

Biosensor enzimático

como alternativa para cuantificar los niveles de glucosa en la sangre



Desarrollo de un biosensor de polianilina dopado con OGr para detectar glucosa

Development of a rGO-doped polyaniline biosensor to detect glucose

RESUMEN

En este trabajo, se fabricó un sensor electroquímico utilizando una placa de circuito impreso revestida con lámina de cobre como sustrato. Se elaboraron sensores con una matriz del polímero conductor polianilina y el compuesto nanoestructurado de óxido de grafeno reducido, aplicando dos tipos de secado: luz infrarroja y *spin coating*. Luego, se inmovilizó la enzima glucosa oxidasa de alta especificidad con una solución de glutaraldehído. Los sensores se analizaron en presencia de una solución de D-Glucosa a una concentración de 16 mM. La medición de la actividad electroquímica se realizó mediante la técnica de voltamperometría cíclica. Los resultados mostraron que las muestras secadas con luz infrarroja presentaban un mejor desempeño a velocidades de exploración de 0,3 a 0,8 mV/s, lo cual sugiere una alta transferencia de carga a 0,8 mV/s y reversibilidad. Los electrodos secados con el método *spin coating* no mostraron reversibilidad. Con esta técnica se demuestra que existe un gran potencial para el desarrollo de biosensores con capacidad de detección de glucosa para la población diabética en el Perú.

ABSTRACT

In this work, electrochemical sensors were designed and manufactured using a Printed Circuit Board coated with copper foil as substrate. These sensors were developed using a matrix of the conductive polymer polyaniline and the nanostructured compound of reduced graphene oxide, and were applied two different drying methods: infrared light and spin coating. Then, the glucose oxidase enzyme of high specificity was immobilized with glutaraldehyde solution. The sensors were analyzed in the presence of a D-Glucose solution at a concentration of 16 mM. The electrochemical activity was measured using the cyclic voltamperometry technique. As for the results, those samples dried with infrared light displayed better performance at scan rates of 0.3 to 0.8 mV/s with a high charge transfer of 0.8 mV/s and reversibility. On the other hand, the electrodes dried with the spin coating method did not show reversibility. With this technique it is highly likely to develop biosensors to detect glucose in diabetic people in Peru.



Palabras Claves

Biosensor enzimático, polianilina PANi, óxido de grafeno reducido OGr, glucosa oxidasa, reacción redox, voltamperometría cíclica.

Key words

Enzymatic biosensor; polyaniline PANi, reduced graphene oxide rGO, glucose oxidase; redox reaction; cyclic voltamperometry.

INTRODUCCIÓN

Este estudio tiene como principal objetivo el desarrollo de un biosensor que cuantifique la concentración de glucosa, mediante el uso de una matriz constituida por el polímero conductor polianilina (PAni), nanomateriales como el óxido de grafeno reducido (OGr), así como enzimas inmovilizadas como la glucosa oxidasa (GOx) sobre un sustrato diseñado a partir de una placa de circuito integrado PCB.

Las soluciones se realizan mediante un procedimiento de limpieza muy riguroso y se ejecutó por capas en condiciones estables en el laboratorio. La preparación se basó en diferentes insumos utilizando como analito al monosacárido D-glucosa (DG), a fin de verificar la sensibilidad del biosensor y, de acuerdo con ello, analizar su comportamiento.

La caracterización del biosensor se realizó por la técnica de voltametría cíclica, la cual consiste en analizar el potencial de óxido-reducción, y la técnica de cronoamperometría, que consiste en analizar la variación de la intensidad de corriente en presencia del analito. Las muestras fabricadas se basaron en matrices poliméricas dopadas con OGr como transductor, se secaron utilizando las técnicas por infrarrojos (IR) y *spin coating*, para luego ser utilizadas en la fabricación de biosensores y aplicarlas en la cuantificación de glucosa.

Los ensayos de esta investigación fueron elaborados en el laboratorio de la Universidad Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), logrando la fabricación de un biosensor electroquímico mediante un electrodo de cobre sensible a la presencia de DG con capacidad para cuantificar.

FUNDAMENTOS

Investigaciones recientes que utilizan anticuerpos, proteínas y enzimas inmovilizadas sobre bases poliméricas indican que las propiedades de estos pueden ser mejorados a través de dopajes. Así, estas muestran un gran potencial en la conversión de señales químicas producidas por la interacción —por ejemplo, con el monosacárido DG, en su capacidad selectiva, sensibilidad (hasta concentraciones de pg/mL) y reversibilidad—; además, pueden ser utilizados para la detección de diferentes patologías brindando resultados rápidos, confiables y de menor costo [6].

