

Artículo Original

Biosensor para la determinación de glucosa provisto de una membrana de poliacrilamida con glucosa oxidasa *

SILVIA SERRADILLA RAZOLA, JEAN-MICHAEL KAUFFMANN*,
BEATRIZ LÓPEZ RUIZ

*Departamento de Química Analítica. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid*

** Institute de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles. Campus
Plaine, CP 205/6, 1050 Brussels, Belgium*

RESUMEN

Se propone un nuevo diseño de biosensor amperométrico para la determinación de glucosa, utilizando glucosa oxidasa inmovilizada en membranas de poliacrilamida, obtenidas mediante la polimerización inducida por radiación gamma. El intervalo de linealidad obtenido fue $5,0 \times 10^{-5}$ M - $1,58 \times 10^{-4}$ M. Se estudió la interferencia producida por el ácido ascórbico. El biosensor propuesto se utilizó para determinar el contenido en glucosa de medios de cultivo celular y los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por un método espectrofotométrico enzimático.

Palabras Clave: Biosensor, Glucosa oxidasa, Membrana de poliacrilamida

* Premio Carlos del Castillo Leyva de la Real Academia de Farmacia. Año 2001.

SUMMARY

Biosensor for glucose measurements based on glucose oxidase entrapment in polyacrylamide membrane.

An amperometric glucose biosensor was constructed using glucose oxidase immobilized into polyacrylamide membranes obtained by gamma radiation-induced polymerization. Calibration curves were lineal in the 5×10^{-5} M - 1.58×10^{-3} M range. The interference of ascorbic acid was studied. The biosensor was employed to analyze a glucose-containing cell culture media and the results were compared to those obtained by an enzymatic spectrophotometric method.

Key words: Biosensor, Glucose oxidase, polyacrylamide membrane.

INTRODUCCIÓN

Desde los años setenta se ha observado un gran incremento en el uso de preparaciones enzimáticas como reactivos analíticos, en sus dos versiones, solubles e inmovilizadas sobre una matriz inerte (1-2). La glucosa oxidasa es, sin duda, la enzima más utilizada como reactivo analítico debido, no solo a su eficacia en la determinación de glucosa, especie de gran interés analítico, sino también debido a su bajo precio y buena estabilidad, tanto soluble como inmovilizada. Todo ello hace del sistema glucosa/glucosa oxidasa un modelo muy conveniente, en particular en el campo de los biosensores (3).

Uno de los métodos más comunes de inmovilización enzimática utilizados en el diseño de electrodos enzimáticos o biosensores consiste en el atrapamiento del enzima en una matriz polimérica. El sistema de atrapamiento en geles poliméricos es tan poco agresivo como el de adsorción, es decir, las biomoléculas no se unen covalentemente a la matriz, lo que evita la pérdida de actividad enzimática, tan habitual en los procesos de inmovilización por uniones covalentes o enlaces cruzados. Los geles de poli(acrilamida) han sido (4) y siguen siendo (5-8) sistemas de inmovilización de biomoléculas muy adecuados para la fabricación de biosensores.

Generalmente, las reacciones de polimerización utilizan como agente iniciador persulfato de amonio y como catalizador de la reacción, N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) (9,10). Esta reacción resulta más eficaz que la polimerización con riboflavi-

na activada con radiación UV, pero requiere de un cuidadoso control de las condiciones de polimerización si se quieren obtener resultados fiables. El método de la riboflavina tiene la ventaja de que no se inicia hasta que la disolución del gel se expone a la radiación UV.

Es bien conocido el problema que aparece al utilizar gel de poli(acrilamida) como material inerte en la inmovilización enzimática. Se ha demostrado que, utilizando este procedimiento, la actividad enzimática desciende drásticamente, (alcanzando valores del 22% de la actividad en contraste con el 80-90% conseguido cuando el mismo enzima se inmoviliza en gelatina), esta caída de la actividad tan acusada es un "efecto secundario" del proceso de fotopolimerización clásico que requiere la preparación del gel, y que presenta el inconveniente de producir un exceso de radicales que dañan irreversiblemente al enzima.

