



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA ELISA
INCORPORANDO BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS**

Alicia Murcia Maya

TRABAJO DE FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Tutorizada por Francisco Javier Andrade
Supervisada por Pascal Blondeau
Tutor académico: Ricardo Cordero
Laboratorio de Nanosensores, URV
Tarragona, España

Facultad de Química, URV
Junio 2022

Yo, Alicia Murcia Maya, con DNI 39523124Q, soy concedora de la guía de prevención del plagio a la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada el julio de 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, junio de 2022.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned to the right of the date.

ÍNDICE

1. Introducción	7
1.1. Sensores electroquímicos.....	7
1.2. Nafion como membrana permselectiva	10
1.3. Glucosa oxidasa sobre biosensores.....	11
1.4. Fluidos biológicos para la detección de glucosa.....	12
1.5. Enzyme-linked immunosorbent assay	13
1.6. Perspectivas de futuro.....	15
2. Hipótesis	16
3. Objetivos	16
4. Materiales y métodos	17
4.1. Sensor de trabajo.....	17
4.2. Mediciones electroquímicas	17
4.3. Nafion como membrana permselectiva	18
4.4. Glucosa oxidasa sobre biosensores.....	18
4.5. Fluidos biológicos para la detección de glucosa.....	19
4.6. Enzyme-linked immunosorbent assay	20
5. Resultados	22
5.1. Nafion como membrana permselectiva	22
5.2. Glucosa oxidasa sobre biosensores.....	23
5.3. Fluidos biológicos para la detección de glucosa	25
5.4. Enzyme-linked immunosorbent assay	26
6. Discusión	31
6.1. Nafion como membrana permselectiva	31
6.2. Glucosa oxidasa sobre biosensores.....	33
6.3. Fluidos biológicos para la detección de glucosa	34
6.4. Enzyme-linked immunosorbent assay	35
7. Conclusiones	38
8. Referencias bibliográficas	39
9. Autoevaluación	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de potenciometría directa e indirecta	8
Figura 2. Esquema del dispositivo de detección electroquímica basado en papel desarrollado por el grupo Whitesides.....	9
Figura 3. Estructura molecular del Nafion	10
Figura 4. Reacción de oxidación de la glucosa	11
Figura 5. Ilustración de la respuesta potenciométrica para la adición de glucosa sobre una plataforma Elisa.....	14
Figura 6. Sensor de trabajo	17
Figura 7. Esquema de medición para potenciometría	18
Figura 8. Representación esquemática de la técnica ELISA sobre un sensor	20
Figura 9. Calibración de H ₂ O ₂ en función del tiempo en PBS pH 7,4.....	22
Figura 10. Calibración de H ₂ O ₂ en función de log[glucosa] en PBS pH 7,4	23
Figura 11. Calibración a diferentes concentraciones de GOx en PBS pH 7,4	24
Figura 12. Calibración de glucosa en distintos fluidos, pH 7,4.	25
Figura 13. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de antígeno para ELISA	27
Figura 14. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de glucosa para ELISA	28
Figura 15. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de glucosa para ELISA. Diámetro del sensor de 2,5 mm	28
Figura 16. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de glucosa para ELISA. Tiempo de incubación del anticuerpo primario 2 horas	29
Figura 17. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de glucosa para ELISA con diferentes metodologías	29
Figura 18. Respuesta potenciométrica en función del tiempo para una concentración de glucosa 10 ^{-2,5} M	30
Figura 19. Curvas de respuesta potenciométrica a la adición de H ₂ O ₂	32
Figura 20. Representación esquemática de las interacciones inespecíficas	35
Figura 21. Curvas de calibración para la diferencia de potencial después de 100 segundos de reacción en función de las concentraciones de troponina	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Unidades de GOx por cantidad de volumen depositado.....	19
Tabla 2. Potencial inicial, sensibilidad y rango lineal para diferentes unidades de glucosa oxidasa	24
Tabla 3. Potencial inicial, sensibilidad y rango lineal para sudor y suero.....	26

Abreviaciones/Siglas

Ag: Antígeno

BSA: Albúmina de suero bovino.

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMF: Fuerza electromotriz

GOx: Glucosa oxidasa

IgG: Inmunoglobulina G

PBS: Tampón fosfato salino

Pt: Platino

Agradecimientos

Este trabajo se basa en los resultados de las prácticas externas llevadas a cabo en el Grupo de Cualimetría, Quimiometría y Nanosensores, de la Universitat Rovira i Virgili.

Quiero dar las gracias al profesor Dr. Andrade por darme la oportunidad de realizar estas prácticas, además de supervisar y guiar este trabajo. Agradecer también al doctor Blondeau por su ayuda, el apoyo y todo lo que me ha enseñado, así como al resto del grupo por integrarme como una más y ofrecerme ayuda siempre que lo he necesitado.

Abstract

Introducción: Los sensores electroquímicos detectan cambios específicos de potencial –sensores potenciométricos– o de corriente –sensores amperométricos–. Debido a que las pruebas serológicas ELISA se utilizan en laboratorios especializados, se generan demoras en los informes de resultados; por lo tanto, un dispositivo de diagnóstico más asequible proporcionaría beneficios significativos.

Hipótesis: Es posible la construcción de una plataforma ELISA para antígeno anti-inmunoglobulina G con detección electroquímica marcada con la enzima glucosa oxidasa.

Objetivos: Construcción y caracterización de biosensores electroquímicos y medición de su rendimiento analítico.

Materiales y métodos: Se construye un sensor mediante papel de filtro y platino pulverizado y se mide su potencial con un dispositivo de datos multicanal EMF15 en un medio de PBS.

Resultados y discusión: Existe detección de potencial a diferentes concentraciones de antígeno para ELISA, pero se trata de una prueba de concepto y se requieren más estudios para conseguir resultados óptimos.

Conclusiones: La detección cuantitativa de antígeno para ELISA por potenciometría a través de glucosa es posible, pero es necesario modificar el protocolo para obtener resultados óptimos.

Palabras clave: sensores electroquímicos, potenciometría, peróxido de hidrógeno, glucosa oxidasa, ELISA.

1. Introducción

1.1. Sensores electroquímicos

Durante los últimos años, con la extensión del campo de aplicación del análisis electroquímico, ha habido un interés creciente en el desarrollo de inmunosensores electroquímicos para el ensayo diagnóstico de analitos biológicos (1).

Un biosensor es un dispositivo que analiza una muestra en presencia de un analito objetivo y, por lo general, se construye a partir de un componente biológico. Los elementos que deben ser reconocidos se inmovilizan en la superficie de los transductores y pueden interactuar con moléculas diana (2).

Un sensor electroquímico es un elemento que recibe y responde a cambios específicos al potencial como consecuencia de que una especie química interactúa con él. Algunos de ellos pueden ser utilizados como sensores en tiempo real para diagnosticar y hacer el seguimiento de diversas enfermedades. Para que esto sea posible, los biorreceptores deben ser selectivos y sensibles para detectar la molécula de interés a bajas concentraciones (3). Los sensores electroquímicos son uno de los biosensores más utilizados desde principios de la década 1960. Su mecanismo de trabajo se basa en las propiedades electroquímicas de los transductores y analitos (2). Los más comúnmente utilizados hacen uso de una reacción enzimática acoplada a la detección amperométrica. Los sensores de glucosa amperométricos no enzimáticos se basan en la oxidación electroquímica directa de la glucosa (4).

A pesar de que los sensores comerciales suelen ser amperométricos por ser robustos y fiables, los métodos potenciométricos ofrecen otras ventajas: son más económicos, requieren menos electrodos –2 en vez de 3– y su uso es más sencillo (5,6).

La potenciometría se basa en la medición de la diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo de trabajo y uno de referencia, considerando que se mide en condiciones de equilibrio –en las que no hay flujo de corriente–, con el fin de no causar interferencias en la reacción.

La diferencia del potencial será proporcional a la actividad o a la concentración del analito. El electrodo de referencia desarrolla un potencial fijo, conocido e independiente del medio en el que se encuentra sumergido. En cambio, el potencial de trabajo desarrolla un potencial proporcional a la actividad o a la concentración del analito (2,5).

Estas mediciones pueden ser directas: se mide la concentración de analito de acuerdo con la ecuación de Nerst, y se incluye la monitorización de pH –electrodos de vidrio–, de iones –electrodos selectivos de iones– o de potencial redox –electrodos de potencial oxido-reducción–. O bien pueden ser indirectas, para monitorizar un cambio producido como resultado de una reacción específica con el analito (**figura 1**) (5).

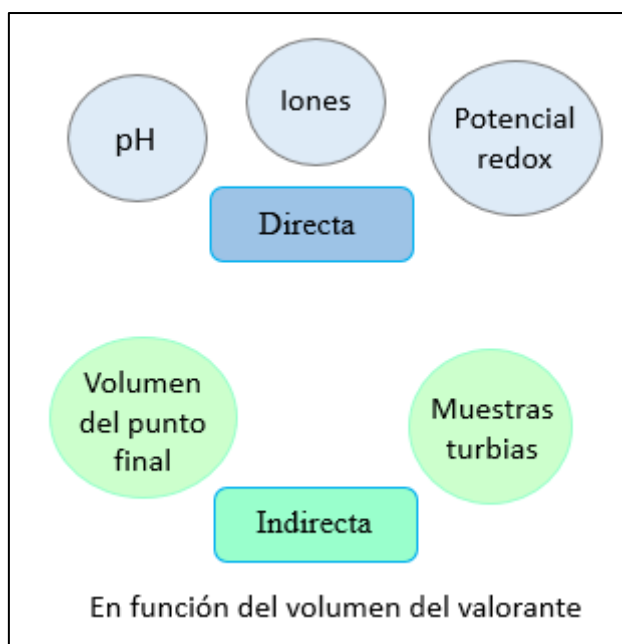


Figura 1. Esquema de potenciometría directa e indirecta. A partir de (5).

La potenciometría permite una mayor simplicidad de operación e instrumentación, bajo consumo de energía y un bajo coste de producción, por lo que es de interés en el cambio médico-biotecnológico (7).

A lo largo de los años, se han utilizado diferentes configuraciones experimentales para la detección, el diagnóstico y la clasificación en tiempo real de diferentes reacciones bioquímicas (8). Concretamente, en las últimas décadas se han empleado materiales como

metales nobles (platino), óxidos metálicos (Fe_2O_3), polímeros (Nafion), nanomateriales (nanotubos de carbono) y sus combinaciones para aumentar la sensibilidad, selectividad, estabilidad y biocompatibilidad (9).

En la actualidad, los sensores electroquímicos proporcionan alta sensibilidad y selectividad, bajo coste operativo y facilidad de miniaturización para poder desarrollar dispositivos portátiles. Además, una de las mayores ventajas con respecto a los métodos actuales es su rápida respuesta, creando un sensor de medición constante (3,7).

El uso de dispositivos domiciliarios para monitorizar diferentes parámetros clínicos se ha convertido en los últimos años en una forma de mejorar la calidad de vida de los pacientes (10). En este ámbito, cada vez ha habido un mayor número de investigaciones a partir de los avances del grupo Whitesides en el desarrollo de dispositivos de microfluidos que explotan la capilaridad de las fibras de celulosa para operaciones analíticas complejas mediante detección colorimétrica y electroquímica (**figura 2**) (10).