El Ministerio de Salud del Perú (Minsa) reportó que la prevalencia de la diabetes fue del 1 al 8 % de la población peruana en 2019, encontrando que las ciudades de Piura y Lima son las más afectadas (2,5 % de su población). Este estudio también menciona que la diabetes mellitus afecta a más de un millón de peruanos, pero menos de la mitad de ellos fueron diagnosticados [8].

Una alternativa para el diagnóstico es el desarrollo de sensores electroquímicos capaces de cuantificar la cantidad de glucosa en la sangre. La fabricación de estos sensores implica el uso de membranas basadas en matrices compuestas por polímeros conductores como la polianilina, compuestos

nanoestructurados como el OGr y enzimas con alta especificidad como la GOx [2].

Una importante sinergia lograda para mejorar la conductividad es la reticulación con OGr. Un paso relevante es la inmovilización de las enzimas en la superficie de los electrodos, lo cual se logra con compuestos como el glutaraldehído (GLU), lo que permite obtener una respuesta a partir de la interacción de GOx con las moléculas de la sonda [3].

El proceso de dopado de PAni con OGr se mejora con el uso de solventes orgánicos como N-metil-2-pirrolidona (NMP), generando dispersiones homogéneas y mejorando su rendimiento electroquímico [4].

Investigaciones recientes que emplean anticuerpos, proteínas y enzimas inmovilizadas en bases poliméricas indican que sus propiedades pueden ser mejoradas a través del dopado. Estas muestran un gran potencial en la conversión de señales químicas producidas por la interacción; por ejemplo, la DG, en su capacidad selectiva, sensibilidad (hasta concentraciones de pg/mL) y reversibilidad. De este modo, pueden ser utilizadas para la detección de diferentes patologías, proporcionando resultados rápidos y confiables [5].

METODOLOGÍA

Materiales y reagentes

Se utilizaron productos químicos de grado reactivo. La polianilina sal de emeraldina (PAni-ES) $[(C_6H_4NH)_2(C_6H_4N)]_n$ de peso molecular promedio $M_w > 15000$, el polietilenglicol (PEG) de peso molecular promedio $M_w = 200$, el óxido de grafeno reducido (OGr), la solución buffer de fosfato (PBS) y la enzima liofilizada glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* tipo II de 19290 U/g fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El glutaraldehído $C_5H_8O_2$ al 25 %, hidróxido de amonio NH_4OH fueron adquiridos de Reagen. La D-Glucosa $C_6H_{12}O_6$ y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fueron adquiridos de Cloroquímica. Se empleó como electrodo de trabajo una placa fenólica recubierta con una lámina de cobre para circuitos impresos PCB. Se preparó una solución de cloruro férrico al 42 % para la fabricación de la placa PCB. Se utilizó agua desionizada utilizada para la preparación de todas las soluciones. El laboratorio se encuentra acondicionado para la fabricación de este tipo de sensores.

Preparación del electrodo de trabajo de cobre

Se utilizó una placa de circuito impreso (PCB) como electrodo de trabajo (*Working Electrode WE*) que sirve como sustrato para la matriz del sensor. Se obtuvo la forma mediante el método de transferencia térmica con papel fotográfico impreso (ver la figura 1). El área activa del electrodo es de 25 mm². Se atacó la placa con la solución de cloruro férrico en un lapso de 15 minutos. Posteriormente, se lavó con alcohol isopropílico y agua desionizada, y se secaron y almacenaron los electrodos en condiciones ambientales.

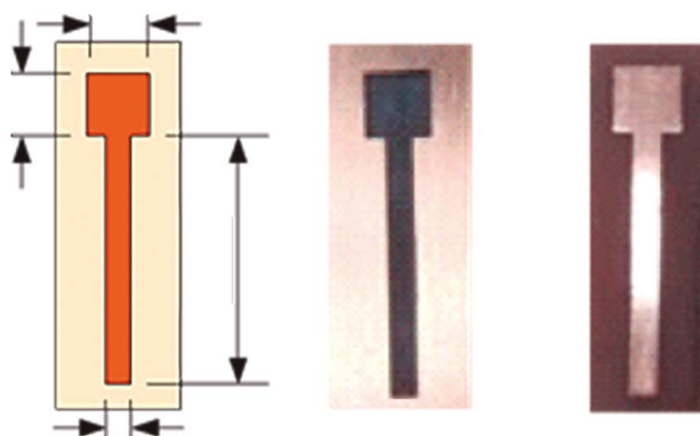


Figura 1. (a) Diseño del electrodo de trabajo, (b) transferencia térmica del diseño impreso en papel fotográfico sobre la placa fenólica recubierta de cobre, (c) electrodo finalizado después del ataque con cloruro férrico y lavado con alcohol isopropílico y agua desionizada

Fuente: Elaboración propia.

