

Optimization of an enzymatic optical biosensor for the determination of glucose.

Optimización de un biosensor óptico enzimático para la determinación de glucosa.

Trabajo Fin de Grado en Química

María Villuendas Romeo

Directora: Susana de Marcos

Junio 2016

Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica, Grupo de Biosensores Analíticos (GBA)

Agradecimiento al Servicio de Instrumentación Electrónica del Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza

Resumen

Este trabajo tiene como objetivo la optimización de un biosensor óptico enzimático para la determinación de glucosa. Es enzimático ya que se emplea una enzima, glucosa oxidasa, como biorreceptor, la cual está entrampada en una matriz polimérica de poliacrilamida. Es óptico debido a que se miden los cambios de absorbancia de la enzima con láseres como fuente de excitación y un detector óptico. Estos cambios se relacionan directamente con la concentración de glucosa.

Primero es necesario el estudio de la reacción en disolución, para optimizar la concentración de enzima necesaria para conseguir la mayor sensibilidad sin perder el rango lineal. A continuación se estudia en celda de flujo, lo que es más similar al biosensor puesto que la enzima ya se entrampa en una lámina.

A continuación se estudia la reacción en el biosensor con la concentración de enzima considerada como óptima. Se optimizan los parámetros que caracterizan el instrumento para obtener la mayor sensibilidad y se estudia el rango lineal, el cual se establece desde $2,79 \cdot 10^{-3} M$ hasta $5,60 \cdot 10^{-3} M$.

El estudio se concluye con la introducción de una muestra sintética y de una muestra real para comprobar la precisión en la determinación de glucosa, observándose lo elevada que es ésta.

Finalmente se estudia la vida de la enzima entrampada en la lámina y si se producen cambios en la sensibilidad de las medidas con el paso del tiempo.

Abstract

The aim of this work is the optimization of an optical enzymatic biosensor for the determination of glucose. It is an enzymatic biosensor because the biorreceptor is an enzyme, Glucose Oxidase, which is immobilized in a polyacrylamide film. It is an optical biosensor because the reaction is followed through the changes of the absorption properties of the enzyme and the excitation source is a laser and the detector is photodiode. This variation of the absorbance can be directly related with the glucose concentration.

First of all is study the reaction in dissolution to optimize the enzyme concentration in order to achieve the maximum sensitivity maintaining the largest linear range. Then the reaction is studied in continuous mode, which is more similar to the behaviour of the biosensor because the enzyme is immobilized in a polymer film.

Using the enzyme concentration optimized is necessary to get the figure of merits of the biosensor to obtain the sensitivity and to establish the linear range which goes from $2,79 \cdot 10^{-3} M$ to $5,60 \cdot 10^{-3} M$.

To conclude it is introduced a synthetic and a real sample in order to verify the precision of the determination, which is as good as expected.

The last study is to quantify the life of the sensor film and the changes of its sensitivity over time.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1-4
1.1.	Biosensor.....	1
1.2.	Características de un biosensor.....	2
1.3.	Biosensores ópticos.....	2
1.4.	Biosensor óptico enzimático basado en la glucosa oxidasa (GOx).....	3
2.	Objetivos.....	5
3.	Parte experimental.....	6-10
3.1.	Reactivos y disoluciones.....	6
3.1.1.	Reactivos y disoluciones generales.....	6
3.1.2.	Reactivos y disoluciones para las medidas en disolución.....	6
3.1.3.	Reactivos y disoluciones para las medidas en flujo y en el biosensor.....	6
3.2.	Instrumentación y material.....	7
3.2.1.	Instrumentación y material general.....	7
3.2.2.	Analizadores.....	7
3.3.	Procedimiento operativo.....	9
3.3.1.	Medidas en disolución: Espectrofotómetro de absorción molecular de doble haz.....	9
3.3.2.	Medidas en celda de flujo: Espectrofotómetro de absorción molecular monohaz.....	9
3.3.3.	Medidas en el biosensor óptico enzimático.....	10
4.	Resultados y discusión.....	11-23
4.1.	Estudio en disolución.....	11
4.2.	Estudio en celda de flujo.....	13
4.2.1.	Optimización de la concentración de glucosa oxidasa.....	13
4.3.	Estudio en el biosensor óptico enzimático.....	16
4.3.1.	Optimización de los parámetros de medida.....	16
4.3.2.	Descripción celdas.....	18
4.3.3.	Comparación celdas.....	18
4.3.4.	Características analíticas. Aplicación en muestras reales.....	21
5.	Conclusiones.....	24
6.	Bibliografía.....	25

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-Biosensor

Un sensor es un dispositivo capaz de detectar magnitudes físicas o químicas de un analito y transformarlas en magnitudes eléctricas útiles. El proceso de medida de este instrumento consta de varias etapas:

-*Etapa de reconocimiento:* La muestra llega al instrumento donde, mediante receptores que interactúan con el analito, se genera una señal específica que es transportada al transductor físico-químico.

El receptor debe estar inmovilizado física o químicamente, lo que proporciona cierta sensibilidad y estabilidad al instrumento, que dependerá del método (de inmovilización) escogido. Puede hacerse una clasificación según su procedencia¹:

- Físicos: Basados en la medida de propiedades físicas.
- Químicos: La señal proviene de una reacción química.
- Biológicos: El material receptor tiene una procedencia biológica (enzimas, anticuerpos, receptores, ácidos nucleicos, células y tejidos²). Si el receptor pertenece a este tipo, biorreceptor, se habla de biosensor.

-*Etapa de transducción:* Convierte en señal eléctrica la señal específica obtenida, lo que nos lleva a una clasificación de transductores¹:

- Térmico: Se mide el cambio de calor sobre la superficie del electrodo. La temperatura puede medirse mediante: termistores o termocuplas³.
- Piezoeléctrico: Dispositivo que mide un cambio de masa sobre un electrodo modificado con materiales con propiedades piezoeléctricas. Pueden emplear: enzimas o agentes inmunológicos³.
- Electroquímico: La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo. Pueden ser: potenciométricos, voltamperométricos, conductimétricos o transistores de efecto de campo (FET)⁴.
- Óptico: Transforma los cambios producidos en una señal óptica por la interacción con el receptor. Se puede medir: absorción, fluorescencia, quimiluminiscencia, bioluminiscencia, reflectancia o reflexión interna total⁴.

-*Etapa de conversión de la señal y amplificación:* Obtención de un registro de la propiedad medida ya transformada en señal eléctrica para poder observar y cuantificar los cambios producidos durante la medida.

En el caso de los biosensores, el uso de algunos biorreceptores implica una cuarta etapa:

-*Etapa de regeneración:* Cesa la interacción con el analito de forma que el biorreceptor vuelve a la situación química inicial, es decir, se regenera y vuelve a la magnitud inicial de la propiedad a medir. Esto permite el uso del biorreceptor durante numerosas medidas.

RECONOCIMIENTO

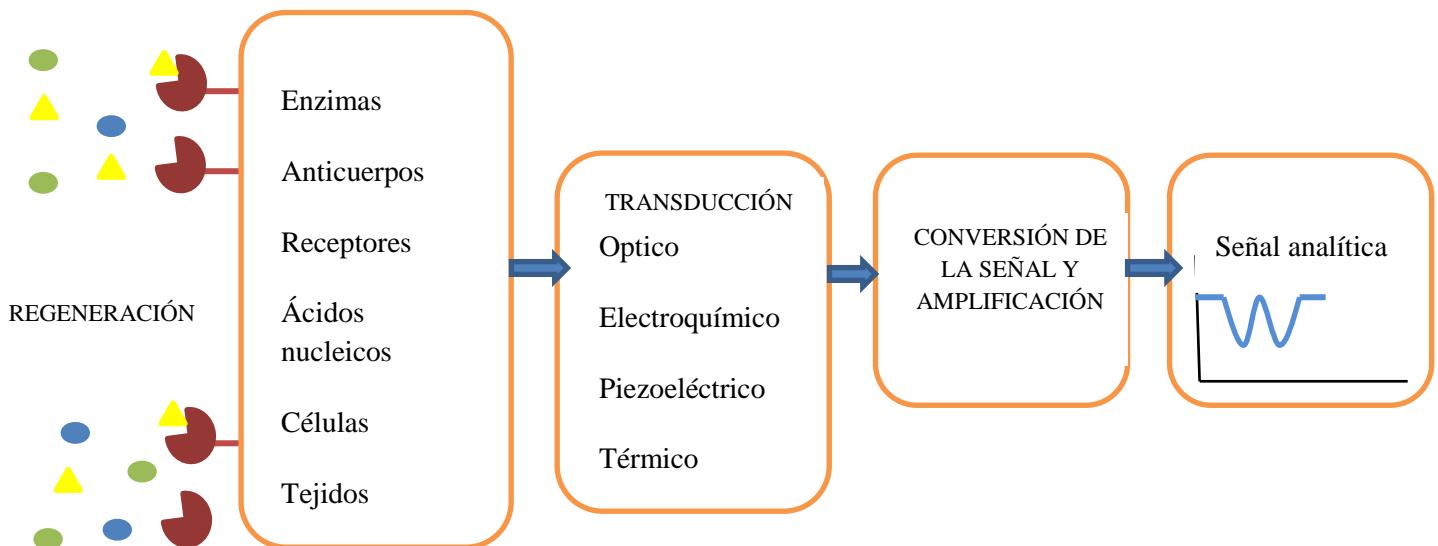


Figura 1. Esquema de un biosensor óptico

1.2.- Características de un biosensor

Las características que hacen de los biosensores instrumentos tan útiles son²:

- Especificidad: Esta cualidad se la proporciona el hecho de ser enzimático, puesto que este tipo de biomoléculas suelen ser específicas de un sustrato.
- Simplicidad y reversibilidad: La reacción que nos proporciona la señal solo consta de un paso, que además es reversible, lo que permite la reutilización de la enzima utilizada.
- Posible automatización: Permite eliminar errores provocados por los humanos, sobre todo en la toma de muestra, lo que confiere mayor fiabilidad al método.

1.3.- Biosensores ópticos

El dispositivo final utilizado para obtener las medidas en este trabajo es un *biosensor óptico enzimático*, ya que el bioreceptor es una enzima sobre la que se miden cambios en sus propiedades ópticas al interaccionar de forma reversible con un sustrato mediante un transductor óptico. Este tipo de transductores⁴ son dispositivos fotométricos que están basados en la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log (I/I_0) = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Dónde:

- I_0 : Intensidad de la luz incidente.
- I : Intensidad de la luz transmitida.
- A : Absorbancia.
- ϵ : Coeficiente de extinción.

