

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS SOBRE NANOMATERIALES DE CARBONO Y SU APLICACIÓN EN BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS Y PROCESOS BIOELECTROCATALÍTICOS.



Tutor: D. Vicente Montiel Leguey
Director: D. Jesús Iniesta Valcárcel

Naiara Hernández Ibáñez



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



INSTITUTO
DE ELECTROQUÍMICA





1.INTRODUCCIÓN

■ Biotransformaciones

- Reacciones catalizadas por enzimas en las cuales se encuentra involucrado un sustrato no natural.

Problemas

- Alto Coste
- Baja estabilidad de la enzima



Retos

- Reducción de la cantidad de enzima
- Aumento estabilidad de la enzima
- Resistencia de la enzima bajo cambios de T,P...



Posibles soluciones

Inmovilización de enzimas



1.INTRODUCCIÓN

■ Inmovilización de enzimas





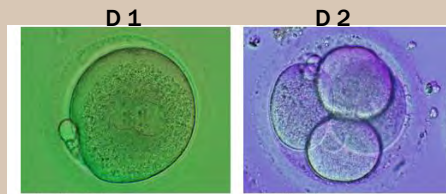
1.INTRODUCCIÓN



Medios de cultivo embrionario

Cambios metabolómicos → reflejan la calidad y viabilidad del embrión para ser transferido

Fases de la división embrionaria



Óvulo fecundado

Embrión de 4 células



Embrión de 8 células



Blastocito



Embrión eclosionando

biomarcadores de una
proliferación celular
adecuada

Lactato

Glucosa

monitorización
biomarcadores
tiempo real y/o *in situ*



Biosensor
electroquímico



1.INTRODUCCIÓN



Organización Meteorológica Mundial

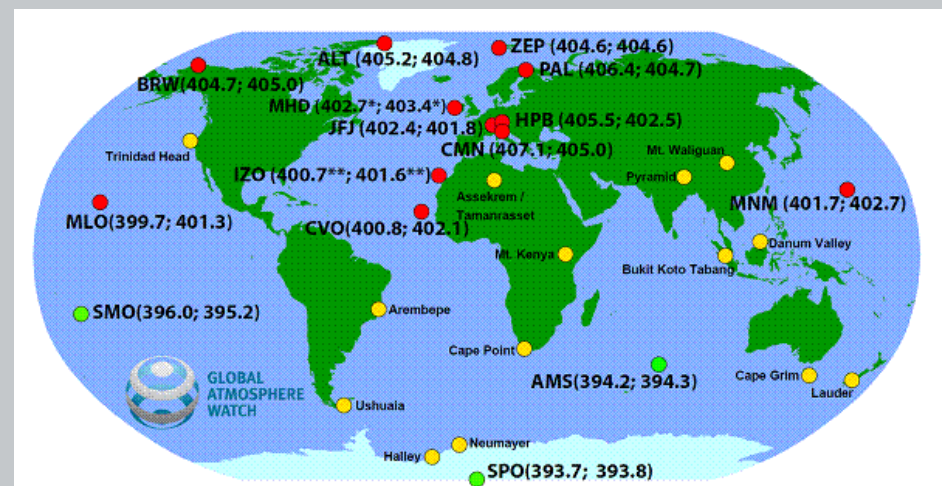
Tiempo • Clima • Agua

Las concentraciones de CO_2 superan 400 partes por millón en todo el hemisferio norte

Ginebra, 26 de mayo de 2014 (OMM) – Por primera vez, las concentraciones mensuales de dióxido de carbono (CO_2) en la atmósfera superaron el umbral de 400 partes por millón (ppm) en todo el hemisferio norte el pasado mes de abril. Ese umbral reviste una importancia simbólica y científica y refuerza la evidencia de que la combustión de combustibles fósiles y demás actividades humanas son las responsables del incremento constante en los gases de efecto invernadero que atrapan el calor y calientan el planeta.

Fracciones molares preliminares de CO_2 en las estaciones mundiales de la Vigilancia de la Atmósfera Global(VAG) (marzo y abril de 2014)

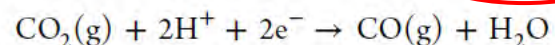
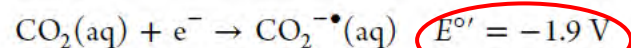
Comunicado de prensa N° 991 publicado en:
http://www.wmo.int/pages/mediacentre/press_releases/pr_991_es.html



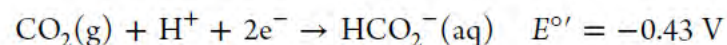


1.INTRODUCCIÓN

■ Reducción electroquímica de CO₂ a ácido fórmico.