Para evitar estos problemas, algunos autores han ensayado un procedimiento de inmovilización basado en la polimerización inducida por radiación gamma a baja temperatura de una disolución acuosa de la enzima mezclada con ésteres acrílicos y metacrílicos formadores de cristales (11-15). La principal característica de la matriz polimérica obtenida por este método es su estructura porosa que resulta de los microcristales de hielo dispersos en el monómero frío. La enzima se encuentra atrapada físicamente sobre las paredes de los poros. Con esta técnica de inmovilización, no es necesario el iniciador o disolvente orgánico para la polimerización. La ventaja de este método de atrapamiento se debe al hecho de que, al no haber enlaces covalentes entre la enzima y la matriz polimérica, se mantienen las propiedades nativas de la enzima.

Galiatsatos y col. (16) y Hajizadeh y col. (17) utilizaron radiación gamma para la obtención de polímeros destinados a la modificación de electrodos, estos autores han mostrado que la glucosa oxidasa y la lactato oxidasa pueden inmovilizarse en una matriz de poli (vinilalcohol) obteniendo una capa enzimática en sandwich entre dos capas de polímero. Doretto y col. (18) inmovilizaron colina oxidasa en membranas de poli (hidroxietilmetacrilato) obtenidas mediante polimerización inducida por radiación gamma a baja temperatura. Birch y col. (19) han utilizado la radiación γ de ^{60}Co para inmovilizar matrices de hidrogeles alrededor de la superficie de un electrodo de grafito.

En el presente trabajo se propone un nuevo electrodo amperométrico enzimático, específico para la determinación de glucosa, en el que la glucosa oxidasa se inmoviliza en un hidrogel de poliacrilamida con N,N'-metilenbisacrilamida como agente reticulante, y donde el proceso de polimerización se inicia con una radiación gamma. La radiación γ se utiliza como iniciadora y catalizadora de la reacción. Este método ofrece ventajas como, evitar la adición de reactivos al medio de reacción que pueden interferir con el enzima y no requerir el uso de temperaturas elevadas. Este último punto es de particular importancia cuando un enzima forma parte de la reacción. El electrodo enzimático se preparó colocando una fina capa de glucosa oxidasa inmovilizada alrededor de un electrodo de disco de platino.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos

Las medidas amperométricas se llevaron a cabo en un potencios-tato Brucker, modelo E 230 conectado a un registrador Kipp & Zonen, modelo 111 BD Single Channel. Las voltamperometrías cíclicas se realizaron con un analizador voltamperométrico Bioanalytical System, Model CV-27. Los experimentos se efectuaron en una celda electroquímica de 10 mL compuesta por un electrodo de referencia de calomelanos saturado, un cable metálico de acero inoxidable como electrodo auxiliar y un electrodo de disco de platino como electrodo de trabajo. El transporte convectivo se consiguió mediante un agitador magnético.

Se utilizó una fuente de radiación γ de ^{60}Co con una intensidad de 0,03 Mrad/h (Université Libre de Bruxelles, Belgium).

Reactivos

La β -D-glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4.) de *Aspergillus niger* fue suministrada por Sigma. La glucosa, acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida fueron productos de Aldrich. El estireno sulfonato de sodio

fue preparado por El Du Pont de Nemours & Co. El ácido L-(+)-ascórbico se obtuvo de Acros Organic. El hidrogenofosfato de sodio anhidro y la sal sódica dihidratada del dihidrogenofosfato se obtuvieron de Vel S.A.

El agua desionizada, se obtuvo mediante el paso de agua bidestilada en vidrio Pirex, a través de un sistema de purificación de agua Milli-Q 50 de Millipore.

Inmovilización del enzima

Para preparar la disolución del gel se mezclaron disoluciones de acrilamida 5 M con N,N'-metilenbisacrilamida 5 M en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,2, en una proporción 97:3 respectivamente. La disolución del gel con enzima se preparó disolviendo 2,5 mg de glucosa oxidasa en 1 mL de disolución del gel. En los casos indicados se añadió estiren sulfonato de sodio hasta una concentración final en el medio de reacción del 10 %. La mezcla se colocó entre dos láminas de vidrio separadas por un espaciador de plástico de 0,4 mm de espesor. Este sistema se introdujo en una fuente de ^{60}Co durante 1 hora, para iniciar la polimerización del gel. Cuando el estiren sulfonato de sodio está presente, el tiempo de radiación se prolongó hasta 3 horas. Al final de este período se obtuvo una película aún frágil, por lo que se dejó en reposo en una disolución tampón de fosfato durante 4 ó 5 días a 5°C para completar la polimerización. Al final de este tiempo la película se hizo resistente y manejable. Las membranas se cortaron en discos de 0,7 cm y se colocaron sobre la superficie del electrodo de platino, como se muestra en la Figura 1. Se utilizó este método para iniciar la reacción sin necesidad de añadir más especies que podrían dañar a la enzima inmovilizada y para evitar un incremento en la temperatura que podría alterarla. Como se observa en la Figura 2, con la radiación gamma se provoca una reacción radicalaria iniciada por los radicales hidroxilo originados de las moléculas de agua. El oxígeno disuelto inhibe el proceso de polimerización, por lo que las mezclas de gel deben ser fuertemente desoxigenadas, antes y durante el proceso de polimerización.