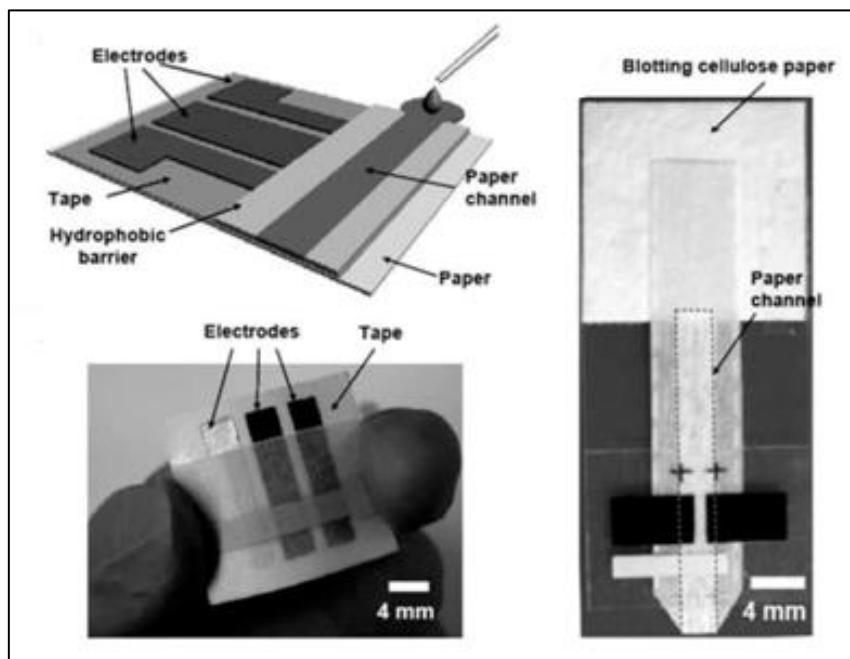


Figura 2. Esquema del dispositivo de detección electroquímica basado en papel desarrollado por el grupo Whitesides (6).

1.2. Nafion como membrana permosselectiva

La principal limitación de la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno es la interferencia producida por otras especies redox que se encuentran en los fluidos biológicos, como por ejemplo el ácido ascórbico (6).

En 2001 Michalska et al. reportaron el Nafion (**figura 3**) como un polímero de alta resistencia y permosselectivo a aniones, que puede estabilizar la sensibilidad del sistema (11). Se trata de un fluoropolímero sulfonado con un esqueleto hidrofóbico de politetrafluoroetileno unido a cadenas laterales hidrofílicas que terminan en grupos sulfónicos. A medida que la membrana absorbe agua, las cadenas laterales se hinchan para acomodar el solvente, mientras que el esqueleto de la membrana actúa contra este efecto hasta que alcanza un estado de equilibrio (12). Los electrodos que son recubiertos por este polímero muestran que sirve como una membrana permosselectiva para reducir las interferencias producidas por otros iones negativos y aumenta la selectividad y la estabilidad (6).

No solamente tiene un papel en la permosselectividad, sino que la naturaleza ácida de los restos de sulfonato modifica el pH local y le da capacidad de intercambio iónico a la membrana. Además, el efecto electrostático de los grupos sulfonato hace que la actividad dentro de la membrana sea relativamente baja. Y por último, la solubilidad del oxígeno es casi 20 veces mayor que en agua, por lo que la membrana actúa como reservorio, aunque no todo el oxígeno es electroquímicamente activo (13).

Las propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas de las membranas de esta sustancia pueden variar según la concentración y el tipo de solvente utilizado para preparar la solución (12).

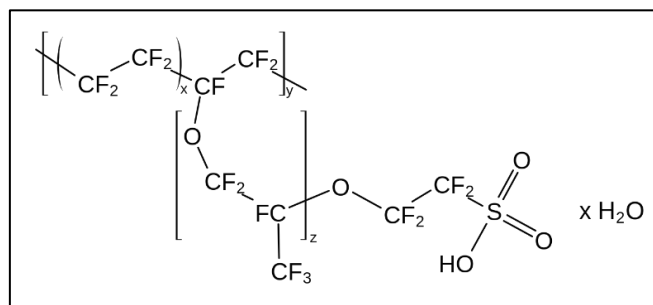


Figura 3. Estructura molecular del Nafion.

En este trabajo se estudia la respuesta potenciométrica a la adición de H₂O₂ sobre un electrodo de platino recubierto de Nafion y se utiliza posteriormente en todas las calibraciones potenciométricas.

1.3. Glucosa oxidasa sobre biosensores

Los sensores electroquímicos representan el grupo más relevante de biosensores de glucosa. Dentro de este grupo se encuentran los sensores enzimáticos y los no enzimáticos, y en ambos se puede encontrar un amplio rango de materiales, como polímeros, enzimas, nanotubos de carbono y polímeros moleculares.

En los sensores no enzimáticos de glucosa se ha observado el problema de la absorción de intermediarios de la oxidación de glucosa o especies activas en solución, además de tener una selectividad baja en comparación con los sensores enzimáticos. Por eso se ha extendido más el uso de biosensores enzimáticos. Estos últimos muestran alta especificidad, estabilidad, reproducibilidad y detección simple, por lo que se utilizan en diversos ámbitos.

El principio del funcionamiento de un gran número de productos químicos y sensores bioquímicos se basa en una reacción enzimática para poder cuantificar la concentración de glucosa, que puede ser detectada por diferentes métodos. La enzima GOx oxida la D-glucosa a gluconolactona, generando peróxido de hidrógeno como subproducto de la reacción y utilizando oxígeno como aceptor de electrones (**figura 4**) (6,10). Como en la actualidad estas técnicas se utilizan frecuentemente, cada vez se requiere más simplicidad de operación y de menor coste (6).

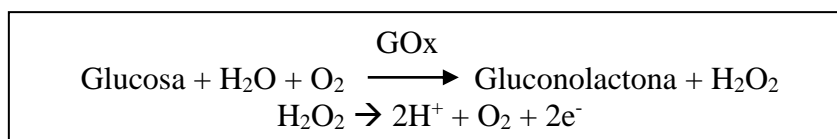


Figura 4. Reacción de oxidación de la glucosa (7). GOx: glucosa oxidasa.

El principio de los sensores enzimáticos fue propuesto por Clark y Lyon en una patente que convertía sustratos electroinactivos en productos electroactivos. El primer electrodo enzimático de glucosa realizaba la reacción enzimática de la **figura 4**.

En la década de 1960 se desarrollaron los biosensores basados en enzimas de glucosa oxidasa (GOx) (14). En 2010 Willander et al. utilizaron las enzimas para la respuesta potenciométrica para la detección de glucosa, colesterol y ácido úrico, aunque la mayoría de los sensores todavía no han sido validados con muestras reales (10,15).

Posteriormente, se han utilizado biosensores para asistencia sanitaria, seguridad alimentaria, monitoreo ambiental, seguridad y defensa del territorio nacional y muchos otros campos.

Recientemente, el grupo de Andrade et al. ha desarrollado un nuevo enfoque para producir sensores potenciométricos basados en enzimas. Se utiliza papel platinado como sustrato y una membrana de Nafion para atrapar la GOx y así desarrollar sensores altamente sensibles y selectivos para glucosa, siguiendo la reacción de la **figura 4**. La superficie de platino monitoriza los cambios en el potencial redox como resultado de la producción de peróxido de hidrógeno.

En el presente proyecto se ha desarrollado un sensor altamente sensible y selectivo para glucosa mediante el uso de un papel con platino como sustrato y una membrana para atrapar la enzima GOx.

El objetivo final es desarrollar un método ELISA incorporando sensores potenciométricos. Debido a que la respuesta potenciométrica viene dada por la cantidad de peróxido de hidrógeno detectado, necesitamos evaluar el impacto de la cantidad de GOx en el sensor –en la técnica ELISA, el anticuerpo secundario está marcado con esta enzima–. Por lo tanto, a una concentración de glucosa constante, se prevé que la respuesta estará relacionada con la cantidad de anticuerpo marcado con GOx y, consecuentemente, a la concentración de antígeno.

1.4. Fluidos biológicos para la detección de glucosa

La concentración de glucosa en sangre actualmente se controla mediante la extracción de sangre. Es un método doloroso que se repite entre tres y seis veces al día, y que además, puede causar infecciones transmitidas por la sangre (7,14). Por estos motivos, se investiga la correlación de los niveles de glucosa en sangre y en fluidos corporales –orina, lágrimas, sudor o saliva–; si fuera posible analizar otros fluidos, se podría monitorizar los niveles de glucosa mediante métodos no invasivos (7).

Anteriores publicaciones han demostrado que el uso de saliva para la medición de glucosa o cortisol es posible (7,16). En estos casos, el sensor consta de una tira desechable en la que se pone una gota de saliva, y un lector de potencial con pantalla digital que registra los valores de cortisol en la superficie del sensor utilizando microscopía electrónica de barrido. La diferencia principal de estos casos respecto al que se estudia en este trabajo es que el sensor era de nanotubos de carbono y los instrumentos utilizados eran distintos (16). Sin embargo, la gran cantidad de impurezas en la saliva dificulta el aislamiento de glucosa (14).

Por este motivo, la investigación actual de biosensores cutáneos no invasivos se centra en el muestreo de biomarcadores del sudor. El 99% del sudor es agua, pero un pequeño porcentaje son sodio, potasio, calcio, magnesio e iones clorhídricos, así como compuestos orgánicos exógenos y endógenos, como la glucosa. Dado que el sudor se produce constantemente, la recolección y almacenamiento de muestras es sencillo, económico e indoloro, de manera que el sensor sería no invasivo y fácil de usar (11).

En concreto, los sensores potenciométricos para el desarrollo de dispositivos portátiles, como parches, han aportado diversos beneficios, como sencillez de operación, bajo consumo y robustez en los resultados (11). Actualmente existen diseños de biosensores portátiles –hechos con materiales diferentes a los propuestos en este estudio– que pueden garantizar un transporte rápido de sudor a la zona de detección y registrar una respuesta continua. Esto ayudaría a evitar la pérdida de muestra o que hubiese resultados erróneos por degradación o evaporación de la muestra (17).

1.5. Enzyme-linked immunosorbent assay

Las pruebas serológicas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) se emplean rutinariamente en laboratorios especializados, lo que genera tiempos de entrega de muestras prolongados y demoras en el informe de resultados. El desarrollo de un dispositivo de diagnóstico de bajo coste proporcionaría unos beneficios significativos en el tiempo de espera de sus resultados.

La técnica ELISA se basa en la unión de anticuerpos al antígeno de manera específica, lo cual modifica el potencial de la superficie (**figura 5**) (18).

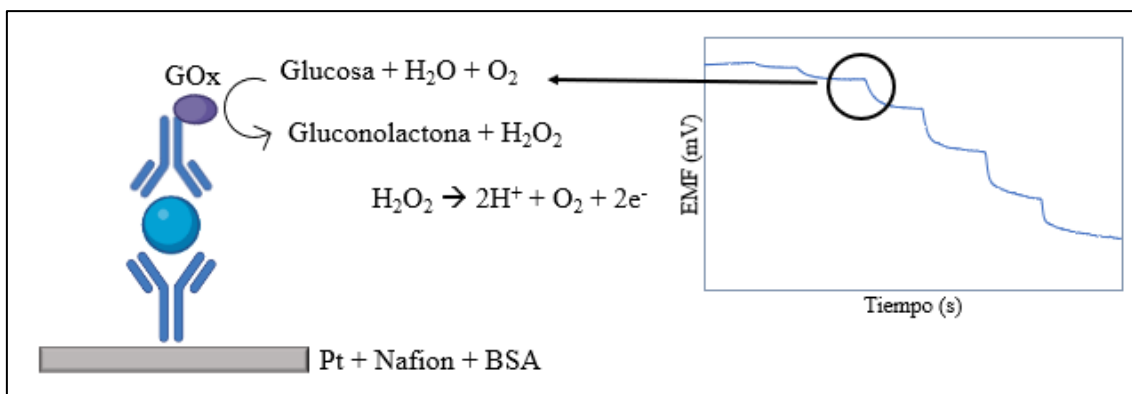


Figura 5. Ilustración de la respuesta potenciométrica para la adición de glucosa sobre una plataforma ELISA.

