

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE AFINIDAD PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOTINA SEGÚN UN FORMATO COMPETITIVO

Schmuck, Josefina

*Laboratorio de Sensores y Biosensores
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL
Directora: Fabiano, Silvia
Codirectora: Hernández, Silvia*

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

La biotina es una vitamina hidrosoluble que el ser humano incorpora a su metabolismo por medio de los alimentos, debido a que no somos capaces de sintetizarla. Pueden sufrir su deficiencia la población infantil y las mujeres embarazadas. Así, deben incorporar alimentos enriquecidos en ella. Los suplementos dietarios (<200 mg/100g) y leches sustitutas de la leche materna (<10mg/100g) la contienen en baja concentración según el Código Alimentario Argentino (2007), por lo que se requieren métodos de ensayos selectivos y sensibles.

La estrategia propuesta para la determinación de biotina se basa en una reacción de afinidad donde la biotina presente en la matriz de la muestra competirá con la biotina marcada con la enzima peroxidasa por los sitios de unión de la estreptavidina (Diamandis y col., 1991) inmovilizada sobre la superficie de electrodos de distintas características.

Los electrodos de trabajo se construyeron en el laboratorio y como superficie sensora se utilizó un compósito de grafito y barniz serigráfico comercial (GBC). Se procedió a su caracterización electroquímica (Van Benschoten y col., 1983) mediante voltametría cíclica. Por otro lado, también se trabajó con los electrodos Screen Printed Electrode (SPE) comerciales (Taleat y col., 2014) que ya tienen la estreptavidina inmovilizada. El uso de SPE resuelve algunos de los problemas que presentan los electrodos convencionales como la necesidad de la regeneración de la superficie después de cada medición. Por otro lado estos electrodos de uso único representan herramientas efectivas en la detección de analitos debido a la alta sensibilidad que ofrecen los transductores electroquímicos y son menos contaminantes al disminuir el volumen de reactivos utilizados.

La inmovilización de estreptavidina sobre los electrodos GBC se llevó a cabo mediante: 1) adsorción (Hernández-Santos y col., 2004); y 2) unión covalente (Parkash y col., 2014).

El sistema de detección utilizado para poner en evidencia la reacción de afinidad consiste en la recolección de la señal analítica por voltametría de onda cuadrada (VOC) producida por la formación de los productos de hidrólisis de la peroxidasa, al agregar los sustratos correspondientes (Kergaravat y col., 2012).

Título del proyecto: Desarrollo de un sensor microflúidico basado en partículas magnéticas con detección electroquímica/óptica, para aplicaciones analíticas de relevancia en Salud Humana y Animal (Zoonosis) Instrumento: CAI+D 2016 Tipo I. Código 50120150100130LI Año convocatoria: 2016 Organismo financiador: UNL Director/a: Dra. Silvia Hernández
--

OBJETIVOS

- ✓ Desarrollar y optimizar un sistema de detección para la determinación de biotina mediante un método electroanalítico basado en una reacción de afinidad.
- ✓ Evaluar la respuesta electroquímica obtenida de la reacción de afinidad sobre diferentes tipos de electrodos utilizados como elemento de transducción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de Electrodos grafito-barniz compósito y caracterización electroquímica

Se utilizó un tubo de cobre, el cual se introduce dentro de un cuerpo cilíndrico de acrílico con conexiones eléctricas interna de cobre y externa una ficha de 4 pin. En uno de los extremos se dejan libre 3 mm de profundidad para la posterior introducción de la pasta de compósito, preparada con una mezcla de 50% de grafito en polvo (provisto por Merck 1042062500) de tamaño de partícula de 50 μm y 50% de barniz comercial adquirido localmente. Los sensores fueron curados a 50 °C en estufa durante 4 días. Una vez curados, los electrodos se pulen y posteriormente se conservan en lugar seco, limpio y a temperatura ambiente.

Mediante la *voltamperometría cíclica* (VC) se realizó la caracterización de los electrodos utilizando el ferricianuro de potasio partiendo de soluciones stock de 100 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y de 100 mM de KCl para llevar a cabo dicha caracterización.

Inmovilización de la estreptavidina sobre los transductores electroquímicos

Se realizó la inmovilización a través de dos estrategias diferentes sobre los electrodos GBC:

Por adsorción física: Se depositaron 50 μL de la estreptavidina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre cada uno de los electrodos de trabajo (GBC) y se dejó 24hs a 4°C en cámara húmeda. Luego se lavaron con solución buffer TRIS 0.1 M, pH=7.2, luego se realizó el bloqueo con 50 μL de una solución de BSA (Albúmina de suero bobino) al 0.2% preparada en buffer PBS 1X (componentes NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM y KH_2PO_4 1.5 mM; pH=7.4) y luego se realizó un segundo lavado con solución de BSA al 1% en buffer TRIS 0.1M, pH=7.2.