Preparación de la película de PANi/OG_r sobre el sustrato

Se utilizan compuestos nanoestructurados como el OGr, que proporciona una mejora significativa en conjunto con el PANi, el cual en su estado de oxidación de la ES se comporta como conductor, permitiendo la transferencia de carga. Debido a que la ES no tiene capacidad de procesabilidad y no es posible dispersar sin un cambio en su estructura, se somete a un proceso de desprotonación, que consiste en la remoción H^+ de la forma ES, resultando en el estado emeraldina base (EB). Se prepara 10

mg de PANi-ES con 0,5 mL de NH_4OH y se somete a ultrasonido (cubeta ultrasónica YX3560, Yaxun) durante 30 minutos a 40 kHz y 50 W de potencia. Se seca en estufa por 10 minutos y luego se agrega 0,5 mL del solvente orgánico NMP y se somete a ultrasonido durante 30 minutos a 40 kHz y 50 W de potencia. A la solución desprotonada EB se le agrega 5 mg de OGr para dispersarse en 1 mL del solvente orgánico NMP y se somete a ultrasonido durante 1 hora a 40 kHz y 50 W de potencia.

Enseguida, se deposita 20 μL de la solución dispersada mediante la técnica de *drop-casting* sobre el sustrato (electrodo de cobre), como se muestra en la figura 2.

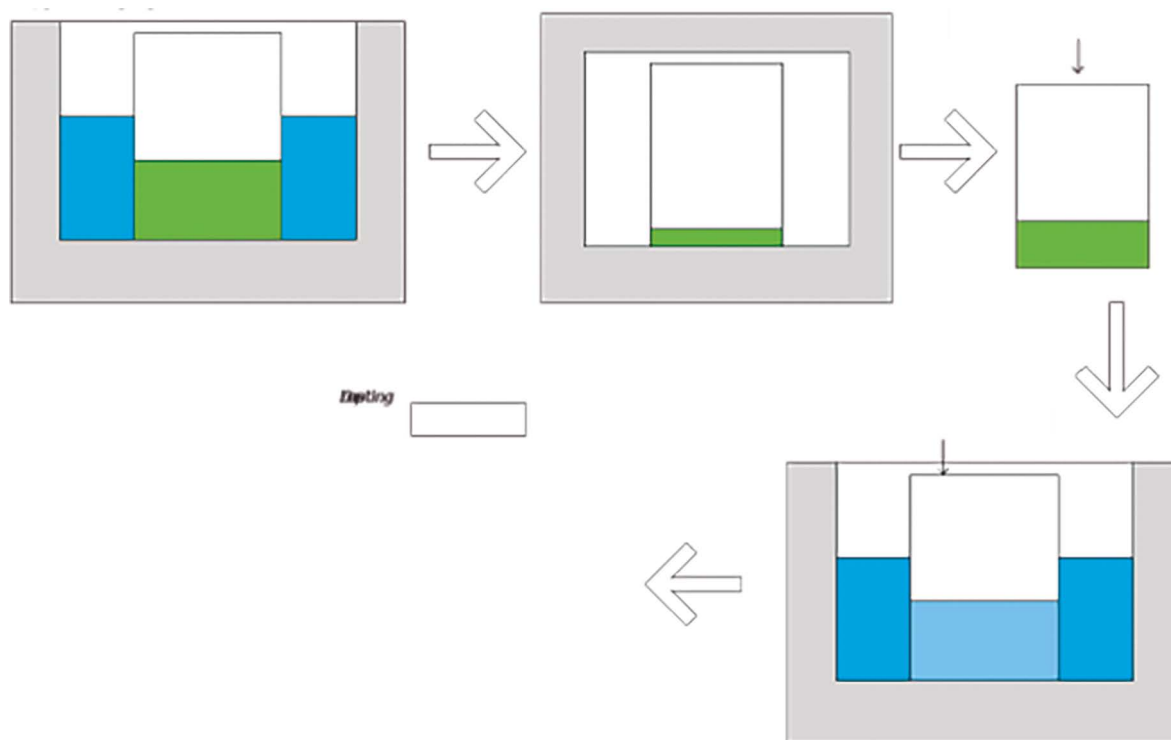


Figura 2. Preparación de las películas de PANi/OG_r mediante drop-casting sobre el sustrato

Fuente: Elaboración propia.

Secado de la película de PAni/OGr con luz infrarroja y spin coater

Se realizó el secado de 4 muestras con luz infrarroja (IR) durante 30 minutos, y 4 muestras mediante *spin coating* a 1100 rpm durante 1 minuto; en la tabla 1, se especifica los análisis que se realizarán posteriormente con las muestras; asimismo, en la figura 3, se aprecia el secado por IR de la película.

Tabla 1
Número de muestras y el tipo de secado

Película	Método de secado	Electrodos	Análisis	Etiqueta
PAni/OGr	Luz IR	2	CV	PAni/OGr-IR
		2	CA	
	Spin Coating (SC)	2	CV	PAni/OGr-SC
		2	CA	

CV: Voltametría cíclica, CA: Cronoamperometría

Fuente: Elaboración propia.