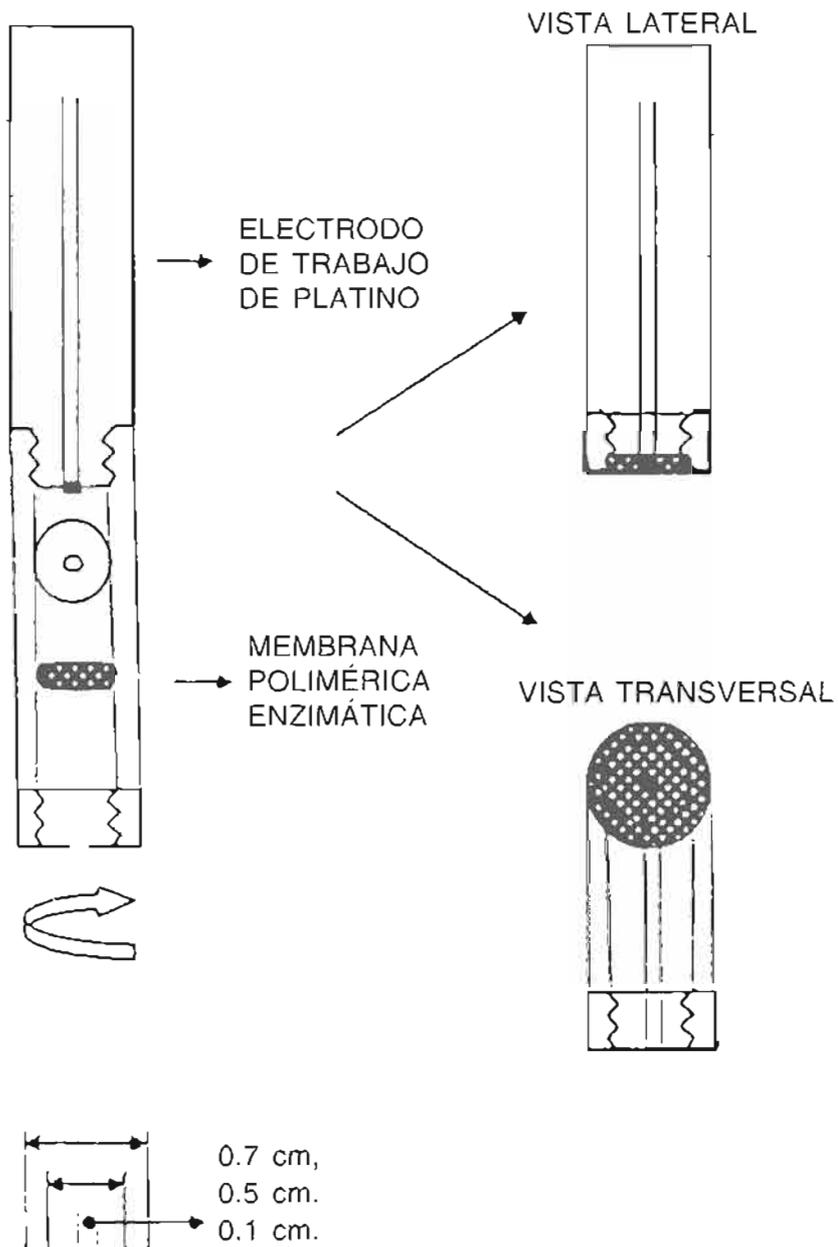


Figura 1. Electrodo de platino recubierto con la membrana polimérica

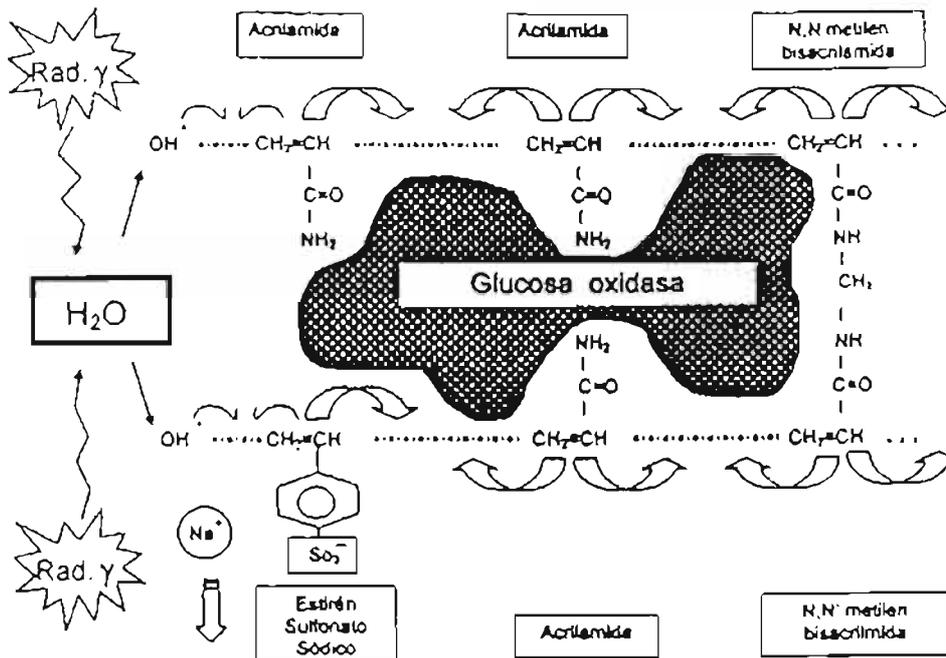


FIGURA 2. Reacción de polimerización con inmovilización de la glucosa oxidasa en la matriz polimérica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios preliminares

Se realizó un estudio amperométrico de H_2O_2 sobre el electrodo de platino, para un intervalo de concentración de $2,5 \times 10^{-5} M$ - $4,5 \times 10^{-4} M$. En la primera experiencia el electrodo no se cubrió con ninguna membrana y posteriormente se cubrió, primero con una membrana de diálisis y luego con una película de gel de poliacrilamida. Los electrodos con membrana dieron una respuesta muy semejante entre ellos y significativamente menor a la obtenida con el electrodo sin membrana. Este efecto se debe a la restricción difusional producida por la membrana en la superficie del electrodo. En este medio el analito presenta un coeficiente de difusión mucho menor y como resultado genera una corriente más pequeña.

Influencia del grado de reticulación del gel

Se realizó este estudio para establecer el grado de reticulación óptimo que permitiera incluir e inmovilizar el mayor número de moléculas de glucosa oxidasa sin que se viera perjudicada la difusión de la glucosa a través del gel. En primer lugar se trató de averiguar la cantidad de N,N'-metilénbisacrilamida necesaria para una inmovilización eficaz del enzima. Para ello se prepararon tres películas de hidrogel con diferente porcentaje de agente reticulante (1%, 2% y 5%) respecto a la cantidad de monómero. Una vez preparadas se mantuvieron refrigeradas en una disolución tampón de fosfato durante dos