- l : Longitud de la cubeta.
- C : Concentración del analito.

Algunas ventajas de medir con dispositivos fotométricos:

- No es necesario un electrodo de referencia.
- No hay interferencias eléctricas.
- Algunos analitos pueden ser medidos en equilibrio.
- Pueden responder simultáneamente a más de un analito.
- Se pueden realizar medidas a varias longitudes de onda a la vez.

Por otra parte, algunos inconvenientes de este tipo de dispositivos:

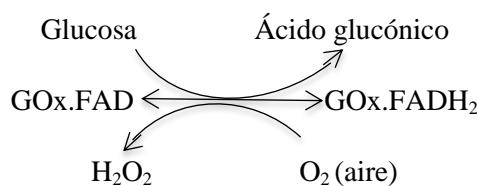
- Se ven afectados por el ruido de la luz ambiental, lo cual puede solucionarse cubriendo la zona de detección para evitar las posibles interferencias.
- Tienen un rango dinámico menor que los sensores eléctricos.
- Son más difíciles de miniaturizar.

La finalidad última de los biosensores es el diseño de un prototipo comercial para lo que, además de las etapas de reconocimiento y transducción comentadas en el apartado anterior, el dispositivo requerirá ⁵:

- Fuente de radiación: Aumenta la especificidad del dispositivo sin tener un gran tamaño, debido a la tendencia comercial de miniaturización; En este caso se utilizan láseres, debido a su bajo coste, tamaño reducido y alta monocromatidad.
- Sistemas de transmisión de la señal: Se ve condicionado por la distancia desde el punto de muestreo, pudiendo ser guías de ondas o fibra óptica.

1.4.-Biosensor óptico enzimático basado en la glucosa oxidasa (GOx)

La enzima utilizada para este trabajo es la glucosa oxidasa, GOx, una flavoenzima que cataliza la oxidación de la glucosa según el mecanismo:



Esquema 1. Mecanismo de reacción de la GOx⁶.

La enzima se encuentra con el FAD en su forma oxidada hasta que, al reaccionar con el analito (glucosa) se reduce a FADH₂, obteniéndose como subproducto de la reacción ácido glucónico. Como ya se ha comentado, es una reacción reversible, lo que permite la regeneración de la enzima gracias al O₂ disuelto, que da como subproducto H₂O₂⁶. Éste subproducto puede eliminarse con catalasa, una enzima que lo consume rápidamente y que provocaría una regeneración más rápida de GOx, aunque

en este trabajo no ha sido necesario su uso debido a que los tiempos de regeneración no eran demasiado largos.

Los estudios realizados hasta ahora se basaban en la determinación de glucosa mediante los cambios en la fluorescencia intrínseca de la GOx debida al triprófano (A), que se excita a $\lambda=280\text{nm}$ y emite a $\lambda=340\text{nm}$, pero esa zona presenta muchas interferencias espectrales. Esto se soluciona modificando químicamente la enzima con fluoróforos que produzcan cambios de absorción en la zona visible del espectro ($\lambda=700-350\text{ nm}$)⁶, sin embargo presenta el inconveniente de que, previo a la inmovilización de la enzima, es necesario modificarla químicamente.

Por estos motivos se ha intentado estudiar la reacción enzimática mediante el seguimiento en el cambio de absorbancia del FAD al reducirse a una longitud de onda menos conflictiva y sin la necesidad de añadir moléculas de marcaje. El espectro de absorción del FAD (B) y el FADH₂ (C) se observa en la siguiente figura:

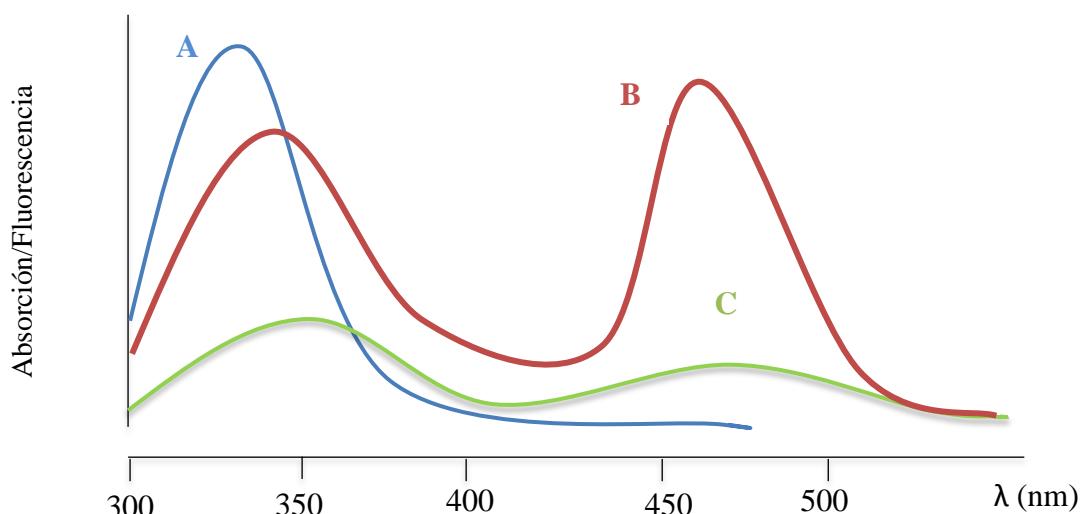


Figura 2. Rango de longitudes de onda de fluorescencia del Trp ($\lambda_{\text{ex}}=280\text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}}=340\text{nm}$) de GOx, y absorción de GOx·FAD y GOx·FAH₂⁶.

Teniendo en cuenta lo observado en la figura 1.2., los espectros de absorción presentan dos máximos:

- $\lambda=340\text{ nm}$: Tanto la forma oxidada como la forma reducida presentan un máximo. La diferencia entre ambos no es tan pronunciada como la que se produce en $\lambda=450\text{ nm}$ y esta zona sigue presentando el problema de las interferencias espectrales.
- $\lambda=450\text{ nm}$: La forma oxidada presenta un máximo muy pronunciado mientras que el de la reducida es mucho menor, lo que permite medir a esta longitud de onda.

Como consecuencia de los espectros obtenidos, se decide medir el cambio de absorción entre GOx·FAD y GOx·FADH₂ producidos por la reacción a estudiar a una longitud de onda de 450 nm, puesto que es una zona libre de interferencias espectrales y no es necesaria la adición de fluoróforos.

2.- OBJETIVOS

La determinación de glucosa cobra gran importancia tanto en el ámbito de la medicina como en el de la alimentación. En el primer caso resulta imprescindible para las personas que sufren diabetes, y está bastante desarrollado debido a la necesidad sanitaria de un método que detecte niveles fuera del rango permitido y, en algunos casos, de sistemas que al detectar dichos niveles liberen una cierta cantidad de insulina que los regula. En el segundo caso es más útil en controles de calidad que aseguren que la concentración es la asegurada en los envases por el fabricante.

Por todo esto, la determinación de glucosa es un tema relevante, que ha sido muy estudiado, y que debe seguir estudiándose para conseguir mejoras en los sistemas. El fin de este trabajo es la optimización de un biosensor óptico enzimático para la determinación de glucosa mediante una enzima inmovilizada, la glucosa oxidasa.

Para llevar a cabo esto ha sido necesario el estudio de la reacción en distintos dispositivos antes de poder trabajar y optimizar el instrumento de interés, cuyo proceso conlleva el cumplimiento de los siguientes objetivos:

1. Estudio mediante absorción molecular de la reacción de la glucosa con GOx en disolución, debido a las propiedades espectroscópicas ya explicadas del FAD presente en dicha enzima.
2. Estudio de la reacción en celda de flujo inmovilizándola en una lámina con una matriz polimérica.
 - a) Optimización de la concentración de enzima en la lámina.
 - b) Estudio del rango lineal de glucosa que permite dicha lámina.
3. Estudio de la reacción en el biosensor y optimización de éste para su correcto funcionamiento.
 - a) Estudio de la respuesta de la GOx inmovilizada con la concentración de glucosa.
 - b) Optimización de los parámetros de medida para conseguir la mayor sensibilidad.
 - c) Estudio del rango lineal con los parámetros fijados como óptimos.
 - d) Corroboration de todo lo anterior mediante el análisis de una muestra sintética y una muestra real.

3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Reactivos y disoluciones

3.1.1.- Reactivos y disoluciones generales

- Disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M a pH=6: se obtiene disolviendo 4,20 g de Na_2HPO_4 en 300 ml de agua milliQ y ajustando el pH con una disolución de HCl 2M.
- Disolución de D-(+)-glucosa (G8270-100G Sigma) 0,498 M: se disuelven 374,4 mg en 5 ml de agua milliQ.

3.1.2.- Reactivos y disoluciones para las medidas en disolución

En disolución se lleva a cabo el estudio de la reacción y se intenta obtener la concentración de enzima a la que se obtiene la mayor sensibilidad, por ello son necesarias distintas concentraciones de la enzima. Se prepara la más concentrada y a partir de esa se hacen las correspondientes diluciones:

- Disolución de glucosa oxidasa (GOx) X-S (G7141-50KU Sigma) de 2000 IU/ml: se pesan 34 mg que se disuelven en 2,2 ml.

3.1.3.- Reactivos y disoluciones para las medidas en flujo y en el biosensor

En estos casos la enzima debía estar inmovilizada¹, lo cual se lleva a cabo mediante el método ya optimizado que consiste en una lámina polimérica en cuyos poros queda entrampada la GOx, debido a su mayor eficacia y distribución.

Dichas láminas en ambos casos se preparan a partir de las mismas proporciones de los mismos reactivos, la diferencia se encuentra el espacio físico en el que se realiza la polimerización:

- Celda de flujo: La polimerización se lleva a cabo en un molde previamente preparado de las dimensiones de la lámina que ajusta perfectamente en la celda (Anexo 1).
- Biosensor: Debido a que la propia celda permite la preparación in situ de la lámina y para evitar tener que traspasarla una vez preparada, la polimerización se lleva a cabo directamente en ella (Figura 11).