Un ELISA convencional se basa en lecturas de densidad óptica, ya que las moléculas unidas a los anticuerpos secundarios desencadenan reacciones cromogénicas. Para los anticuerpos y antígenos utilizados en este estudio, la sensibilidad es de 3,6 de densidad óptica cuando el anticuerpo no está diluido.

Sin embargo, en los ELISA electroquímicos las mediciones se realizan mediante lecturas electroquímicas en vez de ópticas. Esto aumenta la sensibilidad, simplicidad de instrumentación y bajo coste.

A pesar de las ventajas, la formación de una doble capa eléctrica puede ocultar las señales derivadas de los enlaces biológicos y disminuir la sensibilidad. Por suerte, pueden evitarse si la reacción redox ocurre cerca de la superficie del electrodo, como es el caso de los sensores diseñados para este proyecto (19).

Uno de los temas clave en los inmunosensores electroquímicos es la optimización de la estrategia de inmovilización biomolecular. Sin embargo, las metodologías actuales tienen limitaciones de sensibilidad y límite de detección reducido. Por tanto, existe la búsqueda actual de nuevos métodos de fabricación de inmunosensores (1).

A pesar de los resultados positivos, se debe tener en cuenta que otros artículos que han tratado de utilizar la saliva como fluido biológico para la técnica ELISA han sido incapaces de detectar los valores de la molécula de interés por no llegar al rango lineal adecuado (16).

1.6. Perspectivas de futuro

Una vez el sensor de glucosa para ELISA esté debidamente caracterizado, se podría realizar la misma metodología con otros compuestos diferentes a glucosa.

Otros estudios han optado por el uso de otro tipo de material y polímero, utilizando electrodos de carbón vítreo y una mezcla de polianilina con ácido dinonilnaftalenosulfónico tratado con etanol, dando resultados altamente sensibles a los niveles de cortisol (19).

Por otro lado, la técnica ELISA en potenciometría también se ha utilizado para detectar la metástasis temprana. En etapas iniciales de cáncer, los pacientes se someten a pruebas de biomarcadores para diagnosticar pero también para monitorizar la progresión o remisión del cáncer durante la terapia (20).

El enfoque actual –la biopsia– es invasivo y no apto para todos los pacientes, por lo que se intentó validar la asociación entre péptidos y células metastásicas por medio de biosensores, distinguiendo las células metastásicas de las no metastásicas. Así, se intentó proponer un enfoque no invasivo para el diagnóstico de metástasis, aunque no resultó favorable (21).

Los inmunoensayos electroquímicos han ganado peso en los últimos años por su alta sensibilidad, bajo coste y facilidad de uso. Actualmente se pueden utilizar paneles de biomarcadores de 4 a 8 proteínas, pero el diseño de dispositivos para la detección simultánea de paneles de proteínas más grandes es todavía un reto (20).

2. Hipótesis

Es posible la construcción de una plataforma ELISA para antígeno anti-inmunoglobulina G con detección electroquímica marcada con la enzima glucosa oxidasa.

3. Objetivos

Objetivo principal

Construcción y caracterización de un método ELISA que incorpora sensores potenciométricos.

Para poder conocer las condiciones adecuadas en las que la técnica ELISA va a funcionar, es necesario realizar una serie de experimentos previos.

Objetivos secundarios

- (1) Comprobar la diferencia de comportamiento entre sensores al añadir una capa de Nafion.
- (2) Evaluar cómo varía el rango lineal en función de la concentración de la enzima glucosa oxidasa.
- (3) Comprobar que los experimentos son extrapolables a otros fluidos biológicos.

4. Materiales y métodos

4.1. Sensor de trabajo

El sensor de trabajo se fabrica utilizando papel de filtro cualitativo Whatman Grado 5. Para construir la superficie del electrodo de platino (Pt) sensible a redox se realiza una pulverización catódica de radiofrecuencia (ATC-Orion 8-HV, AJA Internacional) operado a 3 mTorr durante 65s a 200E en un lado de un papel de filtro convencional (**figura 6**).

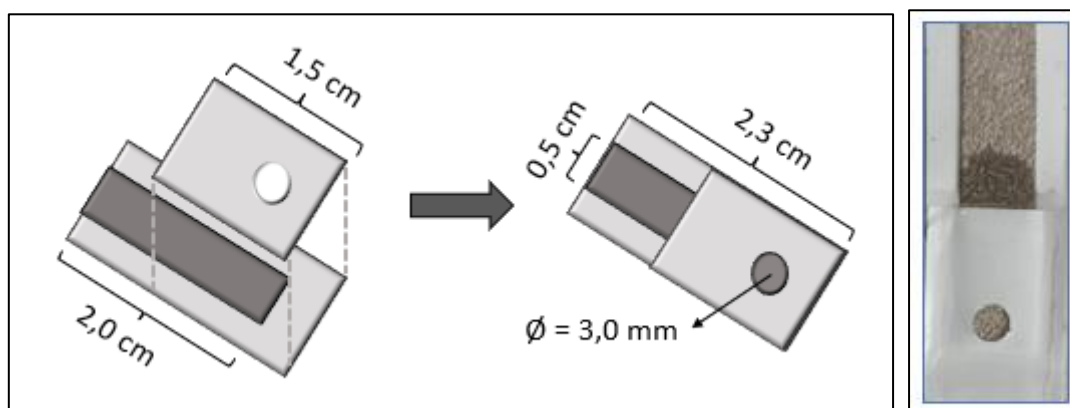


Figura 6. Sensor de trabajo.

Se recubre la parte expuesta de Pt con una solución de Nafion (5% en peso de una mezcla de alcoholes alifáticos y agua).

Las sales de grado analítico son adquiridas por Sigma-Aldrich, España. Todas las soluciones se preparan utilizando $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ de agua doble desionizada (agua Milli-Q, Merch Milli-pore).

4.2. Mediciones electroquímicas

En todos los casos la fuerza electromotriz (EMF) se mide utilizando un dispositivo de datos multicanal EMF15 de alta impedancia de entrada (1015Ω) de Lawson Laboratories, INC. (Malvern, PA, EE.UU.) (**figura 7**). Las medidas se toman a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) en una cubeta de 30 ml de PBS (tampón fosfato salino) 0,1 M pH 7,4.

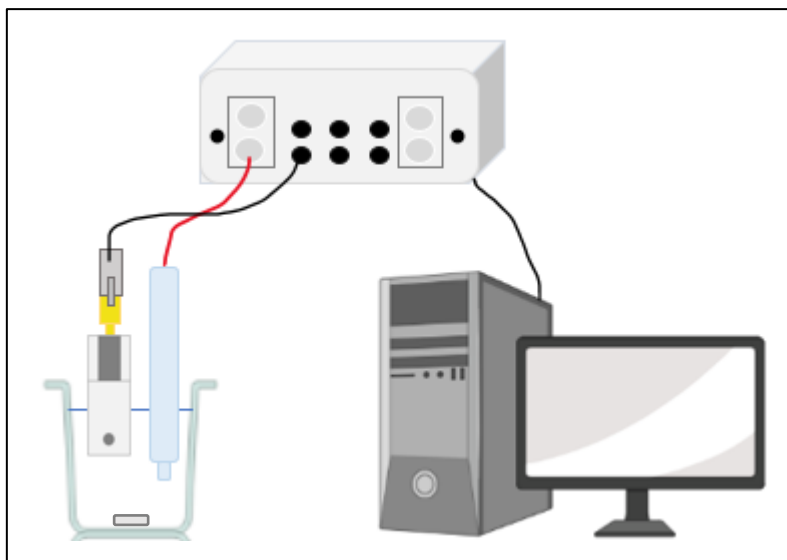


Figura 7. Esquema de medición para potenciometría.

4.3. Nafion como membrana permselectiva

Para conocer la diferencia de respuesta potenciométrica cuando se añade una solución de Nafion a los sensores, se construyen 3 sensores recubiertos con 5 μL de Nafion 5% y 3 sensores de trabajo sin Nafion.

Los experimentos se realizan en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M a pH 7,1 (100 mM Na_2HPO_4 , 18 mM KH_2PO_4 , 14 mM NaCl y 3 mM KCl).

Las calibraciones se realizan mediante adiciones de H_2O_2 a partir de H_2O_2 33% diluido con PBS.

4.4. Glucosa oxidasa sobre biosensores

Para saber cómo varía el rango lineal, el potencial inicial y la sensibilidad según la concentración de enzima glucosa oxidasa (GOx) se utilizan 15 sensores electroquímicos –5 volúmenes diferentes, 3 réplicas–, a los que se les añade una capa de 5 μL de Nafion a cada uno y se deja secar 2 h a 4 $^\circ\text{C}$. A continuación, se añaden 10, 5, 2, 1 y 0,4 μL de glucosa oxidasa en polvo liofilizada proveniente de *Aspergillus niger* tipo XS (EC 1.1.3.4 tipo VII), 145.200 unidades por gramo sólido sin oxígeno añadido, diluidas en PBS, según las indicaciones de la **tabla 1**. Por último, se añaden otros 5 μL de Nafion a todos los sensores para inmovilizar la enzima.

Las calibraciones se realizan mediante adiciones de glucosa a partir de glucosa en polvo diluida con PBS.

Tabla 1. Unidades de GOx por cantidad de volumen depositado. GOx: glucosa oxidasa.

Volumen (μL)	Unidades de GOx
10	29,04
5	14,52
2	5,81
1	2,90
0,4	2,90

4.5. Fluidos biológicos para la detección de glucosa

Para preparar el sudor artificial se utiliza tampón fosfato 0,1M (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 pH 6,5), 50 mM NaCl, 8 mM KCl, 0,17 mM glucosa, 5 mM NH_4Cl y 8 mM urea.

El suero artificial está compuesto por 111 mM NaCl, 29 mM NaHCO_3 , 2,2 mM K_2HPO_4 , 0,8 mM $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ x6, 2,5 mM urea, 4,7 mM glucosa y 50 g/L mM albúmina.

Las calibraciones se realizan mediante adiciones de glucosa a partir de glucosa en polvo diluida con PBS.

Se estudia el comportamiento del sensor en sudor y en plasma –con y sin albúmina– para poder comparar los parámetros característicos y comprobar que los resultados pueden extrapolarse del plasma al sudor.

Se utilizan 9 sensores electroquímicos, a los que se les añade 5 μL de Nafion a cada uno y se dejan secar 24 h a 4 °C. Posteriormente, se añaden 5 μL de GOx –14,52 u– proveniente de *Aspergillus niger* tipo XS, 10,000-250,000 unidades por gramo sólido. Y, por último, se añaden otros 5 μL de Nafion a todos los sensores para inmovilizar la enzima.

Se utilizan 3 sensores para hacer las mediciones en una celda de 30 mL de sudor artificial, 3 sensores para el suero artificial sin albúmina y 3 sensores para el suero artificial con albúmina.

4.6. Enzyme-linked immnosorbent assay

Se utiliza la técnica ELISA sándwich sobre un sensor de Pt de la siguiente manera:

- (1) Se añaden 5 μL de Nafion y se deja secar 2 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- (2) Se añaden 5 μL de anticuerpo primario de captura IgG (inmunoglobulina G) ab6709 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluido 50 $\mu\text{L}/450 \mu\text{L}$ con PBS) y se deja incubando durante la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- (3) Se realizan tres lavados con tampón PBS.
- (4) Se añaden 5 μl de BSA (albúmina de suero bovino) 0,1% para evitar interacciones inespecíficas y se incuba durante 2 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- (5) Se elimina el exceso de BSA.
- (6) Se añaden 5 μL de antígeno anti-IgG ab198772 Native Mousse 1,77 mg/mL diluido a las diferentes concentraciones a cada sensor durante 2 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$, a excepción del control negativo, que no contiene antígeno anti-IgG.
- (7) Se realizan tres lavados con tampón PBS.
- (8) Se añaden 5 μL de anticuerpo secundario ab136783 unido a GOx diluido 1/100 con PBS. Se incuba durante 2 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- (9) Se realizan tres lavados con tampón PBS para su posterior calibración (**figura 8**).