semanas con el objetivo de que la enzima inmovilizada tuviera el tiempo suficiente para salir del gel. Las respuestas obtenidas por los hidrogeles con 2% y 5% de agente reticulante fueron similares. Sin embargo, la respuesta obtenida con el gel cuyo contenido en agente reticulante era 1% resultó ser inferior en un factor de 3. Este comportamiento podría explicarse como consecuencia de la difusión de la enzima hacia el exterior del gel en el proceso de hinchamiento del mismo en la disolución tampón. Los poros del hidrogel con 1% de agente reticulante eran demasiado grandes para mantener la glucosa oxidasa atrapada en su interior. Mientras que a partir de un 2% de agente reticulante de la enzima parece quedar retenida dentro de la red polimérica, por lo que no se consideró necesario aumentar este porcentaje en los siguientes experimentos, ya que no se mejoraba la retención del enzima y se podría dificultar la difusión del sustrato.

Influencia de la radiación gamma

Con el fin de conocer si la radiación gamma, utilizada como iniciador de la reacción de polimerización, podía dañar a la enzima, se utilizaron dos electrodos diferentes. En el primero, se depositó una disolución de enzima sobre la superficie de un gel y todo el conjunto se mantuvo en contacto con la superficie del electrodo, mientras que para preparar el segundo electrodo se preparó un gel con la misma cantidad de enzima, por el método propuesto, utilizando radiación gamma como iniciador de la reacción polimérica obteniéndose un gel del mismo grado de reticulación que el anterior. Las respuestas

obtenidas con ambos electrodos fueron similares, lo que permitió confirmar que la radiación gamma es inocua para la enzima.