Inmovilización de la enzima GOx en la película de PAni/OGr

El paso fundamental en la fabricación del biosensor es la inmovilización de la enzima GOx sobre la película de PAni/OGr, se busca principalmente evitar la pérdida del GOx inmovilizado, para ello se retícula la superficie del biosensor con glutaraldehído GA. Se prepara una solución de 25 mg de GOx en 1mL de PBS a pH 7,2 y se depositan 20 μ L sobre la película de PAni/OGr, por un tiempo de 30 minutos a una temperatura ambiente de 9 C. Posteriormente, se prepara una solución de 1 mL de GA al 0,1 % con agua desionizada para inmovilizar y reticular la enzima a la matriz; se deposita 20 μ L de esta solución en cada electrodo.

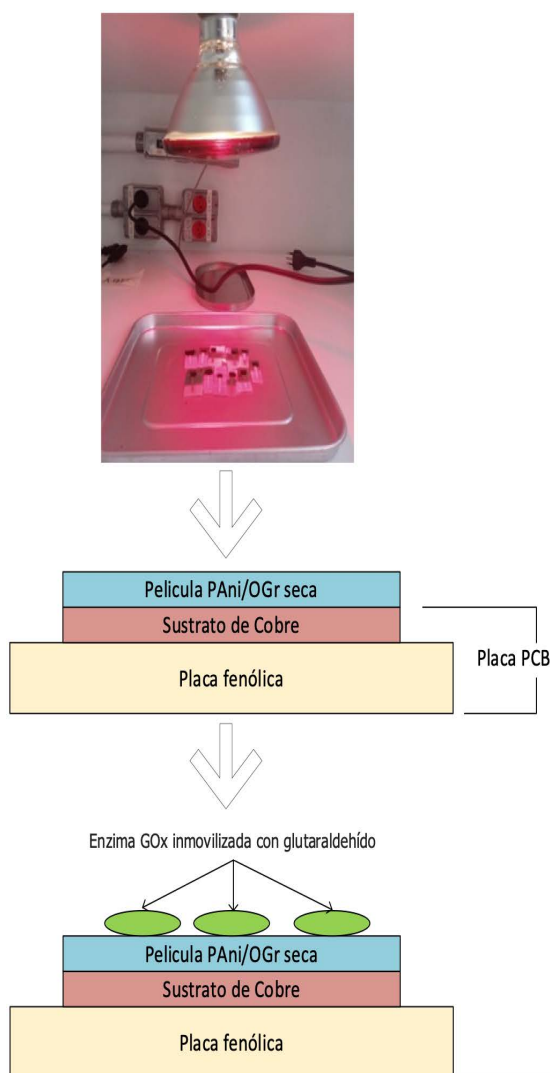


Figura 3. Formación de la película de PAni/OGr sobre el sustrato

Fuente: Elaboración propia.

Procedimiento analítico

Para evaluar el desempeño electroquímico de los electrodos modificados, se utilizó un analizador de parámetros de semiconductores (Keithley 4200-SCS), el esquema de conexión de los electrodos se muestra en la figura 4. Se realiza la conexión de los electrodos de referencia (RE); así, se verificó la variación del potencial y la corriente entre el electrodo de trabajo (WE) de polaridad positiva y el contraelectrodo (CE) de polaridad negativa, los tres electrodos se conectan al analizador de parámetros de semiconductores (SCA).

Se realizaron pruebas de voltametría cíclica (VC) y cronoamperometría (CA); a la muestra de PAni/OGr-IR se le agregó 0,240 g de DG y 4 mL de PBS para realizar el voltamograma a una velocidad de barrido de 0,1 mV/s a 2 mV/s. Para desarrollar la cronoamperometría, se esperó un tiempo de 110 s hasta que se estabilizar y luego se fue agregando 100 μ L de DG cada 30 s 10 veces. El mismo procedimiento se realizó con la muestra PAni/OGr-SC. Este se resume en la tabla 2.