$$E^{\circ'} = -0.52 \text{ V}$$



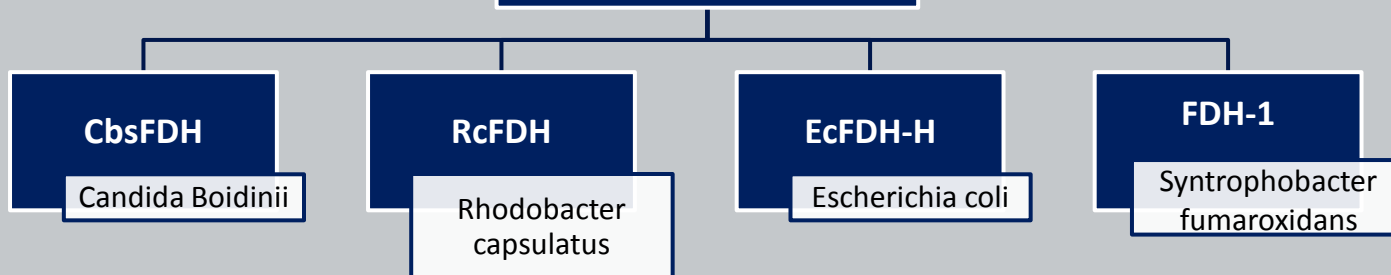
✗ Ineficientes energéticamente

✗ Producen mezcla de productos



Empleo de enzimas como alternativa a la reducción de CO₂

Enzimas para la reducción de CO₂ a ácido fórmico





2.OBJETIVOS



Estudiar distintos materiales carbonosos para inmovilización de enzimas.

Fines Electroanalíticos

Procesos bioelectrocatalíticos

Biosensor de metabolitos en medios de cultivo embrionario

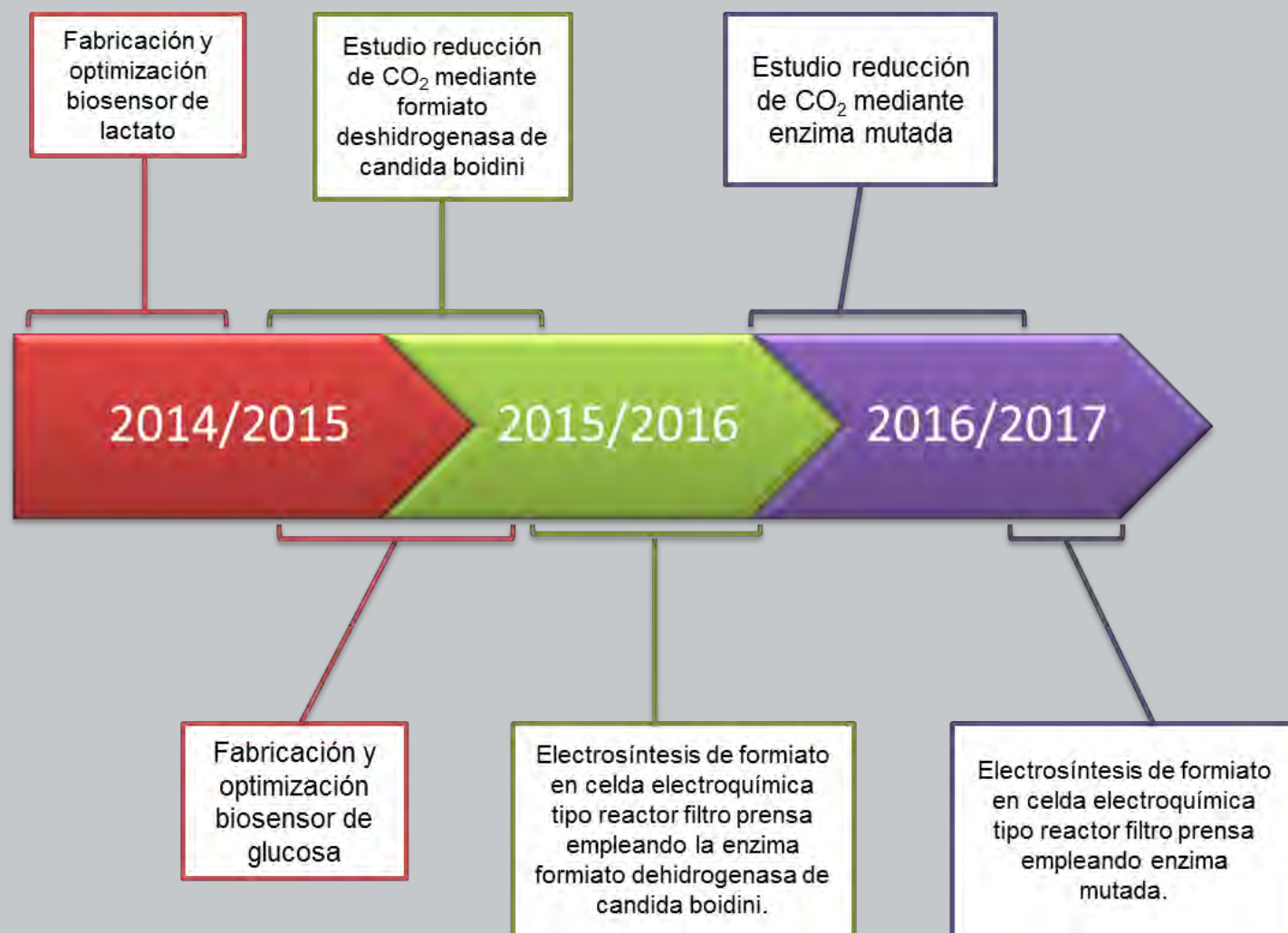
Reducción de CO_2 a ácido fórmico a escala laboratorio y prepiloto



Estudiar la influencia de las propiedades estructurales y texturales de los materiales de carbono sobre la inmovilización.

