está vinculada a la investigación sobre las enzimas. Los bioquímicos han investigado las enzimas y su actividad por más de ciento veinte años. Mucho antes de que tuvieran una comprensión realista de la base física del estado vivo, de manera instintiva apreciaron la importancia de las enzimas. Bioquímicos e investigadores de otras ciencias poco a poco estudiaron las propiedades de los sistemas biológicos demostrando que casi cada proceso en los seres vivos sucede a causa de reacciones catalizadas por enzimas (McKee y McKee, 2009).

Un catalizador es una sustancia que aumenta la rapidez o velocidad de una reacción química, sin cambiar su constitución en el proceso global (Mathews, et al., 2002). Las enzimas son proteínas altamente especializadas que catalizan las reacciones de los sistemas biológicos. Tienen un extraordinario poder catalítico, a menudo muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. La sustancia sobre la que actúa una enzima se denomina sustrato de esa enzima (Mathews, et al., 2002). Las enzimas poseen un grado elevado de especificidad respecto a sus sustratos y funcionan generalmente en soluciones acuosas y en condiciones moderadas de temperatura y pH (Nelson y Cox, 2001).

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico, todas las enzimas son proteínas. Su actividad catalítica depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si se desnaturaliza o se disocia una enzima en sus subunidades, su actividad catalítica se pierde normalmente. Si se descompone una enzima en sus aminoácidos constituyentes, siempre se destruye su actividad catalítica. Se considera entonces que las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas son esenciales para su actividad catalítica (Nelson y Cox, 2001).

Las enzimas al igual que otras proteínas, tienen masas moleculares relativas que van desde 12 000 hasta más de 1 000 000 millones (Nelson y Cox, 2001).

Las enzimas aumentan las velocidades de las reacciones químicas al reducir la barrera de energía libre que separa los reactivos de los productos. Las enzimas cumplen este desafío por diversos mecanismos que dependen de la disposición de grupos funcionales en su sitio activo, la región de la enzima donde tiene lugar la catálisis (Voet, et al., 2008).

Las enzimas tienen un papel central en cada proceso bioquímico. Actuando en secuencias organizadas catalizan cientos de reacciones consecutivas mediante las que se degradan nutrientes, se conserva y transforma la energía química y se fabrican las macromoléculas biológicas a partir de precursores sencillos (Nelson y Cox, 2001).

Las reacciones catalizadas por enzimas suelen ocurrir en lapsos que van desde los microsegundos a los milisegundos. De hecho, las enzimas son el medio por el cual los organismos canalizan el flujo de energía y materia. Según los puntos de vista tradicionales, el funcionamiento de las enzimas depende casi por completo de las formas complementarias y de las interacciones catalíticas entre los reactivos y sus sitios de unión más o menos flexibles. Sin embargo, se demostró en fechas recientes que la actividad catalítica de determinadas enzimas puede vincularse con movimientos internos que se extienden por toda la molécula de la proteína (McKee y McKee, 2009).

Las velocidades de las reacciones catalizadas por las enzimas son a menudo extraordinariamente elevadas (McKee y McKee, 2009). En general, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas es de  $10^6$  a  $10^{12}$  veces más alta que la de las correspondientes reacciones no catalizadas y es al menos varios órdenes de magnitud mayor que la de las reacciones con catalizadores químicos (Voet, et al., 2008).

Hay dos hechos importantes que conviene resaltar. En primer lugar, un catalizador verdadero, aunque participa en el proceso de reacción, no se modifica por ésta. En segundo lugar, los catalizadores modifican la velocidad de los procesos, pero no afectan la posición de equilibrio de una reacción. Un proceso termodinámicamente favorable no pasa a ser más favorable por la presencia de un catalizador, ni éste hace tampoco que un proceso desfavorable pase a ser favorable. Simplemente se alcanza más rápidamente el estado de equilibrio (Mathews, et al., 2002).

Algunas enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que sus residuos aminoácidos. Otros requieren un componente químico adicional llamado cofactor. El cofactor puede ser uno o varios iones inorgánicos tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , un complejo orgánico o molécula metal-orgánica denominada coenzima. Algunas enzimas requieren tanto una coenzima como uno o más iones metálicos para su actividad. Una coenzima o ión metálico unido muy frecuentemente o incluso covalentemente a la proteína enzimática se denomina grupo prostético. Una enzima compleja catalíticamente activa junto con su coenzima y/o iones metálicos se denomina holoenzima. La parte proteica de tal enzima se denomina apoenzima o apoproteína. Las coenzimas actúan como transportadores transitorios de grupos funcionales específicos (Nelson y Cox, 2001).

Los cofactores o coenzimas también pueden ser moléculas orgánicas. Algunos cofactores sólo se asocian en forma transitoria con determinada molécula de enzima, por lo que actúan como cosustratos. La nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ( $\text{NADP}^+$ ) son ejemplos de cosustratos (Voet, et al., 2008).

Comúnmente el ambiente óptimo de las reacciones catalizadas por enzimas se producen en condiciones relativamente moderadas: temperaturas inferiores a 100°C, a presión atmosférica y pH casi neutro. Las reacciones enzimáticas tienen un alto grado de especificidad, por lo que, rara vez presentan productos secundarios (Voet, et al., 2008).

Las enzimas son especialmente sensibles a las variaciones de la temperatura y del pH, por lo tanto, cualquier factor ambiental que distorsione la estructura proteínica puede alterar la actividad enzimática (McKee y McKee, 2009).

Debido a que la temperatura afecta a todas las reacciones químicas, en general, cuanto mayor sea, mayor será la velocidad de reacción, es decir, es mayor la probabilidad de colisiones entre las especies reactantes. La velocidad de reacción se incrementa ya que hay más moléculas con la energía suficiente para entrar al estado de transición. Las velocidades de reacción catalizadas por enzimas también aumentan con la temperatura. Sin embargo, las enzimas son proteínas que se desnaturalizan a temperaturas elevadas. La temperatura óptima de una enzima, que es la temperatura a la que actúa con su máxima eficiencia, se determina en el laboratorio en condiciones específicas de pH, de fuerza iónica y de concentraciones de solutos (McKee y McKee, 2009).

Las enzimas son afectadas de diversas formas por la concentración de iones hidrógeno, expresada como un valor de pH. En primer lugar, la actividad catalítica está relacionada con el estado iónico del sitio activo. Las variaciones de la concentración de iones hidrógeno pueden afectar la ionización de los grupos del sitio activo. Por ejemplo, la actividad catalítica de una determinada enzima requiere la forma protonada del grupo amino de una cadena lateral. Si el pH es lo suficientemente alcalino para que el grupo pierda su protón, la actividad enzimática puede deprimirse. Además, los sustratos pueden afectar también la actividad enzimática. Si un sustrato contiene un grupo ionizable, un cambio del pH puede alterar su capacidad para unirse al sitio activo. En segundo lugar, los cambios de los grupos ionizables pueden alterar la estructura terciaria de la

enzima. Los cambios drásticos del pH a menudo provocan desnaturalización (McKee y McKee, 2009).

Aunque pocas enzimas toleran cambios importantes de pH, la mayoría son activas dentro de un intervalo estrecho de pH. Por esta razón, los seres vivos emplean amortiguadores para regular rigurosamente el pH. El valor de pH en el que la actividad de una enzima es máxima se denomina pH óptimo. Los pH óptimos de las enzimas, determinados en el laboratorio, varían de manera considerable. Por ejemplo, el pH óptimo de la pepsina, una enzima proteolítica que se produce en el estómago, es de alrededor de 2. Para la quimiotripsina, que digiere las proteínas en el intestino delgado, el pH óptimo es de aproximadamente 8 (McKee y McKee, 2009).

Las enzimas se clasifican y se nombran según la clase de reacción que catalizan. A cada enzima se le asigna una clasificación de cuatro números y un nombre con dos partes denominado nombre sistemático. Además la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) sugiere para el uso diario una versión más corta del nombre sistemático denominada nombre recomendado. Las enzimas se dividen en seis principales categorías: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (McKee y McKee, 2009).

Las enzimas utilizan los mismos mecanismos catalíticos empleados por los catalizadores químicos, incluso las catálisis generales: ácida y básica, la covalente y la catálisis por ión metálico (Voet, et al., 2008).

La actividad enzimática se mide en unidades internacionales (UI) y se define como la cantidad de enzima que produce un  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto. La actividad específica de una enzima es una magnitud que se utiliza para monitorear la purificación de la enzima y se define como el número de unidades internacionales por miligramo de proteína. [Recientemente se introdujo una unidad nueva de medida de la actividad enzimática denominada katal. Un katal (kat) indica la cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo. Un katal es igual a  $6 \times 10^7$  IU] (McKee y McKee, 2009).

Las enzimas se analizan de modo que sus velocidades de reacción y su eficiencia global puedan cuantificarse (Voet, et al., 2008). El estudio cuantitativo de

la catálisis enzimática se denomina cinética enzimática y proporciona información sobre las velocidades de reacción. Los estudios cinéticos también miden la afinidad de las enzimas por los sustratos y por los inhibidores y dan indicios sobre los mecanismos de reacción (McKee y McKee, 2009).

Uno de los modelos más útiles en la investigación sistemática de las velocidades enzimáticas fue propuesto por Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913. Según el modelo de Michaelis-Menten, cuando el sustrato  $[S]$  se une al sitio activo de la enzima  $[E]$ , se forma un complejo de estado de transición  $[ES]$ . Durante el estado de transición, el sustrato se convierte en producto. Tras un tiempo, el producto se disocia de la enzima (McKee y McKee, 2009).

La ecuación de Michaelis-Menten describe la relación entre la velocidad inicial de la reacción y la concentración del sustrato bajo las condiciones de estado estacionario, se representa matemáticamente con la siguiente ecuación (Voet, et al., 2008):

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + K_M}$$

Donde:

$V_{m\acute{a}x}$  = Velocidad máxima que puede alcanzar la reacción.

$[S]$  = Sustrato

$K_M$  = Constante de Michaelis-Menten

Cuando  $[S]$  es muy baja, se obtiene la siguiente ecuación:

$$v = \left(\frac{K_{cat}}{K_M}\right)[E][S]$$

Donde:

$K_{cat}$  = Número de recambio de una enzima

$[E]$  = Concentración de la enzima

$[S]$  = Sustrato

El término  $\frac{K_{cat}}{K_M}$  también es llamado constante de especificidad (McKee y McKee, 2009). Cuando  $[S]$  es muy alta, la velocidad inicial  $v$  se aproxima en forma asintótica a  $V_{m\acute{a}x}$ . Sin embargo en la práctica es muy difícil determinar  $V_{m\acute{a}x}$  con

exactitud a partir de los gráficos directos de  $v$  versus  $[S]$  ya que serán valores subestimados (Voet, et al., 2008).

Un mejor método para determinar los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_M$  es el formulado por Hans Lineweaver y Dean Burk que utiliza la forma recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v} = \left( \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Esta es una ecuación lineal de  $\frac{1}{v}$  en función de  $\frac{1}{[S]}$ . Si estas magnitudes se grafican se obtiene el gráfico llamado Lineweaver-Burk o doble recíproco (Voet, et al., 2008).

Muchas sustancias alteran la actividad de la enzima al combinarse con ella en forma que influencia la unión con el sustrato, su número de recambio o ambos. Las sustancias que reducen la actividad de una enzima de esta manera se conocen como inhibidores (Voet, et al., 2008). La inhibición enzimática puede ser reversible o irreversible. Los inhibidores irreversibles en general se unen de forma covalente a las enzimas. En la inhibición reversible, el inhibidor puede disociarse de la enzima (McKee y McKee, 2009). Estos inhibidores reversibles reducen la actividad de la enzima mediante su incorporación al sitio de unión al sustrato de la enzima denominado este fenómeno inhibición competitiva, cuando el inhibidor se une directamente al complejo enzima-sustrato se conoce como inhibición no competitiva y cuando se incorpora a la enzima y al complejo enzima-sustrato se designa inhibición mixta (Voet, et al., 2008).

La inmovilización de enzimas es un proceso utilizado para mejorar de manera significativa la estabilidad de la enzima, es por ello que es muy utilizado en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos, en el tratamiento de residuos, en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y muchas otras aplicaciones. Se define como el proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio (unión en un soporte) dando lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo, 1998).

Las enzimas pueden ser inmovilizadas o confinadas sobre o dentro de una gran variedad de matrices solubles o insolubles en agua con una poca o lenta disminución en su actividad catalítica. Cuando una enzima es removida de su ambiente, su comportamiento puede ser diferente. La inmovilización de enzimas solubles sobre o dentro de membranas sintéticas o de matrices orgánicas o inorgánicas permite a los investigadores el estudio de las enzimas en ambientes modelados (Weetall, 1974).

La inmovilización de enzimas sobre un soporte sólido es una técnica que ha demostrado prevenir el flujo de contaminación del producto y hace a las enzimas más reusables. En distintas aplicaciones las enzimas inmovilizadas ofrecen el beneficio de recuperación y reutilización de estos catalizadores costosos. Además, la inmovilización de enzimas las hace más estables frente a la desnaturalización térmica al disminuir su flexibilidad. Otros beneficios que aporta la inmovilización de enzimas son la protección de las enzimas de la inactivación irreversible que se produce por la agregación, el ataque proteolítico y la acción de los agentes desnaturalizantes (Torabi, et al., 2007).

El proceso de inmovilización puede presentar algunos inconvenientes entre los que se destacan: la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde puede existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte y durante el proceso de inmovilización siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima (Arroyo, 1998).

La inmovilización de las enzimas se clasifican en dos grandes categorías: retención física (método no covalente) y unión química (método covalente) (Arroyo, 1998). Los métodos convencionales para la inmovilización de especies biológicas son la adsorción física y química (Poghossian, et al., 2001), enlace covalente (Dhand, et al., 2010), entrecruzamiento (Liu, et al., 2009) y atrapamiento en geles o matrices poliméricas (Türkarşlan, et al., 2009; Chu, et al., 2012).

Existen varios métodos de inmovilización de enzimas como se mencionó anteriormente pero el comúnmente utilizado es el de inmovilización covalente, en donde se lleva a cabo la unión química de las enzimas a soportes insolubles en

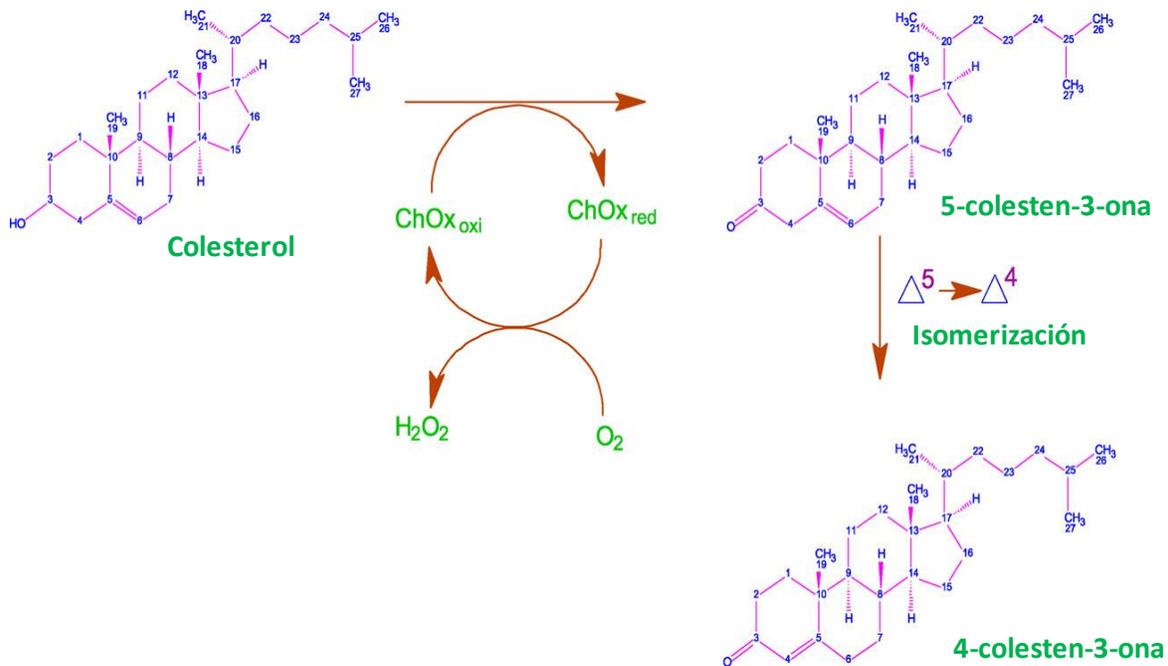
agua (Weetall, 1974) mediante la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con grupos activos de las proteínas utilizando especies bifuncionales como el glutaraldehído. El glutaraldehído se usa principalmente como un agente de reticulación para las modificaciones químicas de las proteínas y los polímeros. Este compuesto bifuncional puede unirse covalentemente a los grupos amino presentes en los 20 aminoácidos que son encontrados en la estructura de las enzimas, participando principalmente aquellos de la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina (Arroyo, 1998; Khan, et al., 2009).