Influencia del tiempo de radiación.

Para este estudio se prepararon tres geles irradiados durante 30 min, 5 y 11 horas respectivamente. Se ensayaron los tres tipos de membranas poliméricas con la enzima atrapada, registrando la señal obtenida con un electrodo de platino recubierto con dichos geles en función de la concentración de glucosa. Las respuestas obtenidas fueron idénticas en los tres casos, lo que demuestra que la actividad enzimática no se ve afectada por tiempos de irradiación de hasta 11 horas. El tiempo seleccionado para preparar las membranas poliméricas fue de 1 hora ya que tiempos inferiores daban lugar a geles de poca calidad física y tiempos superiores no ofrecían ninguna ventaja. Cuando el hidrogel contiene estirén sulfonato de sodio en su composición, fue necesario un tiempo de irradiación de dos horas debido al efecto de ralentización de la reacción polimérica que ejerce este reactivo.

Respuesta del electrodo al contenido de glucosa

Cuando se utilizó la membrana polimérica con la enzima atrapada se pudo observar una respuesta significativa a la glucosa (Fig. 3). Los parámetros experimentales obtenidos fueron: Intervalo de linealidad comprendido entre $5,0 \times 10^{-5}$ M y $1,58 \times 10^{-3}$ M, ecuación de la recta: $y = -0,697 + 33745,499 x$, con $r = 0,999$, límite de detección de $1,18 \times 10^{-6}$ M, concentración de glucosa correspondiente a la saturación enzimática $3,85 \times 10^{-3}$ M y $K_{m_{ap}} = 1,08 \times 10^{-3}$ M. La reacción global del biosensor fue rápida. Al ensayar cuatro electrodos preparados con discos de membrana polimérica tomados al azar del mismo gel las repuestas fueron muy similares, lo que demuestra la homogeneidad de dicho gel. Al realizar varias medidas consecutivas sobre la misma membrana se observa un ligero descenso en la respuesta, probablemente debido a la lenta difusión de los productos de la reacción enzimática que dificultan la entrada de la glucosa.

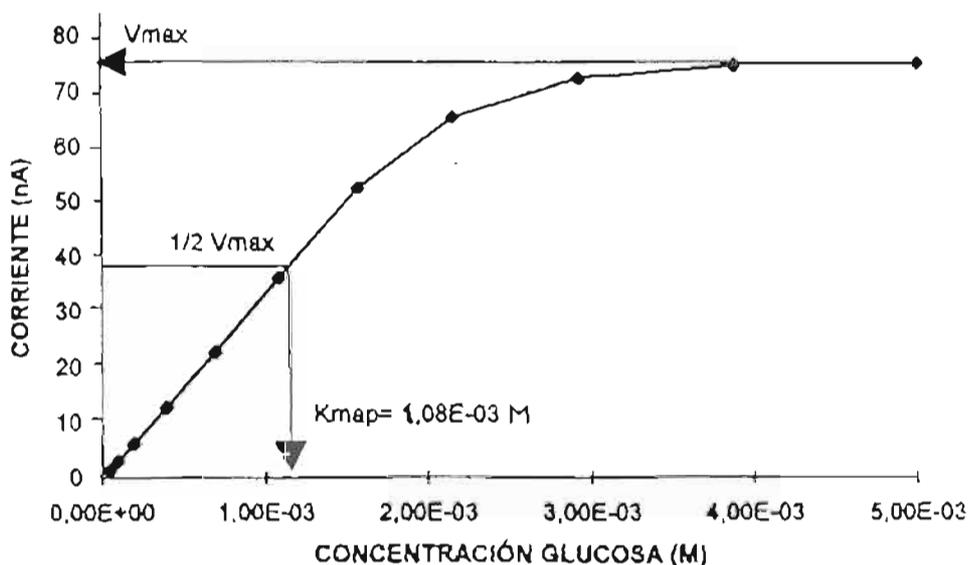


FIGURA 3. Cinética enzimática de la glucosa oxidasa inmovilizada físicamente en la membrana polimérica.