A continuación se describe la metódica a seguir para la preparación de éstas, independientemente del instrumento en el que se vaya a medir posteriormente:

- Disolución 1: Se disuelven en un vial 5 mg de N,N'-Metilbiscarilamida (M7278 Sigma) y 75 mg de acrilamida (A3553 Sigma) en 250 μl de disolución amortiguadora.
- Disolución 2: En otro vial se disuelve la cantidad requerida en cada caso de enzima y se disuelve en 250 μl de disolución amortiguadora.
- Se mezclan la disolución 1 y la 2.
- Se añaden 5 μl de $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ 4% (m/V).
- Se desoxigena la mezcla borboteando N_2 durante 5 minutos.
- Se añaden 2 μl de TEMED.

- Se deposita dicha mezcla en los moldes o celdas correspondientes, cubriendolos con un porta para evitar la entrada de O₂ del aire, ya que inhibe la polimerización.
- 2 horas después la polimerización ya ha terminado y se puede guardar la lámina en un vial o en la celda con disolución amortiguadora para evitar que la enzima se deteriore.

3.2.- Instrumentación y material

3.2.1.- Instrumentación y material general

- Material desechable: puntas de micropipetas, pipetas pasteur, tubos falcon, viales.
- Probetas y pipetas graduadas.
- Vidrio de reloj.
- Vasos de precipitados de 100 ml, 200 ml y 300 ml.
- Matraces de 10 ml y 25 ml.
- Micropipetas de volumen variable: Pipetman Gilson (2-20 µl, 50-200 µl y 200-1000 µl) y Socorex (5-50 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl).
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Balanza analítica de precisión. GR-202-EC.
- pH-metro CRISON, BASIC 20.

3.2.2.- Analizadores

Un biosensor óptico es un dispositivo capaz de registrar de forma directa, continua y reversible la concentración de una especie química⁷. En este trabajo se miden los cambios de absorbancia de la enzima, que se relacionan con la concentración de forma directa mediante la ley de Lambert-Beer. El estudio de la reacción se ha realizado en distintos pasos hasta llegar a la optimización del biosensor, lo que conlleva el uso de distintos equipos.

Espectrofotómetro de absorción molecular de doble haz

Las medidas en disolución requieren una gran superficie de contacto entre el líquido y el aire para permitir una regeneración correcta gracias al O₂ que se intercambia por difusión. Debido a que la superficie de contacto no es algo que se pueda modificar, es necesario el uso de cubetas de bajo volumen para que así la cantidad de enzima sea la mínima posible, y por lo tanto, la de O₂ necesaria también lo sea.

Al utilizar cubetas de bajo volumen, concretamente de 500 µl la incertidumbre de las medidas es muy elevada, por lo que para tratar de minimizarlas, los estudios en disolución se realizaron en un espectrofotómetro molecular de doble haz “Espectrofotómetro Jasco V-730 UV/Vis ($\lambda=190-1100\text{nm}$)”.

Espectrofotómetro de absorción molecular monohaz

Una vez observados los cambios y establecidas unas concentraciones de referencia sobre las que trabajar en flujo se comienza a trabajar con la celda en el espectrofotómetro de absorción molecular monohaz (Anexo 2):

- Espectrofotómetro de fotodiodos UV-Vis Agilent 8453A ($\lambda=190-1100$ nm).
- Celda de flujo.
- Adaptador intercambiable que permite medir en celda de flujo.
- Sistema Peltier Hewlett Packard 89909.
- Bomba peristáltica Minipuls3 Gilson, de 4 canales.

Biosensor óptico enzimático

El analizador portátil está compuesto por dos módulos (A y B) que se conectan a un ordenador que recoge la información de las medidas, mediante un software de control y procesado de señal (C) (Anexo 3), desarrollado por el Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Zaragoza (SO31).

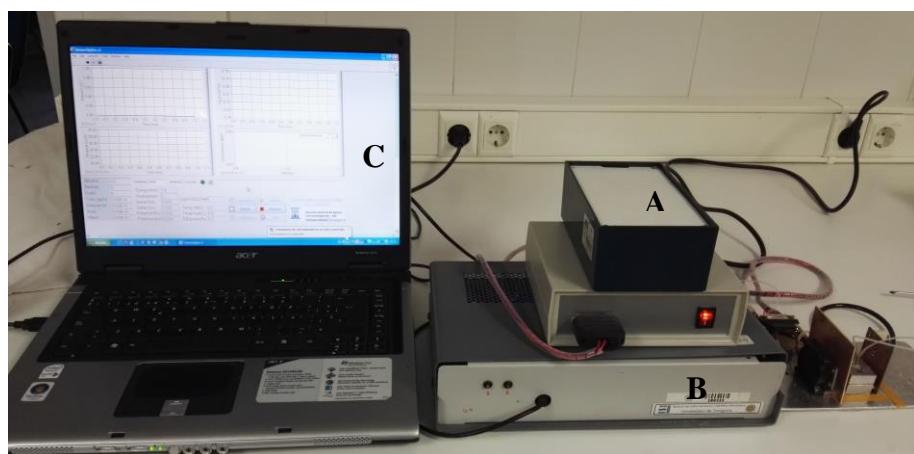


Figura 3. Módulos del biosensor óptico enzimático

■ **Módulo A**

Contiene todos los componentes electrónicos y circuitos necesarios en la transducción de la señal y el control del sistema.

Se puede regular la intensidad luminosa de los láseres girando los tornillos que los controlan.

■ **Módulo B**

Contiene la cabeza sensora (celda de medida, láseres y fotodiodo) y el sistema hidrodinámico (bomba peristáltica y válvulas de tres vías) (Anexo 4):

- Dos válvulas de tres vías: permiten la distribución de la muestra y el portador, a través de la celda o hacia el desecho.

- Minibomba peristáltica: Requiere calibración.
- Celda sensora: Dónde se coloca la lámina sensora.
- Detector: Fotodiodo cuya ganancia se puede regular girando el tornillo de la placa en la que se encuentra colocado.
- Láseres:
 - a) De referencia (65nm, 7mW) “AlGaN P Visible Laser Diode”.
 - b) De medida (405nm, 5mW) “Blue-Violet Laser Diode DL-3146-151”.
- Software de control y procesado de señal

Permite controlar los parámetros de medida (Anexo 5). Una vez optimizados:

- Frecuencia de adquisición: 1Hz.
- Velocidad de la bomba: Se escribe la velocidad de circulación de la bomba en % (de 0 a 100) correspondiente al caudal que queramos obtener. Una vez optimizado: 20%, que equivale a un caudal de 0,6 ml/min.
- Número de medidas: número de veces que mide la muestra.
- Pre-time (min): Tiempo que tarda en llenar el ciclo, 2min.
- Post-time (min): Tiempo que transcurre entre dos medidas, 0 min.
- Lavado-carga (min): Tiempo de llenado del bucle con muestra, 1min.
- Inyección (min): Tiempo que la muestra pasa por la celda, 4min.
- Regeneración (min): Tiempo que el portador pasa por la celda. Depende de la concentración de glucosa inyectada.

3.3.-Procedimiento operativo

3.3.1.-Medidas en disolución: Espectrofotómetro de absorción molecular de doble haz

Al ser un espectrofotómetro de doble haz requiere el uso de dos cubetas de bajo volumen iguales, de forma que una es utilizada de referencia (contiene sólo disolución amortiguadora), y en la otra se añaden la enzima y el sustrato.

Medimos realizando un espectro completo en cada medida, de forma que inicialmente sólo hay enzima en la cubeta de volumen reducido, por lo que obtenemos el espectro de absorción de la GOx, y a continuación se añade la glucosa y se agita la cubeta. De esta forma podemos observar cómo cambia el espectro, y cómo se regenera la enzima.

3.3.2.- Medidas en celda de flujo: Espectrofotómetro de absorción molecular monohaz

Previa preparación y colocación de la lámina con la enzima inmovilizada en el interior de la celda, se conecta la bomba peristáltica para poder obtener una entrada y salida de forma continua tanto del portador como del sustrato a una velocidad de 0,5 ml/min (Anexo 3).

Las medidas se realizan siguiendo la misma metodica que en disolución:

- Se introduce la disolución amortiguadora hasta observar una señal estable de absorbancia.
- Una vez estabilizada dicha señal se hace pasar durante 4 minutos glucosa de la concentración requerida en cada caso.
- Se vuelve a pasar portador hasta la regeneración de la enzima.

3.3.3.- Medidas en el biosensor óptico enzimático

Antes de empezar a medir hay que realizar los siguientes pasos:

- La lámina enzimática se coloca en la celda, entre dos cristales pulidos que permiten el paso de la luz de los láseres, y se cierra con una tapa que impide la pérdida de luz. Entre ambas partes hay una goma que permite el cierre hermético para evitar la pérdida de líquidos.
- Se coloca el detector de forma que la señal obtenida sea la máxima posible, para conseguir la mayor sensibilidad.
- Se preparan las disoluciones de disolución amortiguadora y glucosa que van a ser necesarias durante la medida, y se colocan en sus respectivas posiciones.
- Se conectan los módulos entre sí y al software.
- Se configura el software con los parámetros deseados.
- Se tapa la cabeza sensora para evitar las interferencias de la luz.
- Se inician las medidas.

Cada medida comienza con 1 minuto de lavado-carga, en el que todo el sistema se llena de sustrato, para homogeneizar y asegurarnos de que en la inyección, de 4 minutos, entra sólo glucosa a la celda. A continuación comienza la regeneración, en la que el portador es introducido en la celda para regenerar la enzima (el tiempo de este último paso depende de la concentración de glucosa introducida).

El biosensor mide la intensidad de ambos láseres que llega al detector, para transformarlo en absorbancia:

$$\text{Abs} = -\log \frac{I}{I_0}$$

Los datos de absorbancia se representan frente al tiempo y se obtienen los picos, cuyas áreas calculadas con el Origin Pro 8 aproximándolos a picos gaussianos se relacionan con la concentración de glucosa.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-Estudio en disolución

El primer estudio que se hace tiene como finalidad comprobar que la reacción se produce de forma correcta, y que al introducir la glucosa se observa un descenso de la absorbancia medible a $\lambda=450$ nm, la cual luego se recupera debido a la regeneración de la enzima, gracias al O₂ del aire.