Entre las ventajas de la inmovilización covalente destacan la sencilla manipulación de los derivados inmovilizados, la constancia ó permanencia de la carga de la enzima y la posibilidad de usar los derivados en reactores continuos, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado, al tener estabilizada su estructura terciaria que deriva en una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH. En cambio, se presentan inconvenientes como la dificultad de conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, lo que está condicionado por el número de uniones enzima-soporte y la geometría del soporte. El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo y conducir a derivados inactivos. Para evitar posibles alteraciones se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo y no se aconseja el uso de enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc. (Arroyo, 1998).

La inmovilización covalente también puede realizarse utilizando carbodiimidias, obteniéndose una buena estabilidad en las enzimas pero requiriendo grandes cantidades de la misma (Ansari y Husain, 2012). Se ha tratado de reducir la cantidad de enzima requerida pero se presentan inconvenientes como una reducción en la actividad al finalizar el proceso de inmovilización (Koneracká, et al., 2002).

### 3.4 Colesterol oxidasa

En la fabricación de un biosensor de colesterol, la colesterol oxidasa (COx) es comúnmente utilizada como el elemento biosensible. La colesterol oxidasa es una flavoenzima la cual contiene un dinucleótido de flavina-adenina (DFA) que cataliza la dehidrogenación del grupo hidroxilo C(3)-OH de la molécula del colesterol. Es por lo tanto un miembro de alcohol dehidrogenasa/oxidasa perteneciente a la familia glucosa-metanol-colina-oxido-reductasa. Utilizando el DFA, la COx cataliza la oxidación e isomerización de los 3 $\beta$ -hidroxiesteroides teniendo un doble enlace *trans*  $\Delta^5$ -  $\Delta^6$  del anillo esteroide obteniéndose el correspondiente  $\Delta^4$ -3-cetona (4-colesten-3-ona) y el peróxido de hidrógeno. El DFA es un aceptor primario de hidruro del alcohol. La reducción del DFA por lo tanto transfiere los equivalentes redox al dioxígeno como aceptor final como se muestra en la Figura 5 (Arya, et al., 2008; Ram, et al., 2001).



**Figura 5.** Reacción del colesterol y la colesterol oxidasa (Arya, et al., 2008).

La COx es producida por dos tipos de bacterias: (a) las bacterias no patógenas, las cuales utilizan el colesterol como fuente de carbono y (b) las

bacterias patógenas, que requieren la COx para la infección de los macrófagos huésped debido a su habilidad de alterar la estructura física de la membrana lipídica mediante la conversión del colesterol en 4-colesten-3-ona. Tanto las bacterias patógenas y las no patógenas regulan el comportamiento de la COx en presencia del colesterol (Pollegioni, et al., 2009).

Las dos fuentes más comunes de la colesterol oxidasa son las bacterias *sterptomyces hygroscopicus* y de la *brevibacterium sterolicum* (Arya, et al., 2008).

La COx es una enzima que ha sido utilizada en distintas aplicaciones biotecnológicas como pueden ser en la biocatálisis para la producción de una serie de esteroides, como una proteína insecticida en contra de las larvas de gorgojo del algodón y en particular como una enzima de diagnóstico para determinar los niveles de colesterol en suero sanguíneo. También se han encontrado otros usos de la COx, estos son en la aplicación farmacológica para el tratamiento de infecciones bacterianas y virales y en la industria alimenticia como sensor antifúngico principalmente para prevenir la contaminación del queso y otros alimentos no esterilizados con moho. En un futuro se espera encontrar nuevas aplicaciones en áreas inesperadas (Pollegioni, et al., 2009).

Desde 1973, la COx se ha utilizado en la química clínica en la medición del colesterol en suero humano. Richard demostró que la COx de *Nocardia* puede ser utilizada para medir el colesterol en suero midiendo la cantidad de peróxido de hidrógeno producido (Richmond, 1973).

La COx dentro de los usos clínicos, es una herramienta de análisis para la determinación de colesterol en varias muestras: (a) total y esterificado en sueros, (b) de lipoproteínas de baja y alta densidad, (c) en la membrana celular de los eritrocitos (y de otras células y comportamientos celulares) y (d) en piedras en la vesícula y en la bilis humana (Pollegioni, et al., 2009).

La determinación de colesterol en suero es usado en el diagnóstico de la aterosclerosis o enfermedades coronarias y para estimar el riesgo de trombosis y enfermedades cardiovasculares. Desde que los ensayos utilizan la enzima COx, éstos son simples, específicos y muy sensibles, por lo que su uso se ha extendido

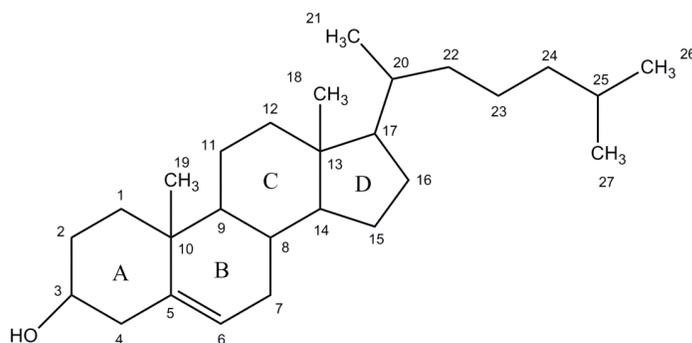
comparado con los métodos químicos convencionales (Doukyu, 2009; Akkaya, et al., 2009).

### 3.5 Colesterol

El colesterol es un lípido muy conocido debido a que presenta una fuerte correlación entre sus niveles altos en la sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares en los seres humanos (Nelson y Cox, 2008).

El colesterol pertenece a un grupo amplio de sustancias denominadas esteroides (Mathews, et al., 2002) los cuales constituyen una clase de lípidos derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado llamado ciclo pentanoperhidrofenantreno, además pertenecen a un grupo amplio de lípidos conocidos como isoprenoides debido a que en su vía biosintética toman parte unidades de cinco carbonos conocidos como isopreno (Díaz y Juárez, 2007).

La estructura del colesterol posee un peso molecular de 386 Da y contiene 27 átomos de carbono, de los cuales se hallan en cuatro anillos unidos (el núcleo ciclopentano perhidrofenantreno), dos están en los grupos angulares de las uniones de los anillos AB y CD y ocho en la cadena lateral periférica. El colesterol está casi compuesto de átomos de carbono e hidrógeno, con un grupo hidroxilo unido al átomo de carbono 3. La molécula se encuentra casi completamente saturada, ya que posee únicamente un doble enlace entre los átomos de carbono 5 y 6 (Figura 6) (Nelson y Cox, 2008).



**Figura 6.** Estructura del colesterol (Díaz y Juárez, 2007).

Los esteroides incluyen diversas hormonas importantes, entre las que se encuentran las hormonas sexuales de los animales superiores. De hecho, el colesterol es el precursor para la síntesis de muchas de estas sustancias (Mathews, et al., 2002).

El colesterol se puede encontrar en los tejidos en las formas, esterificada (CE) y no esterificada o libre (CNE). La principal función de esta última parece ser la de componente estructural de membranas, actuando como regulador de la fluidez en ésta. El colesterol es el producto de una vía biosintética (Díaz y Juárez, 2007) y juega un papel muy importante como componente de las membranas celulares (Nelson y Cox, 2008), siendo un precursor de importantes hormonas esteroides, además de los ácidos biliares (Campbell y Farrell, 2004) y de la vitamina D<sub>3</sub> (Nelson y Cox, 2008; Díaz y Juárez, 2007).

Como todas las hormonas sin importar su naturaleza química, las hormonas esteroides sirven de señales externas a la célula para regular procesos metabólicos en el interior de la misma (Campbell y Farrell, 2004).

En casi todos los organismos eucariotas está presente el colesterol. En el cuerpo humano, cualquier célula, además de utilizar el colesterol de fuentes extracelulares, también tiene la capacidad de sintetizarlo, este proceso se lleva a cabo principalmente en el hígado e intestino (Díaz y Juárez, 2007). Gran parte de la síntesis del colesterol en los vertebrados tiene lugar en el hígado. Una pequeña fracción del colesterol ahí elaborado se incorpora a las membranas de los hepatocitos, pero la mayor parte se exporta en una de las tres siguientes formas: colesterol biliar, ácidos biliares (como el colato y el glucocolato (Campbell y Farrell, 2004)) o ésteres de colesterol (Nelson y Cox, 2008). Estos compuestos ayudan a la digestión de gotitas de lípidos emulsificándolas y haciéndolas más accesibles al ataque enzimático (Campbell y Farrell, 2004).

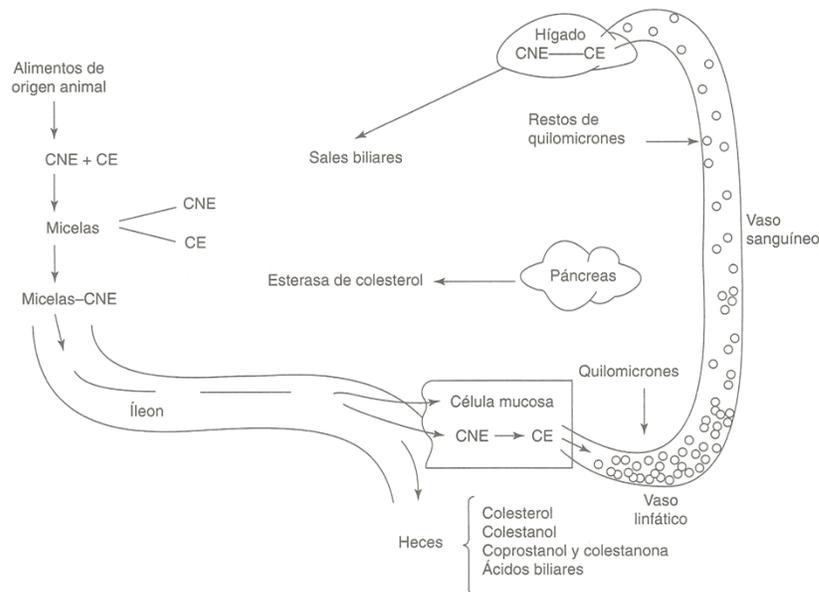
En las últimas décadas, uno de los principales logros en la investigación bioquímica fue dilucidar la serie de reacciones que tienen lugar en la vía de la síntesis de colesterol a partir de acetil-CoA (Díaz y Juárez, 2007). Este proceso ocurre en cuatro etapas: 1) tres unidades de acetato se condensan para formar un intermediario de seis átomos de carbono, el mevalonato, 2) el mevalonato se

convierte en unidades activadas de isopreno, 3) se polimerizan seis unidades de isopreno de cinco átomos de carbono para formar una estructura lineal de 30 átomos de carbono que se denomina escualeno, 4) el escualeno se cicla para la formación de 4 anillos unidos (A,B,C Y D), que forman el núcleo de los esteroides, y después de una serie de cambios (oxidaciones, remoción o migración de grupos metilo) se obtiene el producto final, el colesterol (Hicks, 2001).

El ser humano absorbe con facilidad el colesterol contenido en los alimentos. Una persona cuya dieta comprende carne, leche y huevos ingiere en promedio de 500 a 1000 mg de colesterol por día. Sin embargo, del colesterol ingerido sólo se absorbe 40% (Díaz y Juárez, 2007).

En un proceso conocido como emulsificación, el colesterol de la dieta se incorpora a micelas formadas por ciertos constituyentes que están presentes en la bilis. Estas micelas contienen fosfolípidos y ácidos biliares conjugados además del propio colesterol. Este proceso es indispensable para solubilizar el colesterol en el quimo, que es el medio acuoso presente en el lumen intestinal. Una vez integrado el CE en la fase micelar, se hidroliza en el lumen intestinal debido a la acción de la enzima CE presente en el jugo pancreático; esta hidrólisis es posible gracias al proceso de emulsificación, que permite que la enzima actúe sobre la micela o dentro de ésta. El colesterol se absorbe por la difusión de las micelas hacia las células de la mucosa intestinal, en donde gran parte de éste es esterificado nuevamente (Díaz y Juárez, 2007).

El CE que se sintetiza en las células de la mucosa intestinal, junto con el CNE y se incorporan a partículas lipoproteicas de gran tamaño, que son principalmente triacilglicerolos (TAG) conocidas como quilomicrones, estas partículas transportan el colesterol y los TAG de la linfa hacia el plasma, a través del conducto torácico (Figura 7) (Díaz y Juárez, 2007).



**Figura 7.** Emulsión, digestión y absorción del colesterol incorporado en la dieta. CNE= colesterol no esterificado, CE= colesterol esterificado (Díaz y Juárez, 2007).

Las lipoproteínas plasmáticas son macromoléculas de lípidos y proteínas, cuya función principal es el transporte de lípidos a los tejidos, en general, transportan CE y TAG desde su tejido de origen (intestino, donde se absorben o hígado, donde se sintetizan) hacia los tejidos en donde se consumirán o almacenarán. Las distintas combinaciones de lípidos y proteínas producen partículas de distintas densidades clasificándose en base a ello en: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HLD). Éstas difieren entre sí en tamaño, composición y función (Díaz y Juárez, 2007).

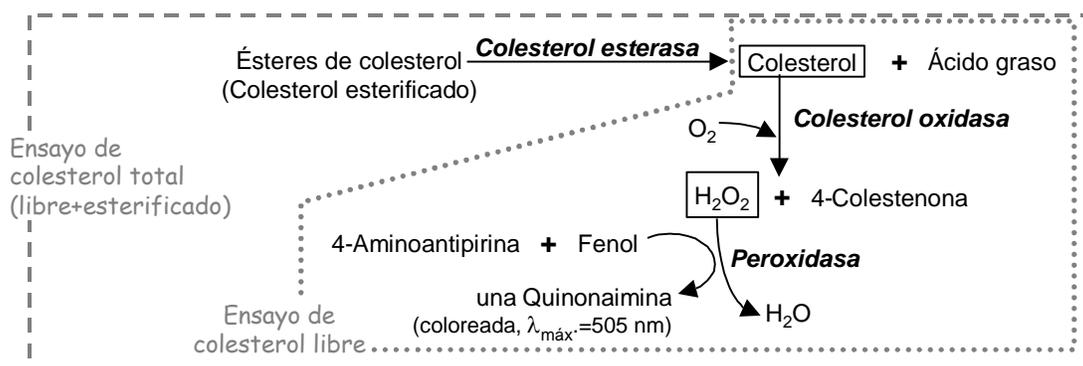
La importancia del colesterol se reconoce principalmente por la fuerte relación entre su aumento en la sangre y la aparición de diferentes grados de disfunción endotelial que pueden terminar en daño vascular precoz y cardiopatía isquémica (Díaz y Juárez, 2007).

La aterosclerosis se caracteriza por el depósito de lípidos, en especial el colesterol y sus ésteres en la capa íntima de los vasos arteriales, obstruyendo la circulación sanguínea ocasionando hipertensión arterial. El infarto miocárdico

agudo constituye una de las principales causas de muerte en países desarrollados y en vías de desarrollo como México (Díaz y Juárez, 2007).

Un suero normal de sangre humana contiene menos de 5.2 mM (200 mg·dl<sup>-1</sup>) de colesterol; en el plasma, las lipoproteínas contienen colesterol y alrededor de un 70% es esterificado por los ácidos grasos. Es por ello que la determinación de la concentración de colesterol en suero sanguíneo es fundamental para la evaluación de múltiples enfermedades (Pollegioni, et al., 2009).

El colesterol total también puede ser determinado en suero (incluyendo los ésteres) empleando un método enzimático-colorimétrico, basado totalmente en reacciones enzimáticas que son: hidrolizar los ésteres de colesterol utilizando la CE. Seguidamente, el colesterol libre se oxida por la COx produciendo peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Finalmente, este último, es evaluado utilizando la peroxidasa de rábano picante mediante el acoplamiento oxidativo de la 4-aminoantipirina y fenol dando como resultado un tinte quinonimina con un máximo de absorción a los 500 nm (Figura 8). Este método se caracteriza por su sencillez y poca interferencia siendo altamente reproducible, es por ello que es implementado aún en los laboratorios clínicos (Pollegioni, et al., 2009).



