

CONSTRUCCION DE UN BIOSENSOR AMPEROMETRICO Y SU INSTRUMENTACION USANDO MICROELECTRODOS DE 4 POZOS

Ittalo Pezzotti^{1,2}, Aldo Luperini¹

¹Institute for Biomedical Technology, CNR, Via F.lli Cervi, 93 - 20093 Segrate Milan – Italy

²Department of Electronic University of Rome Tor Vergata Via della ricerca scientifica 00133 Rome Italy. PhD(c) En Ingeniería de sistemas de aprendizaje y sensorica de la Universidad de Roma “Tor Vergata”, Rome-Italy. Email: ittalopezotti@hotmail.com, ittalo.pezzotti@itb.cnr.it

RESUMEN

Este artículo presenta el desarrollo de un sistema de lectura amperométrica usando una Matriz de Micro-electrodos; se busca mostrar una idea general del proceso que fue implementado para un biosensor amperométrico orientado al área comercial. Se muestra la idea conceptual, la interpretación del fenómeno bioquímico, una breve explicación del diseño y la construcción del instrumento. Se muestran además algunos parámetros que se deben considerar y que forman parte de la cadena comercial como: la vista del instrumento con los componentes más importantes y el software de adquisición de datos. Para el desarrollo del sensor se ha utilizado el MEA (Matriz de Micro-electrodos), este dispositivo tiene ciertas características que son aprovechadas para realizar mediciones en el área biomédica y ambiental. Las áreas que están directamente relacionadas con la instrumentación son descritas brevemente, se presentan pruebas de calibración para el sensor, se comparan los resultados obtenidos con un instrumento calibrado de referencia con respecto al instrumento fabricado y por último se realizan algunas pruebas del biosensor MEA con respecto un sensor SPE para verificar que la señal se encuentra dentro de la zona de trabajo.

Palabras clave: MEA, Instrumentación, Amperometría, Sensor, Calibración, Biosensores biomédicos.

Recibido: 6 de noviembre de 2012.
Received: November 6th, 2012.

Aceptado: 15 de febrero de 2013.
Accepted: February 15th, 2013.

CONSTRUCTION OF AN AMPEROMETRIC BIOSENSOR AND INSTRUMENTATION IN MICRO ELECTRODES MEA 4 WELLS

ABSTRACT

This article presents the development of an amperometric analysis system by means of a Micro-electrodes array; the objective is to provide a general idea of the process that was implemented for an amperometric biosensor that will be commercially orientated. Here is shown the conceptual idea, the interpretation of the biochemical phenomenon and a brief explanation of the instrument, its design and construction. Some of the parameters that should be considered as part of the commercial mix are featured: the input software, the design of the instrument and its more important components. MEA (Array of micro-electrodes) has been used for the development of the sensor; this device encloses certain characteristics that may exploit measurements for biomedical and environmental fields. The areas that are directly related to the instrumentation are briefly described, illustration of calibration tests of the sensor, results obtained with a calibrated reference instrument are compared with regard to the manufactured sensor and finally, in order to check if the instrumentation works within the correct range are proposed some tests performed with the MEA biosensor compared to a SPE (Screen Printed Electrodes) sensor.

Keywords: MEA, Instrumentation, Amperometry, Biomediator, Calibration, biomedical Biosensors.

1. INTRODUCCION

El objetivo principal consiste en el desarrollo de biosensores amperométricos de bajo costo y larga durabilidad del material inmovilizado con sensores basados en micro electrodos. Estos sensores serán usados para asociar concentraciones de sustancias que se desean identificar de forma electroquímica. Otra ventaja de usar estos dispositivos consiste en que la configuración de los electrodos puede ser usada para la lectura de otras variables en células o enzimas como resistencia, impedancia y conductometría, la figura (1) muestra el concepto aplicado al MEA. Para esto se mostrará el proceso y la instrumentación necesaria para la lectura de las señales amperométricas en micro electrodos [1].

Los biosensores son sensores modificados biológicamente que nos permiten identificar, transformar y cuantificar un evento biológico de los transductores químicos y mejorar la selectividad de los bioreceptores [2]. La geometría de este modelo permite utilizar la totalidad del número de electrodos en la superficie, la figura (2a) muestra la disposición de los electrodos para producir la amperometría incluyendo rangos y potenciales con el electrodo externo; la figura (2b), muestra la distribución electrónica de los electrodos de uno de los pozos del MEA.

Para el sensor MEA [3] (arreglo de micro electrodos) se han analizado distintas sustancias

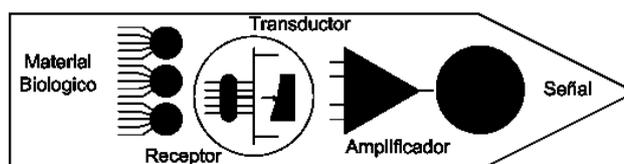


Fig. 1. Concepto de sensor amperométrico

comparando las señales con electrodos estándar SPE (Screen Printed Electrodes), donde se han desarrollado distintos instrumentos de medición amperométrica y varias aplicaciones [4]. Para obtener electrodos multienzimáticos y mejorar la sensibilidad, selectividad y mantener una buena conductividad es necesario disminuir al máximo el valor de la relación señal/ruido. La figura (4a) muestra la distribución de los contactos ordenados de las zonas conductoras, que sumadas aumentan el área del electrodo. Para mejorar la corriente se debe tener en cuenta que al tomar un electrodo plano de geometría arbitraria rodeado por un plano aislante semiinfinito en una solución quiescente, de modo que el único mecanismo de transporte de masa es la difusión, la dependencia de los tiempos cortos de la corriente limitada por difusión es la que derivó Oldham (1981) y que se ve en la ecuación 2, donde A y P son el área activa, y el perímetro del electrodo respectivamente.

$$i = nFDC \left[\frac{A}{(\pi Dt)^{1/2}} + \frac{P}{2} + \dots \right] \quad (1)$$

