

Desarrollo de un electrodo como plataforma para la construcción de un sensor para diagnóstico molecular



López-Rizo LS¹, Balbin-Tamayo AI², Blanco-de-Armas M.¹, Esteva-Guas A.M.².

¹ Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA); ² Facultad de Química, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

Email: cicdc@infomed.sld.cu

RESUMEN

La tendencia actual en el diagnóstico molecular consiste en emplear tecnologías más sensibles de detección de antígenos y ácidos nucleicos, de ahí el incipiente desarrollo de sensores como alternativa de análisis. Su alta especificidad y afinidad de la reacción bioquímica (formación de un complejo antígeno-anticuerpo o la hibridación de ADN) brinda como resultado dispositivos muy específicos y sensibles. El objetivo del trabajo es el desarrollo de un electrodo de bajo costo, que pueda ser utilizado como plataforma de un sensor en el diseño de un método diagnóstico simple y rápido. Se elaboraron compósitos de epoxi-grafito en diferentes proporciones, modificados con los ácidos benzoico y esteárico al 1 %, 5 % y 10 %. Las caracterizaciones superficiales se realizaron empleando la microscopía electrónica de barrido con emisión de campo y espectroscopía Raman, donde se aprecian superficies relativamente rugosas, característica deseada que se debe traducir finalmente en menores límites de detección, así como la presencia de grupos funcionales útiles para la posterior modificación con un elemento de reconocimiento molecular (antígeno, enzimas, ADN, etc). Se monitoreó la respuesta electroquímica de los electrodos mediante mediciones ciclovoltamétricas del sistema redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, donde se analizó la diferencia de potenciales y la influencia de la velocidad de barrido sobre esta y sobre la intensidad de la corriente medida. En todos los casos los electrodos modificados mostraron comportamientos correspondientes a sistemas cuasi-reversibles controlados por difusión, similar al reportado en la literatura para este sistema empleando electrodos de carbón vítreo y otros. Se demostró que la modificación con ácido benzoico al 1 % constituye la mejor selección para introducir los grupos funcionales carboxílicos superficiales y que su presencia no varió significativamente la señal electroquímica. La plataforma obtenida

sirve como base para el futuro desarrollo de diagnosticadores selectivos, sensibles y económicos de enfermedades hematológicas e inmunológicas.

Palabras clave: electrodo, epoxi-grafito, ácido benzoico, ácido esteárico, caracterización, plataforma.

INTRODUCCIÓN

La tendencia actual para el diagnóstico consiste en el empleo novedosas tecnologías capaces de detectar antígenos y ácidos nucleicos con una mayor sensibilidad. A partir de esta necesidad hace algunos años ha surgido una rama de investigación encaminada al desarrollo de dispositivos de manejo sencillo y menor costo, que cumplan con estas expectativas, denominados biosensores. Éstos se han convertido en una poderosa herramienta para analizar una amplia variedad de compuestos en diversas áreas tanto de la industria y el medio ambiente como de la medicina. En este último campo se encuentran por ejemplo un sensor inmunológico que detecta la proteína NS1, excelente biomarcador del virus dengue.¹⁻⁴

Los biosensores están compuestos por un elemento de reconocimiento biológico, que le aporta especificidad, y un transductor (sensor) capaz de detectar el evento de reconocimiento y transformarlo en una señal medible (generalmente eléctrica). Este último componente es el que le otorga la sensibilidad al biosensor y puede estar compuesto por diversos materiales conductores, como el oro y la plata, o una mezcla de ellos, así como algunos materiales en casi todas sus variedades alotrópicas. Uno de los más empleados es el carbono, como grafito, carbón vítreo, mezclas con plata o polímeros, siempre buscando la mejora de sus propiedades para aumentar la sensibilidad del sensor.

OBJETIVO

General: Desarrollar electrodos compósitos de epoxi-grafito modificados con los ácidos esteárico y benzoico como plataforma para la construcción de un sensor para diagnóstico molecular.