**Figura 8.** Reacciones para la determinación de colesterol por el método enzimático colorimétrico.

Distintos métodos enzimáticos y no enzimáticos han sido propuestos para la determinación del colesterol libre y total, teniendo en cuenta que los métodos enzimáticos presentan ciertas desventajas como son costos altos, disponibilidad

de pequeñas cantidades de reactivos e inestabilidad en la actividad de la enzima. De acuerdo a ello, muchos biosensores han sido fabricados para disminuir los costos, mejorar la sensibilidad y la selectividad así como obtener una respuesta rápida y fiable (solanki, et al., 2007; Lin. y Yang, 2003). Charpentier y Murr determinaron el colesterol en suero sanguíneo a través de un electrodo enzimático de tipo amperométrico hecho de una pasta de carbón modificado por la peroxidasa y el hidroximetil ferroceno como mediador de transferencia de electrones, la COx y el colesterol éster hidrolasa se utilizaron en solución. El método fue muy sensible y con mediciones pertinentes en el rango de  $1 \times 10^{-6}$  a  $1.5 \times 10^{-4}$  M en un periodo de tiempo de 30 s (Charpentier y Murr, 1995). Dhand y colaboradores construyeron un biosensor para la detección de colesterol a base de una película compuesta de PANI y nanotubos de carbono de pared múltiple, esta película de nanocompuestos fue preparada por la técnica de electroforesis sobre un soporte de vidrio recubierto de óxido de Indio-Estaño, en la cual se inmovilizó la COx químicamente a través del 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y la N-hidroxisuccinimida. Los resultados de las mediciones de voltamperometría lineal de barrido revelaron que el bioelectrodo puede detectar el colesterol en un rango de 1.29 mM a 12.93 mM, con una alta sensibilidad de  $6800 \text{ nA mM}^{-1}$  y un tiempo de respuesta de 10 s (Dhand, et al., 2008). Recientemente, Shin y Kameoka fabricaron un biosensor para la medición de la concentración de colesterol utilizando nanofibras de PANI y poliestireno y posteriormente inmovilizando la COx en las fibras utilizando la técnica de adsorción electrostática de capa por capa (Shin y Kameoka, 2012).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos

- **Anilina ( $C_6H_7N$ )** (99%), Sigma-Aldrich, Lote: 03696CMV, hecho en EUA.
- **Ácido clorhídrico, ACS (HCl)** (36.57%). Reactivos Química Meyer, Lote: F37C22, hecho en México.
- **Persulfato de Amonio, Cristal, ACS ( $(NH_4)_2S_2O_8$ )** (98.7%). J.T. Baker, Lote: E25584, hecho en EUA.
- **Hidróxido de Amonio, ACS ( $NH_4OH$ )** (29.2%). Productos Químicos Monterrey S.A. DE C.V., Lote: 840353, hecho en México.
- **1-metil-2- pirrolidona, reactivo ACS ( $C_5H_9NO$ )**, (99%) Sigma-Aldrich, Lote: 23796DM, hecho en EUA.
- **Solución de Glutaraldehído Grado I, ( $C_5H_8O_2$ )** (25%), Sigma-Aldrich, Lote: 056K5318, hecho en EUA.
- **Colesterol Oxidasa de Lactobacillus Brevi** (100 UN), Sigma-Aldrich, Lote: 090M1636V, hecho en Japón.
- **Fosfato de Sodio, Monobásico, Monohidratado, Cristal, ACS ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ )** (100.4%). J.T. Baker, Lote: B17158, hecho en EUA.
- **Fosfato de Sodio Dibásico Heptahidratado, ACS ( $Na_2HP0_4 \cdot 7H_2O$ )** (98.0-102.0%), Reactivos Química Meyer, Lote: M0808847, hecho en México.
- **Hidróxido de Sodio (NaOH)** (98%), Sigma-Aldrich, Lote: 104K0043, hecho en EUA.
- ***o*-dianiasidina dihidroclorada ( $C_{14}H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$ )**, Sigma-Aldrich, Lote: MKBF5410V, hecho en EUA.
- **Tritón X-100, para biología molecular ( $(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$ )**, Sigma-Aldrich, Lote: 048K00261, hecho en EUA.
- **Colesterol ( $C_{27}H_{46}O$ )** (99%), Sigma-Aldrich, Lote: 027K53032, hecho en EUA.

- **Peroxidasa de Rábano Picante**, Sigma-Aldrich, Lote: 099K7545V, hecho en EUA.

La anilina fue el único reactivo que recibió un tratamiento previo a su uso, se destiló al vacío, en atmósfera de nitrógeno, almacenándose en la oscuridad y a una temperatura alrededor de 3°C.

#### **4.2 Síntesis de PANI**

Se llevó a cabo la síntesis de la PANI por el método químico estándar (Cao Yong, et al., 1989), para ello se disolvieron 55 mmol anilina en 109 ml de ácido clorhídrico (1M) y se colocaron en un matraz de tres bocas. De manera independiente, se preparó una solución oxidante disolviendo 35 mmol de persulfato de amonio en 44 ml de ácido clorhídrico (1 M). La reacción procedió al adicionar gota a gota la solución oxidante a la solución monomérica, en atmósfera inerte de nitrógeno y utilizando un baño de hielo para el matraz de reacción. Una vez terminada la adición se dejó la reacción en agitación moderada por 2 h. Posteriormente la mezcla de reacción resultante se filtró en un embudo Büchner y el producto se lavó con ácido clorhídrico 1 M y 0.1 M y con abundante agua desionizada. El producto se transfirió a un vaso de precipitado y se secó al vacío a temperatura ambiente, posteriormente se pulverizó en el mortero para obtener partículas más pequeñas. El polvo de PANI que se obtuvo estaba en estado conductor (PANI-Cl) y fue desprotonado para obtener emeraldina en su estado base. Para ello, se trató el polvo de PANI-Cl con una solución de hidroxido de amonio en agitación durante un lapso de tiempo de 3 h. El polímero fue recolectado en un vaso de precipitado, secado al vacío a temperatura ambiente, lavado con agua deionizada hasta que el filtrado fue de pH neutro y secado en vacío dinámico. Finalmente la PANI desdopada fue pulverizada en el mortero.

### **4.3 Depósito de PANI sobre PMMA (PMMA/PANI)**

Previo al depósito de la PANI, para remover cualquier partícula sobre la superficie, se lavaron cuidadosamente las láminas de PMMA con espuma de jabón para no dañar la superficie, posteriormente se introdujeron en baño ultrasónico por 20 min, se retiraron lavándose con agua desionizada y se dejaron secar por aproximadamente 24 h.

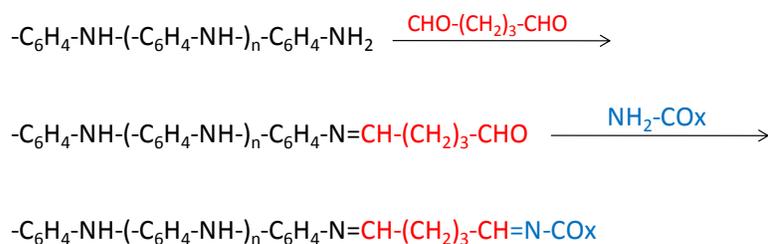
Las soluciones utilizadas en la técnica de recubrimiento por giro se prepararon mezclando una cantidad determinada del polvo de PANI-EB con 10 ml de 1-metil-2-pirrolidona, usando agitación magnética a temperatura ambiente durante 48 h. La mezcla resultante se pasó a través de un filtro de jeringa de PTFE con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . La solución obtenida se almacenó en la oscuridad en un rango de temperatura de 1-5°C antes de su uso.

La solución de PANI neutra se depositó en una superficie de PMMA con dimensiones de 63.5 mm  $\times$  63.5 mm  $\times$  2 mm, utilizando el equipo de recubrimiento por giro Spin Coater de Tecnología Chemat, Modelo KW-4A. Un volumen de 350  $\mu\text{l}$  de la solución polimérica se colocaron sobre el soporte de PMMA a una velocidad dentro de un rango de 1 rpm a 700 rpm para la velocidad I y de 700 rpm a 1880 rpm para la velocidad II en un tiempo total de 12 s (6 s para cada rango de velocidad) y se dejó secar por un tiempo de aproximadamente 24 h. Estas condiciones permitieron obtener películas homogéneas, transparentes y delgadas de PANI las cuales se adhirieron muy bien al sustrato de PMMA. El volumen de solución, la velocidad de giro, el tiempo de giro, la temperatura de la solución y la concentración fueron variadas para evaluar la calidad de las películas en cuanto a su homogeneidad macroscópica y la magnitud de absorbancia en la región del UV-vis.

Una vez realizado el depósito de PANI, las plataformas fueron recortadas a dimensiones de 63.5 mm  $\times$  9 mm  $\times$  2 mm para la inmovilización de la enzima y posteriores estudios de reusabilidad.

#### 4.4 Inmovilización de COx sobre PANI (PMMA/ PANI-Glu-Cox)

El proceso de inmovilización de la colesterol oxidasa se realizó mediante la formación de enlaces covalentes con el glutaraldehído (Glu) ya que este es un compuesto bifuncional cuyos grupos carbonilos pueden reaccionar con los grupos aminos de la lisina o de la hidroxilina presentes en la enzima y con aquellos que se encuentran libres en las terminación de la cadena de PANI, como se muestra en la Figura 9 (Suman, et al., 2006). Éste se realizó extendiendo 10 µl de solución de glutaraldehído 0.1% sobre una superficie de (23 mm x 9 mm) la película de PANI. Se dejó secar y posteriormente, se adicionaron 15 µl de solución de colesterol oxidasa (25 U/ml). Se dejó de nuevo secar por aproximadamente 24 h. Una vez seca la superficie del sistema PMMA/Pani-Glu-COx se lavó con 5 ml de agua desionizada para remover la enzima no inmovilizada y el sistema se almacenó a una temperatura de 1 a 2°C cuando no era utilizado.



**Figura 9.** Reacción propuesta para la inmovilización de la enzima.

#### 4.5 Estudios de Caracterización

Para evaluar el proceso de inmovilización de la enzima sobre la PANI, se realizó la caracterización de superficie de los distintos sistemas: PMMA/PANI, PMMA/PANI-Glu y PMM/PANI-Glu-COx mediante las técnicas que se muestran a continuación:

- Espectroscopia de FTIR: Para la obtención de los espectros de FTIR se colocó KBr sobre la superficie de los distintos sistemas y con la

ayuda del mortero se desprendió parte de la película depositada sobre el soporte de PMMA. Seguido de ello, se colocó el polvo en una prensa para obtener una pastilla. Se obtuvieron los espectros de la COx y el Glu usando el mismo procedimiento para fines comparativos con los otros sistemas. Este estudio se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum GX.

- Espectroscopia de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis): Esta caracterización se llevo a cabo utilizando como blanco el soporte de PMMA. Los espectros de absorción UV-vis-IRC de las películas se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20.
- Espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X: La superficie de la película delgada se irradió con rayos-X con un ánodo de MgK $\alpha$ , aplicando 10 KV y 10 mA. La presión de la cámara en el analisis se mantuvo aproximadamente a  $10^{-8}$  Torr durante cada medición. Para compensar los efectos de carga de la superficie, todas las energías de enlace fueron referenciadas con el pico del carbono neutral (C 1s) a 284.6 eV. Los espectros fueron obtenidos en el espectrómetro de fotoelectrones emitidos por rayos-X Perkin Elmer PHI 5100.
- Microscopía de fuerza atómica: Se corroboró la morfología superficial de los sistemas utilizando el microscopio de fuerza atómica Veeco di Innova.
- Microscopía electrónica de barrido: Se analizó la morfología de la superficie de los distintos sistemas, para ello se recubrieron de oro y seguidamente se introdujeron al microscopio electrónico de barrido Pemtron SS-300.
- Elipsometría espectroscópica: Se analizó la superficie de los sistemas a una ganancia de 1 y fijando los índices de refracción:  $n(PMMA)= 1.491$ ,  $n(PANI)= 1.51$ (Dang, et al., 1993),  $n(Glutaraldehído)= 1.399$ ,  $n(COx)= 1.4$ . Se utilizó ganancia de 1 a un ángulo de  $70^\circ$  y una longitud de onda= 632.8 nm. Las mediciones

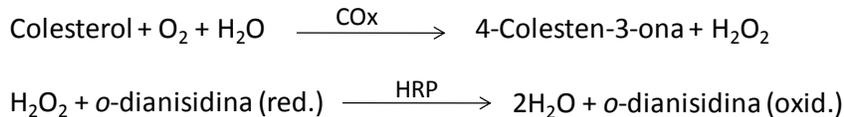
fueron realizadas colocando las distintas muestra en un elipsómetro láser marca Philips 200 nm.

#### **4.6 Evaluación de la actividad de la enzima en función del pH, la temperatura y el tiempo**

La actividad de la enzima inmovilizada colesterol oxidasa (COx) fue analizada en función del pH y la temperatura usando el método enzimático reportado en la literatura (Singh, et al., 2006). Se correlacionó la actividad de la COx con la absorbancia de la *o*-dianisidina oxidada como resultado de la reacción enzimática catalizada.

Se preparó una solución que contenía la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) ( $200 \text{ U mL}^{-1}$ ) utilizando un búfer de fosfatos 50 mM de pH 7.0 previo a su uso. La solución de búfer de fosfatos se ajustó a un determinado pH con soluciones de hidróxido de sodio 1000 mM y ácido clorhídrico 100 mM, midiéndose el pH en un electrodo extra largo Sigma-Aldrich conectado a un potenciómetro Orion modelo 525A+. Se preparó una solución de colesterol de  $200 \text{ mg mL}^{-1}$  disolviendo el polvo de colesterol en una solución de tritón X-100 al 10% y completando la solución con 10% de alcohol isopropílico. Adicionalmente, esta solución madre se diluyó para hacer soluciones de diferentes concentraciones de colesterol. La solución de *o*-dianisidina 1% se preparó disolviendo el reactivo en agua desionizada. Esta solución se preparó cada medio día ya que una vez preparada esta se degradaba adquiriendo un color morado.

Para las mediciones de la actividad de la COx, se añadió en un vaso de precipitado 20  $\mu\text{l}$  de la solución de la enzima peroxidasa (HRP), 20  $\mu\text{l}$  de la solución de *o*-dianisidina, 100  $\mu\text{l}$  de la solución de colesterol y 3 ml del búfer de fosfatos. Se homogenizó la mezcla y se introdujo la plataforma biosensible PMMA/PANI-Glu-COx por 10 min. Posteriormente, se extrajo la plataforma y se midió la absorbancia de la solución antes y después del tiempo transcurrido a una longitud de onda de 500 nm. Las reacciones que describen el procedimiento se muestran en la Figura 10 (Chetna, et al., 2007).



**Figura 10.** Reacciones para la evaluación de la actividad relativa de la enzima COx.

Las mediciones de pH se realizaron en el rango de 4 a 10, variando en una unidad, a una temperatura de 21°C. Una vez encontrado el pH donde la actividad enzimática fue la mayor, se realizaron las mediciones en un intervalo de temperaturas de 25°C a 40°C variando 5 unidades. Para alcanzar las temperaturas deseadas se utilizó una incubadora marca Barnstead|Lab-Line modelo Max Q 4000.

Una vez encontrada las condiciones de pH y temperatura en donde la actividad de la enzima fue mayor, se determinó la actividad en intervalos de tiempo de 2 semanas, y con ello cuantificar la disminución de su actividad biocatalítica. El almacenamiento de los sistemas Pani-Glu-COx se realizó a temperaturas entre 1 y 2 °C.

#### **4.7 Determinación de la cinética de Michaelis-Menten de la COx inmovilizada**

Esta medición se llevó a cabo a la condiciones óptimas de trabajo de la enzima, estas fueron a un pH 6 y a una temperatura de 35°C. Las soluciones de colesterol, HRP, *o*-dianisidina y búfer de fosfatos se colocaron en la incubadora a esta temperatura y utilizando el mismo método descrito para la obtención del pH y temperatura óptima, se determinó a distintas concentraciones de colesterol la absorbancia de la solución del cromóforo. Los datos experimentales de absorbancia en función de la concentración de colesterol, se graficaron usando la representación de *Lineweaver-Burk* y se determinó la constante *Michaelis Menten* relativa a partir de la cual, se valoró la afinidad colesterol oxidasa-colesterol en este sistema.

