

ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE GOX INMOVILIZADA CON FCME₂-LPEI PARA SU USO POTENCIAL APLICACIÓN EN UN BIOSENSOR DE GLUCOSA TIPO PARCHÉ

Behavior analysis of GOx immobilized with FcMe₂-LPEI for potential application in a glucose patch biosensor

Dulce Victoria Estrada Osorio^{1*}, Ricardo Antonio Escalona Villalpando¹
Janet Ledesma García¹

¹Universidad Autónoma de Querétaro

*Autora de correspondencia
dulce.estradao@hotmail.com

RESUMEN

El proceso de inmovilización de la enzima Glucosa Oxidasa (GOx) puede modificar su actividad enzimática, ya que al inmovilizarse con un polímero redox o mediador electroquímico ayuda a la transferencia de electrones generada en la oxidación de glucosa hacia la superficie del electrodo. El polímero redox utilizado para este trabajo fue basado en ferroceno (modificado con lineal dimetilferroceno polietilénimina, FcMe₂-LPEI) y glucosa oxidasa como bio ánodo. Para la evaluación electroquímica se llevó a cabo el método de tres electrodos utilizando como contra electrodo un carbón poroso (Sigracet®), electrodo de pseudoreferencia una película de Ag/AgCl y electrodo de trabajo FcMe₂-LPEI/GOx. Las reacciones electroquímicas se llevaron a cabo en una solución de buffer de fosfato (PBS) de pH 5.7 (0.1 M), y las voltamperometrías cíclicas (CV) se realizaron en una ventana de potencial de -0.2 a 0.3 E/V contra un electrodo de Ag/AgCl a 5 mV s⁻¹. De la metodología consistió en utilizar el PBS en ausencia y presencia de glucosa para establecer su actividad y ser medido por VC bajo condiciones de laboratorio (temperatura de 21°C ± 2°), de pH y presión atmosférica. Se observó un incremento en el pico de oxidación del FcMe₂-LPEI debido a la transferencia de electrones de la enzima hacia el mediador redox. En este trabajo se reporta la comparación entre ambos dispositivos analizados para comprobar el incremento en sus propiedades catalíticas y como perspectiva para utilizarse como biosensor tipo parche o adherido en la piel.

Palabras clave: glucosa oxidasa, polímero redox, microfluídico, biosensor.

ABSTRACT

The immobilization process of the enzyme Glucose Oxidase (GOx) can modify the characteristics of the electrochemistry reaction of the enzyme, when it is immobilized with a redox polymer or electrochemical mediator it helps to enhance

de electrochemical qualities of itself. The redox polymer used in this work was ferrocene-based (dimethylferrocene- modified linear polyethylenimine, FcMe₂-LPEI) as bioanode and Glucose Oxidase. A model with three electrodes (counter electrode (carbon fibers (Sigracet®)), work electrode (clean and FcMe₂-LPEI/GOx) and reference electrode (Ag/AgCl)) to measure the potential difference generated in the redox reaction of the enzyme. The electrochemical reactions were performed in a Phosphate Buffer Solution (PBS) with pH 5.7, and the cyclic voltammetry (CV) were analyzed in a potential window of -0.2 to 0.3 E/V s Ag/AgCl with 150 mV/s. To obtain comparative signals, the experiments were performed in a clean electrode and later the FcMe₂-LPEI/GOx electrode was analyzed, both experiments were under the same laboratory conditions (temperature 21°C ± 2°), pH conditions and potential conditions. It was observed an improvement in the characteristics in both processes (reduction and oxidation) of the work electrode with the immobilized enzyme with this modified polymer. In this work is reported the comparison between both analyzed devices to prove the increase in the qualities and to be tested in a patch biosensor later.

Keywords: glucose oxidase, redox polymer, microfluidic, biosensor.

INTRODUCCIÓN

En el área de la salud, continuamente se buscan mejorar los procesos de análisis y monitoreo de biomarcadores importantes en el ser humano, los cuales tienen como finalidad tener un control más certero, con mayor accesibilidad y comodidad para el usuario. Especialmente se buscan dispositivos de monitoreo continuo, no invasivos, de pequeño tamaño y eficaces en el análisis, tal es el caso del desarrollo de biosensores que detectan cantidades muy pequeñas de biomarcadores en el sudor [1], en las lágrimas [2] o en la saliva [3].