Para ello, en el espectrofotómetro de doble haz, con cubetas de bajo volumen (500μl):

- Cubeta de referencia: 500 μl disolución amortiguadora.
- Cubeta de medida: 450 μl disolución amortiguadora + 50 μl GOx 1400 IU/ml (quedando 90 IU/ml en cubeta).

Se mide realizando barridos desde $\lambda=300$ nm hasta $\lambda=500$ nm. En el tercer barrido se inyectan en la cubeta de medida 25 μl de glucosa $1,25 \cdot 10^{-2}$ M de forma que, la concentración final en la cubeta es de $5,95 \cdot 10^{-4}$ M, observándose un descenso inmediato de la absorbancia.

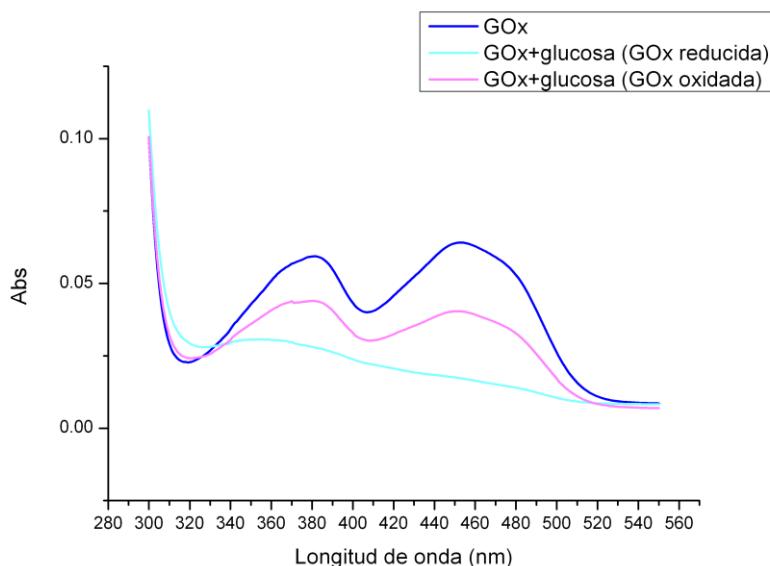


Figura 4. Espectros de absorción durante la reacción enzimática estudiada en disolución.

A continuación, se intentan optimizar tanto la concentración de enzima como la de sustrato, intentando mantener una buena reproducibilidad.

De acuerdo a la cinética de la reacción, al aumentar la concentración de enzima, debería observarse una regeneración más rápida, así como una mayor señal inicial. Para comprobarlo se realiza la medida de distintas concentraciones de enzima con la misma concentración de glucosa en las siguientes condiciones:

- Cubeta de referencia: 500 μl disolución amortiguadora.
- Cubeta de medida: 450 μl disolución amortiguadora + 50 μl GOx de distintas concentraciones (para conseguir concentraciones finales de 100 IU/ml, 150 IU/ml y 200 IU/ml). Antes del tercer barrido se inyectan en la cubeta de medida 25 μl de glucosa $1,25 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ de forma que, la concentración final en la cubeta es de $5,95 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

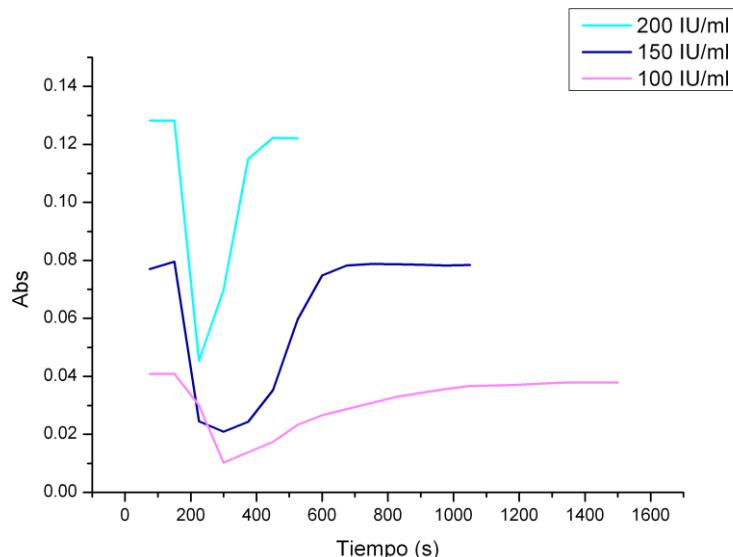


Figura 5. Cambios en absorbancia ($\lambda=450\text{nm}$) y tiempo de regeneración con la [GOx]: 200IU/ml, 150 IU/ml y 100 IU/ml.

→ Debido a la mayor señal inicial y a la rapidez en la regeneración, se elige [GOx]= 200 IU/ml.

Una vez optimizada la actividad de enzima necesaria se procede al estudio de la reacción en función de la concentración de sustrato:

- Cubeta de referencia: 500 μl disolución amortiguadora.
- Cubeta de medida: 450 μl disolución amortiguadora + 50 μl GOx 2000 IU/ml. Antes del tercer barrido se inyectan en la cubeta de medida 25 μl de glucosa de distintas concentraciones: $1,10 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $8,30 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ y $5,60 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Concentración de glucosa (mol/l)	Área
$1,10 \cdot 10^{-3}$	$2,25 \cdot 10^2$
$8,30 \cdot 10^{-4}$	$1,81 \cdot 10^2$
$5,60 \cdot 10^{-4}$	57,1

4.2.- Estudio en celda de flujo

Una vez comprobada la posible cuantificación de glucosa a partir de los cambios de absorbancia del FAD de la glucosa oxidasa se procede a su estudio en celda de flujo, lo que permite una mejor regeneración debido a que el flujo entra de forma constante gracias a la bomba peristáltica que impulsa las disoluciones bañando toda la superficie de la lámina.

Lo primero es comprobar que la concentración de enzima establecida como óptima se mantiene en este sistema:

4.2.1.-Optimización de la concentración de Glucosa Oxidasa

a) Lámina de 600 IU

Para estudiar la reacción enzimática en celda de flujo hay que entrampar la enzima en una matriz polimérica, como ya se ha explicado y detallado en el capítulo anterior. Con el fin de obtener una actividad final similar a la optimizada en el paso anterior, estudio en disolución, y debido a que de la disolución preparada sólo un poco menos de la mitad puede depositarse en el molde para hacer la lámina, se prepara una disolución de mayor concentración. La optimizada previamente es de 200IU/ml, por lo que ahora se prepara una disolución de 600 IU a partir de la cual se prepara la lámina con la que se va a medir en celda de flujo.

Y debido a que de la disolución preparada sólo un poco menos de la mitad puede depositarse en el molde para hacer la lámina, se prepara una disolución de mayor concentración.

Antes de realizar ninguna medida se comprueba la reproducibilidad:

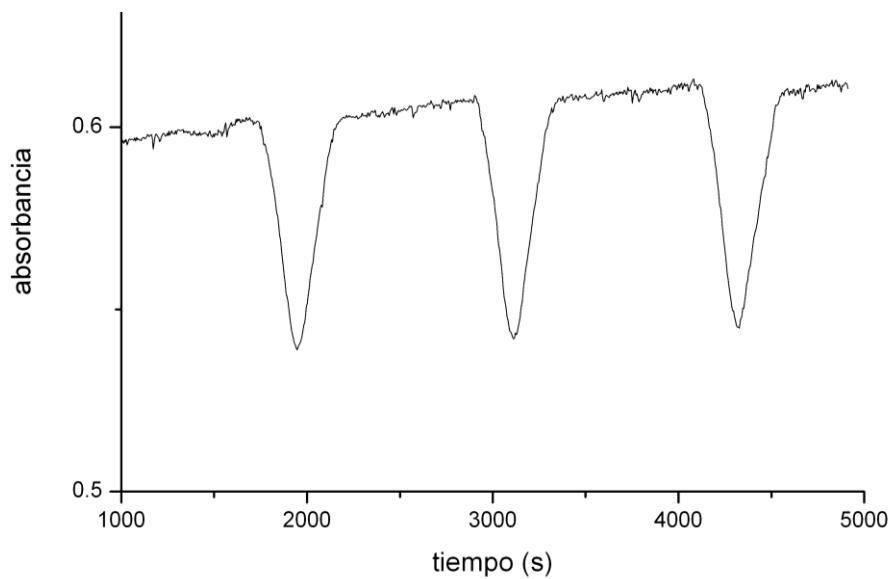


Figura 6. Reproducibilidad en celda de flujo $[GOx]=600$ IU y $[glucosa]=4,13 \cdot 10^{-3}M$.

Para calcular la reproducibilidad se calcula el área de cada pico con el Origin Pro 8.0, y su DSR (%), de forma que, cuanto menor sea esta mayor será la reproducibilidad.

Áreas	
	13,9
	14,1
	14,5
s	0,293
media	14,2
DSR (%)	2,06

Dada la buena reproducibilidad de las medidas se puede realizar una recta de calibrado con distintas concentraciones de glucosa:

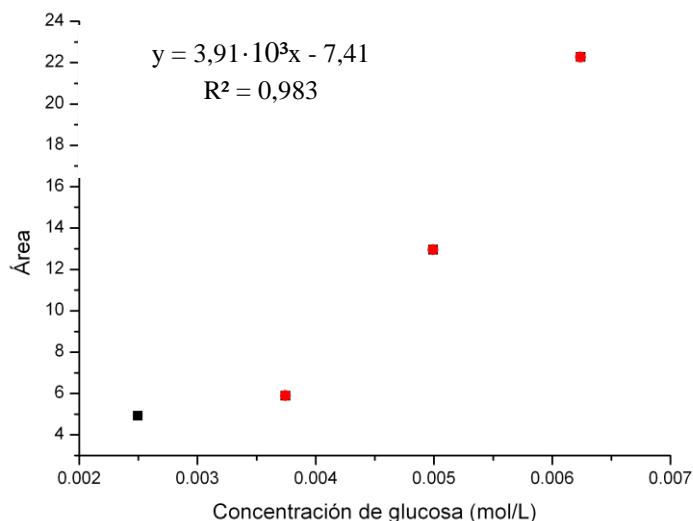


Figura 7. Recta de calibrado [GOx]= 600 IU en celda de flujo.

b) Lámina de 300 IU

A continuación se realizan las mismas medidas que en el apartado anterior con una lámina de 300 IU, para comprobar si el comportamiento de la GOx inmovilizada es similar al que tiene en disolución.