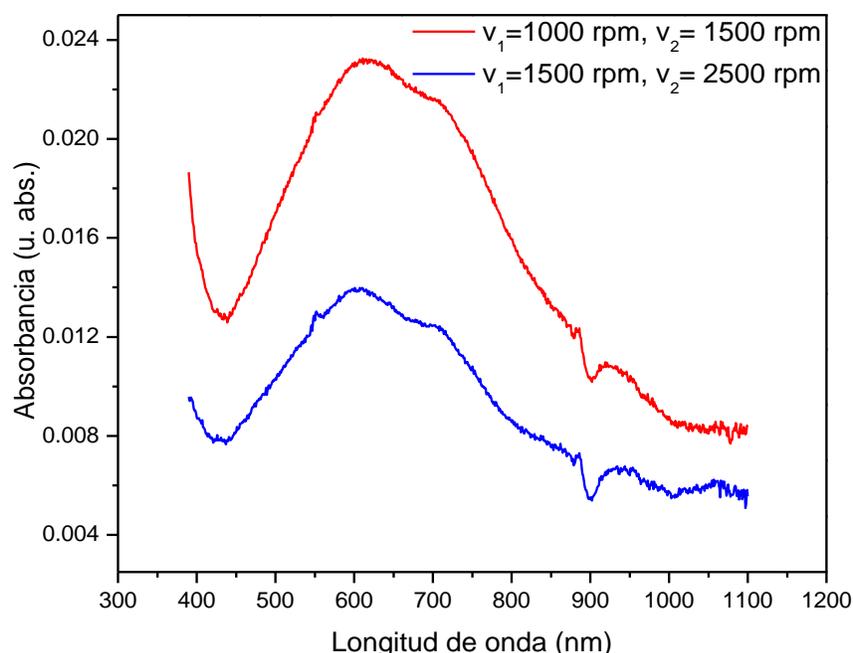
#### **4.8 Análisis de las propiedades ópticas de la PANI en función de la concentración de colesterol**

La capacidad de las películas de PANI como un material transductor fue probada por un procedimiento previamente reportado (Nemzer y Epstein, 2010). Se adicionó en una cubeta de espectrofotómetro 2 mL de búfer de fosfatos pH 6 y se colocó la plataforma biosensible dentro de la misma, se apoyó contra la pared más alejada de la fuente de luz y se insertó dentro del equipo. Después de haber transcurrido un tiempo de 30 min para asegurar una absorción estable, se añadió cuidadosamente por un extremo de la cubeta 100  $\mu$ l de la solución de colesterol libre asegurando que no se moviera el sistema. La absorbancia se determinó a 628 nm y se tomaron valores en intervalos de 60 s durante el experimento. Para eliminar la contribución de absorbancia del colesterol, se realizó un experimento de control usando el mismo procedimiento, sustituyendo el sistema biosensible por una lámina de PMMA con las mismas dimensiones.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización del Sistema PMMA/PANI

Se realizó el depósito de la solución de polianilina en el sustrato de PMMA como se describió anteriormente variando primeramente la velocidad de giro para obtener una película homogénea. Las condiciones utilizadas fueron: volumen de la solución= 350  $\mu$ l y concentración en la preparación de la solución polimérica= 1.5  $\frac{mg\ PANI}{ml\ NMP}$ . En la Figura 11, se observa en ambos espectros una absorción centrada en aproximadamente 628 nm que se atribuye a la transición electrónica del anillo benzoide al quinoide, característica de la PANI en su estado de EB.

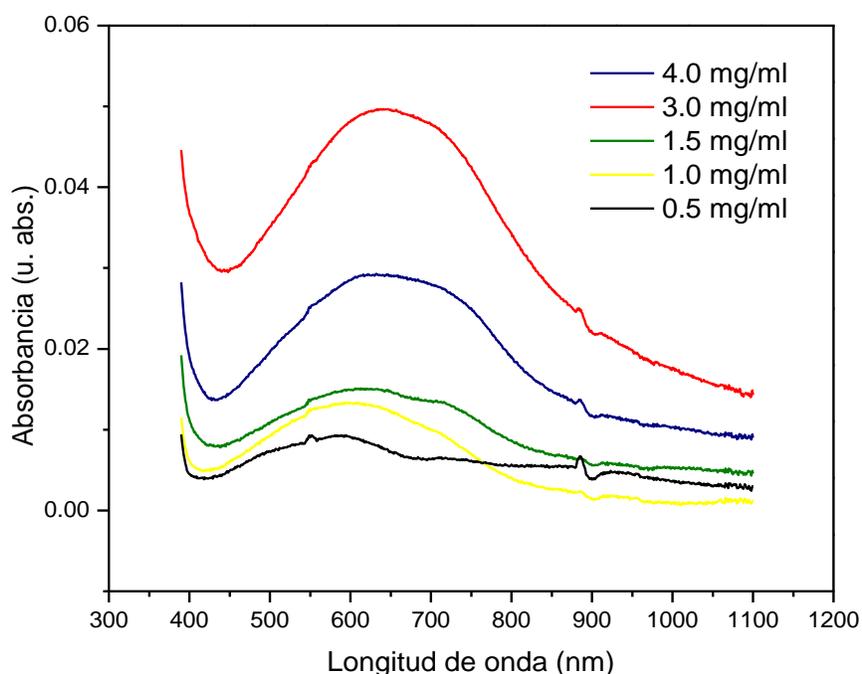


**Figura 11.** Comparación de la absorción de las películas de PANI a distintas velocidades de depósito de la solución. (Las velocidades corresponden a los valores promedios alcanzados en cada intervalo de giro).

La Figura 11 indica una mayor absorción a velocidades más bajas, lo que es indicativo de un mayor espesor de la película. Sin embargo, a simple vista se

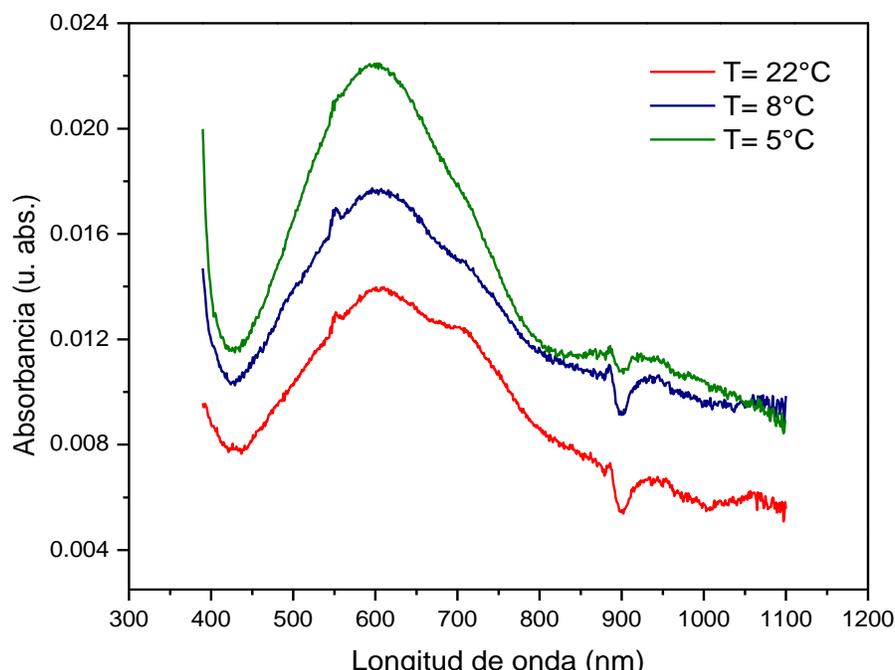
apreció que la película no era homogénea por lo que se consideró usar las velocidades más altas.

Seguidamente se realizaron pruebas variando la composición en la preparación de la solución de PANI, manteniendo los parámetros: volumen de la solución= 350  $\mu$ l y velocidades de giro  $v_1=1500$  rpm y  $v_2=2500$  rpm. En la Figura 12 se observa que la absorbancia presentó un incremento a medida que se aumentó la concentración en la preparación de la solución de PANI, pero hubo una disminución de la misma en la concentración máxima utilizada. Lo anterior se atribuyó a un efecto de saturación en la solución que pudo influir en el proceso de filtrado.



**Figura 12.** Comparación de la absorbancia de las películas de PANI a distintas concentraciones de la solución.

Se continuó realizando variaciones en las condiciones de depósito de la PANI y se modificó la temperatura de almacenamiento de la solución polimérica, presentando un cambio de absorbancia significativo como se observa en la Figura 13.



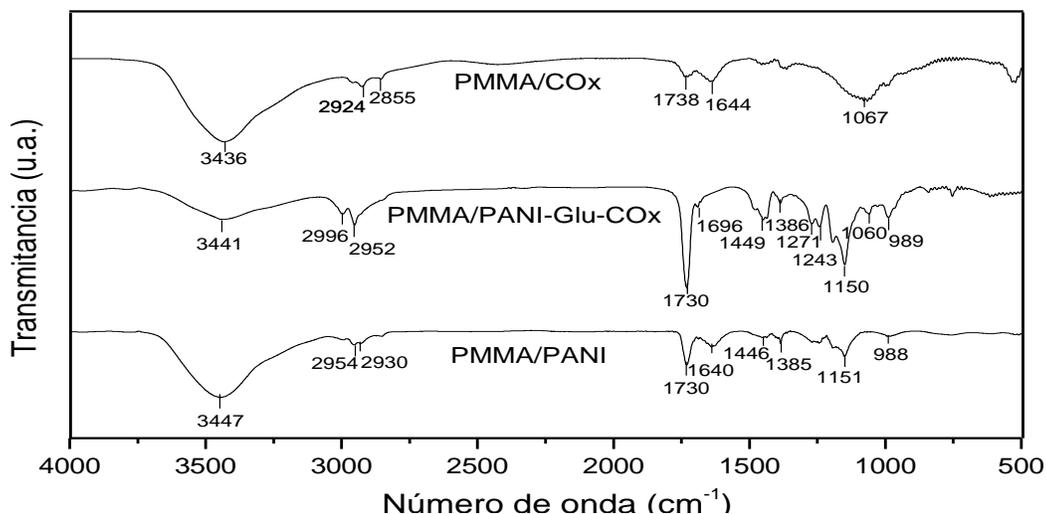
**Figura 13.** Comparación de la absorción de las películas de PANI con la solución almacenada a distintas temperaturas.

Teniendo en cuenta que se perseguía la obtención de películas homogéneas de PANI que tuviesen un espesor suficiente para alcanzar un valor de absorción máximo que pudiese ser monitoreado en los estudios de sensibilidad, se establecieron las siguientes condiciones óptimas para el depósito de las películas de PANI: fueron 350  $\mu\text{l}$  de solución de PANI con una concentración de preparación de  $3.0 \frac{\text{mg PANI}}{\text{ml NMP}}$ , temperatura de almacenamiento de la solución de alrededor de  $1.5^\circ\text{C}$ , velocidad 1 de 1500 rpm y velocidad 2 de 2500 rpm, ambas velocidades con una duración de giro de 6 s cada una.

Yadav y colaboradores realizaron depósitos de PANI/PMMA en soportes de vidrio por la técnica de recubrimiento por giro utilizando una velocidad de depósito constante de 2000 rpm por 5 s. Esta velocidad es similar a las condiciones óptimas de velocidad y tiempo de giro encontradas para los depósitos del sistema PMMA/PANI (Yadav, et al., 2008).

## 5.2 Espectroscopia de FTIR

La Figura 14 muestra los espectros de FTIR de los sistemas PMMA/PANI y PMMA/PANI-Glu-COx, se incluyó también el espectro de la película de COx depositada sobre el sustrato de PMMA para fines de comparación. La similitud entre los tres espectros indica que las señales correspondientes a las vibraciones del PMMA predominan en los espectros. El sistema PMMA/PANI muestra la banda a  $3447\text{ cm}^{-1}$  asignada al grupo amino libre y generada por la vibración de estiramiento. La banda de gran intensidad a  $1730\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la vibración de estiramiento del grupo C=O presente en el PMMA. La banda alrededor de  $1640\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la superposición de la señal de estiramiento del grupo C=O enlazado por puente de hidrógeno ( $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ ) del solvente 1-metil-2-pirrolidona no evaporado y la señal del estiramiento del anillo quinoide (Q) ( $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ ) de la cadena de PANI. Los picos alrededor de  $1450\text{ cm}^{-1}$  se relacionaron con la vibración de estiramiento del anillo benzoide (B) de la PANI. El pico de  $1385\text{ cm}^{-1}$  se asoció a la vibración simétrica de la flexión del grupo  $\text{CH}_3$  del PMMA. Las señales observadas aproximadamente a  $1270\text{ cm}^{-1}$  se asignaron al estiramiento C-N de las estructuras QBQ, QBB y BBQ de la PANI.



**Figura 14.** Espectro FTIR de los sistemas PMMA/PANI, PMMA/PANI-Glu-COx y PMMA/COx.

En la Figura 14 se observa también el espectro de la enzima COx para fines comparativos. Se detecta una banda ancha centrada a  $3436\text{ cm}^{-1}$  que se asignó a las vibraciones de los grupos aminos. Las señales en el intervalo de 3000 a  $2850\text{ cm}^{-1}$  se relacionaron con la vibración de estiramiento de los grupos  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}$ . Los picos  $1738$  y  $1644\text{ cm}^{-1}$  se atribuyeron al estiramiento del grupo carbonilo presente en las funcionalidades carboxilo y amida, respectivamente. La banda ancha y significativa observada a  $1067\text{ cm}^{-1}$  se asignó al estiramiento de la funcionalidad C-N presente en la enzima.

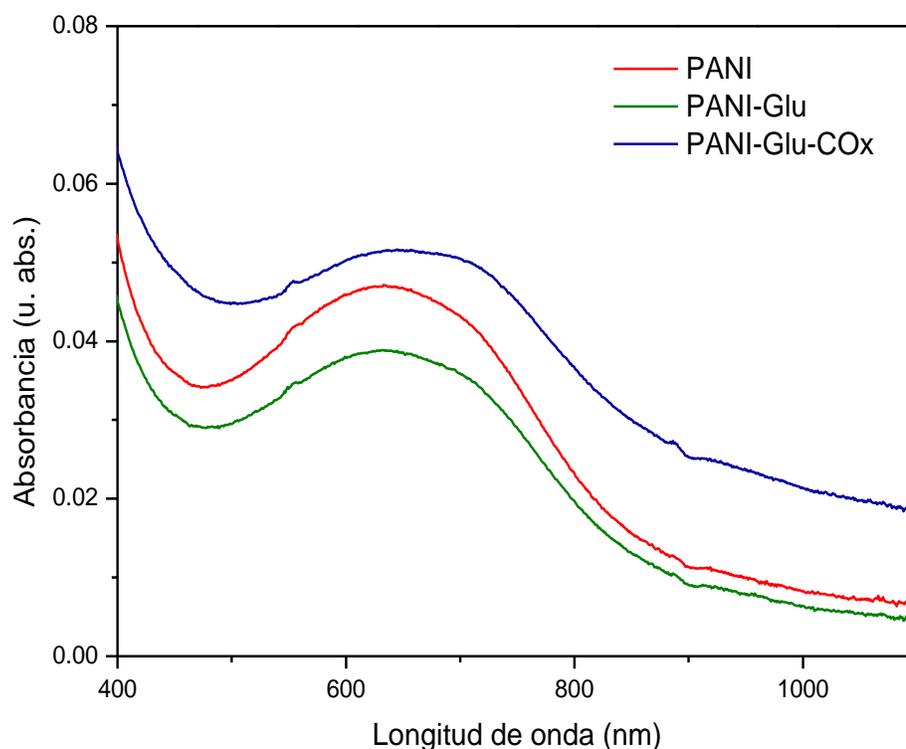
En el espectro del sistema PMMA/PANI-Glu-COx se observa que predominan las bandas características del PMMA y de la PANI. Una de las diferencias encontradas en este espectro con respecto al del sistema PMMA/PANI fue el aumento de la intensidad relativa de la señal del grupo carbonilo centrado a  $1730\text{ cm}^{-1}$  lo que puede ser atribuido a la contribución de los grupos carbonilos incorporados por la enzima. Otra particularidad detectada en este espectro fue la aparición de una banda centrada a  $1060\text{ cm}^{-1}$ , señal que no se observa en el espectro del sistema libre de enzima. Esta señal se relacionó con el estiramiento C-N de la enzima, teniendo en cuenta que se detectó en la misma posición una banda similar en el espectro de la enzima.

Los resultados de FTIR aportan una evidencia de la presencia de la enzima sobre la película de PANI, sin embargo, debido a la similitud de las funcionalidades presentes en las especies involucradas, no es posible evidenciar mediante esta técnica, la naturaleza covalente de la inmovilización enzimática.