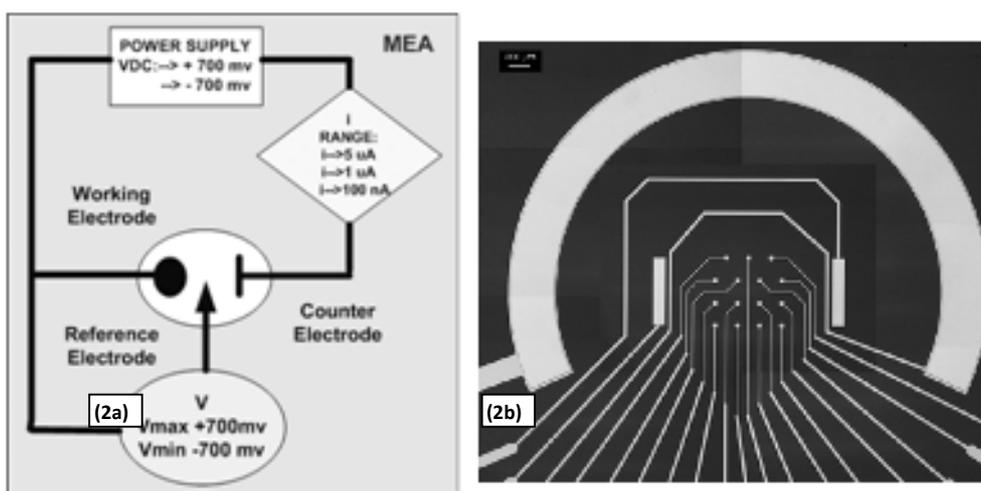


Fig. 2. Funcionamiento sensor amperométrico

2. MATERIALES Y MÉTODO

El sistema está integrado por la componente bioquímica, la instrumentación y el tratamiento de la información. En la componente bioquímica se encuentran los protocolos de extracción, la conservación y la deposición del material. El instrumento está compuesto así: etapa de acople del sensor MEA, como se observa en figura (3); la estructura física, el sistema eléctrico que proporciona las distintas fuentes de alimentación, las tarjetas electrónicas y los periféricos, como: motores, teclado y display entre otros. En el software están todas las interfaces como: el firmware para el microcontrolador, la terminal para la operatividad del instrumento, las bases de datos, el software de adquisición y presentación de datos y las interfaces que operan en la red de internet.

2.1. Componente bioquímica

El elemento de reconocimiento biológico para la aplicación serán las enzimas la tirosinasa y lacasa. El sistema de inmovilización se lleva a cabo dopando la superficie con una mezcla de la enzima a ser fijada, agregando el intercambiador iónico nafion, como aditivo protector que proporciona una buena estabilidad térmica. El método se puede adaptar para el atrapamiento e inmovilización de distintas sustancias biológicas.

2.2. Fabricación y uso del (Mea 4w)

Una de las características importantes de este soporte configurado como sensor de amperometría, radica en la facilidad para las operaciones en estado estático, y la configuración de los electrodos para cubrir la superficie como se ve en la figura (4), otra ventaja que ofrece este sistema es que existe homogeneidad en los contactos en su totalidad en oro [6]. Existe una desventaja al implementar el sistema y consiste en insertar un electrodo en otro material para que se produzca la amperometría. Para esta aplicación se han seleccionado 4 electrodos en Ag/AgCl. Otra buena característica es que el sensor puede usarse durante periodos de aproximadamente 1 año con aproximadamente un número de 250 mediciones amperométricas, en espacios de 3 a 5 ciclos con duraciones de 10 a 15 minutos por ciclo.