Específicos:

- Construir electrodos compósitos de epoxi-grafito variando las proporciones entre el grafito y la resina epóxica.
- Modificar las superficies de los electrodos de mejor respuesta a partir de la modificación de los compósitos con los ácidos esteárico y benzoico.
- Caracterizar todos los electrodos construidos electroquímica y superficialmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los compósitos de epoxi-grafito (EG) se prepararon mediante la mezcla de grafito en polvo (50µm) con el endurecedor y la resina Araldita, que conforman la resina epóxica, en las proporciones de grafito/endurecedor/Aralita (m/v/v) 1.3/2.5/1 (EGI), 3.3/2.5/1 (EGII), y 5/2.5/1 (EGIII).

Para modificar la superficie del electrodo con los ácidos esteárico y benzoico se utilizó el procedimiento descrito arriba, añadiéndole simultáneamente proporciones de un ácido u otro según fuere el caso, que representaran el 1 %, 5 % y 10 % de la mezcla. En este proceder la homogenización de la mezcla es muy importante.

La mezcla se introdujo en un capilar de vidrio (d=1mm) y se insertó un alambre de cobre por la parte superior del capilar (contacto eléctrico), asegurándose que la mezcla conductora se encontrara compacta en la parte inferior del capilar.

Procedimientos electroanalíticos:

Voltametría Cíclica: Se utilizó un barrido de potencial de 1000mV a -1000mV, un incremento de 10, las velocidades de barrido se variaron según el análisis a realizar. Para evaluar el comportamiento electroquímico de los electrodos construidos se realizaron mediciones al sistema redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Se empleó un sistema de tres electrodos: Ag/AgCl (referencia), Pt (auxiliar) y los electrodos construidos como electrodos de trabajo.

El análisis superficial de los electrodos se realizó inicialmente mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido con Emisión de Campo (FESEM). Se empleó además la Espectroscopía Raman para determinar la presencia de grupos funcionales en la superficie de los electrodos con base epoxi-grafito, por ser una técnica de caracterización importante para compuestos basados en carbono

RESULTADOS

Electrodos de epoxi-grafito sin modificar (EGI, EGII y EGIII):

En el presente trabajo se utilizan los electrodos EGII y EGIII contruidos con las proporciones de grafito 3.3 y 5 por su buena consistencia. El electrodo EG) contruido con menor proporción de grafito se descarta debido a la no polimerización de la mezcla (muy líquida).

En todas las micrografías que se realizaron se observan zonas claras y oscuras, las cuales se asocian con las partículas de grafito (conductor) en la mezcla y la resina epóxica (aislante) respectivamente, donde las regiones de material conductor están agrupadas aleatoriamente. Además, se puede observar que la superficie de los electrodos es relativamente rugosa.

Este tipo de electrodo compósito, formado por partículas de grafito distribuidas aleatoriamente en la resina epóxica, se asemeja a un macroelectrodo compuesto por una matriz de microelectrodos. Como resultado, la suma de las corrientes individuales de cada microelectrodo genera una corriente neta elevada, como la de un macroelectrodo conductor puro pero con una mayor relación señal/ruido característica de los microelectrodos. Este comportamiento generalmente se traduce en menores límites de detección, lo cual es una ventaja de la utilización de electrodos de epoxi-grafito en el desarrollo de diferentes biosensores.

En los espectros obtenidos de la superficie de los electrodos EGII y EGIII, mediante Espectrometría Raman, se observan picos correspondientes a las vibraciones de los enlaces C-N y P-H, a 2324 cm^{-1} y 2449 cm^{-1} respectivamente, característicos de la resina epóxica; así como los relacionados con las bandas G y D de grafito (1563 cm^{-1} y 1355 cm^{-1} respectivamente. La banda G corresponde a las vibraciones de doblaje del grafito y la banda D a las vibraciones de valencia. Este resultado corroboró lo observado en el análisis anterior, donde se evidencia la presencia de grafito y resina epóxica en la superficie del electrodo.