### **5.3 Espectroscopia de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-vis)**

La espectroscopia UV-vis/NIR es una herramienta sensible para el estudio de los estados electrónicos, el proceso de dopaje y la conformación de la cadena de la PANI. La Figura 15 muestra los espectros de los sistemas PMMA/PANI, PMMA/PANI-Glu y PMMA/PANI-Glu-COx. Los espectros mostraron la absorción típica de la PANI en forma de emeraldina base la cual es una banda ancha a  $628\text{ nm}$  atribuida a la transferencia electrónica del anillo benzoide al anillo quinoide

(Wallace, et al., 2009). Cuando el glutaraldehído fue incorporado a la superficie de PANI, se observó un decremento en la absorción característica. El decremento de la absorción electrónica sin desplazamientos de la absorción máxima implica un proceso de reducción en la cadena del polímero. Resultados similares fueron observados por Diniz y colaboradores cuando detectaron que el glutaraldehído actúa principalmente como un agente reductor durante la reacción con la PANI (Diniz, et al., 1999). De manera inversa, la incorporación de la enzima COx produce un incremento de la absorción electrónica como evidencia de un proceso de oxidación de la superficie de PANI.

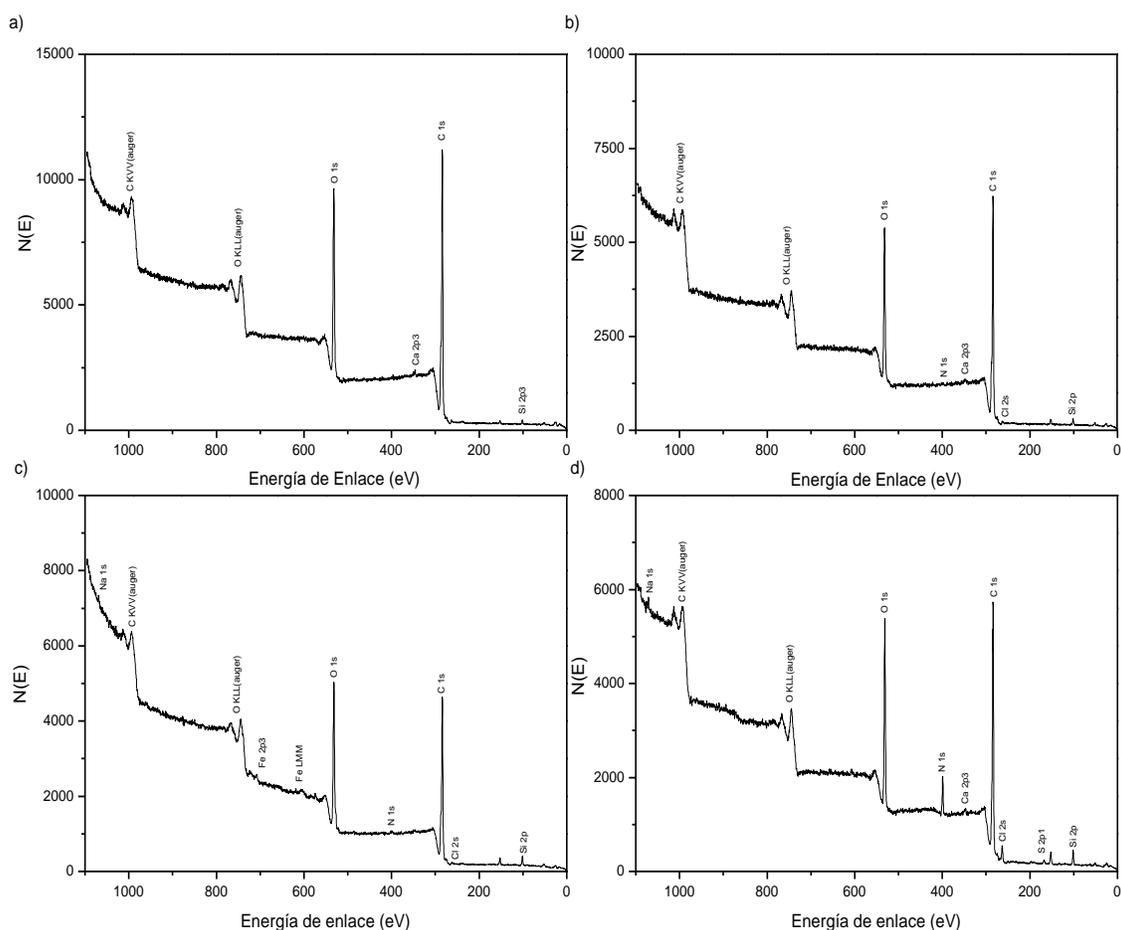


**Figura 15.** Espectro de absorción de las películas de a) PANI, b) PANI-Glu y c) PANI-Glu-COx.

#### 5.4 Espectroscopia de Fotoelectrones Emitidos por Rayos-X (XPS)

El proceso de inmovilización de la COx sobre la superficie de PANI fue estudiado por la técnica de XPS. Primeramente se realizó un barrido amplio de 0 a 1100 eV para los sistemas como se muestra en la Figura 16. Se observó los picos

de los elementos característicos de las soluciones utilizadas. En la Figura 16-a del sustrato PMMA y la Figura 16-b del sistema PMMA/PANI muestran al calcio como impureza proveniente del sustrato. En la Figura 16-c del sistema PMMA/PANI-Glu muestra al hierro como impureza y la Figura 16-d del sistema PMMA/PANI-Glu-COx muestra al potasio y al cloro como impurezas, estas tres últimas impurezas procedentes de las trazas de los reactivos utilizados para elaborar el búfer de fosfatos. Los análisis evidenciaron el enriquecimiento de nitrógeno de la superficie después de la inmovilización enzimática. La cantidad de nitrógeno atómico detectado en la superficie de PANI fue de 0.6 % y se incrementó a un valor de 6.0% cuando la COx fue incorporada.



**Figura 16.** Espectro de XPS de a) sustrato PMMA, b) sistema PMMA/PANI, c) sistema PMMA/PANI-Glu y d) sistema PMMA/PANI-Glu-COx.

La Tabla 2. muestra los porcentajes de la concentración atómica para el soporte y cada uno de los sistemas. Se observa el porcentaje de nitrógeno, así como el oxígeno y el carbono en las películas de PANI, PANI-Glu y PANI-Glu-COx.

**Tabla 2.** Concentración atómica del barrido de XPS de a) sustrato PMMA, b) sistema PMMA/PANI, c) sistema PMMA/PANI-Glu y d) sistema PMMA/PANI-Glu-COx.

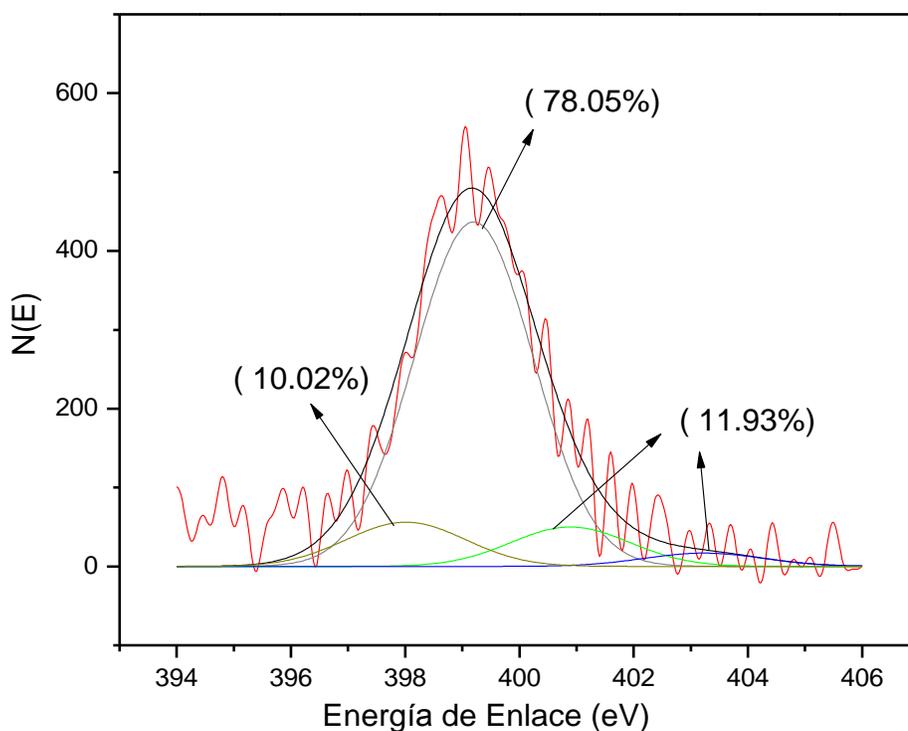
<b>Conc. Atómica (%)</b>	<b>C 1s</b>	<b>O 1s</b>	<b>N 1s</b>	<b>Si 2p</b>	<b>Si 2p3</b>	<b>Cl 2s</b>	<b>Ca 2p3</b>	<b>Fe 2p3</b>	<b>Na 1s</b>	<b>S 2p1</b>
<b>PMMA</b>	78.0	20.46	-	-	1.12	-	0.42	-	-	-
<b>PMMA/PANI</b>	76.2	19.8	0.6	1.9	-	1.2	0.3	-	-	-
<b>PMMA/ PANI-Glu</b>	70.1	23.9	0.5	4.2	-	0.8	-	0.3	0.3	-
<b>PMMA/ PANI-Glu-COx</b>	65.6	18.7	6.0	3.8	-	4.1	0.4	-	0.4	1.0

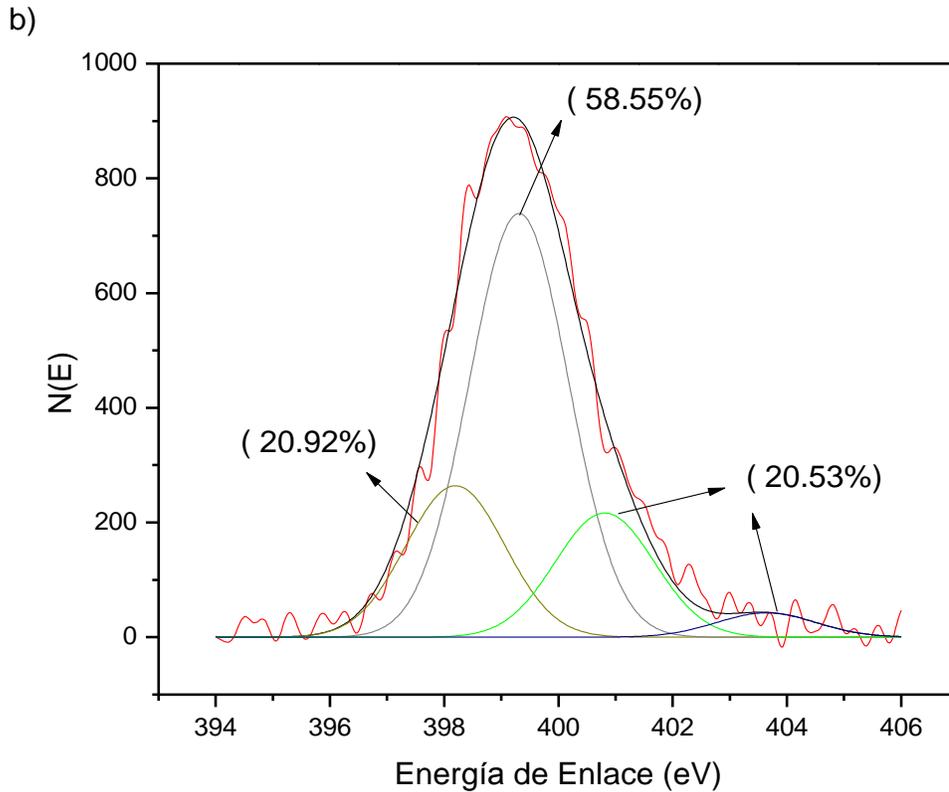
La Figura 17 muestra un análisis detallado de la señal de nitrógeno 1s de la película de PANI antes de la inmovilización de la COx. El espectro cercano de N 1s mostró la componente de más baja energía de enlace (BE) a 398.02 eV que se atribuyó al N del grupo imino neutro (10.02%), seguido por la señal centrada a 399.2 eV del N amina con una fuerte intensidad (78.5%). Los dos componentes de la señal de nitrógeno por arriba de los 400 eV (11.93%) fueron atribuidos a productos de oxidación de la superficie o a las especies de transferencia débil de carga que se crean por la complejación con el oxígeno y que se han reportado para la PANI neutra (Li y Ruckenstein, 2002).

La Figura 17-b muestra un análisis detallado de la señal de nitrógeno 1s de la superficie de PANI después de la inmovilización de la COx. El contenido atómico de la componente imina (20.92%) se incrementó en la muestra que contenía la COx en comparación con la contribución de la misma señal en la

superficie libre de COx. Esta tendencia puede estar asociada con la formación de funcionalidades imina durante la reacción entre el grupo carbonilo de Glutaraldehído y las funcionalidades de la amina de la PANI y la COx. Además, el incremento de la contribución espectral de la fracción de imina también puede ser atribuido a un proceso de oxidación en la cadena principal de la PANI durante la incorporación de la COx. También se notó que los componentes por arriba de 400 eV se incrementaron en gran intensidad (20.53%) con respecto al espectro de la superficie de PANI debido a la contribución de nitrógenos dipéptidos de residuos de aminoácidos de la enzima, de acuerdo con los datos de la literatura para los espectros de proteína (Battocchio, et al., 2008).

a)





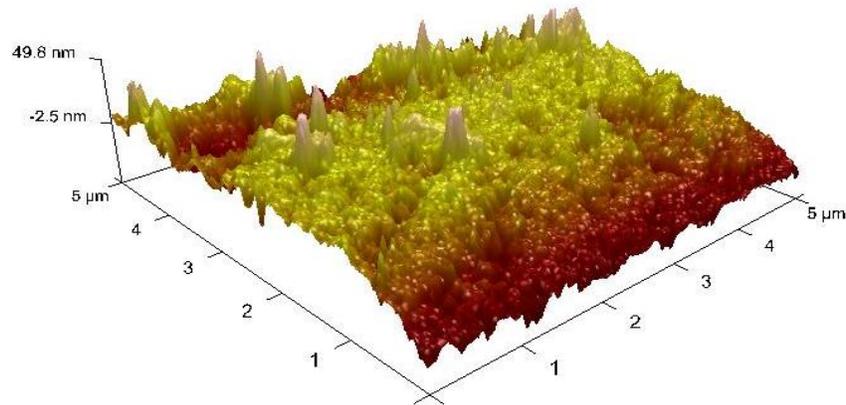
**Figura 17.** Espectro cercano XPS de N 1s para a) la superficie PANI, b) PANI después de inmovilizar la COx.

### 5.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

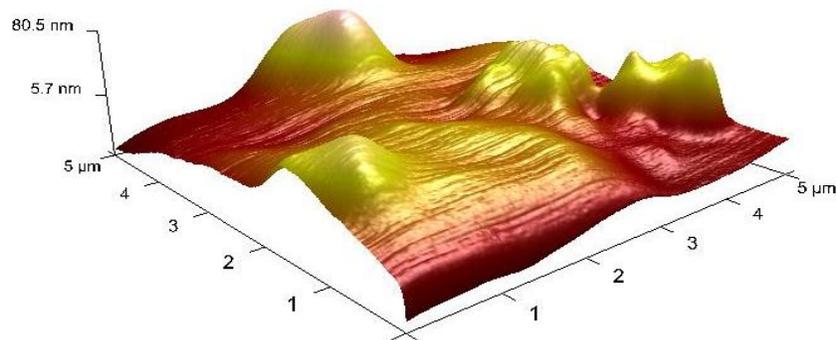
El análisis AFM ilustra las características topográficas de diferentes superficies de la plataforma biosensible. La Figura 18-a muestra la imagen en 3D de AFM de una superficie de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  del soporte PMMA el cual fue limpiado para su escaneo. Numerosas crestas y picos estuvieron presentes en toda la superficie de PMMA. Este perfil de la superficie fue consistente con los hallazgos de Federle y colaboradores quienes también reportaron la existencia de similares irregularidades en superficies nuevas y usadas de plexiglass (Walter, et al., 2004). Por otro lado, la película de PANI presentó una superficie bastante regular y lisa con cúmulos aislados de PANI con diámetros aproximados de  $1 \mu\text{m}$  distribuidos sobre el área escaneada (Figura 18-b). Después de la incorporación de la

colecsterol oxidasa (Figura 18-c), la superficie exhibió significativamente mayor rugosidad e irregularidades en comparación con la superficie de la película de PANI. Además, en la superficie se observaron estructuras globulares que se atribuyeron a la agregación de las moléculas de COx durante el proceso de inmovilización. Los resultados de AFM estuvieron en buena concordancia con los resultados de trabajos anteriores y finalmente se validó la eficacia de la superficie de PANI para la inmovilización de la enzima.