Interferencia causada por el ácido ascórbico

Teniendo en cuenta el objetivo de este biosensor y su posible aplicación como dispositivo para la determinación cuantitativa de glucosa en sistemas biológicos de matrices complejas, es necesario evitar las posibles interferencias causadas por sustancias que sufran oxidación al potencial aplicado (+ 0,7 V) en la determinación de la glucosa. El ácido ascórbico es la principal especie interferente. Si se consideran las constantes de disociación de esta molécula, $pK_1 = 4,17$ y $pK_2 = 11,57$, al pH fisiológico y al que habitualmente se realizan las medidas analíticas, el ácido ascórbico presentará una carga negativa. Una posible forma de eliminar la interferencia causada por la oxidación del ácido ascórbico al potencial de trabajo sería tratar de impedir su acercamiento a la superficie electrodo. Con este propósito se incorpora una carga negativa a la superficie de la membrana polimérica que provoque una repulsión electrostática entre esta especie y la membrana dificultando su acercamiento a la superficie electrodo y como consecuencia su oxidación, eliminán-

dose, así, la interferencia. Una forma de introducir esa carga negativa en la membrana consiste en añadir estireno sulfonato de sodio al medio de reacción (Fig. 2). Es necesario tener presente la cantidad diaria de vitamina C recomendada para la salud de los adultos, 45 mg. En el mejor de los casos, que la absorción de la vitamina C fuera del 100 % en sangre se encontrarían concentraciones de aproximadamente 5×10^{-5} M, es decir, muy inferiores a las concentraciones de ácido ascórbico utilizadas en este estudio.

Con este propósito se estudió el comportamiento de la glucosa y del ácido ascórbico frente a dos membranas de distinta composición: (a) membrana enzimática de poliacrilamida y (b) membrana enzimática de poliacrilamida cargada negativamente con grupos sulfonato.

La Figura 4 muestra la señal del electrodo formado por la enzima atrapada en la membrana polimérica cargada negativamente, frente a disoluciones de glucosa patrón. Para el intervalo de concentraciones de glucosa comprendido entre $2,0 \times 10^{-4}$ M y $9,8 \times 10^{-4}$ M la corrien-

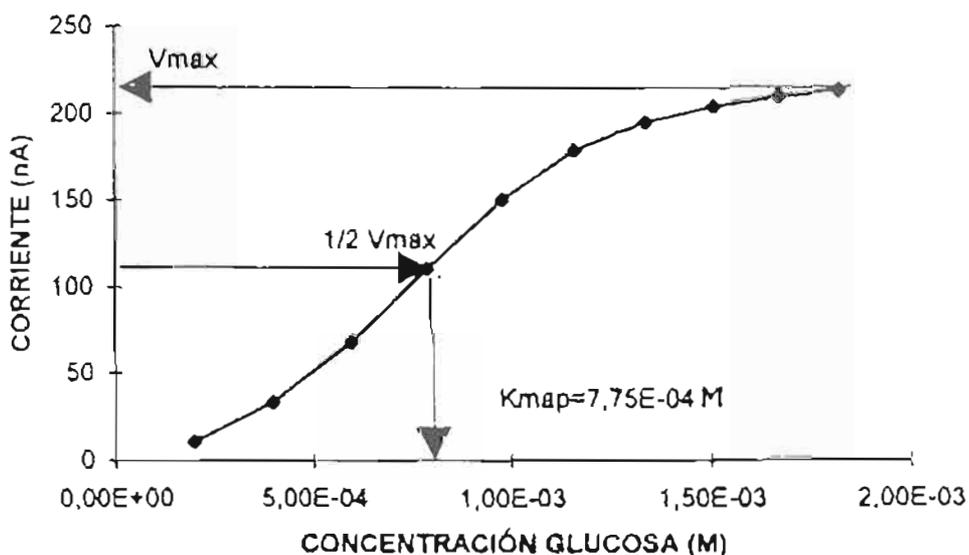


FIGURA 4. Cinética enzimática de la glucosa oxidasa inmovilizada físicamente en la membrana polimérica provista de grupos sulfonato

te aumenta linealmente con la concentración de sustrato. Para concentraciones superiores a $1,85 \times 10^{-3}$ M el valor de la corriente apenas se modifica. El límite de detección fue de $3,56 \times 10^{-6}$ M y el valor de $K_{m,ap}$ $7,75 \times 10^{-4}$ M. La respuesta del electrodo enzimático fue rápida. Al preparar distintos electrodos con membranas obtenidas al azar de un mismo gel, las repuestas obtenidas fueron totalmente aleatorias, lo que significa que la presencia de estiren sulfonato de sodio en el gel afecta enormemente a la reticulación dando como resultado geles muy heterogéneos.