Por enlace covalente: Se depositó sobre cada electrodo una solución de volúmenes iguales de 1-etil-3-(3-metilaminopropil) carbodiimida (EDC, 0.4 M) y Nhidroxisuccinimida (NHS, 0.1 M) preparado en buffer PBS 0.1 M, pH=7.2, y se dejaron en agitación suave a temperatura ambiente. Luego se incorporó 50 μL de la solución de estreptavidina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente se procedió al bloqueo y lavado como en el punto anterior. Para los electrodos SPE comerciales (Radio=2 mm y Área=12.5 mm^2), que ya tienen la estreptavidina inmovilizada, se realiza sólo el bloqueo con solución de BSA al 0.2%.

Determinación electroquímica

Se obtuvieron las señales analíticas con un Analizador voltamétrico BAS modelo Epsilon con un sistema de tres electrodos: de trabajo de grafito (GBC o SPE), de referencia Ag/AgCl 3 M KCl y auxiliar de Pt. Se utilizó la técnica electroquímica de voltametría de onda cuadrada (VOC) con los parámetros: rango: 0 a -400 mV, StepE: 4 mV, S.W. Amplitude: 25 mV, S.W. Frequency: 15 Hz, Quiet Time: 120s. Los reactivos utilizados para la determinación electroquímica fueron buffer de trabajo fosfato salino 0.1 M con KCl 0.1 M y pH=6, y soluciones

de H_2O_2 1.25 mM y o-fenilendiamina 2.50 mM (preparada en etanol-agua MilliQ[®] 50:50).

Determinación de biotina libre (BIO) sobre electrodos GBC y SPE

Las soluciones de biotina fueron solubilizadas en NaOH 2 M y, diluyendo en agua MilliQ[®], se prepararon diferentes concentraciones de biotina (en el rango desde $8 \cdot 10^{-7}$ M a $8 \cdot 10^{-6}$ M) para construir las curvas de dosis-respuesta de las reacciones de competición. Cada punto de la curva se realizó con distintos electrodos, para lo cual en la etapa de biorreconocimiento, sobre la superficie electródica modificada, se depositaron 50 μL de solución de biotina, incubando luego por 15 minutos en agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se efectuó un lavado con buffer citrato y se depositó la solución de biotina-HRP $2.5 \cdot 10^{-8}$ M (1.25 pmoles), incubando durante 15 minutos y en agitación suave a temperatura ambiente para finalizar la etapa de competición. Con los transductores SPE se procedió de la misma manera y el rango de concentraciones de biotina ensayadas fue desde $1.7 \cdot 10^{-6}$ M a $1.3 \cdot 10^{-5}$ M, depositándose 3 μL de cada solución. Posteriormente, se procedió igual que en el punto anterior siendo la concentración de biotina-HRP depositada de $1.67 \cdot 10^{-7}$ M (0.5 pmoles) e incubando 30 minutos.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Caracterización electroquímica de los electrodos de grafito

Desde el punto de vista práctico, un experimento electroquímico está fuertemente influenciado por la composición del electrodo de trabajo y por el procedimiento para su fabricación. La operatividad y funcionalidad de este tipo de transductores se pueden caracterizar electroquímicamente mediante voltametría cíclica utilizando, en este caso, ferricianuro potásico, analito cuyas propiedades redox son perfectamente conocidas sobre electrodos convencionales, lo que permite su utilización como sistema de referencia. Se realizó la evaluación de diferentes series de electrodos construidas en diferentes momentos en el laboratorio y luego se procedió a analizar los datos y clasificar los electrodos de acuerdo a los valores de delta E, es decir la diferencia ($E_{\text{Ox}} - E_{\text{Red}}$) con el fin de utilizarlos en las experiencias subsiguientes. Para mejorar la sensibilidad y repetitividad de los resultados, antes de cada experimento voltamétrico se pulen los electrodos y se realiza el pretratamiento de los mismos mediante la técnica de cronopotenciometría aplicando una corriente anódica de 3 μA durante 2 minutos, en electrolito soporte de ácido sulfúrico 0.1 M. Esto favorece la exposición de grupos OH en la superficie del grafito aumentando la reactividad de la superficie del electrodo.