INTEGRACION DEL SISTEMA

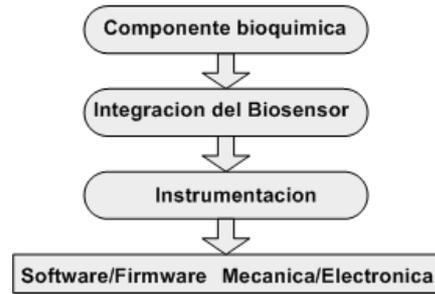


Fig. 3. Pasos para la integración del sistema

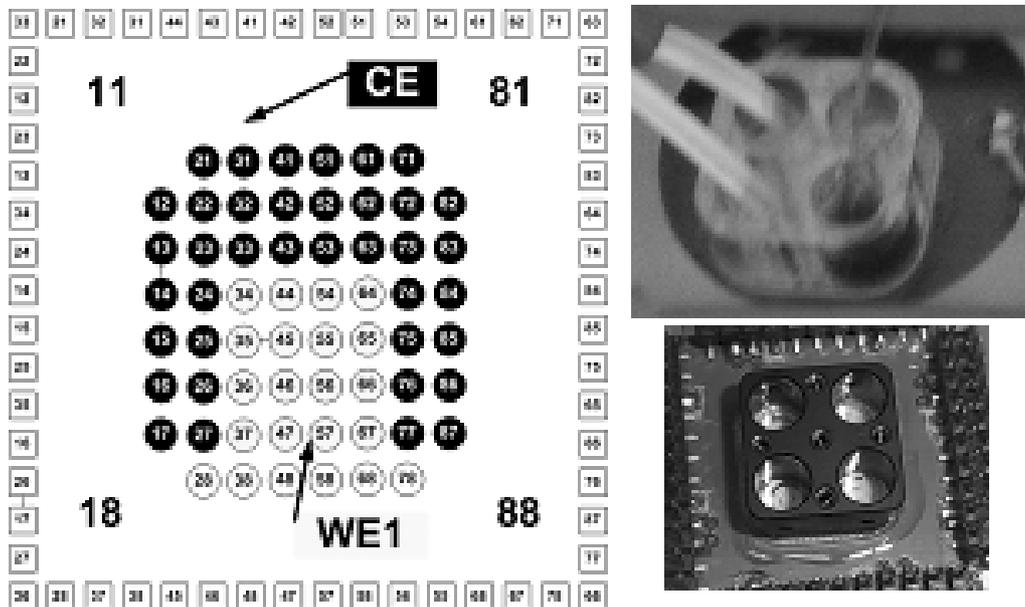


Fig. 4. Distribución de electrodos en 1 pozo

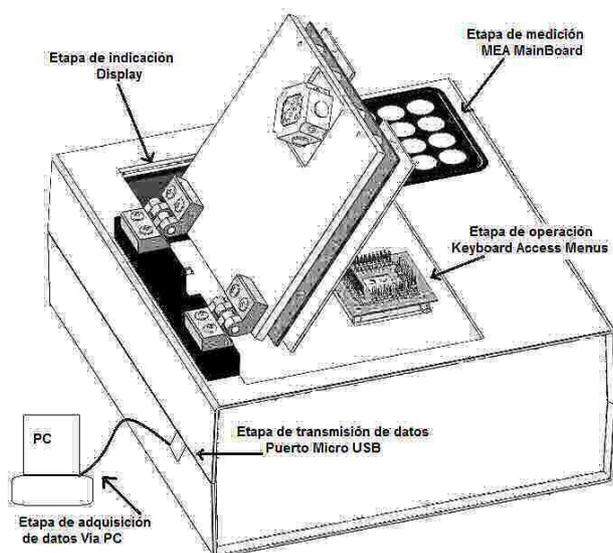


Fig. 5. Vista del instrumento y componentes

2.3. Diseño de la instrumentación

Una característica en el diseño es la precisión cuando se realiza la medición. El instrumento está integrado así: Etapa de medición donde se inserta el MEA en un socket y se registra la señal, etapa de indicación en la cual se observan los valores relacionados con tensión y corriente en la pantalla (display), etapa de operación permite a través del teclado (keyboard) acceder a varios programas dentro de cada menú, y por último la etapa de transmisión de datos vía Micro USB conectado al computador, para que se realice la adquisición de datos, las etapas están representadas en la figura (5). El sistema provee para este proceso tres sistemas de indicación: el primero será directo a través del Display, el segundo se encuentra en la medición de voltajes y corrientes de referencia con un multímetro de banco, y el tercero a través de la terminal de datos, usando la puerta USB.

La etapa de medición compuesta por el Socket permite polarizar cada pozo de acuerdo al potencial de cada aplicación, y se realizará la lectura de corriente utilizando 3 escalas de medición así: 500 nA, 1 uA, 5 uA, este circuito estará integrado con una etapa de amplificación, que entrará a un conversor Análogo Digital y será manejado por el microcontrolador para realizar el procesamiento de los datos antes de su envío al PC y estará integrado en una tarjeta electrónica [7].

2.4. Distribución eléctrica alimentación

Para que el instrumento pueda operar de manera segura, es necesario generar una tensión estable y buena corriente para cada voltaje, debido a que algunos componentes como: motores, la bomba de aire, y otros elementos, pueden calentar los reguladores o provocar caídas de tensión en los otros componentes dentro del instrumento, para evitar esta clase de problemas se ha utilizado una fuente conmutada con 4 salidas así: 5 VDC, 12 VDC, 24 VDC y 220 AC que proporciona estabilidad de forma independiente en los circuitos internos del sistema.

2.5. Desarrollo Mecánico

Para el desarrollo mecánico se ha utilizado un contenedor estándar (caja cuadrada) cuyo panel frontal se puede desmontar fácilmente, esto permite la maleabilidad de los componentes que integran el instrumento, de igual forma el panel posterior es desmontable y contiene los elementos de protección eléctrica como: interruptor, motores, fusibles y otros accesorios. Internamente estarán depositadas las tarjetas electrónicas y en la parte superior el socket para insertar el MEA [8].

2.6. Desarrollo del software

En el desarrollo de software están contemplados todos los programas que conforman la plataforma, entre ellos se encuentran: el firmware, el software, la terminal de datos y el sistema central de datos. El firmware es el conjunto de instrucciones y programas que se encuentran dentro del microcontrolador y que permiten la comunicación con cada uno de los circuitos integrados de la "mainboard" y de los periféricos externos. El software está compuesto por varios subprogramas que permiten el acceso a la información, la configuración del proceso de adquisición de datos, la presentación de gráficos y la clasificación de la información en la base de datos. La terminal es un programa único que permite configurar el puerto con la velocidad y permite acceder al instrumento en modo comandos.

3. DESARROLLO

3.1. Matriz de micro electrodos (MEA) chip

El sensor MEA tiene algunas características importantes basadas en la homogeneidad del material durante el proceso de fabricación en este caso oro [9], la impedancia está comprendida entre 80-150 kΩ, matriz de 4x4 y diámetro de cada

electrodo de 40 μm. La configuración permite obtener 8 electrodos de trabajo y 8 contra electrodos en los cuales varían las distancias y superficies, para realizar distintas pruebas de amperometría, como se observa en figura (4).

3.2. Integración Mecánica y electrónica

La integración mecánica está compuesta por dos etapas: la primera está asociada a la construcción de las partes del instrumento e instalación de los componentes, la segunda está comprendida por los elementos que contribuyen a realizar la medición del sensor y el instrumento, como: celda de flujo estático y dinámico, adicionalmente los accesorios para el transporte de flujo. En el desarrollo electrónico existen aspectos que ayudan a realizar una dimensión característica de acuerdo a lo que se necesita, obsérvese la tabla (1).

Tabla 1. Requerimientos y necesidades del instrumento

Necesidades	Requerimientos
<ul style="list-style-type: none"> Indicación por display. Selección de menús por teclado. Manejo de tiempo y fecha. Transmisión de datos USB. Control de iluminación. Medición de amperometría. Manejo de motor. 	<ul style="list-style-type: none"> Bajo consumo de corriente. Fácil conexión plug and play. Circuito para manejo de carga. Control de motor con velocidad variable. Manejo de rangos de amperometría. Dimensión pequeña.