Lo primero es comprobar la reproducibilidad, para lo que medimos cuatro veces una disolución de glucosa de $3,74 \cdot 10^{-3}$ M obteniendo una DRS (%)= 2,78%.

Dada la elevada reproducibilidad se puede realizar una recta de calibrado con las mismas concentraciones que en la lámina anterior, para así poder comparar:

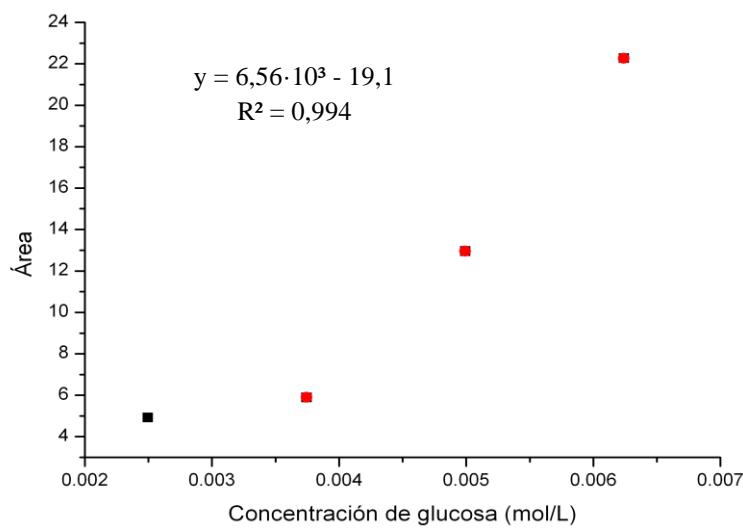


Figura 8. Recta de calibrado $[GOx] = 300$ IU en celda de flujo.

c) Lámina de 750 IU

Finalmente se comprobar si al aumentar la concentración de enzima se consigue mantener el rango lineal disminuyendo el tiempo de regeneración para así conseguir que las medidas sean más rápidas. Se hace una lámina de 750 IU.

Como en todas las medidas, lo primero es comprobar la reproducibilidad, para lo que medimos cuatro veces una disolución de glucosa de $3,74 \cdot 10^{-3}$ M obteniendo una DRS (%)= 2,26%.

A continuación se realiza una pequeña recta de calibrado, como en los casos anteriores:

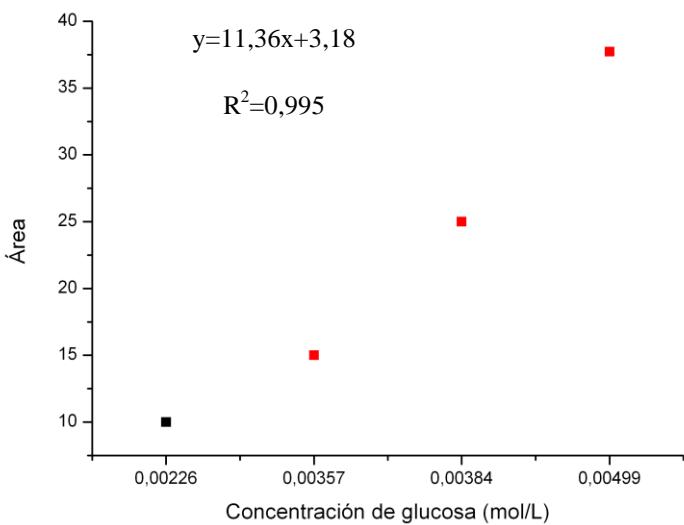


Figura 9. Recta de calibrado [GOx]= 750 IU en celda de flujo.

d) Comparación de las láminas

Para comprobar si disminuye el tiempo del análisis hay que comparar el tiempo de regeneración de las láminas para una misma concentración de glucosa, $3,74 \cdot 10^{-3}$ M:

Concentración GOx (IU)	Tiempo de regeneración (s)	Reproducibilidad,
300	700	2,78
600	700	2,06
750	735	2,26

→A la vista de los resultados, se mantiene como concentración óptima de enzima 600 IU en celda de flujo ya que es la de menor tiempo de regeneración y mayor reproducibilidad, que por los motivos ya explicados, equivale a la optimizada en disolución.

4.3.- Estudio en el biosensor óptico enzimático

Una vez comprobada la mejora de las medidas al trabajar entrampando la lámina se procede al estudio de la reacción con el biosensor óptico enzimático a optimizar.

4.3.1.- Optimización de los parámetros de medida

En el software del biosensor hay varios parámetros de medida que deben ser optimizados para así obtener la mayor sensibilidad posible. Las medidas se van a realizar con la celda pequeña, para así gastar la menor cantidad de enzima posible.

Los parámetros a optimizar son los siguientes:

- *Velocidad de la válvula:* Se expresa en tanto por ciento y está relacionada con el caudal de entrada y salida de las disoluciones a la celda. Se empieza con un caudal igual a 0,80 ml/min, lo que equivale a una velocidad del 33%, y se introduce una concentración de glucosa igual a $5,55 \cdot 10^{-3} M$.

A continuación se modifica la velocidad de la bomba teniendo en cuenta y como referencia que en flujo se introducían el portador y la muestra a una velocidad de 0,50 ml/min, por lo que primero se modifica a una velocidad del 25% (equivalente a 0,70 ml/min), y finalmente a una del 20% (equivalente a 0,60 ml/min), manteniendo siempre la misma concentración de glucosa para así obtener medidas comparables.

Finalmente se miden las áreas de los picos obtenidos en cada caso:

Velocidad de la bomba	0,80	0,70	0,60
Área	$1,64 \cdot 10^5$	$1,90 \cdot 10^5$	$2,16 \cdot 10^5$

→Como se puede observar, la mayor área se obtiene con la menor velocidad, esto es debido a que al entrar más despacio el sustrato tiene más tiempo de interaccionar con la enzima, lo que da lugar a la formación de más GOx·FADH₂ y a un cambio de absorbancia mayor, es decir, a un pico mayor y de mayor área para conseguir la regeneración total.

- *Tiempo de lavado-carga:* Es el tiempo que tarda en llenarse el circuito de sustrato. Tras realizar varias pruebas se llega a la conclusión de que 1 minuto es suficiente para considerar todas las conducciones homogeneizadas.
- *Tiempo de inyección:* Es el tiempo que realmente está entrando y saliendo de forma continua muestra a la celda. Para poder optimizarlo se comienza con un tiempo de 2 min, y a continuación este se va aumentando, manteniendo siempre constante una concentración de glucosa igual a $5,55 \cdot 10^{-3} M$, para así obtener medidas comparables.

Tiempo de inyección (min)	2	3	4
Área	$1,08 \cdot 10^4$	$1,08 \cdot 10^5$	$3,21 \cdot 10^5$

→Como se puede apreciar en la tabla, al aumentar el tiempo de inyección, se introduce muestra durante más tiempo, dando lugar a una mayor transformación a GOx·FADH₂. No se prueba a tiempos mayores de 4 minutos ya que es una reacción reversible y podría producirse en cierta proporción la oxidación del FADH₂ ya formado a la vez que la reducción que debería producirse.

De esta forma se concluye que los parámetros óptimos para una determinación con el biosensor óptico enzimático son:

Parámetro	Valor
Velocidad de la válvula	20% = 0,6 ml/min
Tiempo de lavado-carga	1 minuto
Tiempo de inyección	4 minutos

4.3.2.- Descripción celdas

Para el biosensor es posible el uso de tres celdas distintas, cuya diferencia radica en las dimensiones de la lámina que, como ya se ha explicado, polimeriza en su interior directamente.

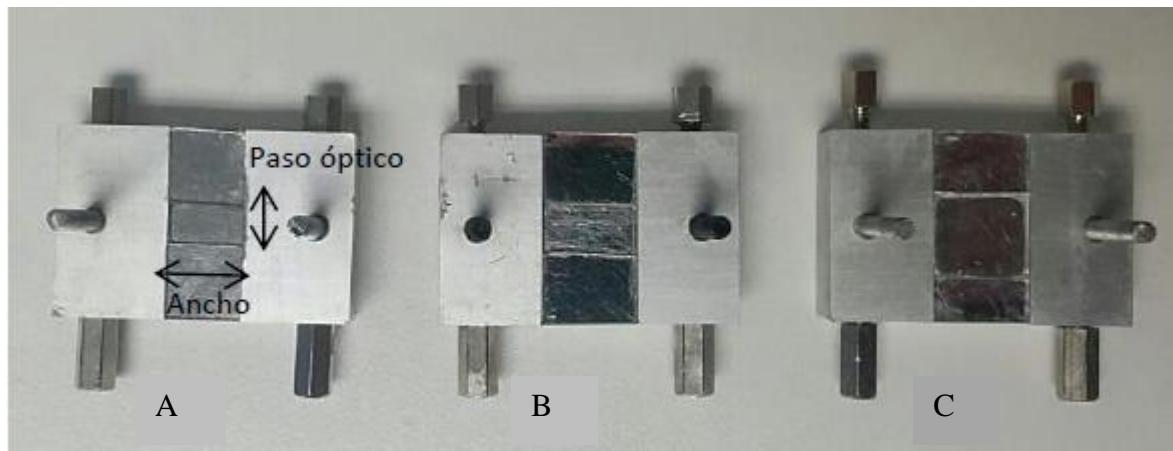


Figura 10. Celdas para el biosensor⁸.

La celda A o *celda pequeña* es la de menor anchura, pero tiene el mismo paso óptico que la celda B o *celda mediana*. Mientras que la celda mediana tiene la misma anchura que la celda C o *celda grande*, aunque esta última posee un paso óptico mayor. En resumen:

- Menor anchura: Celda pequeña.
- Mayor paso óptico: Celda grande.
- Misma anchura: Celdas mediana y grande.
- Mismo paso óptico: Celdas pequeña y mediana.

4.3.3.- Comparación celdas

Como ya se ha explicado, hay tres tipos de celdas que difieren en la anchura y el paso óptico. Una vez optimizados los parámetros de medida hay que comprobar con cuál de las celdas se obtiene la mayor sensibilidad manteniendo una buena reproducibilidad y fiabilidad de las medidas.

Lo primero es realizar con cada una de las celdas una serie de medidas de la misma concentración de glucosa para conocer la reproducibilidad mediante la desviación estándar relativa (DSR). Cuanto más baja sea ésta, mejor reproducibilidad y mayor fiabilidad de las medidas.

