

## **INMOBILIZACIÓN DE LACASA EN ELECTRODOS POR MEDIO DE FUNCIONALIZACIÓN CON APTES Y GLUTARALDEHÍDO**

***Versión 1.0***

**Elaboró: Paula Catalina Cifuentes D.**

**Actualizó: Juan Esteban Cardona Q.**

### **1. OBJETIVO**

Inmovilizar la enzima Lacasa sobre electrodos mediante su funcionalización con APTES y Glutaraldehído.

### **2. REQUISITOS**

Para la elaboración del material es necesario poseer conocimientos previos o tener capacitaciones en: uso de micropipetas, pesado en balanzas de precisión, inmovilización enzimática y cálculos de diluciones.

### **3. REQUISITOS DE SOFTWARE**

Ninguno.

### **4. PASOS PREVIOS**


- Prueba de verificación de la reactividad enzimática de la Lacasa (se puede ver el paso a paso en *P011 – Protocolo Inmovilización de Lacasa en Magnetita*).
- Si es el caso, haber realizado el recubrimiento de plata sobre el electrodo.
- Preparación de reactivos.
  - **NOTA:** En este caso, se utilizó APTES al 2% v/v y Glutaraldehído al 2% v/v. Si se desea utilizar otras concentraciones, es necesario realizar las conversiones necesarias.

### **5. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL (EPP's)**

- Bata
- Tapabocas
- Gafas
- Guantes de nitrilo

### **6. METODOLOGÍA**

#### **6.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

 <b>Universidad de los Andes</b>	<b>Departamento de Ingeniería Biomédica</b>		
	<b>Smart Industries Lab.</b>		
	<b>Centro de Microelectrónica Universidad de los Andes</b>		
	<b>Línea de Biosensores y Microsistemas</b>		
	<b>Protocolo de Manufactura</b>		
	<b>Inmovilización de Lacasa en Electrodo</b>		
Fecha: 06 de diciembre de 2022	Código:PMF201801	Página: 2 de 4	Versión: 1.0

Para la preparación de soluciones se debe partir del concepto de concentración y cómo se está midiendo en el respectivo experimento. Si se disponen de reactivos con un porcentaje de concentración distinto al que se necesita utilizar, se puede hallar la cantidad de reactivo que necesita extraer mediante la siguiente ecuación:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (1)$$

Donde:

- $C_1 \rightarrow$  Concentración que quiere obtener.
- $V_1 \rightarrow$  Volumen de muestra que quiere obtener.
- $C_2 \rightarrow$  Concentración del reactivo disponible.
- $V_2 \rightarrow$  Volumen que debe extraer del reactivo disponible.

Por ejemplo, si se tiene APTES al 10% y se desea una muestra de 200 uL de APTES al 2%. Se realiza lo siguiente:

$$2\% * 200 \text{ uL} = 10\% * V_2$$

$$V_2 = \frac{2\% * 200 \text{ uL}}{10\%}$$

$$V_2 = 40 \text{ uL}$$

Por ende, se deben extraer 40 uL de APTES al 10%, se colocan en otro tubo falcon y allí se agrega Milli-Q hasta que se complete el volumen deseado (160 uL de Milli-Q, en este caso).


## 6.2 INMOVILIZACIÓN DE LACASA SOBRE ELECTRODOS

Para llevar a cabo la inmovilización de la enzima sobre un electrodo, es necesario tener en cuenta que este procedimiento debe realizarse **únicamente sobre el Working Electrode (WE)**, pues si se realiza también sobre el Counter o Reference, las medidas que se tomen serán perjudicadas. Por ende, se debe procurar que los reactivos no se rieguen y permanezcan únicamente allí.

Una vez ya se tengan todos los reactivos, se procede a hacer lo siguiente:

1. Limpiar el electrodo con 10 µL de agua Milli-Q y secar con aire comprimido o papel cuidando de no frotar.
2. Silanizar el electrodo con 10 µL de APTES Ph $\geq$ 10 el working electrode (WE) por 20 minutos.

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO POR:</b>	<b>APROBADO POR:</b>
P. C. C.		
La información contenida en el presente documento es de carácter <b>Confidencial</b> y de uso exclusivo de <b>La Universidad de los Andes</b> . Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.		