Inmovilización de la estreptavidina sobre electrodos GBC

Se procedió a la evaluación de las dos estrategias elegidas para inmovilizar estreptavidina sobre la superficie de los electrodos GBC. Se evaluó la señal analítica obtenida por ambos, como la intensidad de corriente luego de agregar una solución de B-HRP de concentración conocida y los sustratos correspondientes para desencadenar una respuesta electroquímica. Se puede concluir que entre los métodos de inmovilización no hubo diferencias significativas en sus respuestas. Sin embargo se decidió, para la continuación de los experimentos, utilizar la estrategia de inmovilización por enlace covalente cuyo tiempo total de ejecución es significativamente menor que la estrategia por adsorción física.

Determinación de biotina libre (BIO) sobre los electrodos GBC y SPE

A partir de la gráfica mostrada en la Figura 1 que representa la respuesta (Intensidad de corriente de reducción) vs. el incremento de la concentración de biotina en solución se visualiza una relación inversamente proporcional entre ellos. Este comportamiento es el que se espera como resultado de la competición por los sitios de unión de la estreptavidina entre la BIO libre en solución y la B-HRP. Debido a esto la respuesta es menor a mayor concentración de BIO agregada. En este trabajo se pudo realizar la determinación de BIO por competición utilizando dos tipos de transductores diferentes, GBC y SPE, uno reutilizable y otro de un solo uso respectivamente. Toda la parte experimental que se pudo llevar a cabo en este desarrollo servirá de punto de partida para seguir trabajando con sistemas de determinación en flujo.

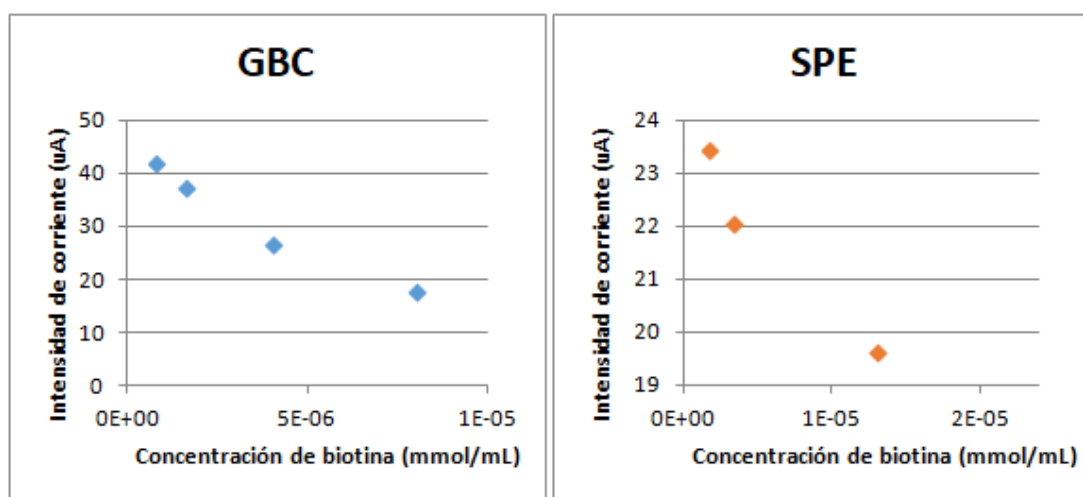


Figura 1: Curvas de calibrado obtenidas para biotina libre sobre los distintos transductores electroquímicos utilizados.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Código Alimentario Argentino** basado en la Comisión del Codex Alimentarius, 2007a. Standards for Infant Formulas and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants (Codex Stan 72-1981) (Revised 2007).
- Diamandis, E. P., Christopoulos, T. K.**, 1991. The Biotin-(Strept)Avidin system: Principles and applications in Biotechnology. *Clin. Chem.*, 37(5), 625-636.
- Hernández-Santos, D., Díaz-González, M., González -García, M. B., Costa-García, A.**, 2004. Enzymatic genosensor on streptavidin-modified Screen-Printed Carbon Electrodes. *Anal. Chem.*, 76, 6887-6893.
- Kergaravat, S. V., Gómez, G. A., Fabiano, S. N., Laube, T. I., Chávez, E., Pividori, M. I., Hernández; S. R.**, 2012. Biotin determination in food supplements by an electrochemical magneto biosensor. *Talanta*, 97, 484-490.
- Parkash, O., Yean, C. Y., Shueb, R. H.**, 2014. Screen Printed Carbon Electrode based electrochemical immunosensor for the detection of dengue NS1 antigen. *Diagnostics*, 4, 165-180.
- Taleat, Z., Khoshroo, A, Mazloum-Ardakani, M.**, 2014. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008-2013). *Microchimica Acta*, 181, 865-891.
- Van Benschoten, J. J., Lewis, J. Y., Heineman, W. H., Roston, D. A., Kissinger, P. T.**, 1983. Cyclic voltammetry experiment. *J. Chem. Educ.*, 60(9), 772-776.