Las características de los ciclovoltamperogramas registrados de la disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (2mmol L^{-1}) (en PBS pH6.9, $\text{KCl } 0.1\text{ mol L}^{-1}$, a 100 mVs^{-1}) con los electrodos modificados, así como el análisis de la influencia de la velocidad de barrido sobre los valores de diferencia de potencial (E) indican que el sistema tiene un comportamiento reversible frente a los electrodos en cuestión.

La relación entre las corrientes de pico anódica y catódica para los electrodos sin modificar y modificados tomó valores cercanos a la unidad, lo que indicó que no existen complicaciones cinéticas por reacciones químicas acopladas.

Se analizó la relación entre la variación de la velocidad de barrido sobre la intensidad de la corriente, con los valores obtenidos mediante Voltametría Cíclica, para corroborar que los procesos que ocurren en la superficie electródica están controlados por difusión o no según la ecuación $I_p = k \nu^{1/2}$. Al elevar la velocidad de barrido se incrementa la intensidad de la corriente anódica, producto de un aumento del flujo desde la solución hasta la superficie electródica. Los resultados muestran la relación lineal de estos dos parámetros, lo que indica que el transporte de masa está limitado por difusión en ambos casos, según la ecuación de Randles-Sevcik.

Los electrodos construidos con una mayor proporción de grafito en polvo (EGIII) mostraron una mejor sensibilidad frente al sistema redox en estudio. Por otro lado, las reacciones electroquímicas que ocurren en la superficie de ambos electrodos corresponden con procesos cuasi-reversibles controlados por difusión.

Electrodos de epoxi-grafito modificados con ácido esteárico (EGXe) y benzoico (EGXb.):

Las microscopías realizadas mostraron características superficiales semejantes a las de los electrodos sin modificar.

El espectro Raman de los electrodos modificados con ácido esteárico y benzoico al 1% mostraron, además, señales de las vibraciones correspondientes a enlaces C-O alrededor de los 1600 cm^{-1} , que aparece como un hombro del pico en 1563 cm^{-1} del grafito; y en el caso de los modificados con ácido benzoico se observan también un grupo de señales de baja intensidad alrededor de los $500\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$, típicas de compuestos aromáticos.

Los resultados obtenidos confirman la presencia de grupos carboxílicos en la superficie de los electrodos modificados con ácido esteárico y benzoico al 1%, por lo que se infiere que los electrodos construidos con mayor proporción de ambos ácidos están igualmente modificados.

Las reacciones electroquímicas que ocurren en la superficie de ambos tipos de electrodos corresponden con procesos cuasi-reversibles controlados por difusión.

Sin embargo, a medida que aumentaba la cantidad de ácido esteárico con que se modifica la mezcla, los electrodos mostraban un comportamiento correspondiente a sistemas cada vez menos

reversibles en las condiciones de trabajo, indicando que la baja conductividad del ácido esteárico influye negativamente en la respuesta electroquímica del compuesto modificado. Además, según las constantes de Randles-Sevcik, la sensibilidad disminuye bastante al incrementar el porcentaje de modificador. Por esta razón y como el ácido esteárico es un mal conductor de electrones, se pensó en el empleo de un modificador que tuviese deslocalización electrónica y una estructura similar a la del grafito para mejorar el compuesto, razón por la cual los electrodos se modificaron posteriormente con ácido benzoico.

Los primeros electrodos construidos se modificaron al 1 % con ácido benzoico, debido a que el estudio realizado anteriormente sobre la influencia del porcentaje de ácido esteárico, arrojó mejores resultados al utilizar esa proporción.