 <b>Universidad de los Andes</b>	<b>Departamento de Ingeniería Biomédica</b>		
	<b>Smart Industries Lab.</b>		
	<b>Centro de Microelectrónica Universidad de los Andes</b>		
	<b>Línea de Biosensores y Microsistemas</b>		
	<b>Protocolo de Manufactura</b>		
	<b>Inmovilización de Lacasa en Electrodo</b>		
Fecha: 06 de diciembre de 2022	Código:PMF201801	Página: 3 de 4	Versión: 1.0

3. Remover el reactivo con ayuda de la micropipeta, es necesario tener cuidado de no tocar el electrodo.
4. Agregar agua Mili-Q al electrodo con micropipeta
5. Remover el agua
6. Agregar 10  $\mu$ L de Glutaraldehído, agente entrecruzante, sobre el WE y dejar por 30 minutos.
7. Remover cuidadosamente el reactivo con la micropipeta.
8. Realizar lavado de la superficie con agua Mili-Q 2 veces como en los pasos 4 y 5.
9. Por último, agregar 10 $\mu$ L de la alícuota de Lacasa, dejar mínimo 12 horas a temperatura ambiente para el procesamiento de fijación con el Glutaraldehído. Recomendado dejar *overnight* (Figura 1).

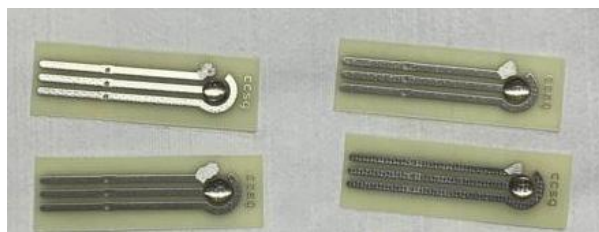



Figura 1: Electrodo una vez se les agrega Lacasa sobre el WE para inmovilización.

Una vez la inmovilización está completa y se verifica que los electrodos ya estén totalmente secos, se recomienda mantener los electrodos refrigerados para que la utilidad de la inmovilización sea más duradera.

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO POR:</b>	<b>APROBADO POR:</b>
P. C. C.		

 <b>Universidad de los Andes</b>	<b>Departamento de Ingeniería Biomédica</b>		
	<b>Smart Industries Lab.</b>		
	<b>Centro de Microelectrónica Universidad de los Andes</b>		
	<b>Línea de Biosensores y Microsistemas</b>		
	<b>Protocolo de Manufactura</b>		
	<b>Inmovilización de Lacasa en Electrodo</b>		
Fecha: 06 de diciembre de 2022	Código:PMF201801	Página: 4 de 4	Versión: 1.0

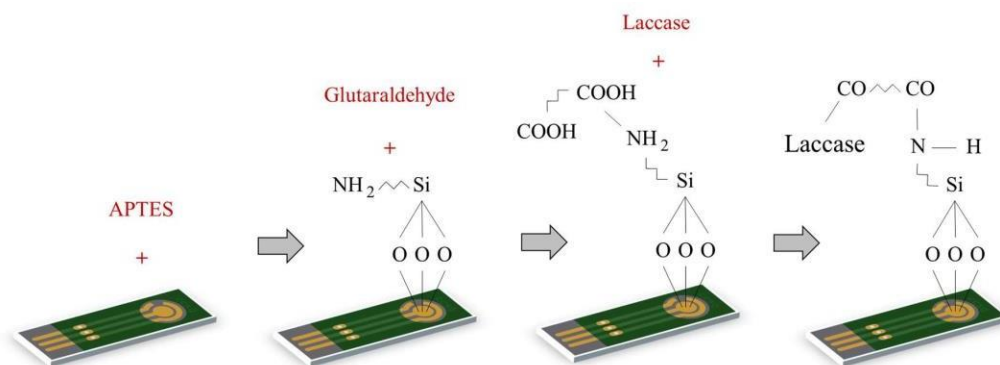


Figura 2: Esquema de los electrodos funcionalizados (Aroca et al., 2022).

Finalizado esto, se obtendrán los electrodos completamente funcionalizados según el esquema de la **Figura 2**. Las muestras que se deseen medir con estos electrodos tienen que cubrir los tres cabezales (WE, RE y CE) para que sean tomadas correctamente.

## 7. CONTROL DE CAMBIOS

DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	FECHA	VERSIÓN	APROBADO POR
<p>Actualización de el procedimiento de funcionalización. Se agregaron y detallaron los pasos intermedios del lavado. Adicionalmente, se cambiaron las cantidades de reactivos de 8 <math>\mu\text{L}</math> a 10<math>\mu\text{L}</math>.</p> <p>Nota: la cantidad de reactivos depende del área superficial del electrodo, se debe ajustar con el objetivo de cubrir la mayor cantidad de área posible.</p>		2.0	

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO POR:</b>	<b>APROBADO POR:</b>
P. C. C.		

La información contenida en el presente documento es de carácter **Confidencial** y de uso exclusivo de **La Universidad de los Andes**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.