Un ejemplo de la aplicación de estas tecnologías es el análisis continuo de la cantidad de glucosa como biomarcador que sirve para monitorear a individuos que padecen

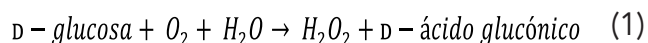


algún tipo de diabetes, para prevenir y evitar desniveles de la misma sustancia que pudiera afectar directamente a su salud física. Este tipo de análisis usualmente se realizan en sangre, lo que sugiere extraer la misma, el uso de biosensores tipo parche puede evitar la incomodidad de los individuos en este proceso.

Los biosensores electroquímicos son dispositivos integrados capaces de otorgar información cuantitativa específica o semi-cuantitativa utilizando reconocimiento biológico de algún elemento [4]. El uso de especies enzimáticas como elemento biológico para llevar a cabo la tarea de reconocimiento de otras especies de interés se ha popularizado y ha demostrado tener múltiples resultados favorables para seguirse utilizando de dicha forma.

Al estudiar específicamente el caso de la construcción de biosensores electroquímicos utilizados para la detección de glucosa, se han reportado múltiples resultados provechosos del uso de la enzima glucosa oxidasa (GOx) [5-7] (véase Figura 1), incrementando la cantidad de los mismos en los últimos años por su gran selectividad, bajo costo y su relativamente fácil obtención. La GOx (EC 1.1.3.4) es una enzima que cataliza la oxidación de la D-glucosa de acuerdo con la siguiente reacción [8]:

Glucosa oxidasa



Los biosensores son usualmente diseñados con grandes cargas enzimáticas para asegurar que exista una actividad biocatalítica suficiente para su adecuado funcionamiento, a su vez a la enzima se le provee con un ambiente favorable para mantener por ciertos periodos de tiempo esta actividad sin afectar la calidad de información buscada [8]. Así como éste existen diferentes puntos clave que se pueden modificar para mejorar la actividad de la enzima que se esté utilizando.

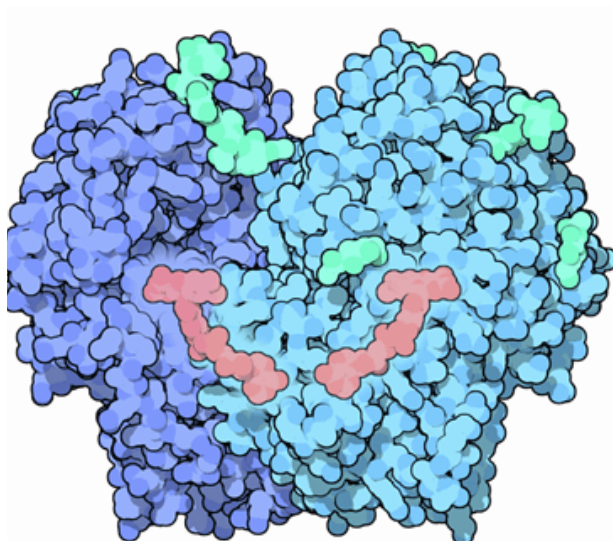


Figura 1. Estructura de dímero de Glucosa oxidasa (Azul claro y oscuro) acomplejado con Dinucleótido Flavina Adenina (FAD) (salmón) y glucanos (aguamarina). Fuente: PGDB (<http://rcsb.org/pdb/>)

Entre los más comunes se encuentran: maximizar la densidad de carga a través de la modificación en el diseño de diferentes materiales para los electrodos [9-11] (base en la que se depositará la enzima), mejoras directamente en el diseño reduciendo tamaños [12] (diseños microTAS, lap-on-a-chip, micro o nanofluidicos) y también se encuentran las mejoras que se realizan en el proceso de inmovilización de las enzimas [13].