Una vez cubiertas las necesidades y los requerimientos se procede al diseño de la “mainboard”, con los periféricos descritos y otros para futuras conexiones. Pará cubrir estas necesidades se optó por construir una tarjeta de control donde se encuentra el microcontrolador que será el STM32, donde se encuentran algunos componentes básicos como el reloj, la puerta de comunicación USB, los puertos de entrada y puertos de salida, el teclado y el display entre otros [10]. Para la lectura de las señales amperométricas se ha diseñado otra tarjeta en la cual se han integrado los amplificadores para cada pozo, los potenciómetros para realizar el ajuste fino, el ADC conversor análogo digital, un DAC conversor digital análogo, un expansor de puertos y una etapa de acondicionamiento de la señal. Para el manejo del flujo se ha utilizado una tercera tarjeta donde se encuentra integrada la parte de potencia, en la cual están incluidos dos drivers para el control de los

motores, la conexión para el control de los “timers” y los reguladores para usar motores de hasta 24 voltios.

A continuación se explicaran algunos circuitos útiles: El primero es el circuito básico que conforma el potencióstato para realizar la medición de corriente amperométrica y se encuentra integrado en la tarjeta de señales, el funcionamiento y la representación se observan en la figura (6).

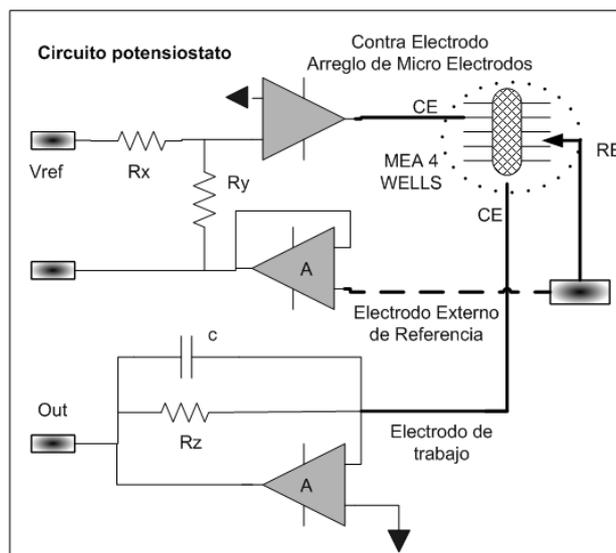


Fig.6. Circuito para la medición de amperetría

En la figura (7) se describen los componentes más importantes para el manejo y adquisición de señales, también se explicarán algunos componentes y su funcionamiento. El MPC23016, dispositivo que ofrece 16-bit, de propósito general, expansión I/O para aplicaciones y usa el bus I2C. Este dispositivo tiene alta capacidad para manejo de corriente y se usa cuando sirve adquirir más pines para el control o manejo de periféricos. El AD7734 es un conversor de alta precisión, tiene 16-bit de resolución y se puede lograr con un tiempo de conversión total de 500 ms (2 kHz conmutación de canales), lo que es idealmente adecuado para las aplicaciones de conmutación de alta resolución, la calibración se logra mediante la ecuación 2, es usada para rangos unipolares donde se busca reducir el error de “offset” y el error de ganancia.

$$\begin{aligned}
 \text{Data} = & ((\text{ADC result} - \text{ADC ZS Cal. reg.}) & (2) \\
 & \times \text{ADC FS Reg./200000h} - \text{Ch. ZS Cal. reg.}) \\
 & \times \text{Ch. FS Cal. reg./200000h}
 \end{aligned}$$

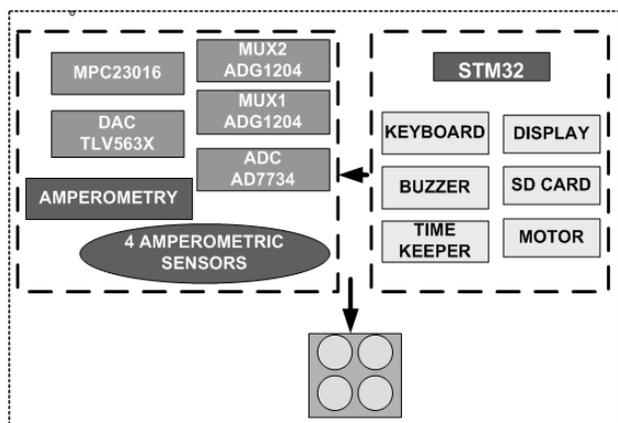


Fig. 7. Vista de los integrados más importantes

3.3. Integración del software

Se presenta una visión global de lo que debe contener esta sección para un software proyectado de forma comercial. Para esto se deben tener cuatro aspectos que van vinculados desde el marketing hasta el funcionamiento, el primero es brindar un programa que permita la interacción directa con el instrumento y posea funciones simples de comunicación salvando los datos de la medición, se denomina (Terminal) representada en la figura (8), este conjunto de programas no trata los datos, se entrega de forma gratuita con el instrumento, la estructura está definida así: Incluir menú o simplemente un formulario, en el formulario se cargan las funciones principales como: abrir puerto, configurar puerto y cerrar puerto. En estos eventos se modifican la velocidad de transmisión de datos, el puerto seleccionado y el modo de transmisión.