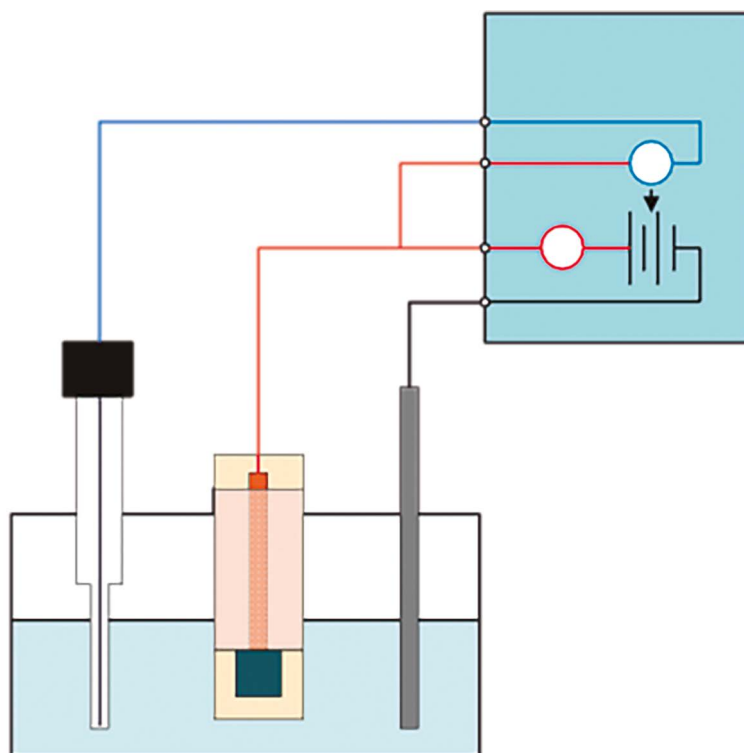


Figura 4. Conexión de los electrodos de referencia (RE), electrodo de trabajo (WE), contraelectrodo (CE) al analizador de parámetros de semiconductores (SCA)

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2
Evaluación de la electroactividad de los sensores

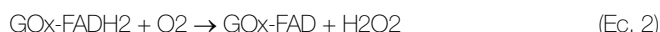
Etiqueta	Análisis	Soluciones adicionales	Rango, V	Velocidad de barrido, mVs ⁻¹
PAni/OGr-IR	CV	– 0,240 g DG + 4 mL PBS	–0,15 a +0,15	0,1 a 2
	CA	100 μ L DG (10 times)	–0,15 +0,15	– –
PAni/OGr-SC	CV	– 1 mL DG +20 mL PBS	–0,15 a +0,15	0,1 a 2
	CA	100 μ L DG (10 times)	–0,15 +0,15	– –

Fuente: Elaboración propia.

RESULTADOS

Actividad electrocatalítica

La reacción redox involucrada en el comportamiento electroquímico del electrodo compuesto PAni/OG_r es catalizada por la enzima GOx inmovilizada, a través del cofactor Flavin adenina dinucleótido (FAD) presente en el sitio activo. Esta oxida la glucosa y reduce el cofactor FAD, lo que resulta en glucono-delta lactona (GDL) y FADH₂ respectivamente, además de la generación de peróxido de hidrógeno, como se muestra en las ecuaciones (1) – (3) [9].



Se obtuvieron voltametrías cíclicas para observar el comportamiento electroquímico de la enzima GOx inmovilizada en la matriz PAni/OG_r en el electrodo de cobre para ambos procesos

de secado. Las voltametrías de las muestras se registraron a diferentes velocidades de barrido en un rango de potencial de -0,15 V a +0,15 V, en PBS a pH 7,2, como se muestra en la tabla 2. La figura 5 muestra la voltametría cíclica de PAni/OG_r-IR en presencia de 100 µL de DG a 16 mM a velocidades de barrido de 0,15; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 y 0,8 mV/s.

De acuerdo con la figura 5, se observa una alta correlación con el proceso de oxidación anódica, los picos de oxidación *I_{pa}* tienen una mejor proporcionalidad a la variación de la velocidad de barrido, mostrando un comportamiento lineal bien definido con el aumento de la velocidad de barrido de 0,3 a 0,8 mV/s. Los picos de corriente anódica calculados restando el fondo de la solución de soporte de PBS fueron de 0,110; 0,131; 0,147; 0,159; 0,170 y 0,171 mA, con una separación de picos (de 0,181, 0,194, 0,208, 0,235, 0,244 y 0,255 V a un potencial formal de +0,091; +0,097; +0,104; +0,117; +0,122 y +0,127 obtenidos a partir de voltamogramas a velocidades de barrido de 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 y 0,8 mV/s, respectivamente. A partir de estos resultados, se observa una alta transferencia de carga a 0,8 mV/s, aumentando el potencial máximo y la separación entre picos de potencial, alcanzando una reversibilidad bien definida.