La Figura 5 muestra el comportamiento del ácido ascórbico frente a electrodos de platino, sin membrana y con membranas de distinta composición. Primero se estudió el efecto del gel de poliacrilamida sin y con enzima y en ambos casos los resultados fueron semejantes pero significativamente menores a los obtenidos con el electrodo de platino sin membrana como era de esperar por la barrera difusional que crean las membranas poliméricas. Es importan-

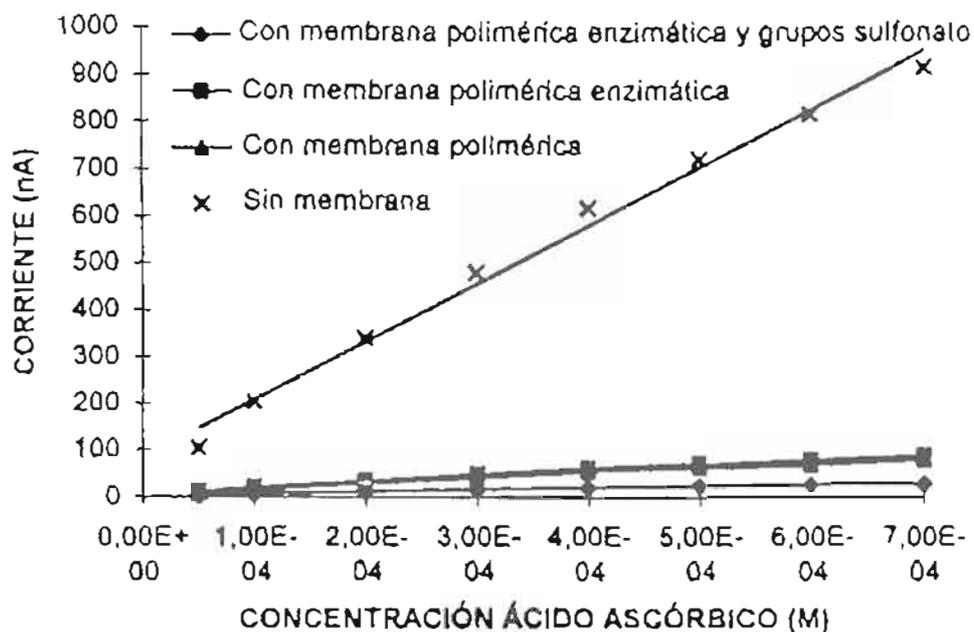


FIGURA 5. Curvas de calibrado del ácido ascórbico frente al electrodo de platino cubierto por distintas membranas.

te indicar que las membranas poliméricas enzimáticas generan señales ligeramente mayores que las generadas por las membranas poliméricas sin enzima. Este resultado se podría explicar como consecuencia del ensanchamiento efectivo que sufre el poro de la matriz polimérica, como si se tratara de un sistema elástico, hinchándose cuando una macromolécula como la enzima se introduce en él. Este mayor tamaño de poro traería como consecuencia una menor dificultad para atravesar la membrana. Al ser la membrana polimérica enzimática con grupos sulfonato la empleada, la señal obtenida fue tres veces menor, lo que prueba la repulsión ejercida por las cargas negativas. Bajo estas condiciones experimentales, la concentración de ácido ascórbico media encontrada en las muestras biológicas, alrededor de 1×10^{-5} M, no produciría un cambio significativo en la respuesta que se pudiera considerar como interferencia en las medidas de glucosa.

Determinación de glucosa en medios de cultivo

En la preparación de un medio de cultivo celular es importante reproducir, en la medida de lo posible, las condiciones medioambientales de las células que van a crecer en él. El crecimiento celular puede caracterizarse en términos cuantitativos, hay varios factores que lo determinan, uno de ellos es la concentración de nutrientes, por su efecto directo sobre la velocidad de crecimiento celular. Por ello, la determinación del contenido en glucosa del medio de crecimiento ha adquirido una gran importancia. El biosensor propuesto en este estudio se ha utilizado para la cuantificación de glucosa en 16 muestras de 100 mL de medio de cultivo comercializado, las concentraciones de glucosa en las muestras estaban comprendidas entre 0 mM y 20 mM. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos. Como método de referencia se utilizó un método espectrofotométrico basado en las medidas de absorción de la quinoneimida generada en la reacción del H_2O_2 producido enzimáticamente con la glucosa en presencia de glucosa oxidasa y oxígeno, con 4-aminoantipirina y *p*-hidroxibenceno sulfonato, en presencia de peroxidasa a 505 nm.