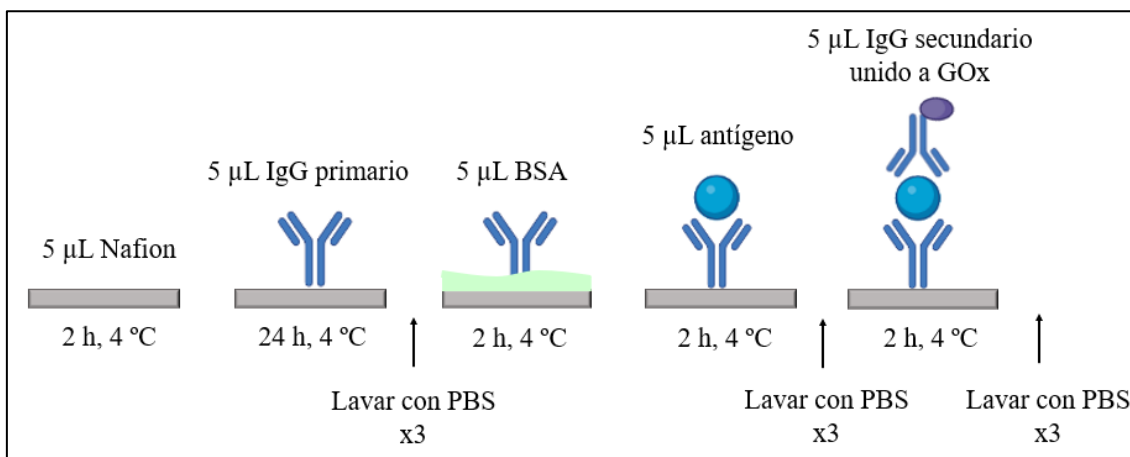


Figura 8. Representación esquemática de la técnica ELISA sobre un sensor.

IgG: Inmunoglobulina G. GOx: glucosa oxidasa.

PBS: tampón fosfato salino. BSA: albúmina de suero bovino.

Basándose en este procedimiento se han realizado diversas modificaciones, que son:

- (i) Reducir el diámetro de la superficie del sensor expuesto a los reactivos de 3,0 mm a 2,5 mm.
- (ii) Reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario de 24 horas a 2 horas.
- (iii) Realizar adiciones individuales de glucosa a aquella concentración en la que se pueda observar mayor diferencia de potencial según la concentración de antígeno.

El tiempo de incubación de cada paso se puede acortar según la manipulación de diversos factores, como la temperatura y el método de conjugado.

Todos los experimentos se realizan por triplicado. Las calibraciones se realizan mediante adiciones de glucosa a partir de glucosa en polvo diluida con PBS.

5. Resultados

5.1. Nafion como membrana permoselectiva

Al sumergir diferentes electrodos con y sin Nafion en PBS, se puede observar que su respuesta potenciométrica a la adición de H_2O_2 es diferente. En las **figuras 9 y 10** se observa la respuesta potenciométrica típica obtenida para un sensor de Pt desnudo y uno recubierto con $5 \mu\text{L}$ de Nafion.

La primera evidencia experimental que muestran los electrodos es la diferencia de potencial inicial. Los sensores a los que se les ha adicionado una membrana permoselectiva tienen un potencial inicial de $465,9 \pm 19,1 \text{ mV}$, mientras que en los electrodos desnudos el potencial es de $233,0 \pm 29,4 \text{ mV}$.

Por otro lado, en los electrodos con Nafion se observa una disminución del potencial a medida que aumenta la concentración de H_2O_2 , siendo su sensibilidad de $80,1 \pm 8,4 \text{ mV}$ en un rango lineal de 10^{-5} a 10^{-3} M . En cambio, los electrodos sin el polímero muestran una disminución del potencial muy sutil y, a grandes concentraciones, un aumento del potencial, siendo su sensibilidad positiva en vez de negativa.

Además, la primera detección en el sensor con Nafion se produce a una concentración de 10^{-5} M de glucosa, mientras que no se obtiene una respuesta para el sensor sin Nafion a la misma concentración (**figuras 9 y 10**).

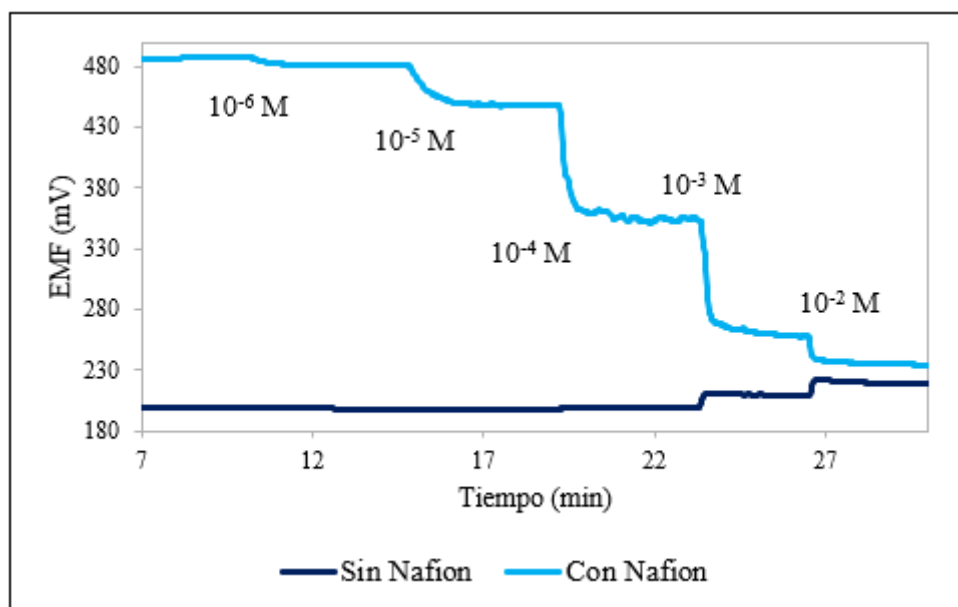


Figura 9. Calibración de H_2O_2 en función del tiempo en PBS pH 7,4. M: molaridad. EMF: fuerza electromotriz. Los valores corresponden a una medición.

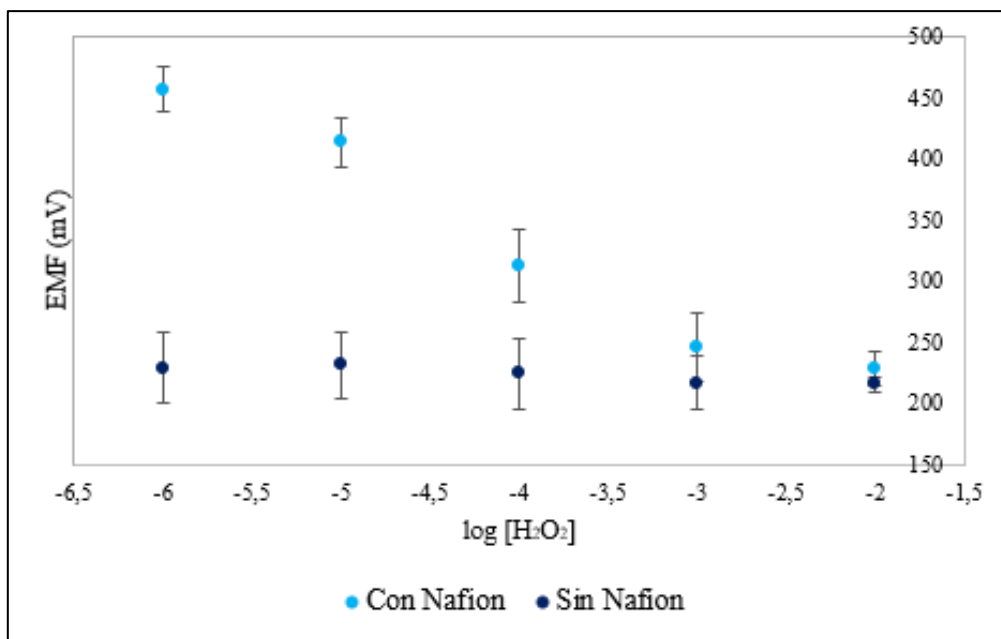


Figura 10. Calibración de H₂O₂ en PBS pH 7,4.

EMF: fuerza electromotriz.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres sensores independientes.

5.2. Glucosa oxidasa sobre biosensores

Al realizar las calibraciones en función de la cantidad de glucosa oxidasa presente en la superficie del sensor, se observa que el rango de concentración de glucosa en el que la sensibilidad es máxima y constante varía.

En la **figura 11** se puede observar el rango lineal a las diferentes concentraciones de enzima GOx que se añade en la superficie del sensor. A mayor cantidad de GOx, el potencial desciende a una concentración de glucosa superior. Es decir, a mayor cantidad de enzima, mayor será el valor del rango lineal.

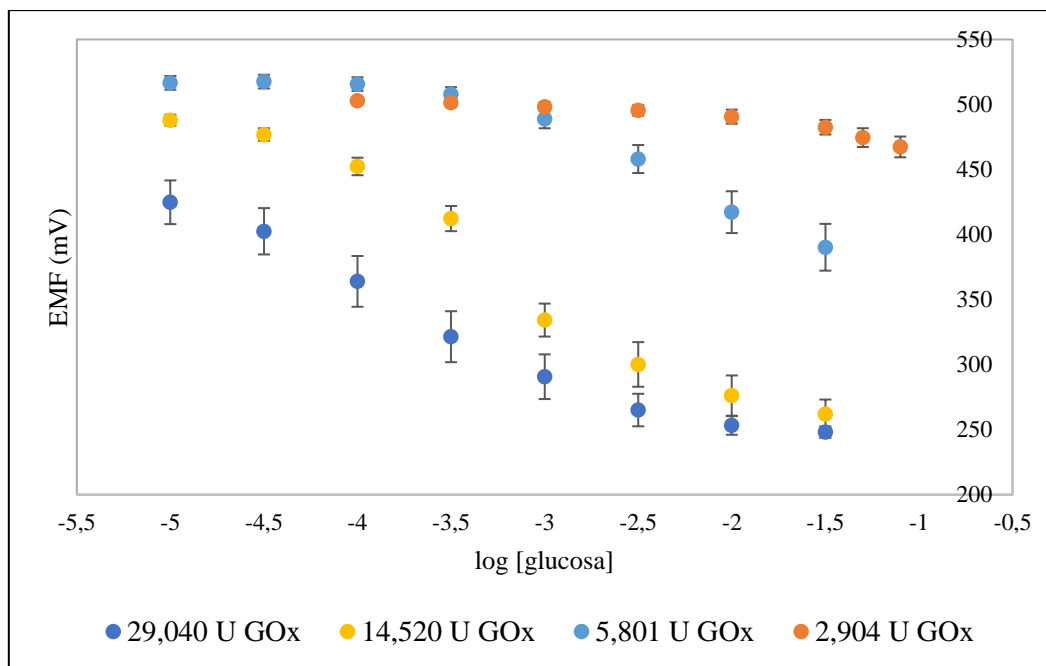


Figura 11. Calibración a diferentes concentraciones de GOx en PBS pH 7,4.

U GOx: unidades de glucosa oxidasa. EMF: fuerza electromotriz.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres sensores independientes.

Sin embargo, tanto el potencial inicial como la sensibilidad es similar entre ellos, como se observa en la **tabla 2**, por lo que no son parámetros que varíen con la cantidad de GOx sobre la superficie del sensor, a diferencia del Nafion.

Consecuentemente, se debería observar en una plataforma ELISA si al variar la concentración de antígeno –y, por tanto, también la concentración de GOx–, se podría diferenciar entre las diferentes concentraciones y calibrar el sistema.

