

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ULTRAMICROELECTRODO (UME) MODIFICADO A BASE DE PEDOT Y ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DEL USO DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) PARA LA DETECCIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO

Corona Elizarrarás, Cristina (1); Gutiérrez Granados, Silvia (2); Olmos Moya, Patricia María (3)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [cristina_c_e@hotmail.com]

2 [Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [gutigs59@hotmail.com]

3 [Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [pamolmo@hotmail.com]

Resumen

Se fabricó un ultramicroelectrodo sensitivo y selectivo para la detección de anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) usando ultramicroelectrodos de platino (Pt) modificados con el polímero conductor poli(3,4-eteilendioxiotiofeno) (PEDOT). Este ultramicroelectrodo modificado presenta características de permosselectividad para H_2O_2 a la vez que actúa como barrera al paso de posibles interferentes redox como por ejemplo ácido úrico, ácido ascórbico, xantina y superóxido de potasio. Se inmovilizó la enzima y se detectó la concentración del anión superóxido dismutasa en muestras sintéticas.

Abstract

A sensory and selective ultramicroelectrode was prepared for the detection of radical superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) using ultramicroelectrodes of platinum (Pt) modified with poly (3,4-ethylenedioxothiophene) conducting polymer (PEDOT). This ultramicroelectrode presents characteristics of permosselectivity for H_2O_2 while acting as a barrier to the passage of possible redox interferers such as uric acid, ascorbic acid, xanthine and potassium superoxide. The enzyme was immobilized and the superoxide dismutase anion concentration was detected in synthetic samples.

Palabras Clave

Biosensor; Ultramicroelectrodo modificado; Radical anión superóxido; Enzima superóxido dismutasa; Anión superóxido

INTRODUCCIÓN

Entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel biológico se encuentra el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es generado como intermediario reducido de oxígeno molecular [1,2]. La principal fuente de superóxido en las células proviene a partir de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y el retículo endoplásmico [3]. Bajo condiciones metabólicas normales los ROS son producidos a una velocidad, la cual no excede la capacidad del tejido para dismutar dichas especies [4,5]. De lo contrario, cuando la producción de $O_2^{\cdot-}$ excede la capacidad natural del organismo para su dismutación, este potencial oxidante desencadena procesos de citotoxicidad dando lugar a ciertas enfermedades, incluyendo el cáncer y enfermedades crónico degenerativas [6-9]. Bajo condiciones fisiológicas normales la concentración de $O_2^{\cdot-}$ se ha registrado en valores entre 10 y 100 nM [10]. Este bajo nivel de concentración se atribuye a la alta capacidad de la SOD para su dismutación y a la alta reactividad con otras moléculas pequeñas [11].

Las técnicas analíticas convencionales no son adecuadas para la detección del $O_2^{\cdot-}$ de manera precisa y en tiempo real, mientras que los sensores electroquímicos pueden detectar la producción local e in-situ de $O_2^{\cdot-}$ [12]. Con este propósito se ha propuesto la modificación de ultramicroelectrodos (UME) (9 micras de diámetro), ya que presentan mayor selectividad, sensibilidad, y límites bajos de detección, además de dar la posibilidad de realizar estudios in-vivo e in-situ en medios biológicos [13].

De manera general, los biosensores aplicados para la detección de superóxido son construidos empleando biomoléculas como la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual actúa de manera eficaz gracias a la alta selectividad, especificidad y sensibilidad para la detección del superóxido, convirtiéndolo en O_2 y H_2O_2 vía un mecanismo redox de transferencia electrónica. La construcción de estos biosensores requiere de cuidadosos pasos que aseguren la buena transferencia electrónica entre el electrodo, la enzima y el analito.

Polímeros electroconductores como poli-3,4-etilendioxiotiopheno (PEDOT), recientemente han sido estudiados por sus efectos sinérgicos para el desarrollo de nuevos biosensores. Las ventajas particulares del uso de PEDOT, además de su alta conductividad eléctrica, puede emplearse en un rango amplio de pH, es altamente estable, es considerado para su aplicación en la inmovilización de enzimas debido a buena compatibilidad y puede ser preparado fácilmente por electropolimerización en solución acuosa (ref).