TABLA I. *Concentración de glucosa de los medios de cultivo obtenida experimentalmente.*

NÚMERO DE MUESTRA	MÉTODO PROPUESTO ^a	MÉTODO DE REFERENCIA ^b
1	17 mM	21.08 mM
2	19 mM	20.45 mM
3	15 mM	17.67 mM
4	9.62 mM	11.10 mM
5	2.79 mM	3.81 mM
6	1.04 mM	1.13 mM
7	0.3 mM	0
8	0	0

^a Biosensor con membrana polimérica enzimática que incluye grupos sulfonato

^b Método de referencia utilizado habitualmente en la cuantificación de la glucosa presente en los medios de cultivo celular

Al comparar los resultados obtenidos con el biosensor propuesto con los obtenidos mediante el método de referencia se puede observar que en todas las muestras los resultados obtenidos con el biosensor son aproximadamente un 15 % más bajos, probablemente debido al momento en el que se hizo el análisis, ya que las medidas obtenidas con el biosensor se realizaron tres días después de las medidas obtenidas con el método de referencia. Durante este período de tiempo las muestras se mantuvieron congeladas las primeras 48 horas para evitar el posible consumo de nutrientes por parte de las células, procediendo a su descongelación 24 horas antes del análisis. Este descenso en el contenido de glucosa podría haberse debido al consumo natural de nutrientes por las células.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) MOTTOLA, H. A. (1987). *Analyst* 112: 719-727
- (2) RABA, J. y M. MOTTOLA, H. A. (1995). *Crit. Rev. Anal. Chem.* 25: 1-42
- (3) MOTTOLA, H.A. (1983). *Anal. Chim. Acta* 145: 27-39.
- (4) GUILBAULT, G. G. y LUBRANO, G. J. (1973). *Anal. Chim. Acta* 64: 439-455.
- (5) GONZÁLEZ-SAIZ, J. M. y PIZARRO, C. (2001). *Eur. Polym. J.* 37: 495-444.
- (6) CARAS, S. D.; PETELEENZ, D. y JANATA, J. (1985). *Anal. Chem.* 57: 1920.
- (7) SHUL'GA, A. A.; SANDROVSKY, A. C.; STRIKHA, V. I.; SOLDATKIN, N. F.; STARODUB, N. F. y EL'SKAYA, V. (1992). *Sensors and Actuators B.* 10: 41.
- (8) JIMENEZ, C.; BARTROLI, J.; ROOIJ, N. F. y KOUDELKA-HEP, M. (1995). *Sensors and Actuators B* 26-27: 421-424.
- (9) BU, H-Z.; MIKKELSEN, S. R. y ENGLISH, A. M. (1995). *Anal. Chem.* 67: 4071-4076
- (10) BU, H-Z.; MIKKELSEN, S. R. y ENGLISH, A. M. (1998). *Anal. Chem.* 70: 4320-4325.
- (11) DORETTI, L.; FERRARA, D. y LORA, S. (1993). *Biosensor Bioelectron.* 8: 443
- (12) KAETSU, I.; KUMAKURA, M.; FUJIMURA, T.; YOSHIDA, M.; ASANO, M.; KASAI, N. y TAMADA, M. (1986). *Radiat. Phys. Chem.* 27: 245
- (13) KAETSU, I. (1981). *Radiat. Phys. Chem.* 18: 3443
- (14) CARENZA, M., LORA, S., PALME, G., BOCCU, E., LARGAIOLLI, R. AND VERONESE, F.M. (1988). *Radiat. Phys. Chem.* 31: 657
- (15) GURSEL, I. y HARISCI, V.N. (1992). *Biomaterials* 13: 150
- (16) GALIATSATOS, C., IKARILAMA, Y., MARK, J.E. y HEINEMAN, W.R. (1990). *Biosensors Bioelectron.* 5: 47
- (17) HAJZADEH, K., HALSAIL, H.B. y HEINEMAN, W.R. (1991). *Anal. Chim. Acta* 243: 23
- (18) DORETTI, L.; GATTOLIN, P. y LORA, S. (1994). *Anal. Lett.* 27: 2455-2470
- (19) BIRCH, M. E.; COURY, L. A. y HEINEMAN, W. R. (1990). *Anal. Chem.* 62: 1123-1130