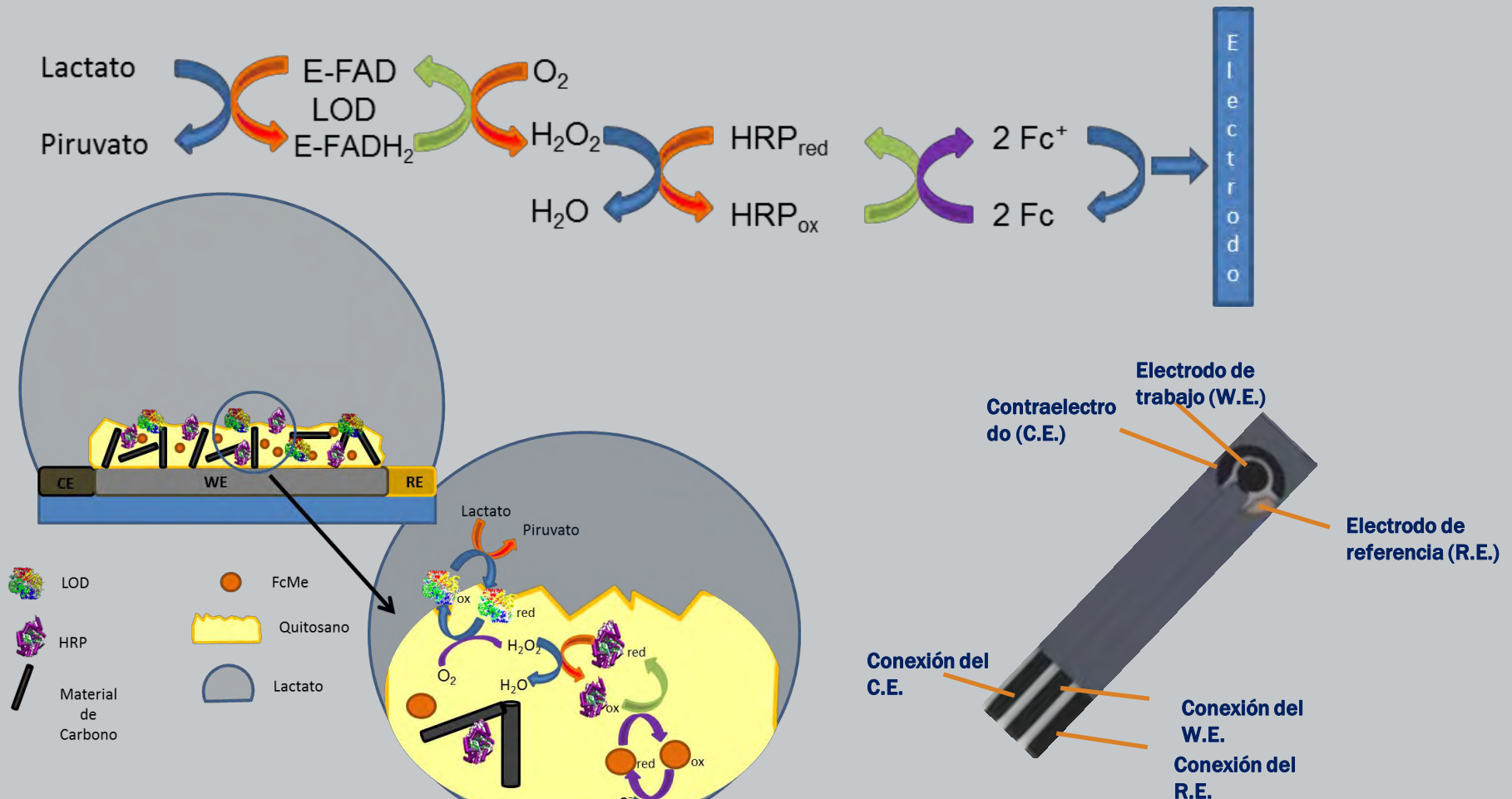


3. PLAN DE TRABAJO



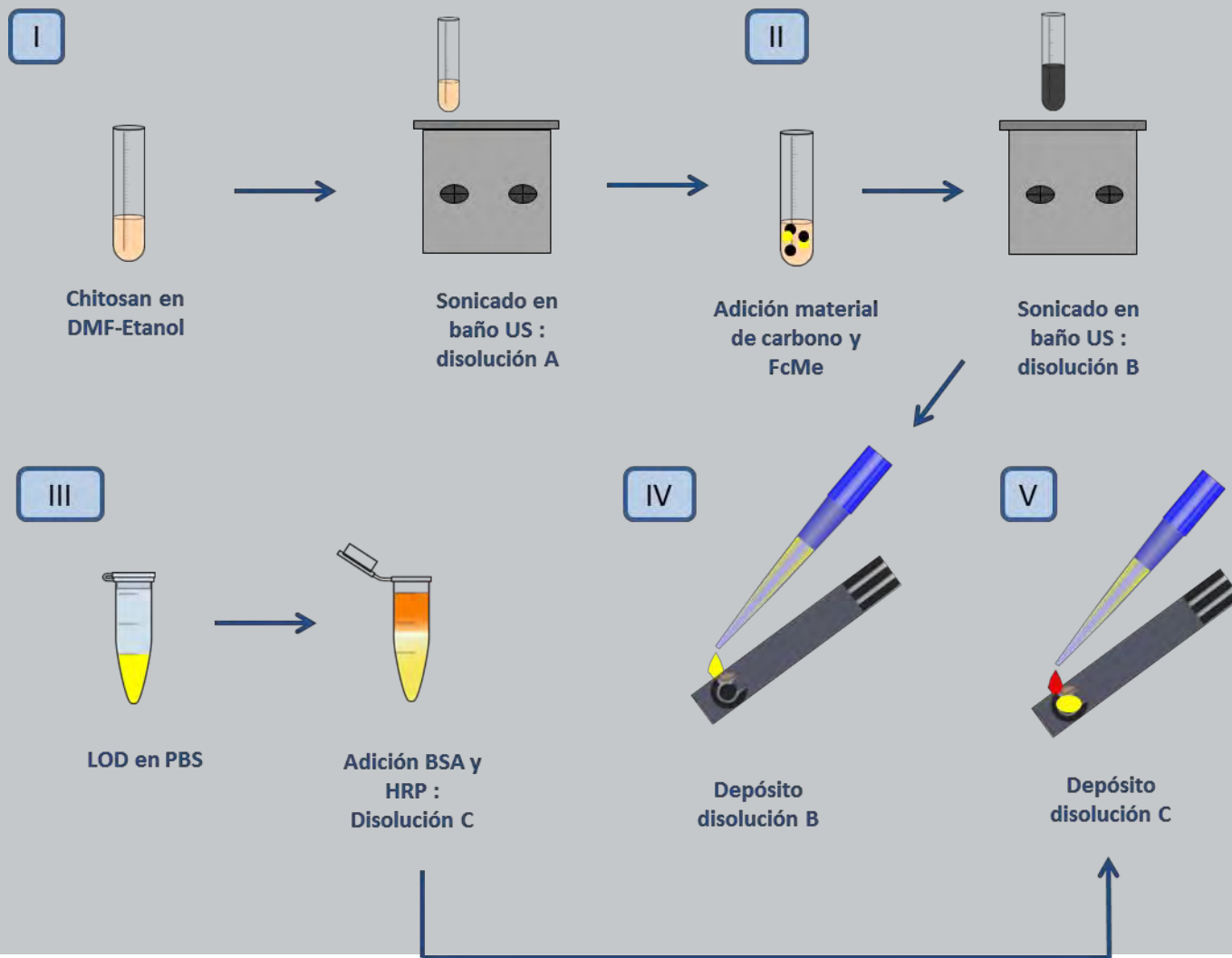


4.METODOLOGÍA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA LACTATO OXIDASA : BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO DE LACTATO





4.METODOLOGÍA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA LACTATO OXIDASA : BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO DE LACTATO

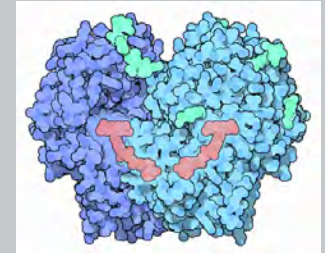
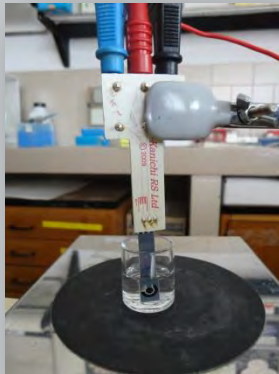




4.METODOLOGÍA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA GLUCOSA OXIDASA Y LACTATO OXIDASA. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS.