A continuación con cada una de las celdas se realiza una recta de calibrado con las siguientes concentraciones de glucosa: $2,24 \cdot 10^{-3} M$, $3,34 \cdot 10^{-3} M$, $4,43 \cdot 10^{-3} M$, y $5,60 \cdot 10^{-3} M$, siendo la pendiente de la recta obtenida la sensibilidad de cada celda.

Se realizan las medidas para conocer ambos parámetros con cada una de las celdas, preparando en todos los casos láminas de la concentración de enzima ya optimizada, 600 IU:

- Celda pequeña:

Se realiza la medida cinco veces de una concentración de glucosa igual a $3,33 \cdot 10^{-3} M$, obteniendo una DSR = 9,88 %.

A continuación se realiza una recta de calibrado:

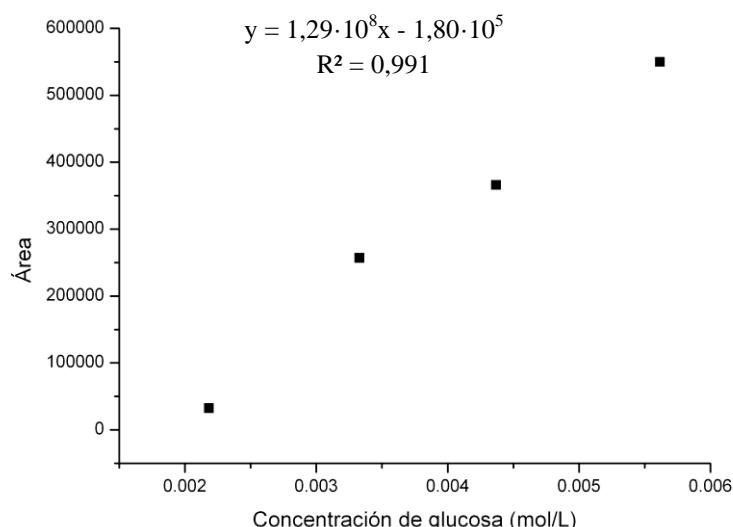


Figura 11. Recta de calibrado en celda pequeña.

- Celda mediana:

Se realizan las medidas para calcular la reproducibilidad con una disolución de glucosa de concentración $2,79 \cdot 10^{-3} M$, obteniendo una DSR = 6,24%

Se realiza otra pequeña calibración para conocer la sensibilidad de la celda:

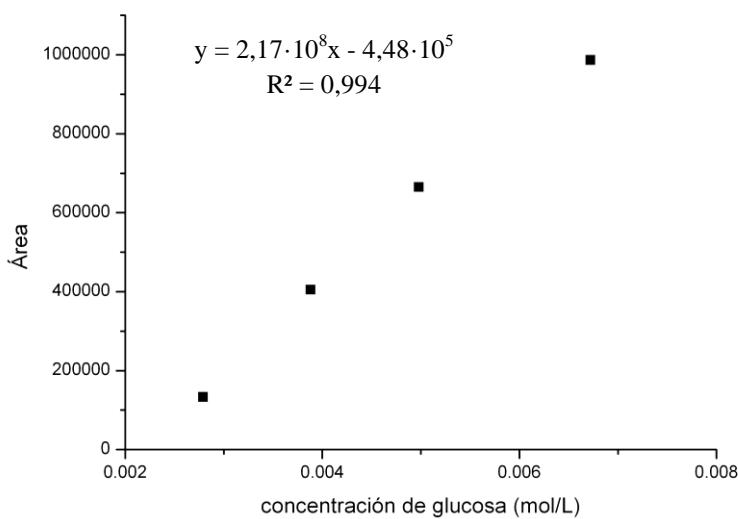


Figura 12. Recta de calibrado celda mediana.

- Celda grande:

Se mide cinco veces la concentración $3,33 \cdot 10^{-3}$ M de glucosa, obteniendo una DSR = 9,05%.

Igual que en los anteriores, se realiza una recta de calibrado para conocer la sensibilidad de esta celda:

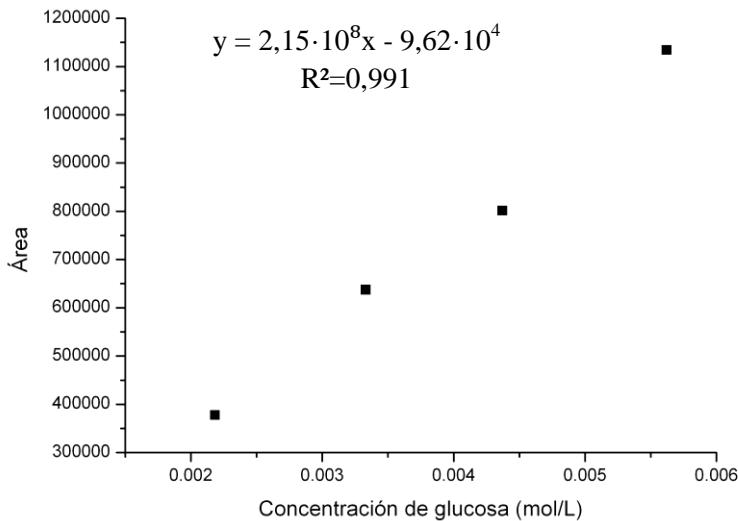


Figura 13. Recta de calibrado con celda grande.

A continuación se procede a la comparación de los parámetros de ambas celdas para elegir la que proporciona las medidas de mayor calidad:

	Celda pequeña	Celda mediana	Celda grande
Reproducibilidad (%)	9,88	6,24	9,05
Sensibilidad	$1,29 \cdot 10^8$	$2,17 \cdot 10^8$	$2,15 \cdot 10^8$
R ²	0,991	0,994	0,991

El parámetro R² es muy similares para todas las celdas, lo que quiere decir que en todos los casos los puntos se ajustan muy bien a la recta descrita por la ecuación, sin embargo se puede observar que hay una mayor reproducibilidad en la celda mediana, la cual además es la más sensible.

4.3.4.- Características analíticas. Aplicación en muestras reales.

Una vez elegida la celda más sensible se realiza una recta de calibrado con más puntos que los utilizados en el apartado anterior para así poder determinar el rango lineal. Para ello introducimos disoluciones de distintas concentraciones de glucosa desde $1,67 \cdot 10^{-3} M$ hasta $7,72 \cdot 10^{-3} M$.

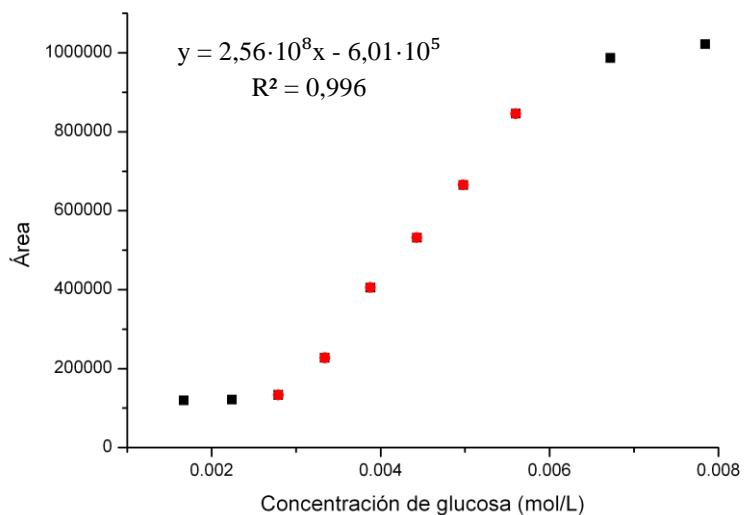


Figura 14. Curva de calibración celda mediana.

Como se observa el rango lineal va desde $2,79 \cdot 10^{-3} M$ hasta $5,60 \cdot 10^{-3} M$, con una sensibilidad de $2,56 \cdot 10^8$.

A continuación, para verificar la precisión en la determinación de glucosa del biosensor, se procede al análisis de una muestra sintética de concentración conocida, $4,43 \cdot 10^{-3} M$, para lo cual se introduce en

el biosensor y se calcula el área bajo el pico formado: $5,39 \cdot 10^5$. Esta cantidad se sustituye en la ecuación de la recta de calibrado calculada anteriormente por el valor de Y:

$$5,39 \cdot 10^5 = 2,56 \cdot 10^8 \cdot X - 6,01 \cdot 10^5 \rightarrow X = 4,46 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

Como vemos, el resultado obtenido interpolando en la recta de calibración realizada previamente es muy parecido a la concentración real de la muestra. Para saber si son significativamente distintas la concentración real y la obtenida, se realiza el test t para dos colas y al 95% de probabilidad, que consiste en calcular la t de student y compararla con el valor establecido, en este caso para N=3 y $\sigma=0,05$ es $t=4,30$, de forma que si la t calculada es menor que la t teórica, no serán significativamente distintas ambas concentraciones:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{N}}{s}$$

Dónde:

$$\bar{x} = 4,46 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

$$\mu = \text{Valor real} = 4,43 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

$$N = \text{Número de medidas para calcular la media} = 3.$$

$$s = \text{Desviación estándar} = 2,12 \cdot 10^{-5}.$$

Sustituyendo se obtiene un valor de t calculado= 2,45. Si lo comparamos con el valor establecido:

$2,45 < 4,30 \rightarrow$ No son significativamente distintas ambas concentraciones.

Se dispone de un “zumo tropical fruta + leche” de la marca Hacendado cuya concentración de azúcares es de 0,517 M. Se calcula la concentración de glucosa realizado una pequeña recta de calibrado e interpolando la muestra con “Glucocard Gmeter, de A.Menarini diagnostics”, siendo de 0,191M y el resto otros azúcares como fructosa o sacarosa. Se introduce una alícuota de la muestra real, 230 μl de muestra en 10 ml de portador, en el biosensor para comprobar su selectividad frente a otros azúcares y se obtiene un área bajo el pico formado de 1093455. Sustituyendo este dato en la recta de calibración se obtiene una concentración en la alícuota:

$$1093455 = 3,02 \cdot 10^8 \cdot X - 2,43 \cdot 10^5 \rightarrow X = 4,425 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

$$\text{Teniendo en cuenta la dilución: } 4,43 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{10}{0,230} = 0,192 \text{ M.}$$

Se compara la concentración obtenida con la real mediante la t de student:

$$\bar{x} = 19,2 \cdot 10^{-2} \text{ M.}$$

$$\mu = 19,1 \cdot 10^{-2} \text{ M.}$$

N= 3.

$$s=7,07 \cdot 10^{-4}.$$

Se obtiene una t experimental = 2,45; $2,45 < 4,30 \rightarrow$ No son significativamente distintas.