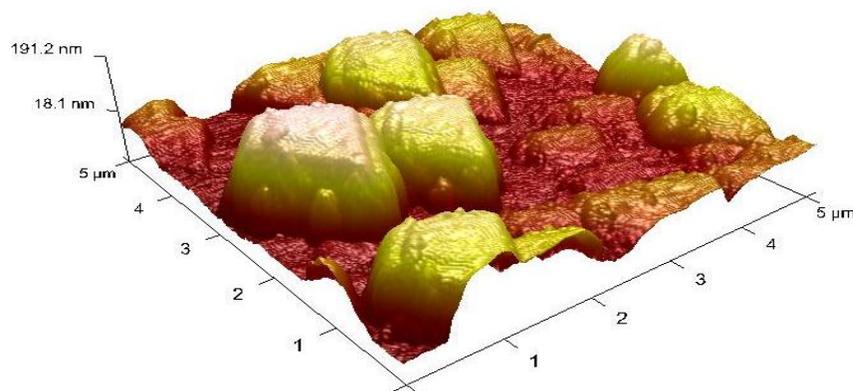
(a)



(b)



(c)



**Figura 18.** Imágenes de AFM de a) PMMA, b) PMMA/PANI, c) PMMA/PANI-Glu-COx.

### 5.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

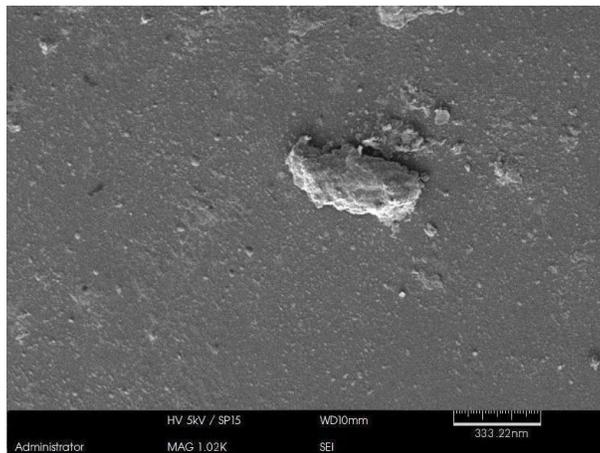
La Figura 19 muestra las micrografías de los sistemas (a) PMMA/PANI, (b) PMMA/PANI-Glu y (c) PMMA/PANI-Glu-COx presentando pequeñas partículas de distintos tamaños en escala nanométrica.

En el estudio de Yadav y colaboradores se depositó una película compuesta de PANI/PMMA por la técnica de recubrimiento por giro sobre soportes de vidrio a condiciones similares a las utilizadas, observándose en las micrografías películas con estructuras irregulares en los depósitos (Yadav, et al., 2008).

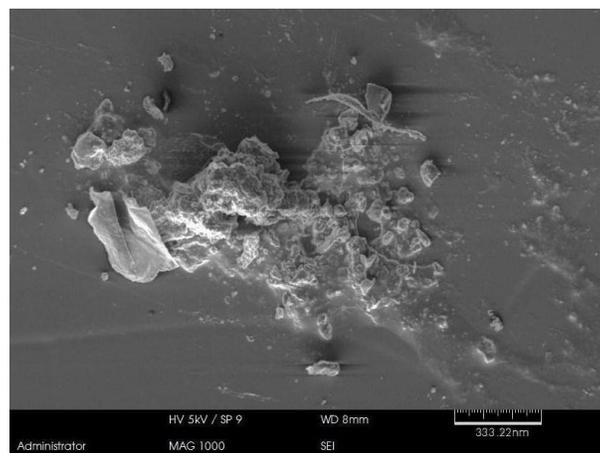
Dhand y colaboradores también reportaron una superficie irregular en la inmovilización de la COx sobre PANI atribuyendo estas estructuras globulares derivadas de la agregación de las moléculas de colesterol oxidasa durante la inmovilización (Dhand, et al., 2007).

La morfología en la superficie no cambia significativamente por la incorporación del glutaraldehído (Glu) y la colesterol oxidasa (COx), en ambas sólo se presenta un cambio en la textura por el recubrimiento de los aglomerados de PANI.

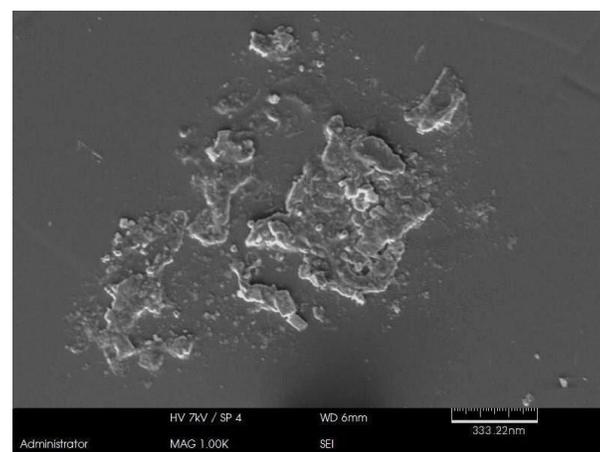
(a)



(b)



(c)



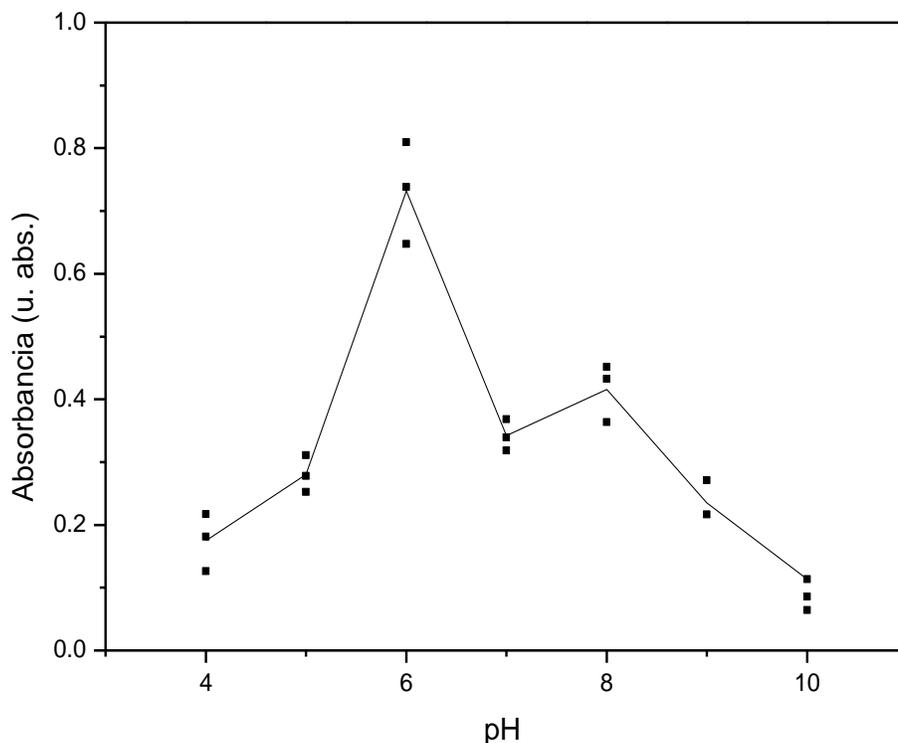
**Figura 19.** Imágenes de SEM de a) PMMA/PANI, b) PMMA/PANI-Glu, c) PMMA/PANI-Glu-COx.

## 5.7 Elipsometría espectroscópica

Se obtuvieron los espesores de las películas con las condiciones mencionadas anteriormente. Para la película de PANI se obtuvo un espesor promedio de 42.80 nm, para la película PANI-Glu se obtuvo un valor promedio de 92.23 nm y para la película PANI-Glu-COx el espesor promedio fue 274.99 nm. Los valores promedio anteriores indican un aumento de espesor a medida que se adicionaron las sustancias al sistema.

## 5.8 Efecto del pH

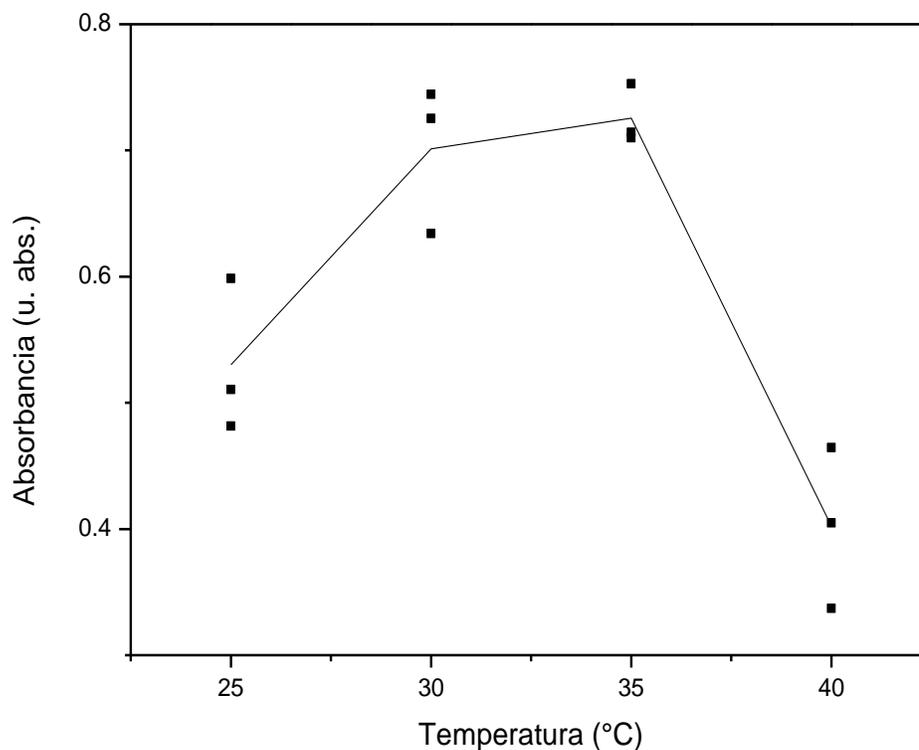
Las propiedades bioquímicas de una enzima inmovilizada son a menudo afectadas por la matriz y los métodos usados para la inmovilización. El cambio en el pH óptimo de una enzima inmovilizada puede variar de una a dos unidades de pH en comparación con la de una enzima libre (Belitz, et al., 2009). La Figura 20 muestra la respuesta fotométrica de la COx inmovilizada como función del pH. La absorbancia de la solución de *o*-dianiasidina como cromóforo aumentó drásticamente en un 62% del pH 5 al pH 6, en el que se obtuvo la respuesta óptima de la enzima. En un pH más alto, la absorbancia se redujo drásticamente 53% del pH 6 al pH 7. En contraste, la COx nativa exhibe la 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 recorrimiento del pH óptimo que ocurre para una enzima por el proceso de inmovilización se ha atribuido entre otros factores, a las interacciones secundarias entre la enzima y la matriz (Emregul, et al., 2006). En nuestro caso, la matriz es un polímero polar con funcionalidades capaces de establecer interacciones secundarias adicionales a las del enlace covalente. Este entorno electrónico puede modificar la distribución de carga en la superficie exterior de la COx, lo cual puede interferir en el comportamiento frente al pH de la enzima.



**Figura 20.** Absorbancia de la solución de *o*-dianiasidina en función del pH.

### 5.9 Efecto de la temperatura

El perfil de temperatura-actividad de la enzima inmovilizada se muestra en la Figura 21. La respuesta óptima de la COx inmovilizada se alcanzó de 30 a 35°C. Más allá de este intervalo, la absorbancia decrece un 45% hasta 40 °C lo que puede ser atribuido al inicio de los procesos de desnaturalización de la enzima. Este resultado indicó que la respuesta óptima de la COx inmovilizada puede ser lograda a una temperatura moderada lo que es deseable para fines prácticos.

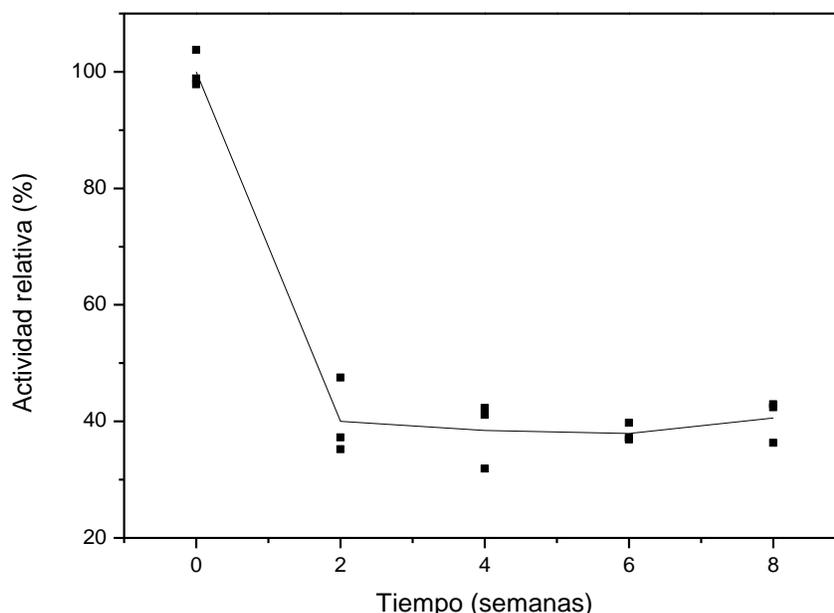


**Figura 21.** Absorbancia de la solución de *o*-dianiasidina en función de la temperatura.

### 5.10 Estabilidad en el tiempo

Se determinó mediante la medición de la actividad relativa el tiempo de vida útil del sistema PMMA/PANI-Glu-COx como posible plataforma biosensible para la medición de colesterol. La actividad relativa de la enzima se hizo equivalente a la respuesta fotométrica de la solución de *o*-dianiasidina. Estas lecturas se tomaron durante 8 semanas en intervalos de 2 semanas. En la Figura 22 se puede observar el comportamiento en donde la actividad relativa presenta un decremento a través del tiempo. A partir de la segunda semana, se encontró una pérdida de la actividad relativa del 60 % y no se modificó en las semanas posteriores. Lo que nos indica que el sistema puede ser utilizado durante un periodo de ocho semanas a temperaturas de 3 a 5 °C, sin embargo, a partir de la segunda semana su actividad se verá modificada.

Singh y colaboradores crearon un sistema similar inmovilizando covalentemente la COx y la CE sobre una película de polianilina en estado conductor donde el tiempo de vida fue medido durante 10 semanas, observándose una pérdida de actividad de las primeras 6 semanas del 30%, una vez pasando las 6 semanas el 75% de la actividad se perdió a las 8 semanas (Singh, et al., 2006).