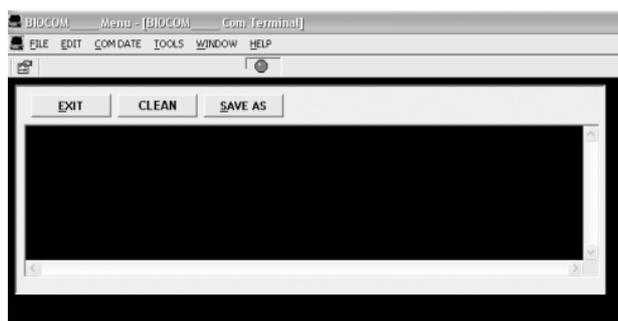


Fig. 8. Pantalla terminal de comunicación

Para el desarrollo del software se deben considerar más elementos a tener en cuenta como la clasificación de la información, la actualización online del software, la seguridad del sistema entre otras. Lo que se recomienda es iniciar con los

objetivos orientados al software, el desarrollo de los menús, los requerimientos y las funcionalidades. Una vez aclarados estos puntos se puede realizar el modelamiento de los datos, los casos de uso, diagramas UML [11], diseño de las interfaces y creación de las bases de datos del sistema. Para este caso utilizaremos el menú Archivo y menú Edición, para el tratamiento de los archivos de texto y para adjuntar información al sistema, se agregarán dos menús para realizar las pruebas del instrumento (menú Instrumento) y para realizar la adquisición (Menú Medición), el tratamiento y presentación de las curvas de amperometría (menú Gráficos) y por último dos menús que serán el menú Usuarios, para administrar permisos y reportes y el Menú Ayuda, donde se accederá a los documentos [12].

3.4. Integración del firmware

El firmware es un programa con un funcionamiento distintivo, debido a que está grabado dentro del microcontrolador, el cual maneja los recursos de memoria, direcciones y puertos del mismo. Una de las funciones principales a la hora de diseñar un firmware es identificar cada uno de los chips importantes dentro de la tarjeta madre, y asociarlos como un driver, esto permite adicionar o retirar de manera versátil código cada que se genera una nueva aplicación de rutinas e integrados [13]. Para el manejo de esta aplicación se describirán brevemente algunos chips, ADC7734, DAC TLV5630, driver para el motor TA8435, el reloj RTCM41 entre los más importantes, adicionalmente se deben agregar los drivers para el "display", "keyboard" y el "buzzer". En el menú principal se encuentran las rutinas que contienen los menús mostrados en el display y al acceso a dichos programas, el acceso a los menús cargados desde la terminal, y la programación en modo comandos para realizar programas con los periféricos de manera rápida [14]. Usando el ADC/DAC es posible seleccionar 4 valores distintos de potenciales para cada pozo cuyos rangos van desde +1000 mV hasta -1000 mV. De la misma forma se puede seleccionar el rango de lectura: 5 uA, 1 uA y 500 nA. Para la aplicación fotosintética se usa el integrado TLC5923 que sirve para seleccionar la intensidad de la luz en el material fotosintético.

4. CALIBRACION AMPEROMÉTRICA

Cuando el instrumento se encuentra listo, se conecta el sensor (MEA) en conjunto a la

componente bioquímica y se completa la integración del sistema, para esto es necesario asegurar y verificar que la señal que se está midiendo sea igual a la señal que se está recibiendo [15]. Existen algunos métodos para asegurar estos parámetros como la exactitud, que es la medición de la salida del sensor más cercana al valor real, y se calcula mediante la ecuación 3.

$$Ea(\%) = 100 \frac{X_m - X_v}{X_v} \quad (3)$$

Si en cambio existe un error se debe conocer el tipo de error que existe, su identificación en el sistema y desarrollar un método que permita corregirlo, para este motivo se desarrolló una tarjeta que permite seleccionar los pozos del MEA y ajustar los potenciales y corrientes para cada rango como se muestra en la figura (9).

Las características para la medición serán divididas así: número de pozos dentro del MEA (4), electrodos de trabajo (2, WE1, WE2), potencial de trabajo (-1000 mV a 1000 mV), rangos de corriente amperométrica (3, Rca1: 500 nA, Rca2: 1 uA, Rca3: 5 uA).

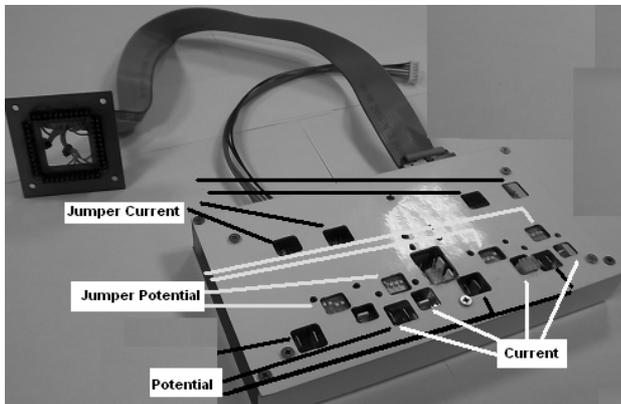


Fig. 9. Sistema de calibración MEA4W

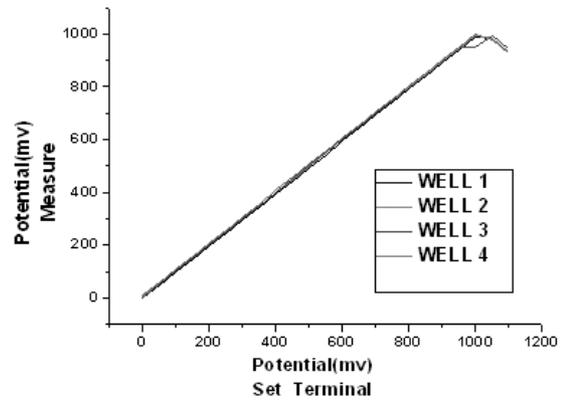


Fig. 10. Calibración potenciales 0-1000 mV

La figura (10) representa la linealidad del potencial para los 4 pozos, se representa entonces la adquisición respecto a la medición, nótese que el error es incrementado en los extremos, por este motivo la escala recomendada está comprendida entre: ± 10 mV hasta ± 950 mV. En la figura (11) se muestra el circuito utilizado para realizar la medición de tensión y corriente para cada uno de los pozos.