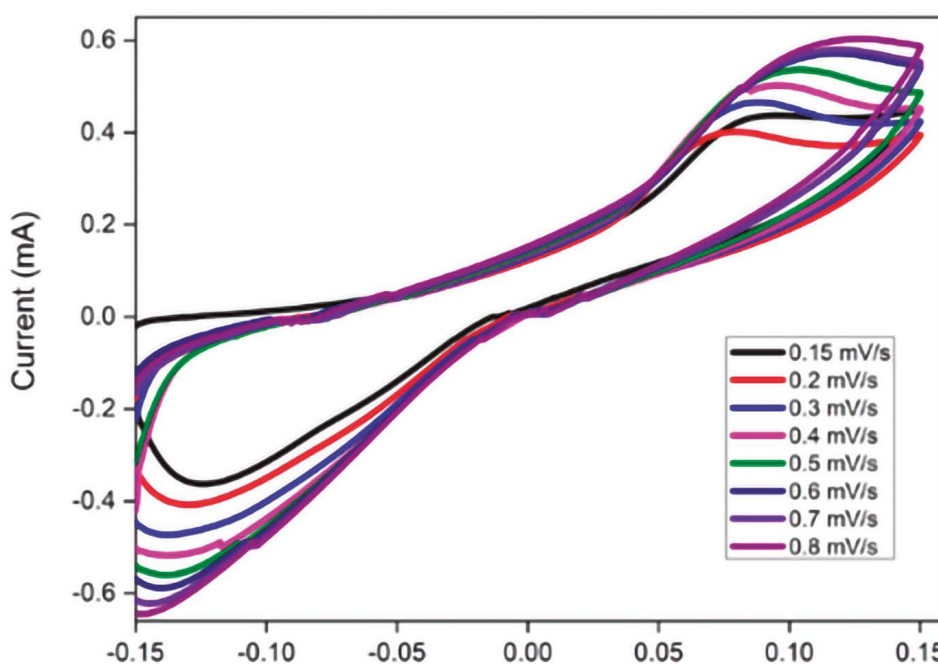


Figura 5. Voltametrías cíclicas de PAni/OG_r-IR en PBS a pH 7.2 en presencia de 16 mM DG a velocidades de barrido de 0,15 a 0,8 mV/s..

Fuente: [1].

Tanto la corriente *I_{pc}* como *I_{pa}* (corriente de pico anódico) son proporcionales a la velocidad de barrido, como se muestra en la figura 6 (a), lo que indica que la cinética electroquímica siguió el proceso de superficie controlada. *I_{pa}* e *I_{pc}* aumentaron linealmente a medida que aumentó la velocidad de barrido. El potencial de pico del cátodo (*E_{pc}*), el potencial de pico del ánodo (*E_{pa}*) y su diferencia variaron con la velocidad de barrido y la cinética de transferencia de carga del electrodo. La figura 6 (b) muestra *E_{pa}* y *E_{pc}* del electrodo PAni/OG_r-IR en función del logaritmo de la velocidad de barrido. El potencial del cátodo y del ánodo se desplazó linealmente con una velocidad de barrido logarítmica en el rango de 0,3 a 0,8 mV/s. El cálculo del coeficiente de difusión,

a partir del gráfico *I_{pa}* (A) en función de $v^{(1/2)}(V^{1/2}s^{-1/2})$, como se muestra en la figura 7, se relaciona con la ecuación de Randles-Ševčík (Ec. 4). Esto puede deber a un área electroactiva calculada a partir del coeficiente de difusión de referencia (0,19 cm²) menor que el área original (0,25 cm²) [1].

$$I_{pa} = 0,4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} A n^{3/2} C_o D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde *I_{pa}* es la corriente de pico anódico (A) para cada velocidad de barrido *v*(V/s), *F* es la constante de Faraday (96485 C/mol), *T* es la temperatura absoluta (291,15 K), *R* es la constante de

los gases (8,314 J/K mol), A es la superficie efectiva (cm^2), n es el número de electrones transferidos, C es la concentración de la

especie redox en solución a granel (mol/cm^3), y D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva (cm^2/s).