Tabla 2. Potencial inicial, sensibilidad y rango lineal para diferentes unidades de glucosa oxidasa con la desviación estándar de los tres sensores independientes.

GOx: glucosa oxidasa. E0: potencial inicial. M: molaridad.

Unidades de GOx	29,040	14,520	5,801	2,904
E0 (mV)	432,7 ± 16,8	490,4 ± 4,2	514,1 ± 5,2	489,7 ± 9,1
Sensibilidad (mV)	82,6 ± 10,5	97,2 ± 9,4	71,7 ± 7,9	40,3 ± 6,0
Rango lineal	10 ^{-4,5} -10 ^{-3,5} M	10 ⁻⁴ -10 ⁻³ M	10 ⁻³ -10 ⁻² M	10 ^{-1,5} -10 ^{-1,1} M

5.3. Fluidos biológicos para la detección de glucosa

Es importante conocer si el medio en el que se van a realizar las calibraciones ejerce algún tipo de influencia, por lo que se van a comparar los datos obtenidos en PBS y aquellos obtenidos a partir de las calibraciones realizadas en sudor y plasma artificial.

La **figura 12** muestra la lectura potenciométrica en función de la concentración de glucosa. Se expone la diferencia de potencial para un sensor con 5 μL de GOx en diferentes medios: sudor, suero sin albúmina y suero con albúmina.

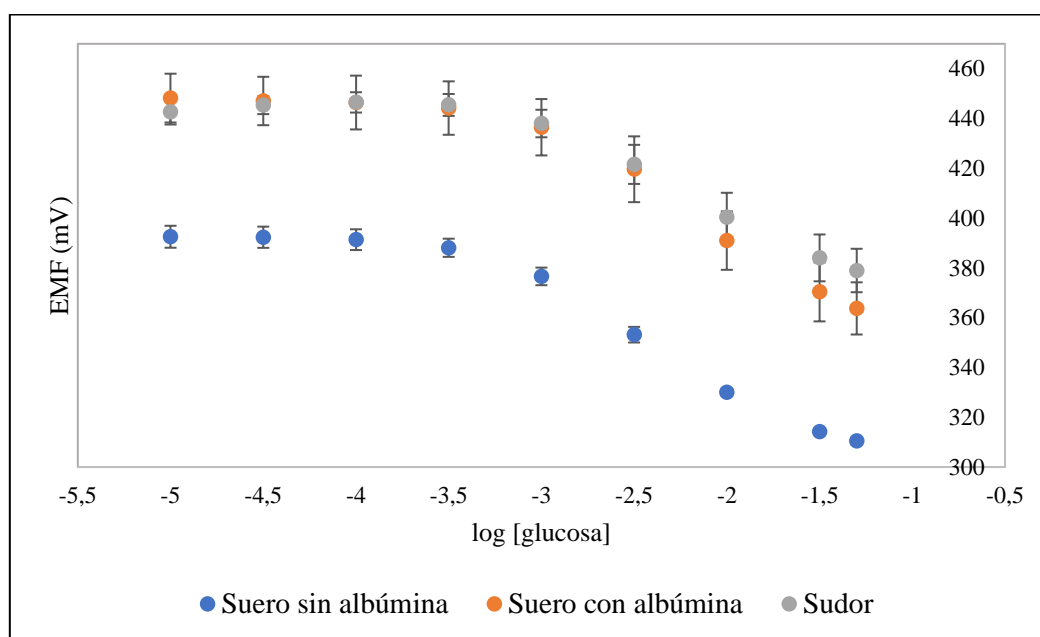


Figura 12. Calibración de glucosa en distintos fluidos, pH 7,4.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres sensores independientes.

EMF: fuerza electromotriz.

El potencial inicial es similar para los tres medios ($427,0 \pm 31,8$ mV), al igual que la sensibilidad ($36,8 \pm 2,0$ mV), por lo que no son parámetros que varíen significativamente dependiendo del medio de medición (ver **tabla 3**).

El factor que varía y es de interés es el rango lineal. Este hace referencia al intervalo de concentración de glucosa dentro del cual la sensibilidad del sensor es máxima y constante. En este caso, es el mismo para el suero con y sin albúmina (10^{-3} a 10^{-2} M glucosa) y similar al sudor (10^{-3} a $10^{-1,5}$ M glucosa).

Tabla 3. Potencial inicial, sensibilidad y rango lineal en sudor y suero con y sin albúmina. La desviación estándar corresponde a la medición de tres sensores independientes. glu: glucosa. E0: potencial inicial.

	Sudor	Suero sin albúmina	Suero con albúmina
E0 (mV)	442 ± 5,1 mV	390 ± 4,4 mV	448 ± 9,8 mV
Sensibilidad (mV)	35 ± 1 mV	39 ± 2,6 mV	39 ± 5,5 mV
Rango lineal	10 ⁻³ -10 ^{-1,5} M	10 ⁻³ -10 ⁻² M	10 ⁻³ -10 ⁻² M

5.4. Enzyme-linked immunosorbent assay

Una vez se ha establecido qué beneficios aporta el Nafion y cómo varía el rango lineal en función de la cantidad de glucosa y de los fluidos biológicos, se pone en práctica sobre una plataforma ELISA.

Se realizan tres réplicas para todas las condiciones y controles negativos para evaluar la eficacia de la solución de bloqueo convencional: BSA al 1% p/v. No se añadió Ag (antígeno) anti-IgG al control negativo durante el ELISA. Una vez que el complejo “anticuerpo primario-antígeno-anticuerpo secundario-GOx” está inmovilizado en el sensor, se sumerge en la solución PBS.

En la **figura 13** se representa la respuesta potenciométrica respecto a la concentración de antígeno sobre la superficie del sensor. A medida que se añade glucosa en el medio, esta reacciona con la GOx ligada al anticuerpo secundario y se produce una a una disminución del potencial siguiendo la reacción de la **figura 4**.

En esta gráfica es visible que a mayor concentración de Ag, mayor es la respuesta potenciométrica. Sin embargo, la magnitud es diferente entre concentraciones. Entre la concentración de Ag de 0 y 1 mg/μL hay un incremento de potencia mayor que en el resto de las concentraciones, ya que a partir de este límite se establece en el tiempo –llega a la zona de plato–. Cabe destacar que la concentración límite de antígeno antes de que se establezca la zona de plato es menor a una concentración de 10^{-2,5} y 10⁻² M de glucosa. En cambio, esta respuesta lineal se encontrará a una concentración de antígeno más baja a menor concentración de glucosa.

Por otro lado, se observa en las **figuras 13-18** que a una concentración nula de Ag, existe respuesta potenciométrica, cuando esta debería ser nula o cercana a cero por ser el control negativo.

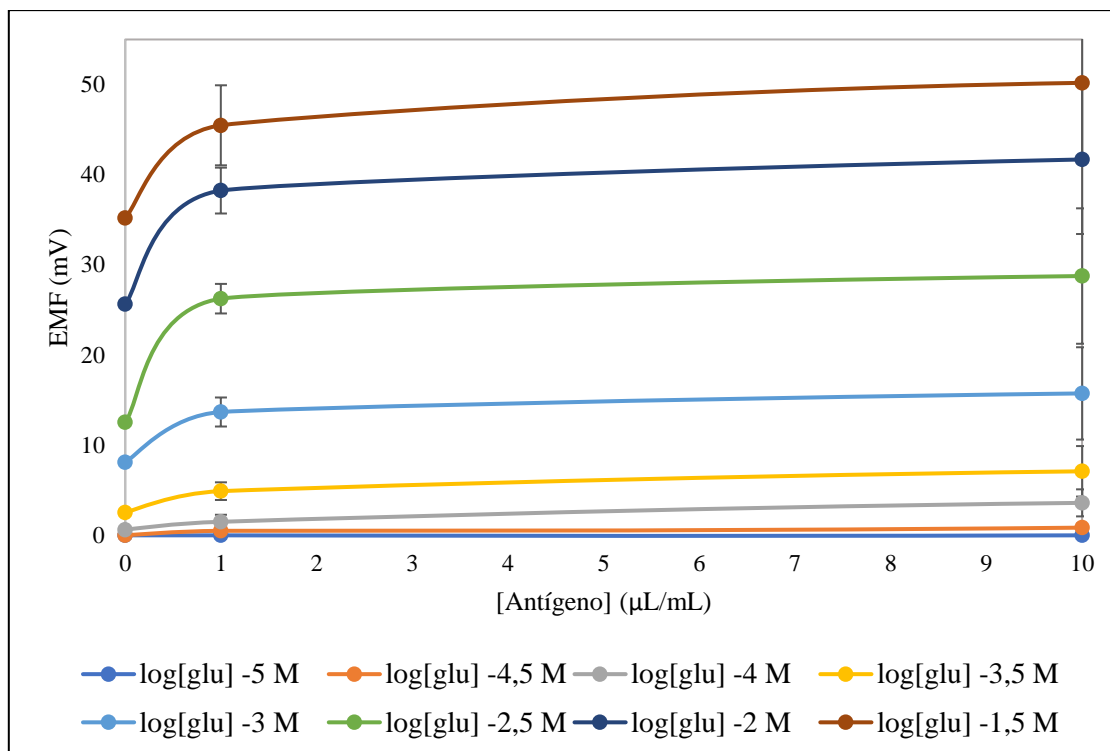


Figura 13. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de antígeno para ELISA a concentración de glucosa 10^{-5} , $10^{-4,5}$, 10^{-4} , $10^{-3,5}$, 10^{-3} , $10^{-2,5}$, 10^{-2} y $10^{-1,5}$ M.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 sensores independientes.
M: molaridad. glu: glucosa. EMF: fuerza electromotriz.

En las **figuras 14-16** se puede observar la diferencia de potencial en función de la concentración de glucosa para las 3 variantes de los experimentos con la técnica ELISA sándwich:

- En la **figura 14** se muestra la respuesta para el protocolo base descrito anteriormente con calibraciones de glucosa de 10^{-5} a $10^{-1,5}$ M.
- En la **figura 15** se observa la respuesta para el apartado (i) del protocolo. Con el fin de disminuir las interacciones inespecíficas que pueda haber entre el antígeno o el anticuerpo secundario con el Pt, se redujo el diámetro de la parte del sensor que está expuesta a los reactivos, pasando de 3,0 mm a 2,5 mm.
- En la **figura 16** se observa la respuesta para el apartado (ii) del protocolo, en el que se reduce el tiempo de incubación del anticuerpo primario a 2 horas. El objetivo se basa en disminuir el tiempo necesario para el experimento obteniendo una respuesta similar o igual al protocolo base.

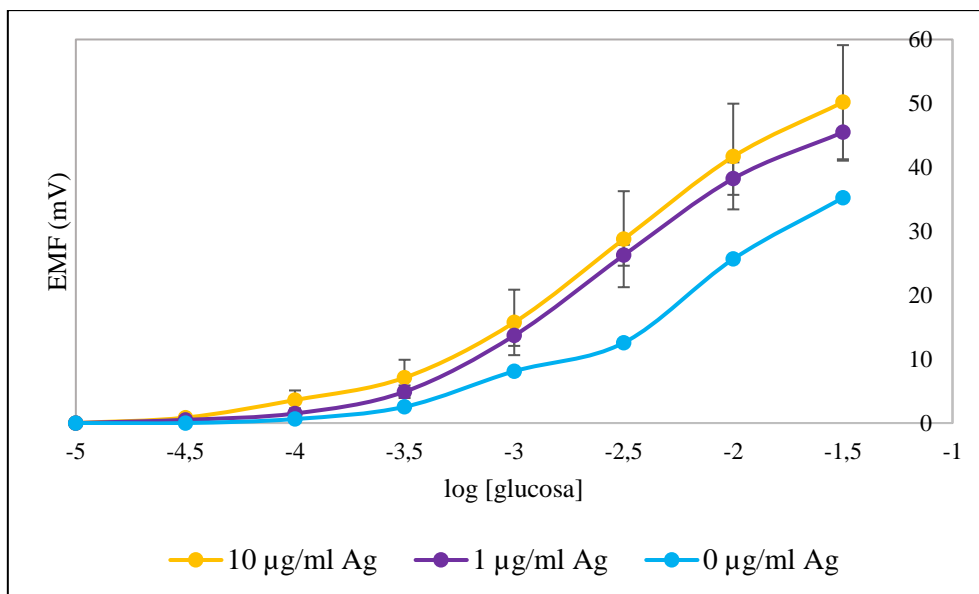


Figura 14. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de glucosa para ELISA. Diámetro del sensor 3,0 mm. Tiempo de incubación del IgG primario 24 horas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 sensores independientes. Ag: antígeno. EMF: fuerza electromotriz.