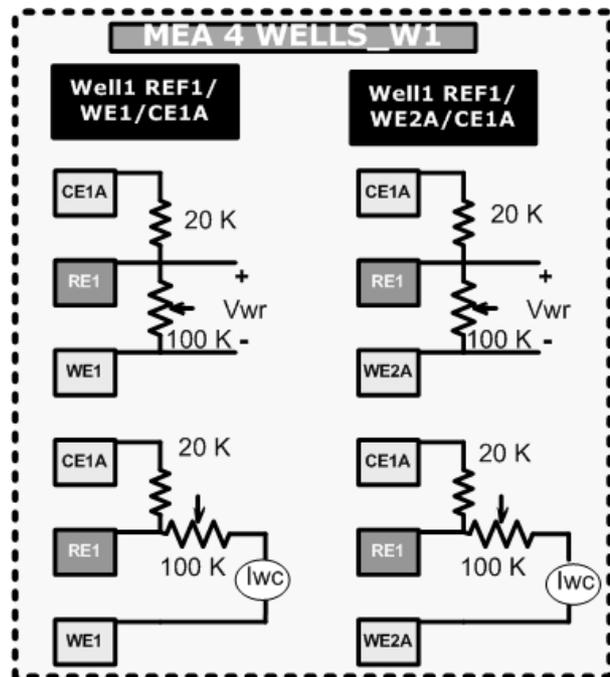


Fig. 11. Circuito de calibración Tensión/Corriente

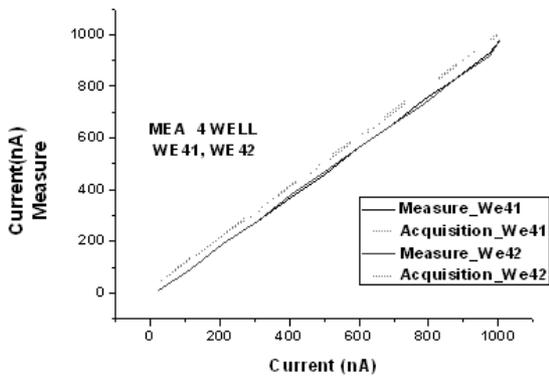


Fig. 12. Respuesta sensor amperométrico.

Como se muestra en la figura (12) la medición de los valores de tensión para cada electrodo de trabajo del pozo 4, en el rango de 1 uA, contiene un error de tipo sistemático y lineal, como se muestra en las figuras las líneas permanecen paralelas, este error se puede corregir, calculando el error de cero (aproximadamente 50 nA) que es un valor despreciable en la escala de 1uA. Una vez conocida la respuesta del sensor para cada estímulo provocado en la escala de voltaje y la escala de corriente, se obtienen las curvas del sensor con los respectivos errores.

Una vez que son identificados los errores o la desviación de la lectura amperométrica y potencial de operación del sensor, se procede al ajuste del instrumento agregando en el menú dentro del firmware las funciones necesarias para realizar el ajuste.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En esta sección se evaluarán 3 aspectos que están relacionados directamente con la construcción y desarrollo del instrumento. El primer aspecto está relacionado con la respuesta del sensor, y se compara el MEA con otro tipo de electrodo con la misma aplicación. El segundo aspecto está relacionado con las escalas de corriente que puede registrar el instrumento con respecto a otros instrumentos usando el mismo sensor. A continuación se explicará la aplicación ambiental y biomédica del sensor.

5.1. Preparación del material biológico

Para las pruebas del sensor y la comparación del instrumento se utilizan dos enzimas que son muy

comunes la tirosinasa y la lacasa, para la identificación de pesticidas y venenos usaremos las membranas tilacoidales [16].

5.2. Material usado en la aplicación biomédica

Una de las expectativas del desarrollo del MEA entre las varias aplicaciones consiste en probar el sensor y obtener una curva de concentración que permita verificar si la concentración de las catecolaminas en el sangre es alta o baja para realizar un pre-análisis de la muestra y determinar si el paciente requiere un análisis más profundo. Entre las aplicaciones en el MEA, de acuerdo a configuración permite utilizar muestras de sangre, orina y heces, con distintas enzimas al mismo tiempo, como se muestra en la figura (13), uno de los objetivos es buscar presencia de sustancias que están asociadas a desordenes hormonales, para identificar algunas enfermedades o parámetros que no se encuentran dentro de los límites médicos. Se pueden determinar las catecolaminas en la sangre como: la adrenalina y la dopamina [17].

Utilizando la configuración anterior se han obtenido los gráficos correspondientes a los valores de la potenciometría cíclica para cada una de las sustancias. La primera curva representa el potencial para la l-dopa con un valor de + 219 mV y de - 282 mV para la adrenalina. La curva de calibración del sensor representa el rango examinado que corresponde a 2.1 ug/l - 6.5 ug/l que es la concentración normal de catecolaminas en el plasma humano. Se realizaron varias curvas de preliminares con buffer fosfato a pH 4.6 para encontrar el potencial de oxidación-reducción. Las mediciones se realizaron depositando sobre los electrodos inicialmente una solución de lacasa 8.5 mg/8 ml y agregando en pasos subsiguientes concentraciones crecientes de l-dopa, figura (14).