El uso de polímeros o mediadores redox entre enzimas se ha popularizado en los últimos años, debido a que dichos compuestos potencializan las capacidades conductoras de las enzimas para aprovechar de mejor forma la reacción electroquímica que sucede cuando el biosensor (basado en enzimas) se pone en contacto con el analito. Un polímero redox es definido como macromoléculas formadas por la unión mediante enlaces covalentes de uno o más monómeros [14] funcionalizados con grupos redox, en los que la movilidad de la carga de los recubrimientos con polímeros redox puede modularse con el potencial aplicado a los grupos en estado oxidado y en estado reducido se igualan [15]. El ferroceno es una molécula bastante estudiada desde su descubrimiento y ha sido bastante atractiva para estudiar debido

a su bajo costo, fácil modificación y que es un compuesto no tóxico. El ferroceno (Fc) tiene fórmula $(C_5H_5)_2Fe$ y es un compuesto organometálico, cuando los átomos de carbono de un ligando orgánico forman enlaces covalentes con un átomo metálico [16], el cual tiene una estructura en la que el ión ferroso se encuentra posicionado entre dos anillos ciclopentadieno [17]. Este compuesto se ha catalogado como una opción altamente popular en el ámbito de desarrollo de biosensores, debido a que cumple con gran mayoría de los requerimientos necesarios para funcionar como mediador ideal en la catálisis enzimática redox [18].

Al aplicar un compuesto organometálico a un polímero redox se pueden estudiar las reacciones electroquímicas que están ocurriendo en el biosensor. En la Figura 2 se muestra el mecanismo de reacción ocurrido cuando un compuesto de este tipo es utilizado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa para su potencial uso en un biosensor de glucosa. Teóricamente el ferroceno mejora la transferencia de la enzima para tener un mejor análisis cuantitativo de glucosa en una solución y una mayor sensibilidad.

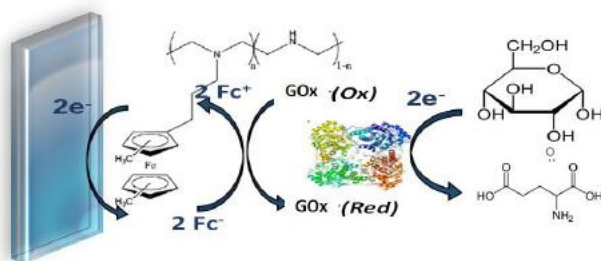


Figura 2. Mecanismo de reacción de polímero redox.

Al tener en cuenta lo descrito en el párrafo anterior sobre las capacidades de ciertos polímeros redox para su potencial aplicación en biosensores, en este trabajo se analizó un polímero basado en poli (etilenimina) lineal (LPEI) y ferroceno (FcMe₂-LPEI) para utilizarse en la inmovilización de la Glucosa Oxidasa (GOx) en un prototipo de biosensor tipo parche para su posterior aplicación para detectar glucosa en sudor.

METODOLOGÍA, MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales para inmovilización enzimática

Todas las sustancias utilizadas fueron de grado reactivo y sin modificaciones. El ferroceno (FcMe₂-LPEI), la glucosa oxidasa (GOx, Sigma-Aldrich), el etilenglicol diglicidil éter (EDGE (7.5 %)) se obtuvieron de Polysciences, Inc. Solución de Buffer de Fosfato (PBS, pH 5.7). Estas sales se consiguieron de JT-Baker.

Materiales para construcción de prototipo de biosensor

Para construir los electrodos se utilizó un papel de fibras de carbono (Sigracet®) y un electrodo de Ag/AgCl cortado a medida, así mismo se utilizó cinta Micropore™ transparente como base para los electrodos y así obtener un diseño tipo parche. Para las conexiones eléctricas se utilizaron caimanos que se conectan directamente al potenciostato.

Equipo de análisis

Las pruebas electroquímicas de potencial constante se realizaron en un potenciostato de la serie SP de BioLogic Science Instruments.

Inmovilización de glucosa oxidasa

Para realizar la inmovilización de la GOx con el FcMe₂-LPEI, se siguió la siguiente metodología: se comenzó por disolver 0.5 mg de GOx en 36 μ L de PBS pH 5.7 y se agitó hasta conseguir una solución homogénea. Posteriormente se depositaron 84 μ L de FcMe₂-LPEI y 4.5 μ L de EDGE (7.5 %) y se agitó durante aproximadamente 2 minutos.