■ Biosensor de Glucosa

- Se seguirá una estrategia similar a la empleada para el biosensor de lactato: *elección de mediador, elección de materiales, inmovilización sobre electrodos serigrafados...*



■ Caracterización de los biosensores

- Química-Física : *TEM, SEM..*
- Electroquímica : *Voltamperometría Cíclica, cronoampermetría.*

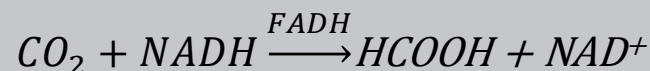
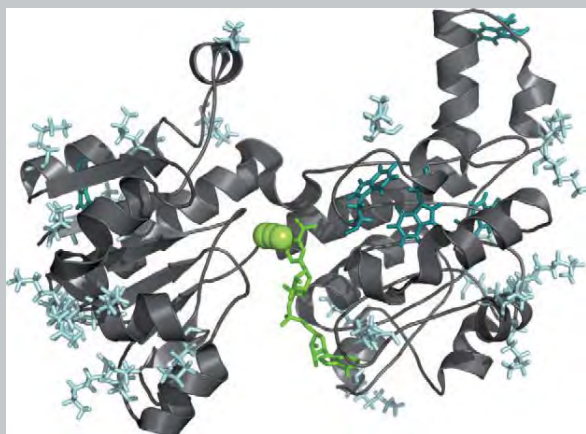
■ Validación de los biosensor

- Rectas de calibrado: *sensibilidad, reproducibilidad, estabilidad...*
- Comparación métodos: análisis medio de cultivo por HPLC y biosensor.