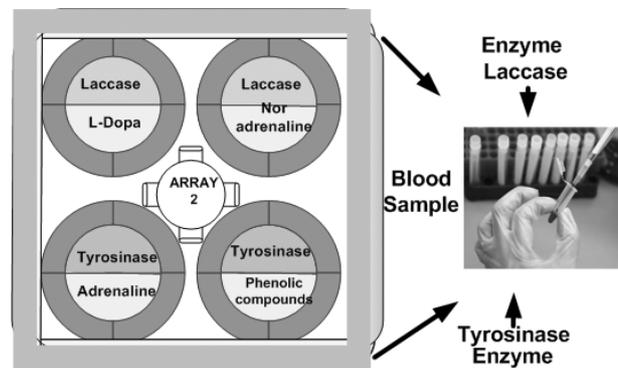


Fig. 13. Configuración del MEA para una aplicación

Resultados tirosinasa en MEA

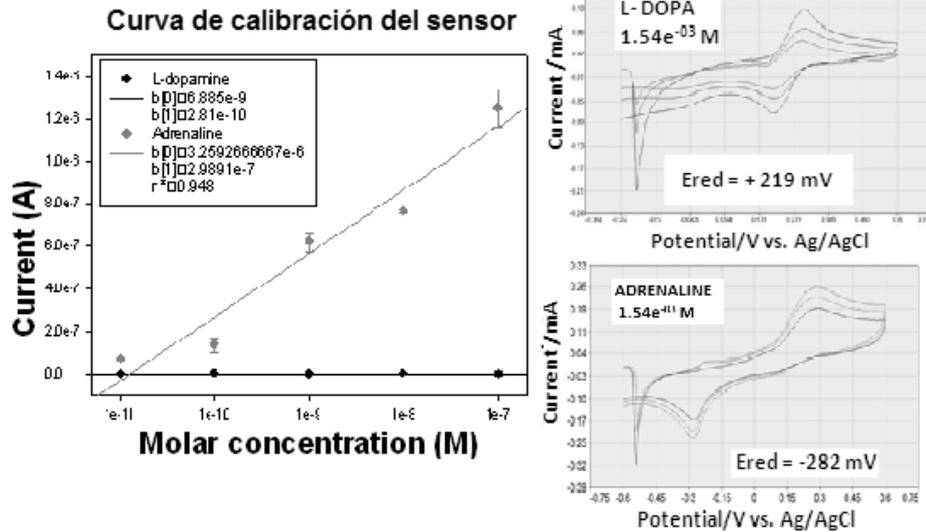


Fig. 14. Concentración de catecolaminas

5.3. Material usado en la aplicación ambiental

En la aplicación ambiental se utilizan las mismas enzimas, para determinar la presencia de compuestos fenólicos. También se utiliza el fotosistema a través de las membranas tilacoidales para determinar la presencia de venenos o pesticidas en alimentos [18].

5.4. Selección del electrodo externo

Como se explicó en otro artículo [19], el electrodo de referencia externo en Ag/AgCl que se ha seleccionado servirá para generar la amperometría.

5.5. Respuesta del Biosensor

Para la inmovilización del material, se ha utilizado el Nafion que proporciona una buena estabilidad térmica, se ha evaluado la respuesta del biosensor utilizando la misma enzima en cada sensor, inmovilizando la lacasa y la tirosinasa sobre la superficie del electrodo, se han comparado las respuestas en el sensor SPE en la figura (15) y el sensor MEA figura (16), obteniendo la curva de potenciometría cíclica que permite identificar el potencial de trabajo sobre el electrodo específico, utilizando un instrumento potenciostato certificado.

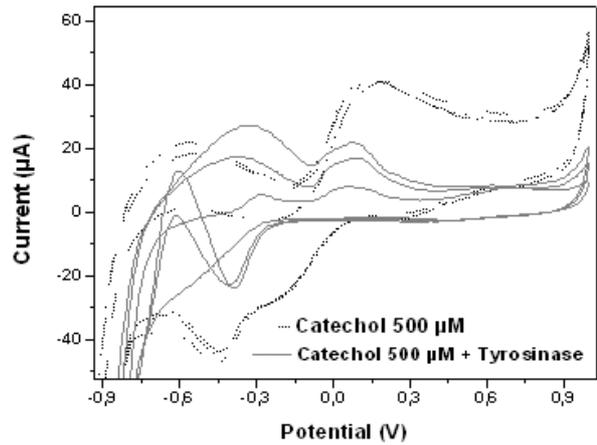


Fig.15. Potenciometría cíclica sensor SPE

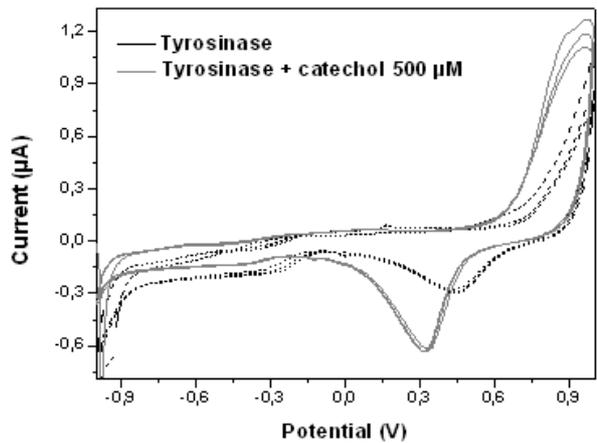


Fig. 16. Potenciometría cíclica sensor MEA 4W

Para las pruebas de potenciometría los parámetros usados son: enzima lacasa Trametes versicolor 270 U/μl (2 μl para obtener una actividad final de 2.7 U), buffer 0.1 M PBS pH 4.5, volumen del MEA: 200 μl, sustrato: catecol 10 mM (10 μl para obtener una concentración final de 500 μM). Para la segunda enzima tirosina Agaricus bisporus 170 U/μl (2 μl para obtener una actividad final de 1.7 U), buffer: 0.1 M PBS pH 6.5, volumen del MEA 200 μl, sustrato catecol 10 mM (10 μl para obtener una concentración final de 500 μM).

5.6. Respuesta amperométrica de los sensores

Para verificar la respuesta de cada uno de los sensores se utilizó el mismo método, y se probaron distintos instrumentos certificados, como se muestra en la figura (17).

Para las pruebas y mediciones enzimáticas, se utiliza el mismo protocolo antes mencionado.



Fig.17. Instrumentos para probar los sensores

En el procedimiento de medición amperométrica de los sensores SPE y MEA se procede de la siguiente manera:

- Agregar en la medición de la célula 200 búferes de μl.
- Agregar 2 μl de enzima 270 U (2.7 U actividad final) y mezclar suavemente.
- Esperar 5 minutos para estabilización actual.
- Añadir 10 μl de analito de destino 1 mM (concentraciones finales de 100 μM).
- Registro actual durante 10 minutos.

La respuesta está representada en la figura (18).