Construcción de Sensor tipo parche

El diseño de los electrodos para el prototipo del biosensor tipo parche se desarrolló a partir del tamaño, los materiales. Por medio de la distribución de los electrodos se obtuvo la eficacia necesaria.

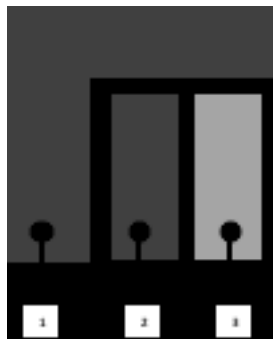


Figura 3. Propuesta de diseño de biosensor tipo parche.

Como se observa en la Figura 3, el biosensor cuenta con 3 electrodos necesarios para su funcionamiento:

-Contra electrodo: fabricado con papel de fibras de carbón, que recibe la corriente aplicada y mide la corriente como una caída de tensión [19]. Este electrodo requiere ser el de mayor área comparada con los otros dos para trabajar correctamente.

-Electrodo de trabajo: se utiliza como base el mismo papel de fibras de carbón, sin embargo, aquí es donde se encuentra depositada la solución de FcMe₂-LPEI/GOx. En este electrodo es donde ocurre la reacción electroquímica de interés, que para este caso particular la reacción es la oxidación de la Glucosa.

-Electrodo de referencia: se utilizó un electrodo de Ag/AgCl.

Los electrodos fueron construidos y dispuestos sobre una cinta tipo Micropore™ transparente, que es una cinta microporosa de grado médico. Al disponer los electrodos en esta cinta como lucen en la Figura 1, se consolida el diseño tipo parche del biosensor. La intención de este prototipo era de construirse con un diseño microfluídico para su posterior análisis.

Proceso de depósito de FcMe₂-LPEI/GOx en electrodo

Para realizar el depósito de la solución primero se debe aislar una pequeña parte del electrodo para dividir la parte donde se encontrará la solución y la demás área del mismo. Para aislar el electrodo se puede utilizar

cualquier material no conductor, como cinta adhesiva, parafina, etc. Para este prototipo se utilizó cinta adhesiva transparente, tal como se ilustra en la Figura 4.



Figura 4. Ilustración de aislado de electrodo de trabajo.

Una vez aislado el electrodo se procede a depositar la solución FcMe₂-LPEI/GOx (10µL) en la parte superior del electrodo, se coloca de esta manera para que se tenga cercanía con mayor área del contra electrodo y también posicionarse cerca del electrodo de referencia. La solución depositada se deja secar por aproximadamente 24 h en refrigeración.

Síntesis de ferroceno con quitosano

Para la síntesis comparativa se realizó el siguiente procedimiento: Fc-COOH (0.18mM) se disolvió en 15 mL de metanol y se le agregaron NHS ((0.27mM) y EDC (0.54mM) mientras se efectuaba una agitación constante. Se dejó por 4 h y se notó el cambio de color de naranja intenso a un color cercano al café. Después de esta agitación se le agregó CHIT (0.39mM) disuelto en 15 mL de ácido acético (0.1M) y se dejó agitando por una hora y posteriormente se le agregó NaBH₄ (0.36mM). Después se dejó en agitación por 24 h. y a esta solución se le agregaron aproximadamente 15 mL de una solución de hidróxido de sodio para formar los precipitados que posteriormente fueron filtrados y lavados con agua desionizada y metanol. Los productos se dejaron secando por 24 h al aire y pasado el tiempo se rasparon del papel filtro para su extracción y para diluirlos en una solución de ácido acético de 1% w. Una vez concluido este proceso se notaron 2 cosas principalmente: 1) el producto seco tiene consistencia de escarcha muy fina y si-

milar a un polvo y 2) al momento de disolver los productos se forma una consistencia parecida a una gelatina.

Estos productos se depositaron en un electrodo de carbón vítreo para realizar su análisis, se utiliza una celda electroquímica con una solución de PBS a pH 7.4, utilizando un electrodo de referencia de calomel saturado y un contra electrodo de alambre de platino.