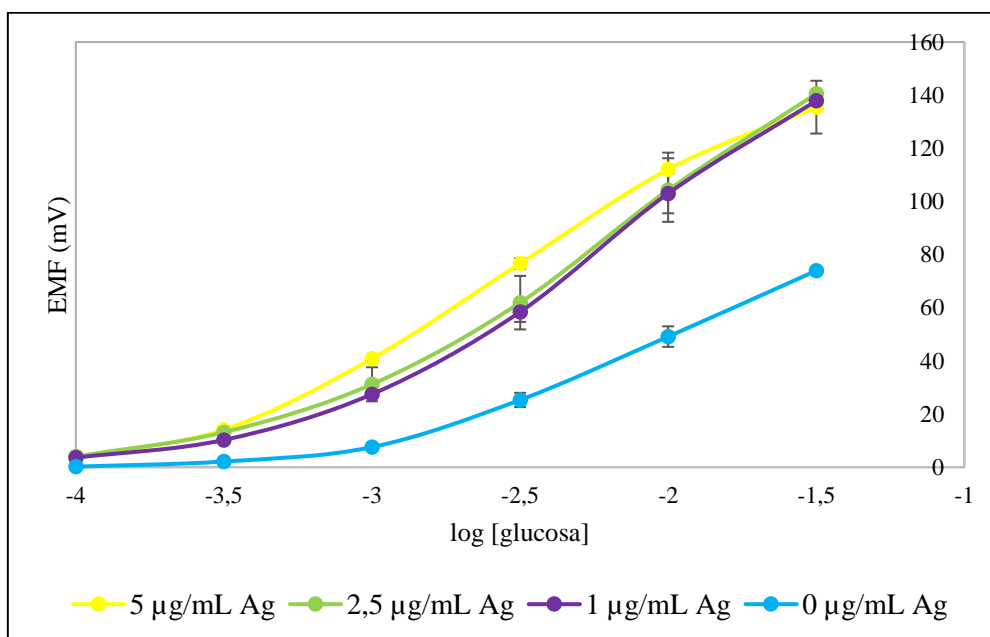


Figura 15. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de glucosa para ELISA. Diámetro del sensor 2,5 mm. Tiempo de incubación del IgG primario 24 horas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 sensores independientes. Ag: antígeno. EMF: fuerza electromotriz.

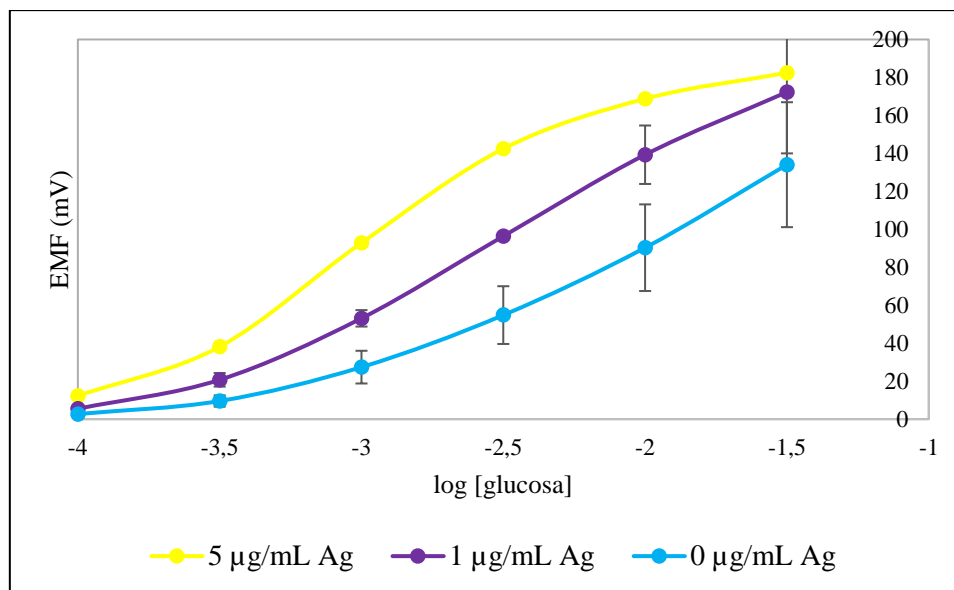


Figura 16. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de glucosa para ELISA en PBS pH 7,4. Tiempo de incubación del anticuerpo primario de 2 horas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 sensores independientes. Ag: antígeno. EMF: fuerza electromotriz.

En la siguiente figura se plasman los datos obtenidos para los tres protocolos diferentes para el caso de 1 µg/mL. Se observa que la diferencia entre el protocolo base y aquellos en los que se modifica un solo parámetro es de 100-140 mV.

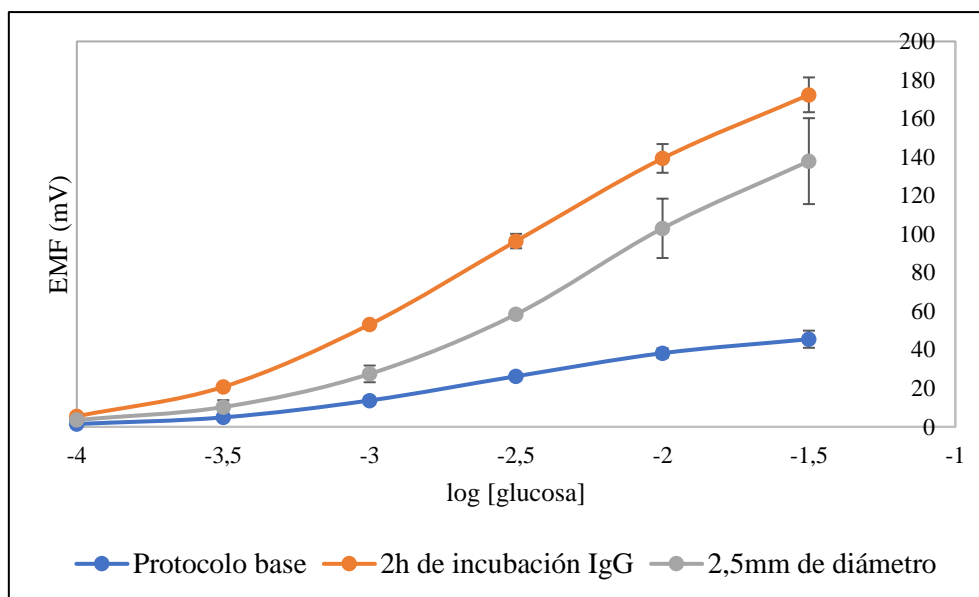


Figura 17. Respuesta potenciométrica en función de la concentración de glucosa para ELISA con diferentes metodologías. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 sensores independientes. Ag: antígeno. EMF: fuerza electromotriz.

En las **figura 17** se aprecia que la sensibilidad mejora notablemente cuando se realizan pequeñas modificaciones en el diámetro y tiempo de incubación (**figuras 15 y 16**), ya que el potencial aumenta de 40 a 180 mV en el caso de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Para realizar la medición de potencial en adiciones simples –protocolo (iii)–, es necesario escoger aquella concentración de glucosa a la cual la diferencia de concentración de antígeno sea mayor.

Por lo tanto, para que la especificidad de detección sea mayor, se escoge la concentración de 2,5 M de glucosa para realizar las adiciones individuales siguiendo el mismo protocolo base (**figura 18**).

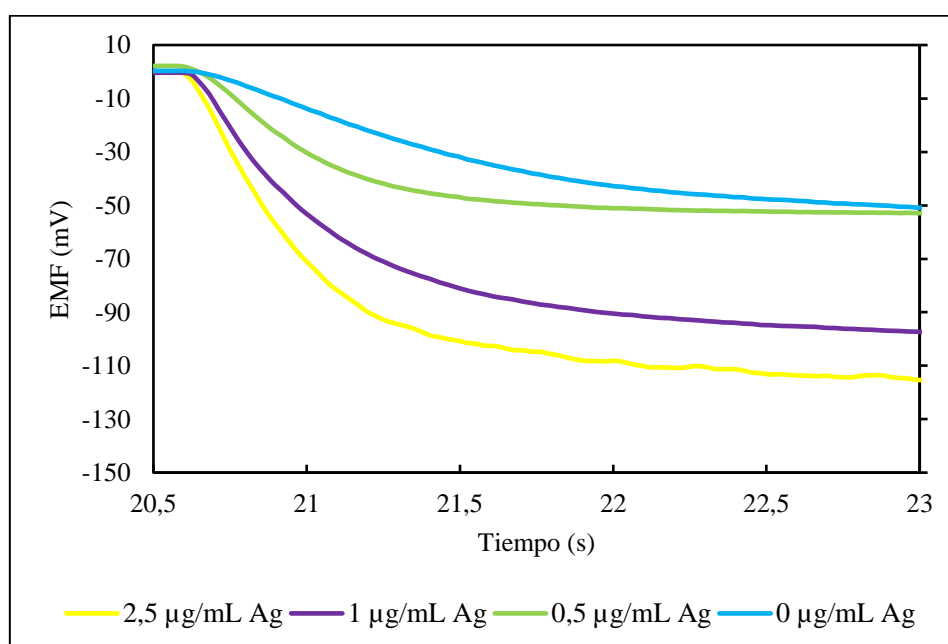


Figura 18. Respuesta potenciométrica en función del tiempo para una concentración de glucosa $10^{-2.5}$ M. Los valores representados corresponden a una medición.

Esta última figura muestra que para una sola adición de glucosa, la potencia resultante es diferente en función de la concentración de antígeno. En un intervalo de tiempo de 40 segundos a partir de la adición de glucosa podemos conocer la concentración de antígeno existente en el sensor según el voltaje. Consecuentemente, se puede discriminar la concentración de antígeno en función del tiempo.

6. Discusión

6.1. Nafion como membrana permoselectiva

El electrodo de Pt detecta los cambios en el potencial redox cuando se adiciona peróxido de hidrógeno. La semirreacción redox en la superficie del Pt se puede expresar como:



El potencial de circuito abierto de un electrodo metálico –Pt en este estudio– que se expone a una solución se explica por el mecanismo del potencial mixto, que está bajo control cinético de la reacción de reducción de oxígeno.

A diferencia del equilibrio, el potencial mixto se origina por corrientes de intercambio que se producen por las reacciones que se dan entre el material del electrodo, el solvente y los componentes de la solución.

El mecanismo de potencial mixto está bajo el control cinético de la reacción de reducción de oxígeno, que es una reacción lenta, irreversible y el mecanismo incluye pasos y vías que dependen de las condiciones de la reacción.

Como el paso limitante de la velocidad incluye la adsorción de O₂ en los sitios libres en el Pt más una transferencia de un electrón, la disponibilidad de los sitios tiene un papel de suma importancia en la reacción de reducción del oxígeno. Gracias a la permoselectividad del Nafion, se modula los factores que afectan a la cinética de la reacción, permitiendo que:

- (i) Se aumente la concentración de H⁺.
- (ii) Se minimice el efecto de otras especies: se reduce la adsorción de iones en la superficie de Pt.
- (iii) El Nafion actúe como reservorio de oxígeno (13).