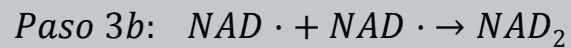
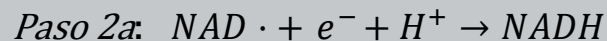
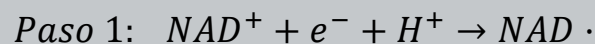


4. METODOLOGÍA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA FDH. REDUCCIÓN BIOELECTROQUÍMICA DEL CO₂ A ÁCIDO FÓRMICO

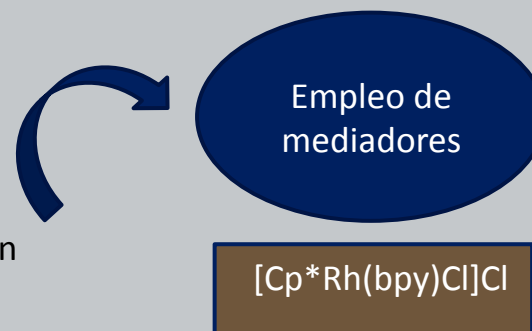
■ CbsFDH



■ Regeneración del cofactor

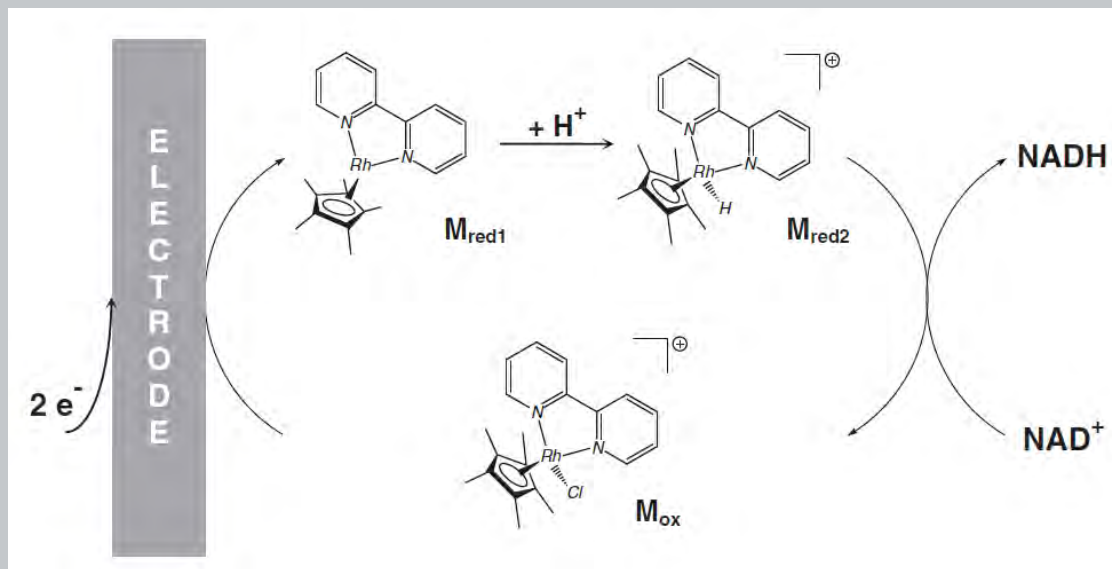


Inactivación

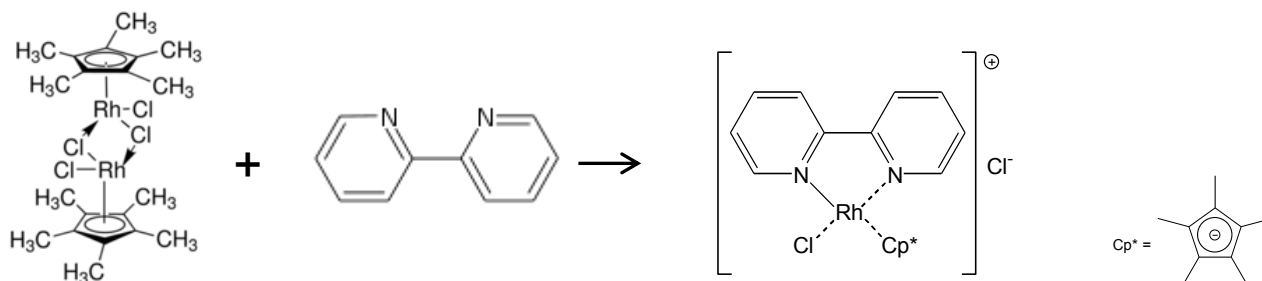


4. METODOLOGÍA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA FDH. REDUCCIÓN BIOELECTROQUÍMICA DEL CO_2 A ÁCIDO FÓRMICO