Igual que el caso anterior, al aumentar el porcentaje del modificador, las características electroquímicas de los electrodos fueron menos favorables. La diferencia en la respuesta electroquímica obtenida usando electrodos modificados con respecto a los sin modificar, es indicativa de la presencia de grupos carboxílicos en la superficie del electrodo. El sistema electroquímico evaluado con ellos mantuvo características de procesos cuasi-reversibles controlados por difusión. Según los valores de las constantes de Randles-Sevcik, la modificación realizada disminuye la sensibilidad de los electrodos EGIIab y EGIIIab respecto a los electrodos sin modificar. Por otro lado, los electrodos construidos empleando una mayor proporción de grafito en polvo siguen mostrando una mejor sensibilidad frente al sistema redox en estudio. Estos resultados se resumen en la tabla.

Tabla I. Comportamiento de los electrodos de epoxi-grafito sin modificar y modificados con ácido esteárico y benzoico construidos

Electrodo	k	ipa/ ipc	Control de transferencia de carga	Complicaciones cinéticas por reacciones químicas acopladas	ΔE (mV)	Comportamiento
EGI	-	-	-	-	-	-
EGII	0,45 ± 0.04	1,19	Difusión	No	179	Cuasi-reversible
EGIII	1,84 ± 0.02	0,96	Difusión	No	163	Cuasi-reversible
EGIIIe1 %	2,13 ± 0.03	0,93	Difusión	No	183	Cuasi-reversible
EGIIIe5 %	0,037±0.001	1,05	Difusión	No	294	Cuasi-reversible
EGIIIe10 %	-	1,01	Difusión	No	362	Cuasi-reversible
EGIIe1 %	0,56 ± 0.01	1,04	Difusión	No	112	Cuasi-reversible
EGIIIb1 %	0,69 ± 0.02	1,05	Difusión	No	410	Cuasi-reversible
EGIIb1 %	0,27 ± 0.01	1,19	Difusión	No	1000	Cuasi-reversible

CONCLUSIONES

Los electrodos construidos con mayores proporciones de grafito mostraron respuestas electroquímicas correspondientes a procesos cuasi-reversibles controlados por difusión para el sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, sin complicaciones cinéticas asociadas a reacciones químicas acopladas.

A partir de las caracterizaciones superficiales y electroquímicas realizadas a los electrodos compósitos de epoxi-grafito modificados con ácidos esteárico y benzoico, se demostró que hubo mayor modificación superficial utilizando el ácido benzoico al 1 %.

La disposición de grupos carboxílicos en la superficie del electrodo permite la inmovilización de elementos de reconocimiento molecular como antígenos (inmunosensor) o sondas de ADN (genosensor). Con su empleo se pudieran detectar diversos tipos de inmunoglobulinas o antígenos específicos a esas inmunoglobulinas, para identificar marcadores fenotípicos, para el inmunodiagnóstico, diagnóstico de tumores, determinar la efectividad de la terapia, entre otros.

RECOMENDACIONES

Realizar la determinación de bases libres nitrogenadas o antígenos, o anticuerpos de interés en disolución, para algún tipo de diagnóstico molecular, con los electrodos modificados con ácido benzoico.

Inmovilizar moléculas de interés al electrodo de epoxi-grafito modificado con ácido benzoico al 1 % para la posterior determinación de enfermedades hematológicas y/o inmunológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bazin I, Tria SA, Hayat A, Marty JL. New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins, Biosensors and Bioelectronic. 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.083>
2. Arugula MA, Simonian AL, Biosensors for Detection of Genetically Modified Organisms in Food and Feed, Elsevier. 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802259-7.00010-5>
3. Wu H, Zuo Y, Cui C, Yang W, Ma H, Wang X. Rapid Quantitative Detection of Brucella melitensis by a Label-Free Impedance Immunosensor Based on a Gold Nanoparticle-Modified Screen-Printed Carbon Electrode, SENSORS, 2013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/s130708551>.
4. Figueiredo A, Vieira NCS, dos Santos JF, Janegitz BC, Aoki SM, Paulo P Jr, et al. Electrical Detection of Dengue Biomarker Using Egg Yolk Immunoglobulin as the Biological Recognition Element, SENSORS AND BIOSENSORS. 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep07865>