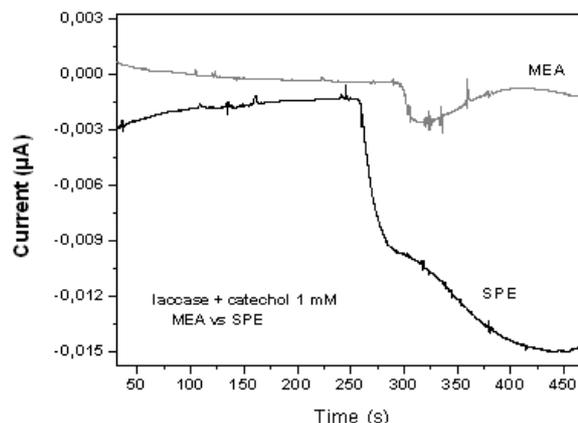


Fig. 18. Medición amperométrica MEA vs SPE

6. CONCLUSIONES

Es importante la determinación del fenómeno bioquímico en el desarrollo del sensor; para el diseño del mismo se deben tener en cuenta el método de medición y la sensibilidad; esto se determina realizando pruebas externas con otros sistemas de referencia. Para el desarrollo electrónico se deben conocer los rangos de potenciales y los rangos de corrientes de amperometría para el sensor MEA desarrollado. Las pruebas de carga en el MEA en el rango de voltaje muestra la característica lineal después del 10% de la escala y hasta el 90% de la misma donde los valores son más precisos. Las pruebas realizadas en el rango de corriente para la escala nA, presenta un error de paralelismo de fácil corrección. Las pruebas realizadas entre el instrumento de referencia y el instrumento diseñado presentan repetitividad, y precisión con el material biológico probado. Lo ideal en cuanto a la fabricación del sensor sería integrar el electrodo externo directamente dentro del MEA, sin embargo el problema está asociado a los costos de fabricación.

7. AGRADECIMIENTOS

Al grupo del instituto de cristalografía del concejo nacional de investigación italiana (CNR), en el proyecto de aplicaciones agro alimentarias.

8. REFERENCIAS

- [1] Rawal R, Chawla S, Malik P,. An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto MnO₂NPs/cMWCNT/PANI modified Au electrode. *Int J Biol Macromol.* 2012 Jul-Aug;51(1-2):175-81. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.11.022.
- [2] Jitendra Kumar and S. F. D'Souza, biosensors for Environmental and Clinical Monitoring, *Barc newsletter issue no. 324* i jan. - feb. 2012.
- [3] P.J. Koester, C. Tautorat, Dielectrophoretic Positioning Of Cells For The Measurement Of Intracellular Potentials Using Kidney- Shaped Electrodes, July 8-11, 2008.
- [4] Scognamiglio, Pezzotti, Cano, Giardi, "Biosensors for Effective Environmental and Agrofood Protection and Commercialization: from research to market", *Microchimica Acta*, SpringerLink ISSN 0026-3672, Jan 2010.
- [5] Scognamiglio, Pezzotti, Manfredonia, Giardi (2012) Micro-Electrodes Array (MEA) technology in the development of a biosensor platform for food analysis. *Analytical and Bioanalytical.*
- [6] Sezgintürk MK, Odaci D. Construction and comparison of Trametes versicolor laccase biosensors capable of detecting xenobiotics. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.*2010 Aug;38(4):192-9. PMID: 20380615.
- [7] STM-P103 development board, Users Manual, Rev.A, April 2008, Copyright(c) 2008, OLIMEX Ltd, All rights reserved.
- [8] Ittalo Pezzotti, Biosensors based on microarray and nanowire systems:study, design, construction, calibration and applications, construction of the instrument , *Learning And Sensor Systems Engineering*, University "Tor Vergata, June 2012.
- [9] Belluzo, Ribone and Lagier, Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics sensors, ISSN 1424-8220, 2008, 8, 1366-1399.
- [10] STM32F103x8, STM32F103xB, Medium-density performance line ARM-based 32-bit MCU with 64 or 128 KB Flash, USB, CAN, 7 timers, STMicroelectronics.
- [11] Scott W. Ambler, The enterprise unified process extendering, Charper I, Charper II, 2004-2009.
- [12] Ian Sommerville 2010 *Software Engineering*, 9th edition. Chapter 1,2. ISBN13: 9780137053469 ISBN10: 0137053460
- [13] *Embedded Systems: World Class Designs*, Jack Ganssle, 2008, el sevier,ISBN: 978-0-7506-8625-9.
- [14] Gary Stringham, *Hardware/Firmware Interface Design Best Practices for Improving Embedded Systems Development [Charper Design]*.
- [15] *Amperometric Instrumentation System with On-chip Electrode Array for Biosensor Application*, Lin Li, Waqar A. Qureshi, Michigan State University, E. Lansing MI, USA 978-1-4244-7268-0/102010 IEEE.
- [16] Rea, Polticelli, Antonacci, Lambreva, Pastorelli, Giardi; *Computational Biology, Protein Engineering, and Biosensor Technology: a Close Cooperation for Herbicides Monitoring*; Source: *Herbicides, Theory and Applications* ISBN 978-953-307-975-2, Publisher: InTech, January 2011.
- [17] Manjunatha R, Shivappa G, Melo JS. An amperometric bienzymatic cholesterol biosensor based on functionalized grapheme modified electrode and its electrocatalytic activity towards total cholesterol determination. *Talanta.*2012 Sep 15; 99:302-9. doi:10.1016/j.
- [18] Ibarra Escutia. "Determinación de fenólic content area, in natural extracts by enzymatic sensors", Mexico, August, 2010, thesis, C III.
- [19] Ittalo Pezzotti, Eleftherios Touloupakis, Gianni Pezzotti, Katia Buonasera, Multiparametric system for biosensing technologies applications based on microarray electrodes, *Politecnica magazine*, Year 7, n° 13, page 107- 116 Medellin, 18 December 2011, ISSN 1900-2562.