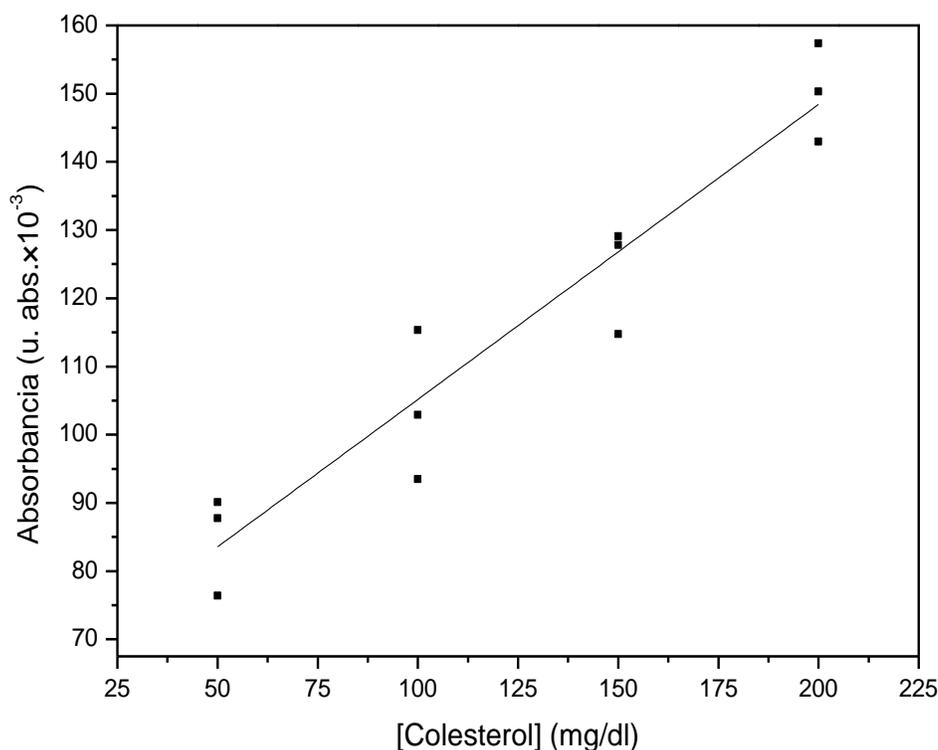


**Figura 22.** Actividad de la enzima inmovilizada en función del tiempo.

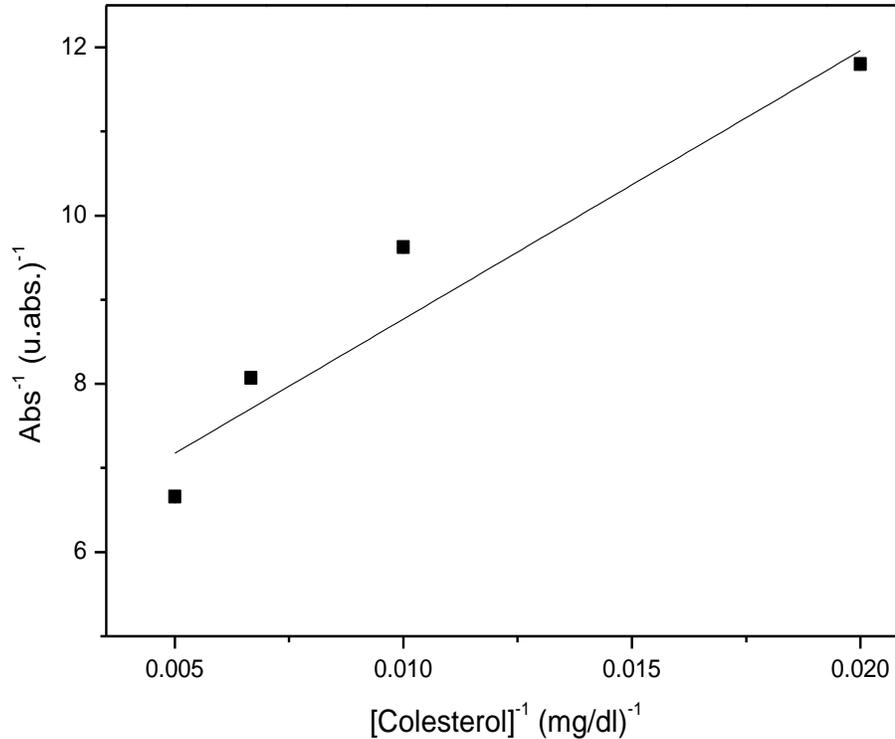
### 5.11 Determinación de la cinética de Michaelis-Menten de la COx inmovilizada

Una vez determinadas las condiciones óptimas de pH y temperatura para la COx inmovilizada, los parámetros cinéticos de la enzima fueron determinados siguiendo la técnica fotométrica. La reacción bioquímica se llevó a cabo a las condiciones óptimas (pH 6 y 35°C) para la COx inmovilizada y la absorbancia de la solución de *o*-dianisidina en estado oxidado se monitoreó en función de la concentración de colesterol. La Figura 23 muestra la respuesta fotométrica de la plataforma biosensible de colesterol libre en el intervalo de 50 a 200 mg dl<sup>-1</sup> (1.29 mM a 5.17 mM). Los parámetros aparentes de Michaelis-Menten ( $V_{max}$  and  $K_M$ ), los cuales indican la cinética enzima-sustrato, fueron estimados usando el ajuste

Lineweaver-Burk, es decir, un gráfico de la inversa de la absorbancia contra la inversa de la concentración de colesterol (Figura 24). Los parámetros del ajuste calculados fueron  $V_{max} = 0.17$  AU y  $K_M = 57.19$  mg dl<sup>-1</sup> (1.48 mM). El valor aparente extraído  $K_M$  difiere de los valores reportados de la literatura para la COx inmovilizada en la PANI en su estado conductor (0.51 mM, 0.56 mM, 2.72 mM y 3.26mM (Wang y Mu, 1999)); en películas de polipirrol conductoras (9.8 mM (Singh, et al., 2004)) y en una película polimérica (6 mM (Bongiovanni, et al., 2001)). No se encontraron reportes para la COx inmovilizada sobre la PANI en su estado neutro. Las diferencias en la cinética enzimática entre varias matrices y los métodos de inmovilización evidencian la importancia de la técnica y las interacciones que se establecen durante el proceso sobre la conformación estructural de la enzima.



**Figura 23.** Absorbancia de la solución de *o*-dianisidina en función de la concentración de colesterol.



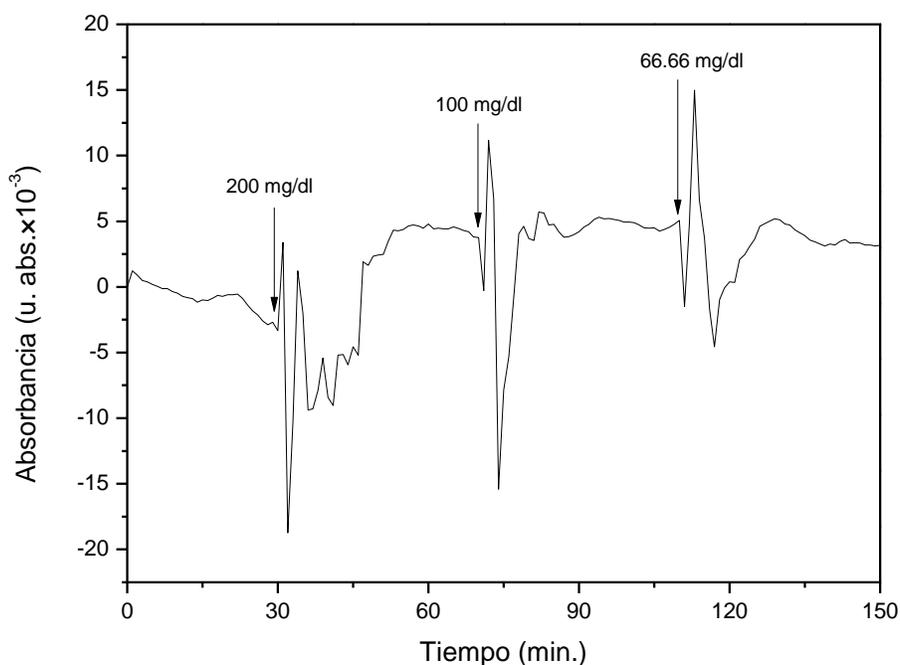
**Figura 24.** Gráfica Lineweaver-Burke de la absorbancia de la solución de *o*-dianisidina en función de la concentración de colesterol.

### 5.12 Análisis de las propiedades ópticas de la PANI en función de la concentración de colesterol

En presencia del agente oxidante adecuado, el grupo amina de la estructura de la PANI puede ser oxidado a un grupo imino a través de la abstracción de dos protones y dos electrones. En una reacción inversa, un agente reductor puede donar dos protones y dos electrones para convertir un grupo imino en uno amino. La posición y la intensidad de las bandas de absorción de UV-vis para la PANI son sensibles a las transiciones entre sus estados electrónicos. Este comportamiento crómico puede ser una herramienta útil en el monitoreo de procesos reducción-oxidación como la reacción de la COx con el colesterol libre.

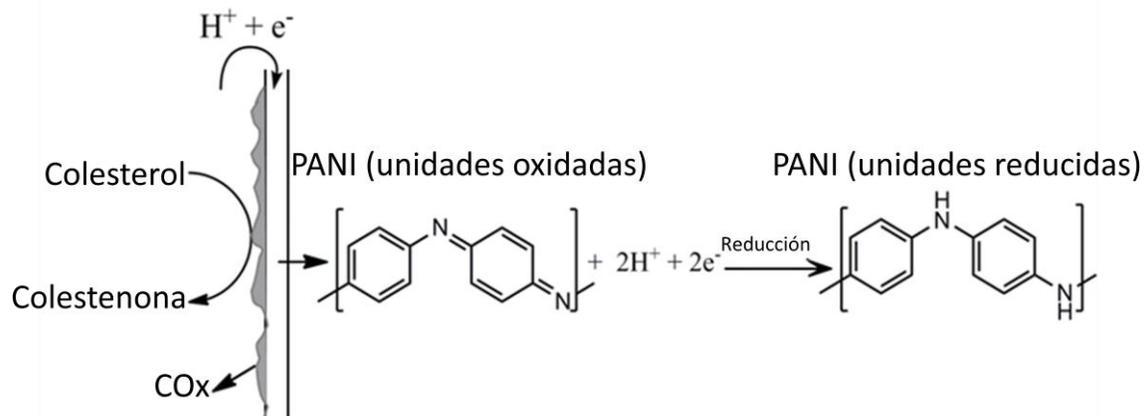
Con el fin de evaluar las capacidades de transducción de la PANI neutra para la detección del colesterol libre, la absorción de UV-vis de la película biosensible fue determinada a 628 nm, como función de la exposición del

colesterol. Este experimento fue llevado a cabo en búfer de fosfatos pH 6 en ausencia de cualquier otra especie cromófora. La Figura 25 muestra la respuesta de la plataforma biosensible con adiciones de alícuotas de 100  $\mu$ l de solución de colesterol. Se puede observar que la adición de colesterol causó una disminución en la absorbancia de la película de PANI como evidencia de una reducción en el estado de oxidación del polímero de la emeraldina base (EB) hacia el estado de leucoemeraldina base (LEB).



**Figura 25.** Tendencia de la absorbancia de la plataforma biosensible tras la adición de la solución de colesterol. Las flechas representan cuando se añadió la solución de sustrato.

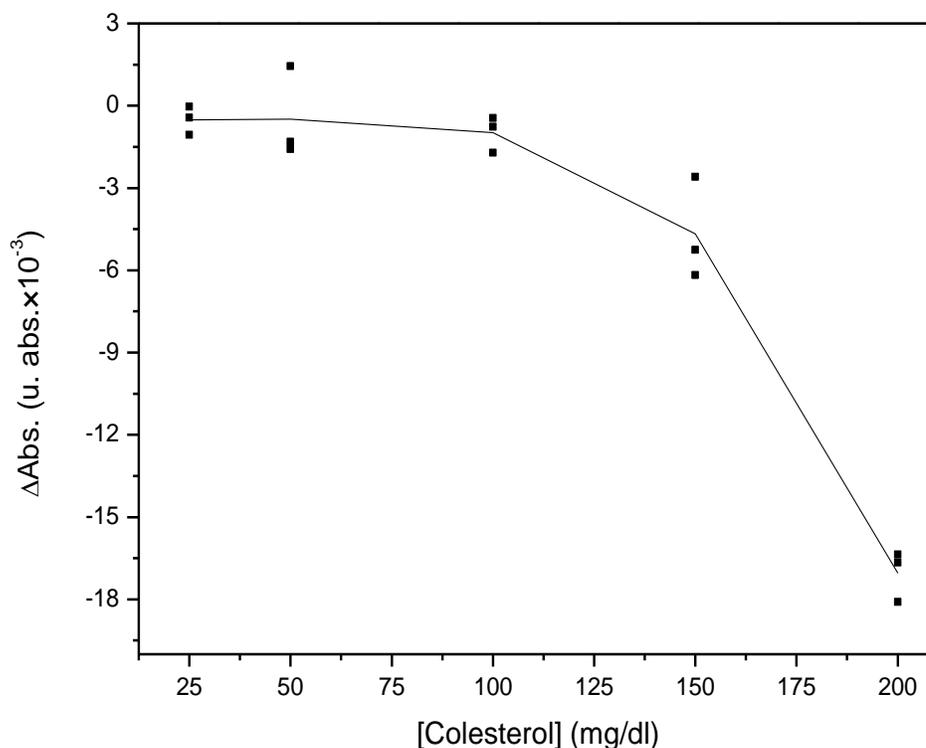
En el sistema presente, la película de PANI puede actuar como el receptor de electrones e iones hidronio en la reacción de oxidación del colesterol libre en la presencia de la COx. Una representación de este proceso se muestra en la Figura 26; hay una reducción de la EB hacia la forma de LEB cuando una unidad de repetición imina acepta dos protones y dos electrones de la molécula de colesterol para formar una unidad reducida en la PANI. Entre las adiciones de las alícuotas, el polímero fue regenerado desde la LEB que es menos estable que la EB en condiciones ambientales y es susceptible que se oxide de nuevo.



**Figura 26.** Principio fundamental de la capacidad de detección de la película de PANI durante la exposición del colesterol.

Un comportamiento similar fue descrito por Epstein y colaboradores quienes evaluaron el comportamiento crómico de la PANI neutra frente a la glucosa, la colina y el ácido úrico usando las enzimas oxido-reductoras específicas para cada uno de estos analitos (Nemzer y Epstein, 2010).

El mismo experimento fue llevado a cabo variando la concentración del analito y la disminución en la absorbancia a 628 nm fue graficada como función de la concentración de colesterol como se muestra en la Figura 27. El cambio de absorbancia que se representa en esta figura se midió cuando en el experimento se adicionó la alícuota de la solución de colesterol por primera y única vez. Se observa una tendencia al aumento del cambio de absorbancia cuando la concentración de las alícuotas de colesterol varió desde 25 a 200 mg dl<sup>-1</sup>. Este comportamiento crómico demostró el potencial de la plataforma biosensible para el monitoreo óptico de colesterol libre.



**Figura 27.** Cambio de la absorbancia de la plataforma biosensible como función de la concentración de colesterol.

A fin de demostrar la detección selectiva de la plataforma biosensible de colesterol, el experimento fue realizado usando individualmente alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de solución de urea ( $30 \text{ mg dl}^{-1}$ ), ácido úrico ( $5 \text{ mg dl}^{-1}$ ) y creatinina ( $0.85 \text{ mg dl}^{-1}$ ). La adición de las soluciones interferenciales no produjo un cambio detectable en la absorbancia óptica de la plataforma biosensible, lo cual corroboró que la respuesta óptica contra el colesterol libre fue selectivamente determinada por la actividad de oxidación-reducción de la COx inmovilizada y la transferencia de carga a la matriz de PANI con la activación de sus propiedades crómicas.

## VI. CONCLUSIONES

Hemos descrito la preparación y la caracterización de una plataforma biosensible factible basada en un soporte comercial de Plexiglass recubierto por el método de recubrimiento por giro de una película de polianilina en su estado neutro con espesores aproximados de 42.80 nm y la subsecuente inmovilización de la enzima colesterol oxidasa. La plataforma ofrece algunas ventajas incluyendo su sencilla y barata fabricación. El proceso de inmovilización de la enzima afecta el estado de oxidación de la película de polianilina así como la distribución de carga en la superficie exterior de la colesterol oxidasa que además modifica su comportamiento del pH comparado con el de la enzima libre. En la plataforma biosensible, la polianilina atrapa la enzima y también actúa como una película ópticamente activa para la detección del colesterol libre. El comportamiento crómico de la polianilina frente al colesterol es selectivamente determinado por el comportamiento de oxidación-reducción de la colesterol oxidasa inmovilizada y la transferencia de carga a la polianilina neutra. La sensibilidad del sistema al colesterol en concentraciones equivalentes a aquellas presentes en el suero humano evidencia su potencialidad en un método óptico en el que no se requiere la enzima peroxidasa ni las especies cromóforas usadas en los trabajos reportados y en la técnica estándar implementada en los laboratorios clínicos.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Con base en los resultados obtenidos de este trabajo de tesis se sugiere lo siguiente:

1. Continuar este estudio utilizando suero sanguíneo para las mediciones de determinación de colesterol.
2. Determinar la cantidad de enzima inmovilizada por área de superficie.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

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

Ansari Shakeel Ahmed, Husain Qayyum. 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*. 30:512-523.

Arroyo Miguel. 1998. Inmovilización de enzimas: fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. 39:2:23-39.

Arya Sunil K., Datta Monika, Malhotra Bansi M. 2008. Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and bioelectronics*. 23:1083-1100.

Bahmani Baharak, Moztarzadeh Fathollah, Rabiee Mohammad, Tahrii Mohammadreza. 2010. Development of an electrochemical sulfite biosensor by immobilization of sulfite oxidase on conducting polyaniline film. *Synthetic Metals*. 160:2653-2657.

Barik Abdul, Solanki Pratima R., Kaushik Ajeet, Ali Azahar, Pandey M.K., Kim C.G., Malhotra B.D. 2010. Polyaniline-carboxymethyl cellulose nanocomposite for cholesterol detection. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 10:6479-6488.