Comparando el resultado obtenido con el valor real comprobamos que el biosensor es muy selectivo ya que solo produce cambios de absorbancia al interaccionar la enzima con la glucosa, no con el resto de azúcares.

Finalmente se intenta establecer el tiempo de vida de la lámina, llegando a realizar hasta 35 medidas consecutivas con la misma, sin que haya diferencias significativas entre los resultados.

Por último se realiza una comparación de la sensibilidad de su recta de calibrado con el tiempo, para lo que se realizaron calibraciones los días 2, 7 y 10:

	Sensibilidad	R ²
Día 2 (Anexo 6)	$3,02 \cdot 10^8$	0,999
Día 7 (Anexo 7)	$2,95 \cdot 10^8$	0,997
Día 10 (Anexo 8)	$3,11 \cdot 10^7$	0,999

Se realiza un estudio de la regresión comprobando que las pendientes no difieren significativamente durante los 7 primeros días pero, a partir del décimo día se obtiene una disminución de la pendiente que da lugar a diferencias significativas (Anexo 9).

5.-CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto la reacción enzimática reversible de la glucosa con la glucosa oxidasa basada en las propiedades de absorción molecular de la enzima, y en concreto del FAD, lo que permite trabajar en una zona espectral libre de interferencias:
 - a) Con el estudio de la reacción en disolución se comprueba que es imprescindible para la regeneración rápida y total un contacto óptimo y continuo con el O₂ del aire. Condiciones que el biosensor cumple ya que las disoluciones son impulsadas gracias a una bomba peristáltica.
 - b) En la celda de flujo se ha optimizado la concentración de enzima necesaria para conseguir el mayor rango lineal manteniendo tiempos de regeneración no demasiado largos entrampando la enzima en una lámina polimérica que permite una mejor regeneración debido a que la disolución se pone en contacto con toda la superficie de ésta.
2. Una vez estudiada la reacción y optimizada la concentración de enzima se optimizan los parámetros del biosensor óptico enzimático, de forma que:
 - a) A menor velocidad de la bomba, mayor tiempo de contacto de las disoluciones con la enzima, lo que produce señales mayores.
 - b) El tiempo de inyección óptimo, 4 minutos, no debe ser demasiado corto para permitir que se produzca la reacción, ni demasiado largo para impedir que se produzca una segunda reducción antes de la regeneración completa.

Con estas condiciones se consigue que la lámina se regenere de forma adecuada proporcionando señales muy sensibles y permitiendo hasta 35 medidas, es decir, estas condiciones tan poco agresivas confieren a la lámina un tiempo de vida elevado.

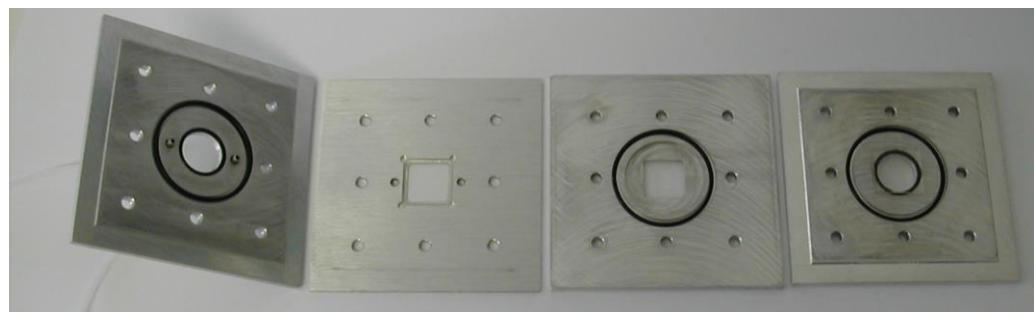
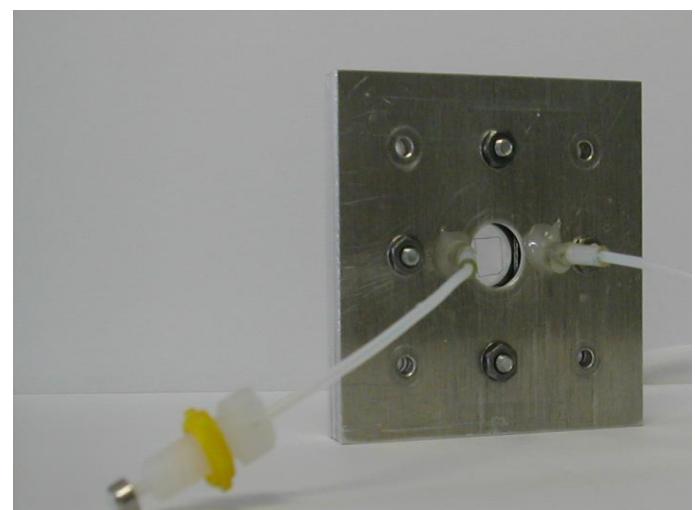
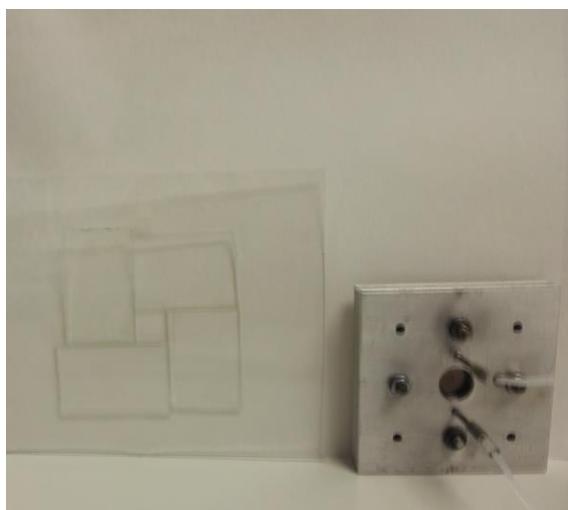
3. Para comprobar la precisión del análisis con este biosensor se ha introducido una muestra sintética de concentración conocida, obteniéndose un valor muy próximo al real.
4. Finalmente para comprobar la selectividad frente a otros azúcares se ha analizado un zumo que contiene cierta cantidad de otros azúcares como sacarosa o fructosa, obteniéndose un resultado también muy próximo al real, lo que nos permite concluir que el biosensor es muy selectivo y preciso

6.-BIBLIOGRAFÍA

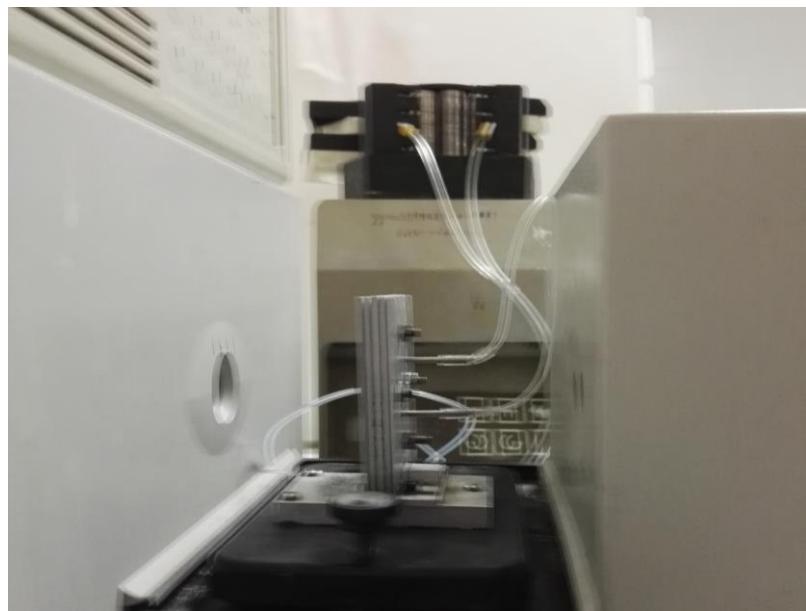
- 1.- Gonzalo Ruiz, Javier. “Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria”. Directores: Javier Muñoz Pascual y M^a Asunción Alonso Lomillo. Universidad Autónoma de Barcelona, departamento de Química, 2006.
- 2.- Ángel Maquieira. “¿Qué son los sensores y para qué los podemos utilizar? Conceptos y aplicaciones”. Universidad politécnica de Valencia, IDM, Departamento de Química, 2010.
- 3.- López Rodríguez, María Lorena. “Transductores y biosensores”.
- 4.- Brian Eggins, “Biosensors, an introduction”. Wiley Teubner, 1996.
- 5.- Ortega Castell, M^a Estefanía. “Desarrollo de biosensores ópticos autoindicadores basados en las propiedades ópticas intrínsecas o inducidas de oxidases y hemoproteínas: Diseño, puesta a punto e implementación de esquemas de detección alternativos”. Directores: Javier Galbán Bernal y Susana de Marcos Ruiz. Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Analítica, Grupo de Biosensores Analíticos, 2014.
- 6.- Del Barrio Redondo, Melisa. “Desarrollo de (nano) biosensores enzimáticos de fluorescencia dirigidos a la monitorización mínimamente invasiva de glucosa”. Directores: . Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Analítica, Grupo de Biosensores Analíticos, 2014.
- 7.- Concepción Pérez Conde. “Sensores ópticos”. Universitat de Vàlencia, 1996.
- 8.- Martín Barreiro, Alba. “Puesta a punto de un biosensor óptico enzimático para la determinación de peróxido de hidrógeno”. Directora: Susana de Marcos Ruiz. Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Analítica, Grupo de Biosensores Analíticos, 2015.