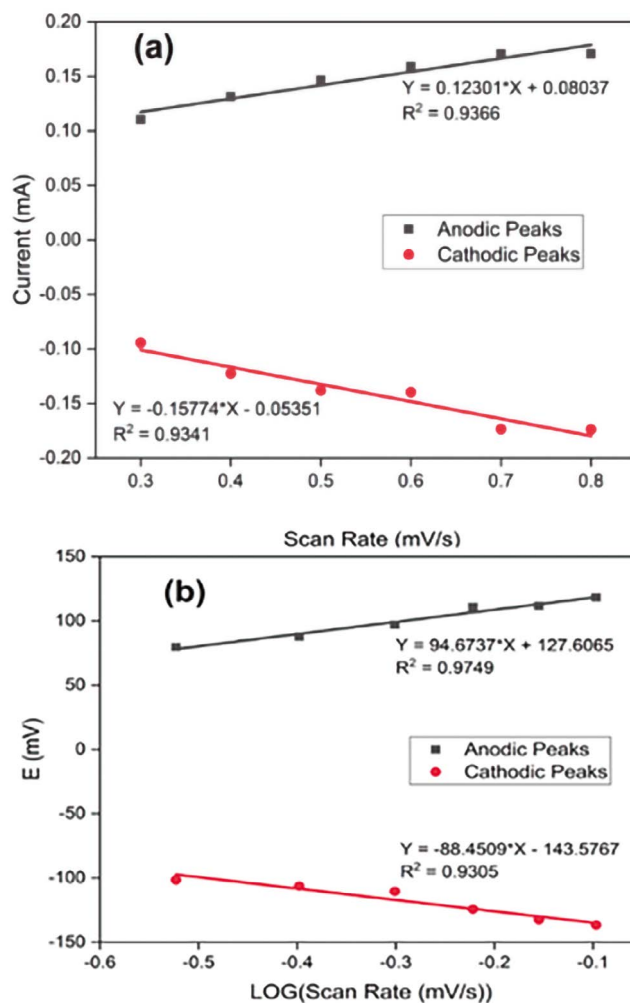


Figura 6. (a) Corriente de picos anódicos y catódicos vs. regresión lineal de la velocidad de barrido y (b) picos de potencial vs regresión lineal del logaritmo de la velocidad de barrido

Fuente: [1].

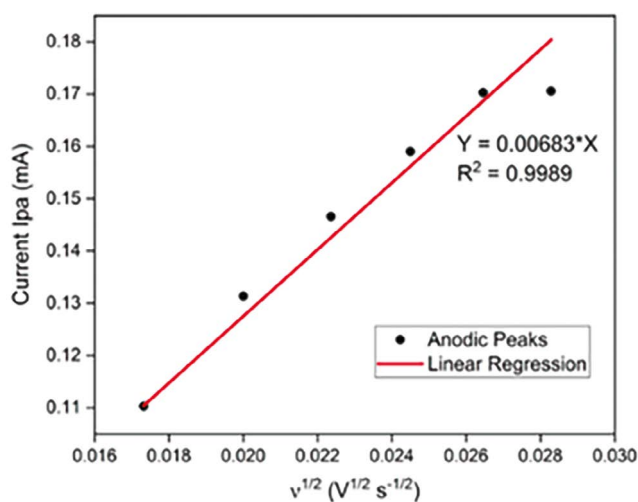


Figura 7. Gráfico de las corrientes de pico anódicas en las voltametrías cíclicas del compuesto PANi/OG-IR en PBS a pH 7,2 en presencia de 16 mM de D-glucosa en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido

Fuente: [1].

Para el caso del electrodo PANi/OGGr/GOx-SC (*spin coating*), la figura 8 muestra las voltametrías cíclicas a diferentes velocidades de barrido (0,4 a 0,8 mV/s) en un rango de potencial de -0,15 V a +0,15 V, con una solución de PBS pH 7,2 en presencia de 100 μ L de DG a 16 mM. Se observó que, a medida que aumentaba la velocidad de barrido, el pico de la corriente anódica disminuye, lo que significa que hay una reducción en la tasa de transferencia de electrones, en comparación con la figura 5 (en la que se alcanza la reversibilidad). Por otro lado, se observa una mayor separación de los picos de potencial [7]. Además, considerando la ausencia de picos de reducción, la respuesta de este electrodo implica reacciones irreversibles; el análisis no se realizará como en el caso del electrodo PANi/OGGr/GOx-IR. Se asume que la naturaleza de este comportamiento puede deberse al sustrato del electrodo (cobre metálico) o a problemas en la inmovilización de la enzima mediante el método *spin coating*.

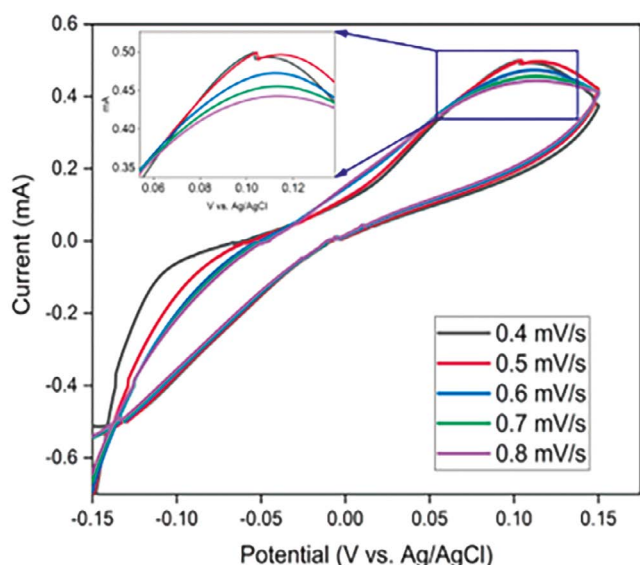


Figura 8. Voltametrías cíclicas del compuesto PANi/OGGr-SC en PBS a pH 7,2 en presencia de 16 mM de D-glucosa a velocidades de barrido de 0,4 a 0,8 mV/s

Fuente: [7].