Battocchio C, Iucci G, Dettin M, Monti S, Carravetta V, Polzonetti G. 2008. XPS investigation on the structure of two dipeptides studied as models of self-assembling oligopeptides: comparison between experiments and theory. *Journal of Physics: Conference Series*. 100 0520079.

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

Blinova Natalia V., Stejskal Jaroslav, Trchová Miroslava, Ćirić- Marjanović Gordana, Sapurina Irina. 2007. Polymerization of aniline on polyaniline membranes. The Journal of Physical Chemistry B. 111:2440-2448.

Bongiovanni Cristiana, Ferri Tommaso, Poscia Alessandro, Varalli Maurizio, Santucci Roberto, Desideri Alesandro. 2001. An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol. Bioelectrochemistry. 54:17-22.

Brazdžiuvienė K., Jurevičiūtė I., Malinauskas A. 2007. Amperometric ascorbate sensor based on conducting polymer: Poly (N-methylaniline) versus polyaniline. Electrochimica Acta. 53:785-791.

Campbell Mary K.; Farrell Shawn O. 2004. Metabolismo de lípidos. Bioquímica. Editorial Thomson. Ciudad de México, D.F. México. Pp. 575-613.

Cao Yong, Andreatta Alejandro, Heeger Alan J, Smith Paul. 1989. Influence of chemical polymerization conditions on the properties of polyaniline. Polymer. 30:2305-2311.

Castrellon-Uribe J., Nicho M.E., Reyes-Merino G. 2009. Remote optical detection of low concentrations of aqueous ammonia employing conductive polymers of polyaniline. Sensors and Actuators B. 141:40-44.

Chandrasekhar P. 1999. Semiconductor models for CPs. Conducting polymers, fundamentals and applications: a practical approach. Kluwer Academic Publishers. Freehold, United States of America. Pp. 23-41.

Charpentier L., Murr N. El. 1995. Amperometric determination of cholesterol in serum with use of a renewable surface peroxidase electrode. *Analytica Chimica Acta*. 318:89-93.

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.

Chetna Dhand, S. P. Singh, Sunil K Arya, Monika Datta, B. D. Malhotra. 2007. Cholesterol biosensor based on electrophoretically deposited conducting polymer film derived from nanostructured polyaniline colloidal suspension. *Analytica Chimica Acta*. 602:244-251.

Chowdhury A., Chowdhury J., Pal P., Pal A.J. 1998. Light-emitting diodes from molecularly thin porphyrin derivate: effect of molecular packing. *Solid State Communications*. 107:725-729.

Chowdhury A., Österbacka R., Pal A.J., Stubb H. 2001. Electric field redistribution on light-emitting devices based on Langmuir-Blodgett films of a porphyrin derivate. *Solid State Communications*. 117:223-228.

Chu Haihong, Wei Xiuhua, Wu Meisheng, Yan Jilin, Tu Yifeng. 2012. An electrochemiluminescent biosensor based on polypyrrole immobilized uricase for ultrasensitive uric acid detection. *Sensors and Actuators B*. 163:247-252.

Clark Jr. Leland C. 1956. Monitor and control of blood and tissue oxygen tentions. *Transactions- American Society for Artificial Internal Organs*. 2:41-48.

Clark Jr. Leland C., Lyons Champ. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 102:29-45.

Dang Mo, Yongyao Lin, Kecheng Gong, Guiping Zhang, Rekuan Yuan. 1993. Ellipsometric spectra and refractive index of polyaniline. Chinese physics letters. 10:374-376.

De Melo J V, Bello M E, Azevêdo, de Souza J M, Diniz F B. 1999. The effect of glutaraldehyde on the electrochemical behavior of polyaniline. Electrochimica Acta. 44:2405-2412.

De Souza Solange. 2007. Smart coating based on polyaniline acrylic blend for corrosion protection of different metals. Surface & Coatings Technology. 201:7574-7581.

Dhand Chetna, Arya Sunil K., Datta Monika, Malhotra B.D. 2008. Polyaniline-carbon nanotube composite film for cholesterol biosensor. Analytical Biochemistry. 383:194-199.

Dhand Chetna, Solanki Pratima R., Pandey Manoj K., Datta Monika, Malhotra Bansi. 2010. Electrophoretically deposited polyaniline nanotubes based film for cholesterol detection. Electrophoresis. 31:3754-3762.

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

Doukyu Noriyuki. 2009. Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases, Applied Microbiology and Biotechnology. 83:825-837.

Eftekhari Ali. 2010. Polyaniline nanostructures, spectroscopy of nanostructured conducting polymers. Nanostructured conductive polymers. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, Reino Unido. Pp. 19-98, pp. 341-365.

Emr Sally A., Yacynych Alexander M. 1995. Use of polymer films in amperometric biosensors. *Electroanalysis*.7:913-923.

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

Faez R., Reis C., Scandiucci de Freitas P., Kosima O.K., Ruggeri G., De Paoli M.A. 2000. Polímeros conductores. *Química Nova na Escola*.11:13-18.

Ghanbari Khadijeh, Mousavi Mir Fazlollah, Shamsipur Mojtaba, Karami Hassan. 2007. Synthesis of polyaniline/graphite composite as a cathode of Zn-polyaniline rechargeable battery. *Journal of Power Sources*. 170:513-519.

Godoy S., Leca-Bouvier B., Boullanger P., Blum L.J., Girard-Egrot A.P. 2005. Electrochemiluminescent detection of acetylcholine using acetylcholinesterase immobilized in a biomimetic Langmuir-Blodgett nanostructure. *Sensors and Actuators B*. 107:82-87.

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.

Gupta Bhavana, Singh Shakti, Mohan Swati, Prakash Rajiv. 2010. Urea biosensor based on conducting polymer transducers. *Biosensors*. Intech. Vukovar, Croacia. Pp. 93-114.

Huang Jiaying. 2006. Syntheses and applications of conducting polymer polyaniline nanofibers. *Pure and Applied Chemistry*. 78:15-27.

Juan José Hicks Gómez. 2001. Colesterol. *Bioquímica*. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores. Ciudad de México, D.F. México. Pp. 376-389.

Kalendová Andrea, Veselý David, Stejskal Jaroslav. 2008. Organic coatings containing polyaniline and inorganic pigments as corrosion inhibitors. *Progress in Organic Coatings*. 62:105-116.

Kaneto K., Kaneko M., Min Y., MacDiarmid Alan G. 1995. "Artificial muscle": electrochemical actuators using polyaniline films. *Synthetic Metals*. 71:2211-2212.

Khan Raju, Kaushik Ajeet, Mishra A.P. 2009. Immobilization of cholesterol oxidase onto electrochemically polymerized film of biocompatible polyaniline-Triton X-100. *Materials Science and Engineering C*. 29:1399-1403.

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

Koneracká M., Kopčanský P., Timko M., Ramchand C.N. 2002. Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 252:409-411.

Kumar Arun, Malhotra Rajesh, Malhotra B.D., Grover S.K. 2000. Co-immobilization of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase in a sol-gel film. *Analytica Chimica Acta*. 414:43-50.

Laska J., Włodarczyk J., Zaborska W. 1999. Polyaniline as a support for urease immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 6:549-553.

Laslau Cosmin, Zujovic Zoran D., Zhang Lijuan, Bowmaker Graham A., Travas Sejdic Jadranka. 2009. Morphological evolution of self-assembled polyaniline nanostructures obtained by pH-stat chemical oxidation. *Chemistry of materials*. 21:954-962.

Li Z F, Ruckenstein E. 2002. Conductive surface via graft polymerization of aniline on a modified glass surface. *Synthetic Metals*. 129:73–83.

Lin Chi-Chang, Yang Ming-Chien. 2003. Cholesterol oxidation using hollow fiber dialyzer immobilized with cholesterol oxidase: effect of storage and reuse. *Biomaterials*. 24:549-557.

Liu Yu, Chu Zhenyu, Zhang Yannan, Jin Wanqin. 2009. Amperometric glucose biosensor with high sensitivity based on self-assembled Prussian Blue modified electrode. *Electrochimica Acta*. 54:7490-7494.

MacDiarmid A.G., Yang L.S., Huang W.S., Humphrey B.D. 1987. Polyaniline: electrochemistry and application to rechargeable batteries. *Synthetic Metals*. 18:393-398.

Makeiff Darren A., Huber Trisha. 2006. Microwave absorption by polyaniline-carbon nanotube composites. *Synthetic Metals*. 156:497- 505.

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

Malhotra Bansi D., Chaubey Asha. 2003. Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators B*. 91:117- 127.

Masters J.G., Sun Y., MacDiarmid A.G., Epstein A. J. 1991. Polyaniline: Allowed oxidation states. *Synthetic Metals*. 41-43:715-718.

Mathews Christopher K., Van Holde Christopher K., Ahern Kevin G. 2002. Lípidos, membranas y transporte celular y Enzimas: catalizadores biológicos. Bioquímica. Editorial Pearson Educación. Madrid, España. Pp. 353-400, pp. 403-461.

McCall R.P., Ginder J.M., Leng J.M., Coplin K.A., Ye H.J., Epstein A.J., Asturias G.E., Manohar S.K., Masters J.G., Scherr E.M., Sun Y., MacDiarmid A.G. 1991. Photoinduced absorption and erasable optical information storage in polyanilines. *Synthetic Metals*. 41:1329-1332.

McKee Trudy; McKee James R. 2009. Enzimas. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. Editorial McGraw-Hill. Ciudad de México, D.F. México. Pp. 183-226.

Miller Joel S. 1993. Conducting polymers-Materials of commerce. *Advanced materials*. 5:587-589.

Muhammad-Tahir Zarini, Alocilja Evangelyn C. 2003. A conductometric biosensor for biosecurity. *Biosensors and Bioelectronics*. 18:813-819.

Nelson David L.; Cox Michael M. 2001. Enzimas. Lehninger principios de bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, España. Pp. 243-292.

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.

Nemzer Louis R., Epstein Arthur J. 2010. A polyaniline-based optical biosensing platform using an entrapped oxidoreductase enzyme. *Sensors and Actuators B*. 150:376-383.

Östergård T., Paloheimo J., Pal A.J., Stubb H. 1997. Langmuir-Blodgett light-emitting diodes of poly (3-hexylthiophene): electro-optical characteristics related to structure. *Synthetic Metals*. 88:171-177.

Poghossian A., Schöning M.J., Schroth P., Simonis A., Lüth H. 2001. An ISFET-based penicillin sensor with high sensitivity, low detection limit and long lifetime. *Sensors and Actuators B*. 76:519-526.

Pollegioni Loredano, Piubelli Luciano, Molla Gianluca. 2009. Cholesterol oxidase: biotechnological applications. *The FEBS Journal*. 276:6857-6870.

Ram Manoj Ku., Bertocello Paolo, Ding H., Paddeu Sergio, Nicolini Claudio. 2001. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. *Biosensors & Bioelectronics*. 16:849-856.

Ricci F., Amine A., Paleschi G., Moscone D. 2003. Prussian blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. *Biosensors and Bioelectronics*. 18:165-174.

Richmond W. 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clinical Chemistry*. 19/12:1350-1356.

Rupprecht Larry. 1999. Electrical conductivity in conjugated polymers. *Conductive polymers and plastics in industrial applications*. Plastic Design Library. Norwich city. United States of America. Pp. 1-9.

Sadana A. 2003. Introduction. *Biosensors: Kinetics of binding and dissociation using fractals*. El Sevier B.V. Amsterdam, Países Bajos. Pp. 1-16.

Shih Ying-Tai, Huang Hsuan-Jung. 1999. A creatinine deiminase modified polyaniline electrode for creatinine analysis. *Analytica Chimica Acta*. 392. 143-150.

Shin Young Jae, Kameoka Jun. 2012. Amperometric cholesterol biosensor using layer by layer adsorption technique onto electrospun polyaniline nanofibers. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 18:193-197.

Singh Suman, Solanki Pratima R., Pandey M. K., Malhotra B. D. 2006. Cholesterol biosensor based on cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase immobilized onto conducting polyaniline films. *Sensors and Actuators B*. 115:534-541.

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.

Solanki Pratima R., Singh Suman, Prabhakar Nirmal, Pandey M.K., Malhotra B.D. 2007. Application of conducting poly (aniline-co-pyrrole) film to cholesterol biosensor. *Journal of Applied Polymer Science*. 105:3211-3219.

Soto-Oviedo Mauro A., Araújo Olacir A., Faez Roselena, Rezende Mirabel C., De Paoli Marco-A. 2006. Antistatic coating and electromagnetic shielding properties of a hybrid material based on polyaniline/organoclay nanocomposite and EPDM rubber. *Synthetic Metals*. 156:1249-1255.

Stasyuk Nataliya, Smutok Oleh, Gayda Galina, Vus Bohdan, Koval'chuk Yevgen, Gonchar Mykhailo. 2012. Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 37:46-52.

Stejskal J., Gilbert R.G. 2002. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer. *Pure and Applied Chemistry*. 74: 857-867.

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.

Sun Lie-Jie, Liu Xiao-Xia, Lau Kim King-Tong, Chen Liang, Gu Wei-Min. 2008. Electrodeposited hybrid films of polyaniline and manganese oxide in nanofibrous structures for electrochemical supercapacitor. *Electrochimica Acta*. 53:3036-3042.

Tahir Zarini Muhammad, Alocilja Evangelyn C., Gooms Daniel L. 2005. Polyaniline synthesis and its biosensor application. *Biosensors and Bioelectronics*. 20:1690-1695.

Tamer Uğur, Seçkin Ali İhsan, Temur Erhan, Torul Hilal. 2011. Fabrication of biosensor base on polyaniline/gold nanorod composite. *International Journal of Electrochemistry*. ID 869742. 7 páginas.

Torabi Seyed-Fakheddin, Khajeh Khosro, Ghasempur Salehe, Ghaemi Nasser, Ranaei Siadat Seyed-Omid. 2007. Covalent attachment of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase on perlite through silanization: Activity, stability and co-immobilization. *Journal of Biotechnology*. 131:111-120.

Trivedi D.C., Dhawan S.K. 1993. Shielding of electromagnetic interference using polyaniline. *Synthetic Metals*. 59:267-272.

Türkarlan Özlem, Kayahan Senem Kiralp, Toppare Levent. 2009. A new amperometric cholesterol biosensor base on poly (3-4-ethylenedioxyppyrole). *Sensors and Actuators B*. 136:484-488.

Vidal Juan C., Garza-Ruiz Esperanza, Castillo Juan R. 2000. Strategies for the improvement of an amperometric cholesterol biosensor based on electropolymerization in flow systems: use of charge-transfer mediators and platinization of the electrode. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 24:51-63.

Vo-Dinh Tuan, Cullum Brian. 2000. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 366:540-551.

Voet Donald, Voet Judith G., Pratt Charlotte W. 2008. Catálisis enzimática y cinética, Inhibición y regulación de las enzimas. *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 312-394.

Wallace Gordon G., Spinks Geoffrey M., Kane-Maguire Leon A.P., Teasdale Peter R. 2009. What are intelligent material systems and structures?. *Synthesis of polyanilines. Properties of polyanilines. Conductive electroactive polymers: intelligent polymer systems*. CRC Press. Boca Raton city, United States of America. Pp. 1-58., Pp. 137-178, Pp. 179-194.

Walter Federle, Werner Baumgartner, Bert Hölldobler. 2004. Biomechanics of ant adhesive pads: frictional forces are rate- and temperature dependent. *The Journal of Experimental Biology*. 206:67-74.

Wang Haiyan, Mu Shaolin. 1999. Bioelectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in a polyaniline film. *Sensors and Actuators B*. 56:22-30.

Weetall Howard H. 1974. Immobilized enzymes. *Analytical Chemistry*. 46:602A-615A.

Willner Itamar, Willner Bilha, Katz Eugenii. 2007. Biomolecule-nanoparticle hybrid systems for bioelectronic applications. *Bioelectrochemistry*. 70:2-11.

Wisitsoraat Anurat, Karuwan Chanpen, Wong-ek Krongkamol, Phokharatkul Ditsayut, Sritongkham Pornpimol y Tuantranont Adisorn. 2009. High sensitivity electrochemical cholesterol sensor utilizing a vertically aligned carbon nanotube electrode with electropolymerized enzyme immobilization. *Sensors*. 9:8658-8668

Yadav J.B., Patil R.B., Puri R.K., Puri Vijaya. 2008. Studies on Spin Coated PANI/PMMA composite thin film: Effect of post-deposition heating. *Applied Surface Science*. Pp. 2825-2829.

Zhao Chun, Xing Shuangxi, Yu Youhai, Zhang Wanjin, Wang Ce. 2007. A novel all-plastic diode based upon pure polyaniline material. *Microelectronics Journal*. 38:316-320.