ANEXOS

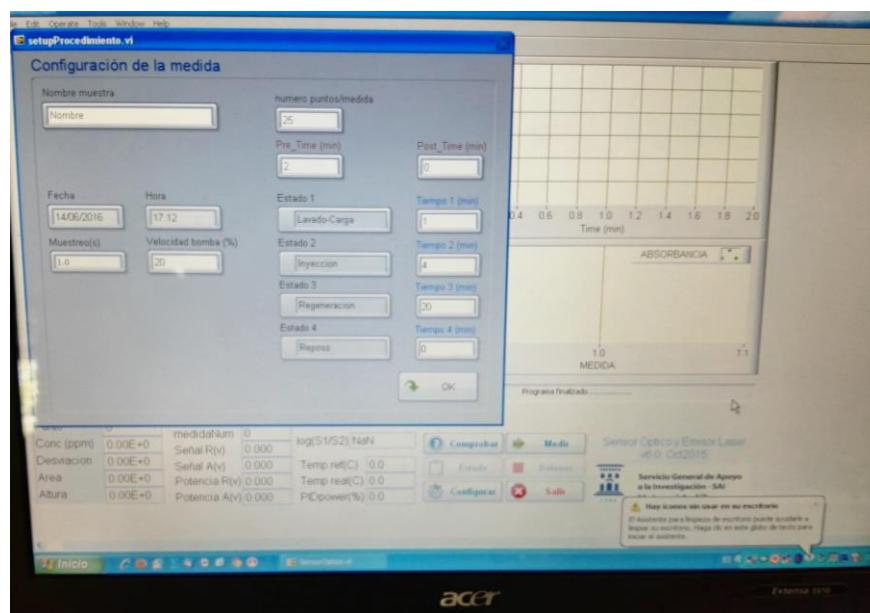
- Anexo1: Celda de flujo y molde para láminas



- Anexo 2: Celda de flujo en espectrofotómetro de absorción molecular monohaz



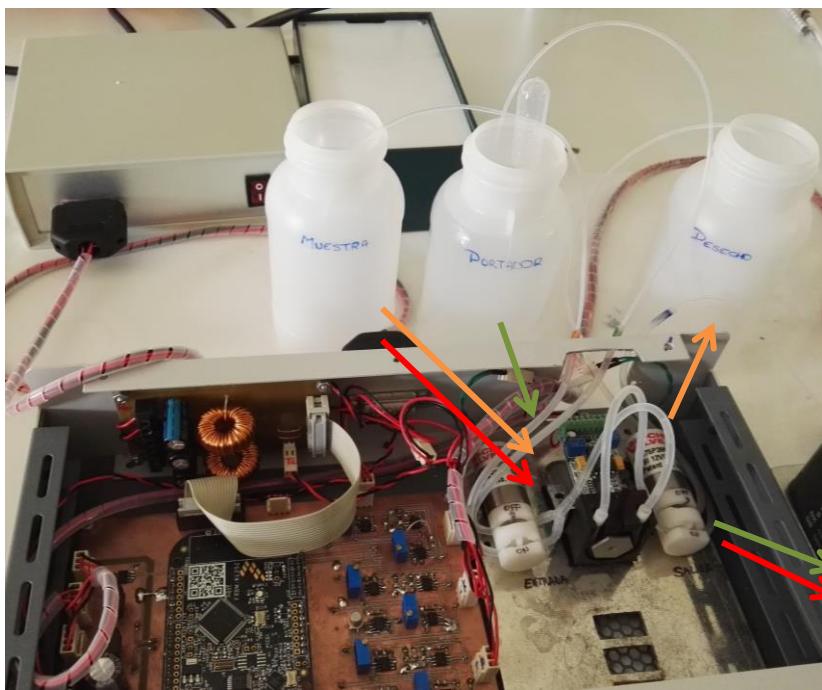
- Anexo 3: Módulo C, software de control del biosensor



- Anexo 4: Módulo B del biosensor



- Anexo 5: Recorrido de los ciclos del biosensor



Lavado-carga

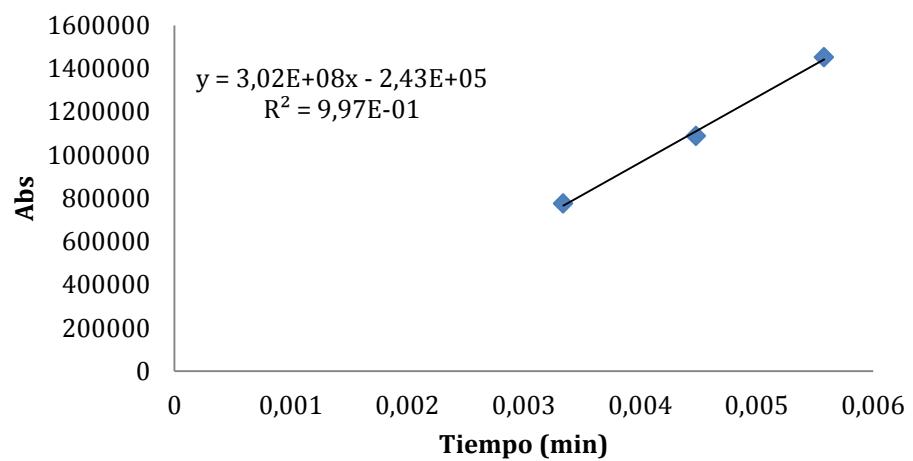
Inyección

Regeneración

Celda de medida

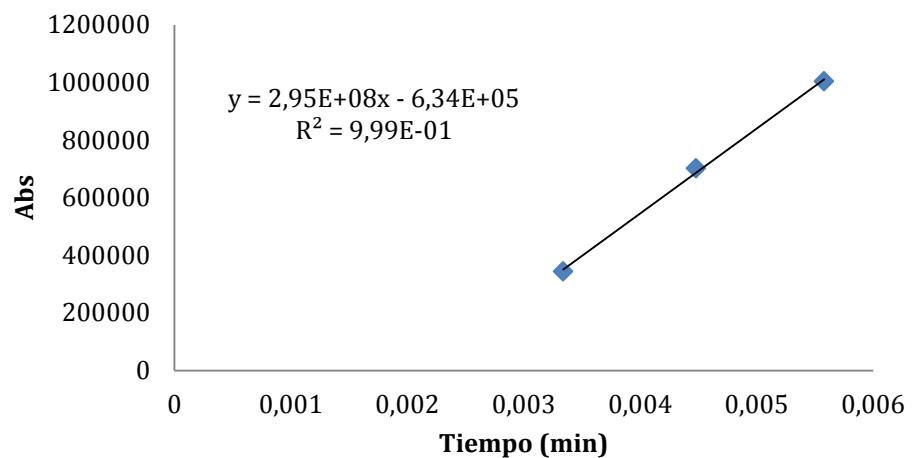
- Anexo 6: Lámina día 2

Día 2



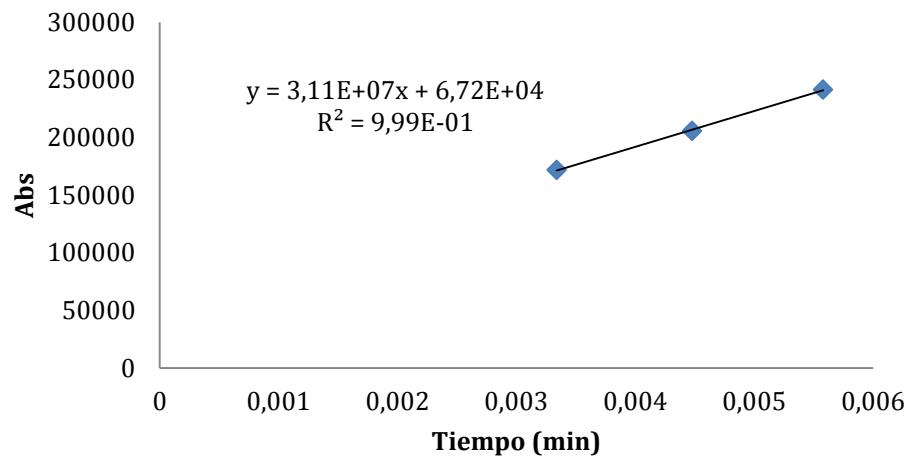
- Anexo 7: Lámina día 7

Día 7



- Anexo 8: Lámina día 10

Dia 10



- Anexo 9: Estudio de regresión.
- 1) Estudio de los días 2 y 7:

Resumen

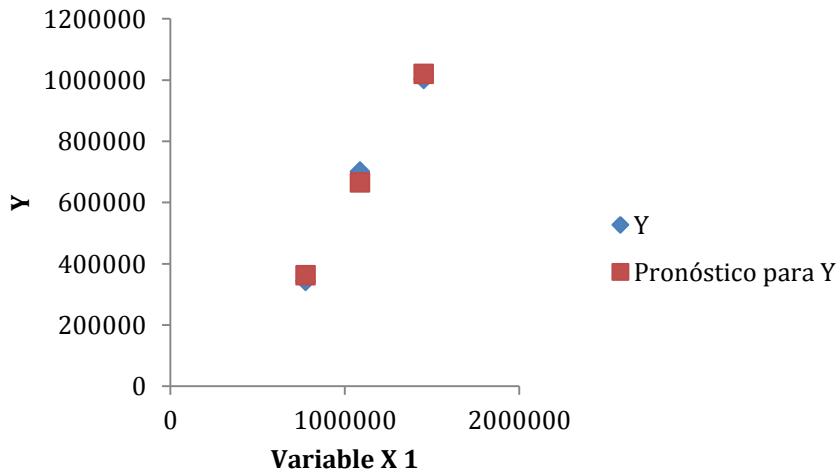
<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,995658
Coeficiente de determinación R ²	0,991335
R ² ajustado	0,98267
Error típico	43498,17
Observaciones	3

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2,16E+11	2,16E+11	114,4064	0,059346
Residuos	1	1,89E+09	1,89E+09		
Total	2	2,18E+11			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-390927	103465,9	-3,77831	0,164716	-1705586	923732,3	-1705586	923732,3
Variable X 1	0,97122	0,090801	10,69609	0,059346	-0,18252	2,12496	-0,18252	2,12496

Variable X 1 Curva de regresión ajustada



2) Estudio de los días 2 y 10:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99959
Coeficiente de determinación R^2	0,99918
R^2 ajustado	0,998361
Error típico	1411,601
Observaciones	3

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2,43E+09	2,43E+09	1219,221	0,018227
Residuos	1	1992618	1992618		
Total	2	2,43E+09			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	92490,87	3357,673	27,54613	0,023101	49827,6	135154,1	49827,6	135154,1
Variable X 1	0,10289	0,002947	34,91735	0,018227	0,065449	0,140331	0,065449	0,140331

Variable X 1 Curva de regresión ajustada