Esto explicaría que los electrodos con Nafion tengan un potencial inicial y sensibilidad superior a los electrodos desnudos (**figuras 10 y 19**).

Además, también puede deberse a la acumulación de cargas en la interfaz Nafion-medio, ya que gracias a los grupos sulfonato cargados negativamente, tiene capacidad de intercambio iónico (6,13).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con datos previos (6). En estos, se puede observar que la sensibilidad que se obtiene es mucho mayor (125 mV) en comparación con los experimentos producidos para este ensayo (80 mV), pero esto puede deberse a que:

- (i) Al hacer adiciones de H_2O_2 con intervalos más pequeños, el rango para medir la sensibilidad es más preciso.
- (ii) Se insertó un hilo de platino de 1 mm de diámetro con una pureza del 99,95%, mientras que para este proyecto se ha utilizado una pulverización catódica de radiofrecuencia.

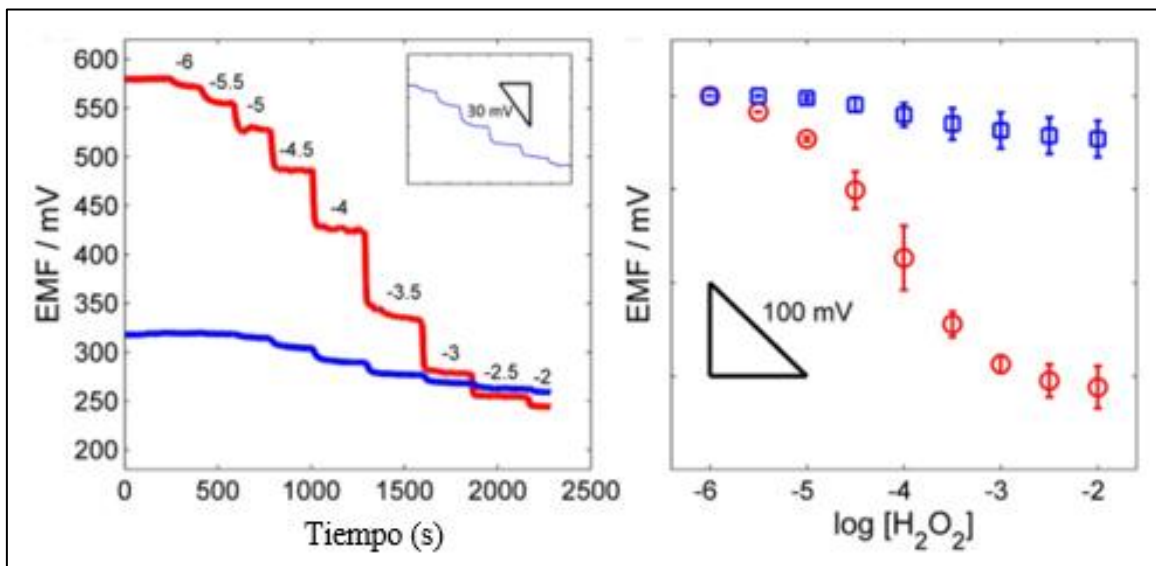


Figura 19. Curvas de respuesta potenciométrica a la adición de H_2O_2 (6). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 sensores.

En consecuencia, el sensor con 5 μL de Nafion sería más adecuado para la cuantificación de H_2O_2 .

6.2. Glucosa oxidasa sobre biosensores

En la **figura 11** se ha observado que a mayor cantidad de unidades de GOx en el sensor de trabajo, el rango lineal se mueve hacia una concentración de glucosa más baja.

Esto es racional a nivel de bioquímica porque a mayor cantidad de enzima, esta podrá convertir el sustrato –glucosa– en producto – H_2O_2 – hasta que el sustrato se agote o la enzima se sature.

En otras investigaciones en las que también se ha estudiado la influencia de la carga de GOx sobre la respuesta a glucosa (22), se ha visto que a mayor carga de enzima, mayor es la concentración de glucosa detectable. Es decir, más unidades de GOx sobre las superficie del sensor dan como resultado una sensibilidad sustancialmente más elevada y un rango lineal más amplio, lo cual coincide con los resultados obtenidos. En consecuencia, se da como resultado una actividad catalítica mejorada. Por tanto, dependiendo de la concentración de glucosa que se desee medir –sea en estado patológico o sano–, el rango lineal será diferente y, consecuentemente, la cantidad necesaria de enzima GOx para conocer la concentración de glucosa variará.

Por otro lado, en otros estudios se ha visto que al mejorar el rango lineal, también se mejora la sensibilidad del sensor (22). Este hecho no se ha podido demostrar en los experimentos realizados para este trabajo, ya que la diferencia de sensibilidad para 29,040 y 14,520 u de GOx no corresponde a un aumento de la sensibilidad a mayor cantidad de enzima. Sin embargo, sí aumenta significativamente la sensibilidad del sensor entre 2,904 y 29,040 u de GOx. Para poder alcanzar una conclusión sobre estos resultados sería necesario reducir la desviación estándar de las mediciones.

Hay que tener en cuenta que una concentración de enzima demasiado alta dará como resultado la fuga de la enzima de la superficie del sensor y afectará a su estabilidad (22).

Estos resultados podrían ser útiles si se realizara el mismo experimento con ELISA, ya que permitiría ajustar el rango lineal en función de la cantidad de anticuerpo secundario marcado con GOx que se añada. Por ejemplo, $3,8 \cdot 10^{-3} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de glucosa se considera una concentración basal no patológica en ayunas. Si se quisiera medir en este rango, se tendrían que añadir 14,52 unidades de enzima GOx. En cambio, en estados patológicos por hiperglucemia o bien en ausencia de ayuno, se deberían añadir 5,808 unidades de enzima sobre el sensor de trabajo para hacer la medición de glucosa en el rango lineal óptimo.

6.3. Fluidos biológicos para la detección de glucosa

El sudor se considera un fluido biológico de interés para el seguimiento de los niveles de glucosa. Para ello, se debe comparar el comportamiento del sensor en un medio conocido, como el PBS, y el fluido biológico a valorar.

Dado que en los diferentes medios de estudio es posible la medición de glucosa, con una sensibilidad y potencial inicial similares (**figura 12**), la concentración de glucosa en sudor podría extrapolarse a la concentración en suero.

La diferencia principal radica en el rango de medición: para el sudor el rango lineal es ligeramente inferior que en el suero. Por este motivo, dependiendo del rango lineal necesario, no se podría utilizar el sudor como medio de medición de la glucosa.

En otras investigaciones se ha visto que para adiciones de glucosa en PBS y en saliva, la disminución de potencial electroquímico sigue la misma tendencia que al añadirse H_2O_2 (7).

Se ha reportado que el rango lineal en PBS para glucosa va de $10^{-3,5}$ a $10^{-2,5}$ M, que es similar al que se ha encontrado experimentalmente en suero y sudor para este trabajo: $10^{-3} - 10^{-2}$ M en suero y $10^{-3} - 10^{-1,5}$ M en sudor.

Como el principio de detección aplicado es el potencial mixto, la respuesta del electrodo depende del pH de la solución y de la concentración del electrolito de soporte (13). Aunque el pH sea el mismo para saliva, sudor y PBS $-7,4-$, la concentración de iones totales es diferentes, por lo que afecta el potencial entre el electrodo y la solución (7).

La alta concentración iónica de la matriz, en el caso del sudor, afecta los parámetros analíticos. Si en una muestra biológica dichos parámetros pueden cambiar, la detección también podría verse alterada (13).

La determinación de glucosa en saliva requiere de sensores ultra-sensibles, ya que la concentración de glucosa es mucho menor que en sangre (7). De la misma manera, el uso del sudor como método de diagnóstico requiere de una sensibilidad mayor, ya que la concentración de glucosa en la saliva es mucho más baja que en sangre. También se debe tener en cuenta en las muestras reales las limitaciones por degradación de la muestra, la variación interpersonal y la viabilidad comercial (14).

6.4. Enzyme-linked immunosorbent assay

En este apartado se presenta la prueba de concepto del ELISA con sensores electroquímicos Pt/Nafion.

Los resultados confirman que los anticuerpos son exitosamente inmovilizados en la superficie del electrodo de platino, ya que se obtiene respuesta potenciométrica (**figuras 13-18**). El hecho de obtener diferente magnitud de potencia a diferente concentración de antígeno indica que es posible la medición específica para diferentes concentraciones de antígeno.

Sin embargo, el control negativo también proporciona una respuesta potenciométrica. El ruido de fondo no deseado y la señal positiva en el control negativo pueden deberse a interacciones inespecíficas del antígeno anti-IgG y el anticuerpo secundario con el sustrato. La cantidad de unión del complejo antígeno-anticuerpo se correlaciona con la cantidad de potencia detectada.

De manera positiva, la respuesta potenciométrica para el control negativo se ha visto reducida al disminuir el diámetro del sensor y reducir el tiempo de incubación (40-60 mV de diferencia entre el control negativo y 1,0 mg/ μ L). Esto es debido a que las interacciones inespecíficas entre antígeno-Pt y anticuerpo secundario-Pt son menores debido a que los 5 μ L añadidos de cada reactivo ocupan la totalidad del sensor (**figura 20**).

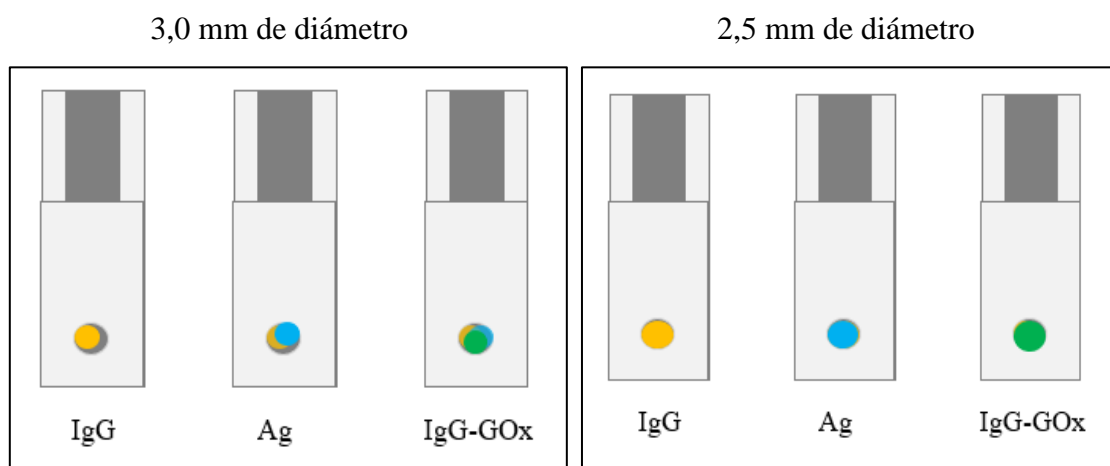


Figura 20. Representación esquemática de las interacciones inespecíficas.

Es importante destacar que a pesar de detectar potencia para el control negativo, en la **figura 18** se muestra que la respuesta potenciométrica es específica para diferentes concentraciones de antígeno, y que podemos diferenciarlas en un periodo de 40 segundos a partir de la adición de glucosa.

Se han realizado otros estudios en los que se ha visto que la cinética de la respuesta potenciométrica es similar: la respuesta aumenta con la cantidad de antígeno y a partir de determinada concentración comienza a nivelarse (1). La tendencia positiva que se establece en un plato también se ha descrito en otros artículos.

La gran diferencia que se ha observado es la sensibilidad: mientras que en este estudio se llega a un máximo de 180 mV para 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno a 1,5 M de glucosa, en otros estudios en los que se detecta el nivel de cortisol se alcanza un máximo de 140-150 mV para 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno (19). Por tanto, es necesario optimizar los parámetros y/o introducir nuevas estrategias, ya que el valor máximo de sensibilidad puede aumentar.