CONCLUSIONES

En este estudio, se preparó un sensor con una matriz de PANi/OGGr comparando los secados por IR y *spin coating*, utilizando la enzima GOx inmovilizada en la superficie de PANi/OGGr. Los resultados indican que el sensor secado con luz IR se comportó mejor a una velocidad de barrido de 0,3 a 0,8 mV/s, lo que sugiere una alta transferencia de carga de electrones a 0,8 mV/s además con un acercamiento a reversibilidad a esa tasa. Los electrodos secados mediante el método *spin coating* demostraron no tener una buena reversibilidad; sin embargo, mostraron picos de oxidación ligeramente definidos. Este comportamiento puede deberse al sustrato del electrodo (cobre metálico) o a problemas en la inmovilización de la enzima GOx.

Se demuestra la factibilidad de construir un biosensor selectivo, lo que conlleva a un gran potencial para la fabricación de sensores con la capacidad de detectar glucosa para la población diabética en Perú.

REFERENCIAS

- [1] Bilgi, M., Sahin, E. M., y Ayranci, E. (2018). Sensor and biosensor application of a new redox mediator: Rosmarinic acid modified screen-printed carbon electrode for electrochemical determination of NADH and ethanol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 813, 67-74.
- [2] Christwardana, M., y Kwon, Y. (2015). Effects of multiple polyaniline layers immobilized on carbon nanotube and glutaraldehyde on performance and stability of biofuel cell. *Journal of Power Sources*, 299, 604-610.
- [3] Hu, F., Li, W., Zhang, J., & Meng, W. (2014). Effect of graphene oxide as a dopant on the electrochemical performance of graphene oxide/polyaniline composite. *Journal of Materials Science & Technology*, 30(4), 321-327.
- [4] Luong, A. D., Roy, I., Malhotra, B. D., & Luong, J. H. (2021). Analytical and biosensing platforms for insulin: a review. *Sensors and Actuators Reports*, 3, 100028. doi: 10.1016/J.SNR.2021.100028.
- [5] Maity, D., Minitha, C., y Rajendra, K. (2019). Glucose oxidase immobilized amine terminated multiwall carbon nanotubes/reduced graphene oxide/polyaniline/gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode for highly sensitive amperometric glucose detection. *Materials Science and Engineering*, 105:110075. doi: 10.1016/j.msec.2019.110075.
- [6] Nuñez-Chavez, O., Mayorga, Untiveros-Mayorga, C., Tapia-Zegarra, L. (2004). Diabetes mellitus tipo 2 en el Hospital II Essalud-Cañete: Aspectos demográficos y clínicos. *Revista Médica Herediana*, 15(1), 19-23.
- [7] Pletcher, D., Greff, R., Peat, R., Peter, L., y Robinson, J. (2001). *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Elsevier.
- [8] Serafín González-Carrato, V. (2015). Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales y en materiales magnéticos para la determinación de analitos de interés bioquímico.
- [9] Suzuki, N., Lee, J., Loew, N., Takahashi-Inose, Y., Okuda-Shimazaki, J., Kojima, K., ... & Sode, K. (2020). Engineered glucose oxidase capable of quasi-direct electron transfer after a quick-and-easy modification with a mediator. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1137. doi: 10.3390/ijms21031137.

ACERCA DE LOS AUTORES

John Alexander Flores Tapia

Magíster en Educación Superior por la Universidad Católica de Santa María, licenciado en Física por la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa y, actualmente, con estudios de doctorado en Ciencias y Tecnologías Medioambientales por la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, con experiencia en películas delgadas. Ha participado en proyectos de investigación unas, donde investiga en actividades relacionadas con sensores y biosensores. Es docente en la UNSA, y en Tecsup sede sur en la especialidad de electricidad y electrónica con cursos de Taller Electromecánico y Electricidad Industrial.

 jflorestap@unsa.edu.pe

Fabrizio Valer Gomez

Ingeniero químico y bachiller en Ingeniería Mecánica por la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Estudios concluidos en la maestría en Ciencias con mención en Seguridad y Medio Ambiente por la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Docente en Tecsup sede sur en el Departamento de Mecánica.

 fvaler@tecsup.edu.pe

José Luis Vega Ramírez

Doctor en Física por la Universidad de Sao Paulo Brasil, con especialización en Radiodiagnóstico clínico, Radioterapia en la planificación de los sistemas de tratamiento. Experto en dosimetría de Resonancia Paramagnética Electrónica en materiales equivalentes a tejidos humanos, en materiales poliméricos y dosimétricos utilizados en la calibración y tratamientos de tumores. Docente de la Escuela de Física de la Universidad Nacional de San Agustín; responsable del área de investigación: Física Médica Aplicada a la Medicina y Biología, coordinador de la Maestría en Física Médica.

 jvegar@unsa.edu.pe

Recibido: 30-06-23

Revisado: 03-07-23

Aceptado: 23-10-23



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons AtribuciónNoComercial 4.0 Internacional.