Pruebas de voltamperometría cíclica

Las señales de corriente generadas por la reacción electroquímica de la enzima se midieron utilizando pruebas de voltamperometría cíclica (CV). El rango de potencial fue de -0.1 a 0.5 (vs. Ag/AgCl) a una velocidad de barrido 5 mV s^{-1} utilizando como electrolito soporte una solución de buffer pH 5.7 (0.1 M). Se realizaron mediciones repetitivas limpiando la superficie de los electrodos y repitiendo las mismas condiciones. Todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de laboratorio a una temperatura de $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis obtenida del polímero con la enzima en una solución líquida, ideal para utilizarse como una tinta que se puede depositar fácilmente sobre el electrodo y que el papel de fibras de carbono puede absorber sin dificultad alguna.

El electrodo con FcMe2-LPEI/GOx se caracterizó examinando los picos redox que pertenecen al mediador (FcMe2). En la Figura 5 se muestra el dispositivo construido con los electrodos en conjunto, en la que se aprecia un pequeño cambio de color en la parte superior del electrodo de trabajo, ya que se tiene depositada la enzima inmovilizada.

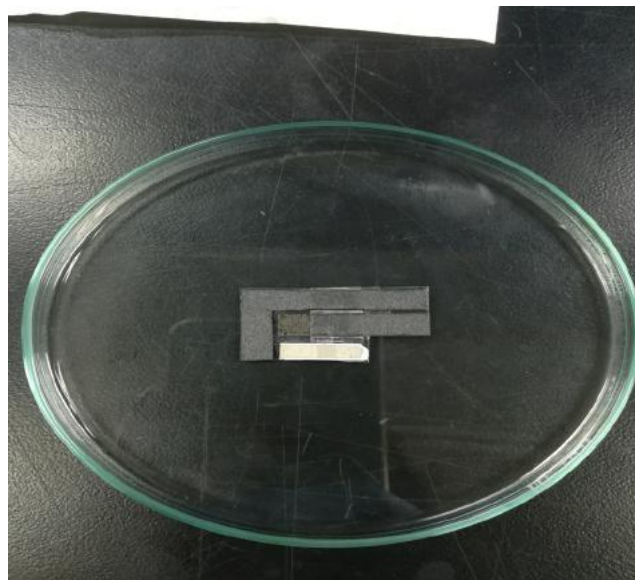


Figura 5. Prototipo de dispositivo de biosensor de glucosa, contra electrodo de fibras de carbono, electrodo de trabajo FcMe2-LPEI/GOx depositado sobre papel de fibras de carbono y electrodo de referencia Ag/AgCl.



Figura 6. Prototipo de dispositivo de biosensor de glucosa (FcMe2-LPEI/GOx) conectado al potencióstato para su análisis. El área de trabajo de los electrodos se encuentra sumergida en PBS pH 5.7.

Una vez construido el dispositivo con la GOx inmovilizada y depositada en el electrodo de trabajo y este mismo correctamente aislado, se procedió a realizar las pruebas de Voltamperometría Cíclica (CV) en el potencióstato. Para estas pruebas, cabe mencionar que se utilizaron dos prototipos, uno con la FcMe2-LPEI/GOx y el otro "limpio", es decir, únicamente con el polímero, para comparar los resultados obtenidos y cotejar el funcionamiento con la GOx inmovilizada.

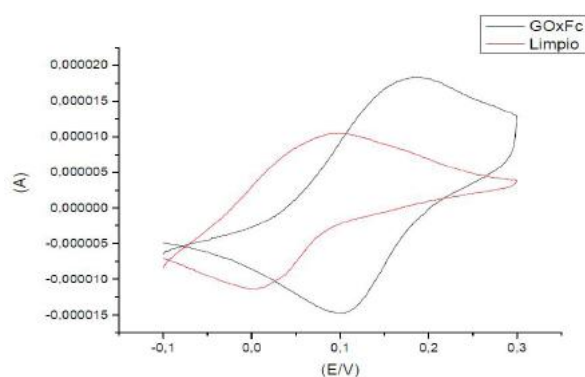


Figura 7. Pruebas CV de prototipo de biosensor con FcMe₂-LPEI/GOx (línea color negro) y señal de blanco (línea color rojo). Rango de escaneo 150 mV/s, PBS pH 5.7, Ag/AgCl como electrodo de referencia, 21°C

En la Figura 7 se presenta el voltamperograma obtenido de las señales de reacción electroquímica de la FcMe₂-LPEI/GOx. Se puede observar que los valores de la corriente fueron constantemente menores en el dispositivo limpio; la corriente máxima fue de 10.43 μ A y la mínima de -11.38 μ A. Las corrientes analizadas para el dispositivo con la enzima, con una corriente máxima de 18.31 μ A y una mínima de -14.77 μ A, sugieren que el polímero está funcionando en un rango aceptable y comparable con otros trabajos reportados.