■ $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$



□ Síntesis $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$

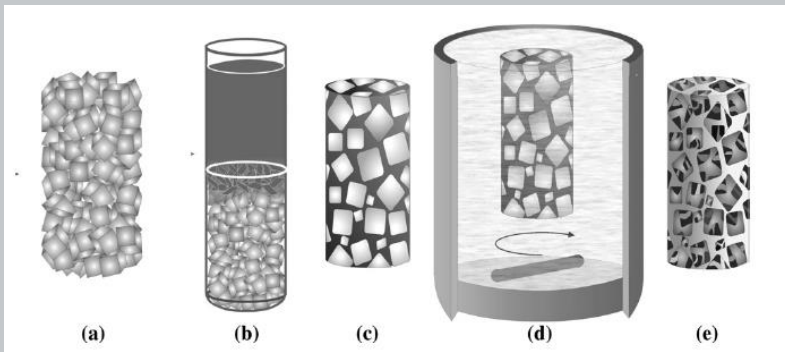




4.METODOLOGÍA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA FDH. REDUCCIÓN BIOELECTROQUÍMICA DEL CO₂ A ÁCIDO FÓRMICO

■ Espumas carbonosas mesoporosas

Proporcionadas por I.U. Materiales (universidad de Alicante)



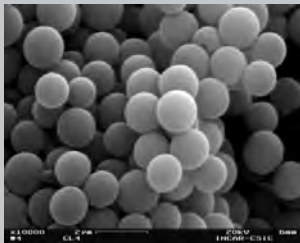
Pasos de fabricación a) Compactación de una preforma (NaCl); b) penetración de la breja de mesofase entre los huecos (400°C and 16 bar); c) solidificación ;d) la sal se disuelve e) oxidación y carbonización.

Características

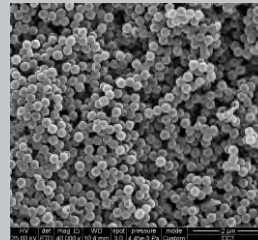
- Mesoporosos
- Uniforme en el tamaño del poro
- Forma de poro muy definida
 - posibilidad de diseñar distintas formas de poro
- Área superficial alta
- Resistencia mecánica



- Geles mesoporosos
- Microesferas de carbono



■ Cápsulas de Carbono



Proporcionados por el INCAR-CSIC
(Oviedo)



4. METODOLOGÍA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA FDH. REDUCCIÓN BIOELECTROQUÍMICA DEL CO_2 A ÁCIDO FÓRMICO

■ Inmovilización de enzimas



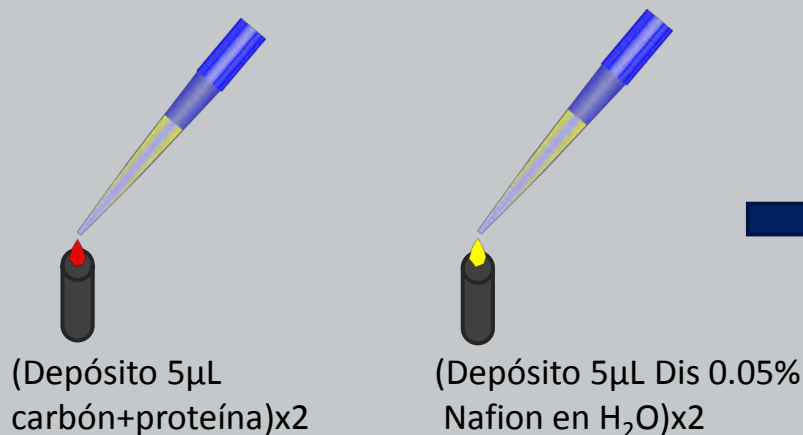
■ Control inmovilización



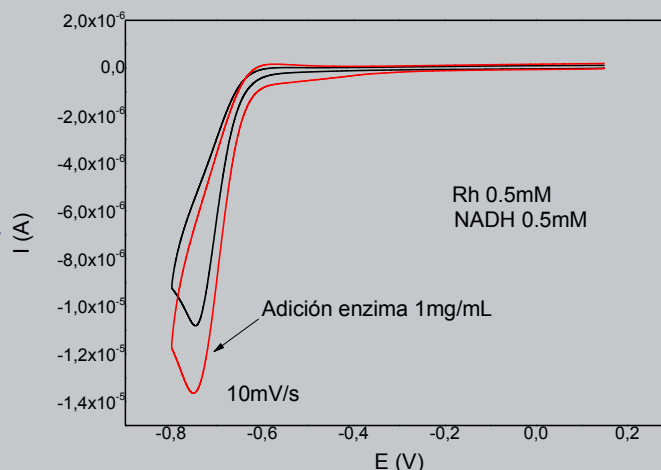


4. METODOLOGÍA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA FDH. REDUCCIÓN BIOELECTROQUÍMICA DEL CO_2 A ÁCIDO FÓRMICO