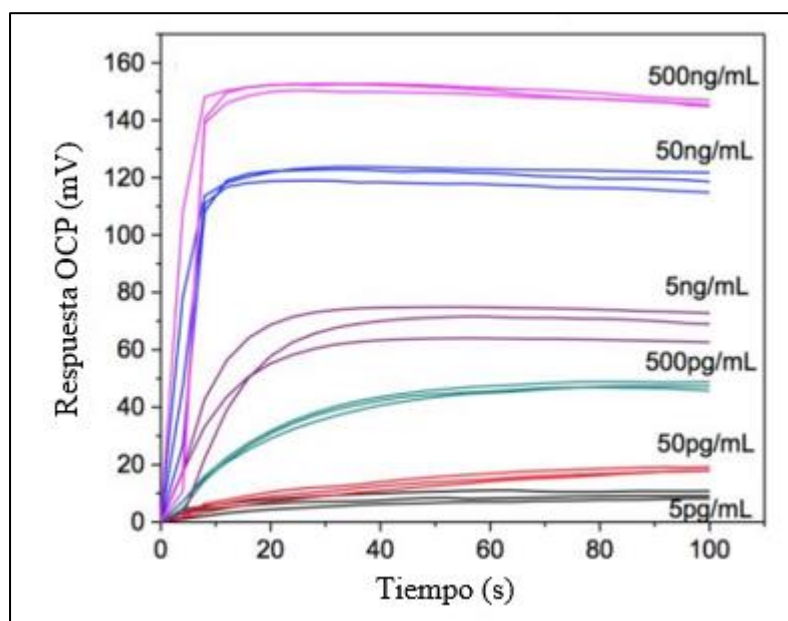


Figura 21. Curvas de calibración para la diferencia de potencial después de 100 segundos de reacción en función de las concentraciones de troponina. OPC: potenciometría de circuito abierto (19).

Por otro lado, la reproducibilidad proporciona una indicación de la precisión del biosensor en múltiples mediciones. La alta reproducibilidad es esencial para que la detección sea sensible. El ensayo resultó ser repetible y exhibió una desviación estándar perfecta.

Los resultados de estos experimentos resaltan la necesidad de nuevas tecnologías, como sensores electroquímicos, que puedan usarse para detectar de manera confiable la respuesta a glucosa en tiempo real para ayudar a reducir los tiempos de espera y, por tanto, el tiempo de respuesta.

En futuros estudios se pretende optimizar diversos parámetros, como es el tiempo de incubación, ya que se ha visto que a menor tiempo de incubación, mayor es la respuesta potenciométrica, o si al cambiar el porcentaje de BSA en las muestras se reducen las interacciones inespecíficas –menor respuesta en el control negativo–.

Además, también sería necesario definir el rango lineal de trabajo, para poder adaptar la concentración tanto de antígeno como de anticuerpo secundario a los estados patológicos y sanos.

7. Conclusiones

Se ha observado claramente que aquellos sensores que tienen una capa de Nafion en su superficie consiguen un potencial inicial y sensibilidad más elevados cuando se mide su potencia. Se ha concluido que el uso de una membrana permselectiva optimiza la detección en un 76%.

El rango lineal de medición varía dependiendo de la cantidad de enzima GOx presente en la superficie del sensor. A mayor cantidad de enzima, se podrá medir en un rango lineal más bajo. Consecuentemente, se debe adaptar la cantidad de GOx en el sensor para poder medir los diferentes estados –patológico y sano– de la glucosa en el cuerpo humano.

Por otro lado, se detecta peróxido de hidrógeno en sudor y suero artificial, siendo su rango lineal similar al PBS, aunque escasamente inferior. Esto quiere decir que los resultados obtenidos en una muestra de sudor son extrapolables para conocer la concentración de glucosa en suero.

En los últimos experimentos, se observa que la técnica ELISA mide de manera específica la concentración de antígeno en el medio. A pesar de que no se consiguen anular las interacciones inespecíficas, sí es posible diferenciar la respuesta potenciométrica con y sin antígeno, aunque se debe aumentar la reproducibilidad de la técnica.

En conclusión, la construcción de un biosensor electroquímico que detecte antígeno a concentraciones específicas mediante ELISA es posible y se optimizará en futuros trabajos, pero es necesario establecer cambios en los diferentes parámetros para optimizar la respuesta. Además, es necesario asegurar la reproducibilidad de la técnica para que sea un método fiable.

8. Referencias bibliográficas

1. Tang, D. P., Yuan, R., Chai, Y. Q., Zhong, X., Liu, Y., Dai, J. Y., & Zhang, L. Y. (2004). Novel potentiometric immunosensor for hepatitis B surface antigen using a gold nanoparticle-based biomolecular immobilization method. *Analytical biochemistry*, 333(2), 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.035>
2. Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., & Kim, M. (2019). Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(1), 121. <https://doi.org/10.3390/ma12010121>
3. Khosravi Ardakani, H., Gerami, M., Chashmpoosh, M., Omidifar, N., & Gholami, A. (2022). Recent Progress in Nanobiosensors for Precise Detection of Blood Glucose Level. *Biochemistry research international*, 2022, 2964705. <https://doi.org/10.1155/2022/2964705>
4. Hassan, M. H., Vyas, C., Grieve, B., & Bartolo, P. (2021). Recent Advances in Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Glucose Sensing. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(14), 4672. <https://doi.org/10.3390/s21144672>
5. Guadarrama-Fernández, L., Novell, M., Blondeau, P., & Andrade, F. J. (2018). A disposable, simple, fast and low-cost paper-based biosensor and its application to the determination of glucose in commercial orange juices. *Food chemistry*, 265, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.082>
6. Parrilla M, Cánovas R, Andrade FJ. (2017). Enhanced potentiometric detection of hydrogen peroxide using a platinum electrode coated with Nafion. *Electroanalysis*. 29(1), 223–30. <https://doi.org/10.1002/elan.201600403>
7. Borràs-Brull M, Blondeau P, Riu J, Domingo M. (2021) Characterization and validation of a platinum paper-based potentiometric sensor for glucose detection in saliva. *Electroanalysis*. 33(1), 181-7. <https://doi.org/10.1002/elan.202060221>
8. Asif, M. H., Ali, S. M., Nur, O., Willander, M., Brännmark, C., Strålfors, P., Englund, U. H., Elinder, F., & Danielsson, B. (2010). Functionalised ZnO-nanorod-based selective electrochemical sensor for intracellular glucose. *Biosensors & bioelectronics*, 25(10), 2205–2211. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.02.025>

9. Regiart, M., Ledo, A., Fernandes, E., Messina, G. A., Brett, C., Bertotti, M., & Barbosa, R. M. (2022). Highly sensitive and selective nanostructured microbiosensors for glucose and lactate simultaneous measurements in blood serum and in vivo in brain tissue. *Biosensors & bioelectronics*, *199*, 113874. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113874>
10. Cánovas, R., Parrilla, M., Blondeau, P., & Andrade, F. J. (2017). A novel wireless paper-based potentiometric platform for monitoring glucose in blood. *Lab on a chip*, *17*(14), 2500–2507. <https://doi.org/10.1039/c7lc00339k>
11. Hoekstra R, Blondeau P, Andrade FJ. (2018) IonSens: A wearable potentiometric sensor patch for monitoring total ion content in sweat. *Electroanalysis*. *30*(7), 1536–44. <https://doi.org/10.1002/elan.201800128>
12. Romero, M. R., Ahumada, F., Garay, F., & Baruzzi, A. M. (2010). Amperometric biosensor for direct blood lactate detection. *Analytical chemistry*, *82*(13), 5568–5572. <https://doi.org/10.1021/ac1004426>
13. Baez, J. F., Compton, M., Chahrati, S., Cánovas, R., Blondeau, P., & Andrade, F. J. (2020). Controlling the mixed potential of polyelectrolyte-coated platinum electrodes for the potentiometric detection of hydrogen peroxide. *Analytica chimica acta*, *1097*, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.018>
14. Zafar, H., Channa, A., Jeoti, V., & Stojanović, G. M. (2022). Comprehensive Review on Wearable Sweat-Glucose Sensors for Continuous Glucose Monitoring. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *22*(2), 638. <https://doi.org/10.3390/s22020638>
15. Parrilla, M., Cánovas, R., & Andrade, F. J. (2017). Paper-based enzymatic electrode with enhanced potentiometric response for monitoring glucose in biological fluids. *Biosensors & bioelectronics*, *90*, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.034>
16. Urizar, G. G., Jr, Hernandez, H. S., Rayo, J., & Bhansali, S. (2020). Validation of an Electrochemical Sensor to Detect Cortisol Responses to the Trier Social Stress Test. *Neurobiology of stress*, *13*, 100263. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100263>

17. Pérez, D., & Orozco, J. (2022). Wearable electrochemical biosensors to measure biomarkers with complex blood-to-sweat partition such as proteins and hormones. *Mikrochimica acta*, *189*(3), 127. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05228-2>
18. Tarasov, A., Gray, D. W., Tsai, M. Y., Shields, N., Montrose, A., Creedon, N., Lovera, P., O'Riordan, A., Mooney, M. H., & Vogel, E. M. (2016). A potentiometric biosensor for rapid on-site disease diagnostics. *Biosensors & bioelectronics*, *79*, 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.086>
19. Zhang, Q., Prabhu, A., San, A., Al-Sharab, J. F., & Levon, K. (2015). A polyaniline based ultrasensitive potentiometric immunosensor for cardiac troponin complex detection. *Biosensors & bioelectronics*, *72*, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.084>
20. Dhanapala, L., Krause, C. E., Jones, A. L., & Rusling, J. F. (2020). Printed Electrodes in Microfluidic Arrays for Cancer Biomarker Protein Detection. *Biosensors*, *10*(9), 115. <https://doi.org/10.3390/bios10090115>
21. Zhang, H., Li, X., Bai, Y., Niu, R., Jia, Y., Zhang, C., Zhang, L., Feng, X., & Cao, Y. (2009). Metastatic cell detection using a phage-peptide-modified light-addressable potentiometric sensor. *Biotechnology and applied biochemistry*, *53*(3), 185–192. <https://doi.org/10.1042/BA20080051>
22. Yang, M., Yang, Y., Liu, Y., Shen, G., & Yu, R. (2006). Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors. *Biosensors & bioelectronics*, *21*(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.04.009>

9. Autoevaluación

He realizado el trabajo de final de grado en base a las prácticas en el grupo de Cualimetría, Quimiometría y Nanosensores, de la Universitat Rovira i Virgili, en Tarragona, en el periodo de octubre a marzo.

Decidí hacer las prácticas en este grupo cuando se presentó la oportunidad gracias a una beca de colaboración. Además, una compañera del mismo grado había realizado las prácticas el año anterior, teniendo muy buenas referencias.

El proceso de realización de este trabajo me ha supuesto un reto personal, ya que nunca había realizado ningunas prácticas en potenciometría y no es algo que se explique ampliamente en el grado.

Estoy muy satisfecha de haber podido realizar los procedimientos por mí misma con la correspondiente supervisión. Esto me ha permitido asumir la responsabilidad de los resultados de los experimentos. Además, el hecho de tener que repetir experimentos múltiples veces me ha ayudado a mejorar mis habilidades en el laboratorio, por lo que estoy muy agradecida.

En este periodo he adquirido experiencia, formación y una mejora de la adaptación al laboratorio. Complementariamente, he podido buscar soluciones a las limitaciones que se iban presentando conforme avanzaba con el proyecto, como la optimización de los protocolos de ELISA.

En conclusión, he podido aplicar los conocimientos y habilidades adquiridas durante el grado, pero sobre todo he podido adquirir muchos nuevos conocimientos. Ha sido una estancia muy satisfactoria.