En este mismo voltamperograma se observa un desplazamiento del potencial mostrando el pico de reducción en 3 mV para el electrodo limpio y en 105 mV para el electrodo de FcMe₂-LPEI/GOx, mientras los picos de oxidación se encuentran en 103 mV para el electrodo limpio y en 185 mV en el electrodo con el polímero y la enzima. Durante la experimentación se analizaron otros polímeros redox para generar resultados comparativos que justifiquen el uso de este polímero en la inmovilización de la GOx. Entre las opciones a analizar, se realizó la síntesis de ferroceno con quitosano y de ferroceno con quitosano y nanotubos de carbono (CNT) para comparar el funcionamiento del ferroceno en ambas condiciones (quitosano y LPEI). Todas las síntesis tienen la enzima inmovilizada para hacer una comparación correcta.

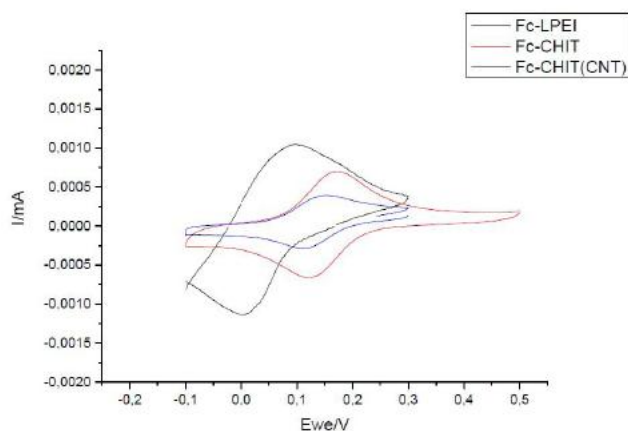


Figura 8. Pruebas CV de prototipo de biosensor con diferentes polímeros redox: ferroceno con LPEI y GOx (línea color negro), ferroceno con quitosano y GOx (línea color rojo) y ferroceno con quitosano y nanotubos de carbono y GOx (línea color azul). Todos bajo solución de PBS pH 5.7, 21°C

CONCLUSIONES

Se logró comprobar que la reacción electroquímica generada es reversible, lo que sugiere que se obtiene la misma cantidad de productos que reaccionaron que al inicio de la reacción química. Lo anterior ocasiona que esta síntesis sea altamente recomendable para aplicarse en un biosensor y que no se generen pérdidas en la reacción. En este trabajo se mostró el comportamiento de un electrodo que funciona con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada con el FcMe₂-LPEI y que presentó mejor comportamiento que los electrodos previamente analizados. Con estos resultados se puede concluir que este prototipo tiene expectativas altas de funcionar como biosensor de glucosa, debido a que se pudo apreciar el incremento en las capacidades electroquímicas del mismo, aun así se requiere mayor experimentación para comprobar que es viable su uso en aplicaciones de éste tipo.

Así mismo, cabe mencionar que se pudo observar una disminución en la corriente de la síntesis con quitosano, lo que se puede deber a una hidrólisis del polímero debido al tiempo que pasó en la solución de ácido acético, a pesar de estas condiciones, se

aprecia claramente que la síntesis con LPEI tiene una corriente considerablemente mayor que las otras dos síntesis analizadas. Esto indica que el rendimiento es mayor y justifica su uso para el biosensor de glucosa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo durante toda esta investigación.

Así mismo se agradece el aporte y apoyo de los miembros del Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica del Estado de Querétaro.