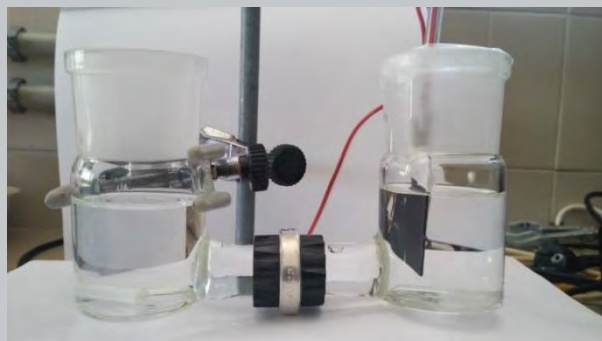
■ Preparación de los electrodos a escala laboratorio y prepiloto



Depósito sobre el electrodo



Caracterización electroquímica



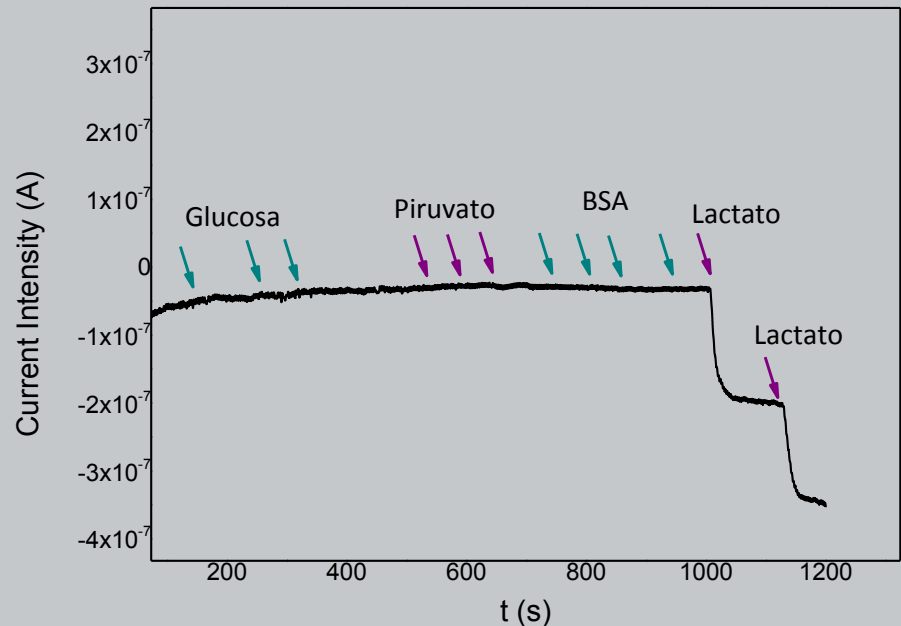
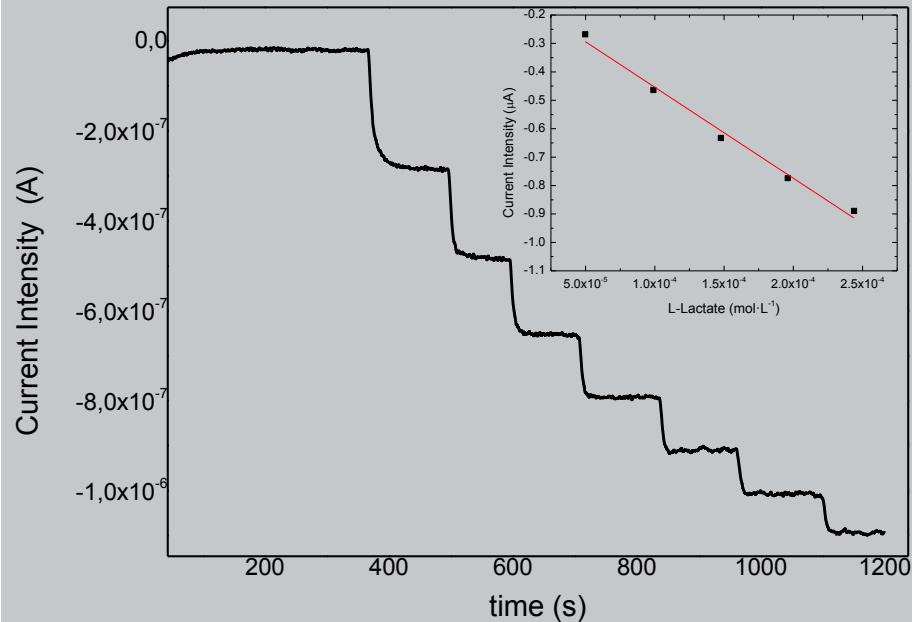
Escalado



Viabilidad del proceso



5.RESULTADOS INICIALES. BIOSENSOR DE LACTATO PARA MEDIOS DE CULTIVO EMBRIONARIOS.



G1

método	Lactato
HPLC	11.94 ± 0.10 mM (n=3)
Biosensor	11.8 ± 1.7 mM (n=4).