REFERENCIAS

- [1] S. Anatasova, B. Crewther, P. Bembnowicz, V. Curto, H. MD. Ip, B. Rosa and G. Z. Yang, "A wearable multisensing patch for continuous sweat monitoring", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 93, 2017, p. 149-145.
- [2] S. R. Corrie, J. W. Coffey, J. Islam, K. A. Markey and M. A. F. Kendall, "Blood, sweat and tears: developing clinically relevant protein biosensors for integrated body fluid analysis", *Analyst*, 2015, 140, p. 4350-4364.
- [3] W. Zhang, Y. Du and M. L. Wang, "On-chip highly sensitive saliva glucose sensing using multilayer films composed of single-walled carbon nanotubes, gold nanoparticles, and glucose oxidase", *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 4, 2015, p. 96-102.
- [4] A. Conlisk, *Essentials of micro and nanofluidics: with applications to the biological and chemical sciences*, New York: Cambridge Press, 2013.
- [5] F. Su, L. Zhang, X. Kong, F. Lee, Y. Tian and D. R. Meldrum, "Ratiometric glucose sensing based on fluorescent oxygen films and glucose oxidase", *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol 14, 2017, p. 1-6.
- [6] C. O. Ania, A. Gomis-Berenguer, J. Dentzer and C. Vix-Guteri, "Nanoconfinement of glucose oxidase on mesoporous carbon electrodes with tunable pore sizes", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 808, Jan. 2018, p. 372-379.
- [7] W. Zhang, Y. Du and M. L. Wang, "Non-invasive glucose monitoring using saliva nano-biosensor", *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 4, June 2015, p. 23-29.
- [8] D. G. Buerk, *Biosensors Theory and Applications*, Taylor & Francis Group, 1993, CRC Press.
- [9] A. Walcarius, S. D. Minteer, J. Wang, Y. Lin and A. Merckoci, "Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends", *J. Mater. Chem. B*, 2013, 1, 4878.
- [10] M. Romero-Arcos, M. G. Garnica-Romo and H. E. Martínez-Flores, "Characterization of Amperometric Laccase Biosensor Based on Carbon Nanotube", *Procedia Technology*, vol. 27, 2017, p. 279-281.
- [11] M. S. Rahman, Md. S. Anower, L. B. Bashar and K. A. Rikta, "Sensitivity analysis of graphene coated surface plasmon resonance biosensors for biosensing applications", *Sensing and Bio-sensing Research*, vol. 16, Nov. 2017, p. 41-45.
- [12] R. A. Escalona-Villalpando, R. C. Reid, R. D. Milton, L. G. Arriaga, S. D. Minteer and J. Ledesma-García, "Improving the performance of lactate/oxygen biofuel cells using a microfluidic design", *Journal of Power Sources*, vol. 342, 2017, p. 546-552.
- [13] A. S. Campbell, C. Dong, F. Meng, J. Hardinger, G. Perhinschi, N. Wu and C. Z. Dinu, "Enzyme Catalytic Efficiency: A function of Bio-Nano Interface Reactions", *Appl. Mater. Interfaces*, 2014, 6 (8), p. 5393-5403.
- [14] J. W. Nochilson, *The Chemistry of Polymers*, 3ra. Edición, University of Greenwich, 2006.
- [15] S. Alegret, M. del Valle and A. Merkoçi, *Sensores electroquímicos*, Universitat Autònoma de Barcelona, Servicio de Publicaciones, 2004.
- [16] G. A. Carriedo U. y D. M. San José, *Curso de iniciación a la química organometálica*, Servicio de Publicaciones, Universidad de Oviedo.
- [17] G. Wilkinson, M. Rosenblum, M. C. Whiting and R.B. Woodward, "The structure



of iron bis-cyclopentadienyl", *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 8, 1952, p. 2125-2126.

[18] N. Palomera, J. L. Vera, E. Meléndez, J. E. Ramirez-Vick, M. S. Tomar, S. K. Arya and S. P. Singh, "Redox active poly(pyrrole-N-ferrocene-pyrrole) copolymer based mediator-less biosensors", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 658, 2011, p. 33-37.

[19] A. Hickling, "Studies in electrode polarization. Part IV: The automatic control of the potential of a working electrode", *Transactions of the Faraday Society*, 38, 1942, p. 27-33.