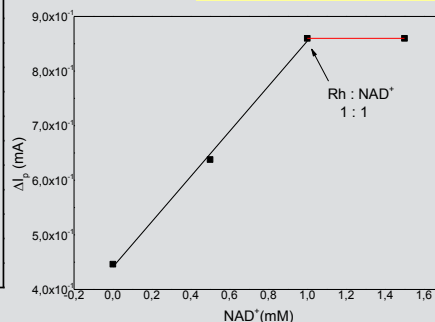
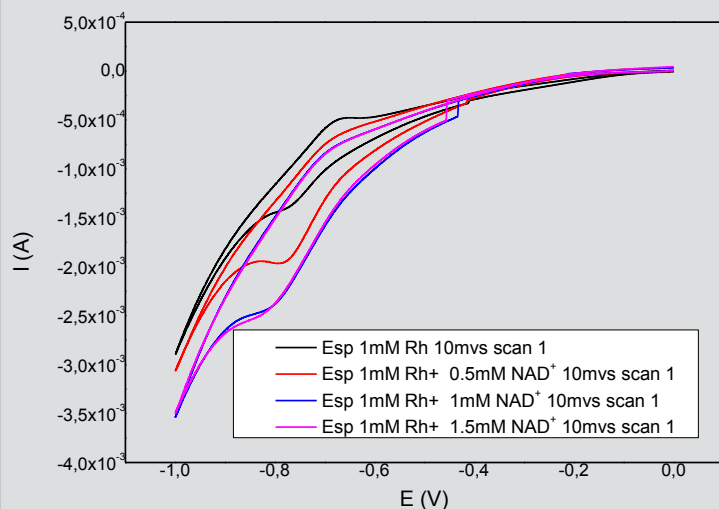
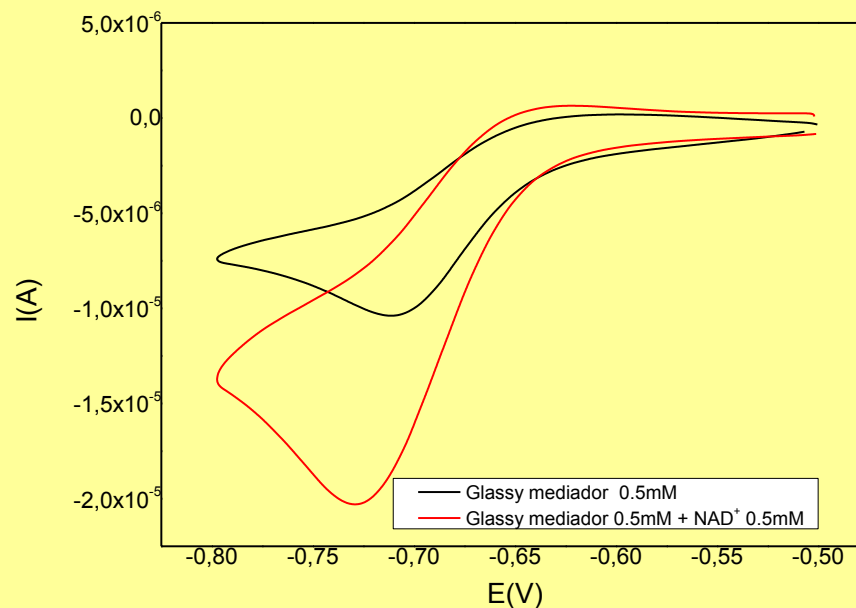
- Patente “Biosensor de alta precisión para la medición del lactato en cultivos embrionarios”
- Validación del sensor: muestras cultivos embrionarios proporcionados por la clínica Vista Hermosa.



5.RESULTADOS INICIALES. REDUCCIÓN BIOELECTROQUÍMICA DE CO_2 A ÁCIDO FÓRMICO

■ Estudio regeneración NADH

- Voltamperogramas cíclicos en 0.1M PBS pH 7.5 0.5mM complejo de Rh (línea negra: ausencia de NAD^+ ; línea roja: en presencia de 0.5mM NAD^+) 50mV/s. WE:glassy carbon



Estudio concentración NAD^+ para regeneración mediante Complejo de Rh 1mM ; W.E. espuma de carbón;10mV/s .En 0.1M PBS pH 7.5.



6.DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS Y VISITAS CIENTÍFICAS

🌸 Posibles **revistas** del área de la Química-Física, Analítica, bioelectroquímica y **Electroquímica**: Journal of Physical Chemistry B., Physical Chemistry Chemical Physics, Biosensor and bioelectronics, Sensors and Actuators B, Analytica Chimica Acta, Bioelectrochemistry, Analyst, Electrochimica Acta, etc.

🌸 **Congresos**: Real Sociedad Española de Química y Electroquímica y congresos internacionales en el campo de la electroquímica, electrocatálisis y bioelectroquímica.

🌸 **Patentes nacionales e internacionales** de los resultados obtenidos durante el programa formativo de la tesis doctoral.

🌸 **Estancias**: Instituto nacional del carbón (Oviedo) y Universidad de Bath (grupo de Frank Marken)

🌸 **Colaboraciones**: I.U. Materiales (UA), INCAR-CSIC (Oviedo), empresa Kanichi-Research (Manchester), Clínica Vista hermosa(Alicante)

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS SOBRE NANOMATERIALES DE CARBONO Y SU APLICACIÓN EN BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS Y PROCESOS BIOELECTROCATALÍTICOS.



Tutor: D. Vicente Montiel Leguey
Director: D. Jesús Iniesta Valcárcel

Naiara Hernández Ibáñez



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