Justificación

Las especies reactivas de oxígeno, los cuales incluyen radicales hidroxil, radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, se encuentran involucrados en reacciones químicas presentes en varios procesos patológicos, en donde se ha observado que estos radicales son detonadores de procesos oxidativos y juegan un importante papel en el desarrollo de ciertas enfermedades como el cáncer y otras del tipo neurodegenerativo. Diferentes tecnologías han sido utilizadas para la determinación del anión radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, tales como resonancia espín electrón, entre otras. La utilización de ultramicroelectrodos modificados a base de PEDOT y la enzima superóxido dismutasa pueden ser muy eficaces, gracias a la alta selectividad, especificidad y sensibilidad para la detección del superóxido.

En este trabajo se preparó y caracterizó un ultramicroelectrodo (UME) modificado a base de poly-3,4-ethylendioxythiophene (PEDOT) y superóxido dismutasa (SOD) para la detección de anión superóxido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema electroquímico

El electrodo de trabajo utilizado fue un ultramicroelectrodo de platino (9 micras de diámetro), el electrodo de referencia usado fue Ag/AgCl y como electrodo auxiliar se usó alambre de platino. El electrolito soporte utilizado fue un buffer de fosfatos (PBS) en concentración 0.01 M. Una celda con volumen de 15 mL.

Se pulieron los electrodos en papel lija de 1500 con una gota de agua, después enjuagados con agua mili-Q. Posteriormente se pulieron con polvo de alúmina de $0.05 \mu\text{m}$, luego sonicados por 3 minutos en agua mili-Q. La superficie se secó con paños para superficies delicadas.

La caracterización electroquímica del ultramicroelectrodo se realizó empleando la técnica de voltamperometría cíclica y como solución redox se utilizó ferrocianuro de potasio con una concentración de 5mM.

Modificación de la superficie del UME

Se utilizó 4-vinilbencenosulfonato de sodio 5mM como electrolito soporte y una solución de EDOT de concentración 0.5mM. Se montó la celda con los 3 electrodos, el electrodo de referencia se colocó en un compartimento separada con solución de NaSS para proteger su superficie de que también fuera polimerizada. Se utilizó la técnica de voltametría cíclica en una ventana de potencial que parte de -600 mV a 1200 mV y regresa a -600 mV; la velocidad de barrido fue de 40 mV/s y el número de ciclos: 5.

Evaluación de especies que son interferentes con el UME modificado

Previo a esta evaluación se descartaron como interferentes: glucosa, glicina, cisteína, arginina y glutatión reducido. Se prepararon soluciones 0.05 mM de cada uno de los reactivos usados en buffer de fosfatos (PBS) 0.01 M; excepto con superóxido de potasio, que se preparó en solución de hidróxido de sodio de pH 12.5, posteriormente aforado con buffer de fosfatos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la electropolimerización del EDOT sobre el UME de Pt por el método de voltamperometría cíclica, donde se han aplicado 5 ciclos de potencial. Se observa que la corriente aumenta, lo que indica la formación de la película sobre el UME.

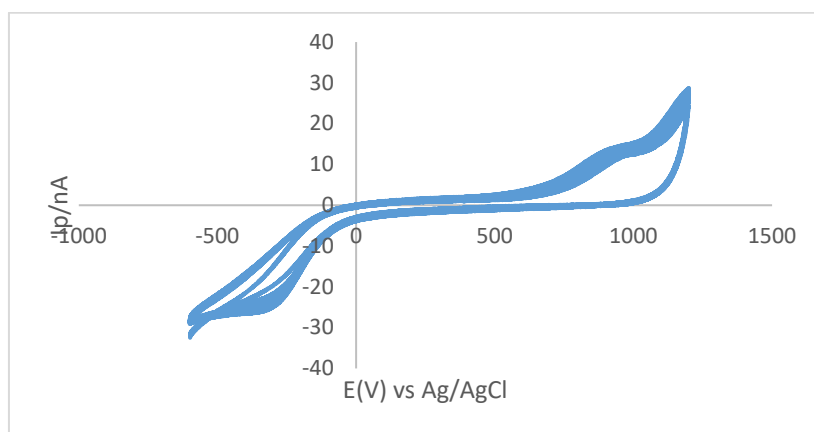


Figura 1. Voltamperogramas cíclicos de la electropolimerización de EDOT (0.5mM) sobre la superficie del UME-Pt. Se usó como electrolito soporte NaSS (5mM); barrido de potencial de -0.6 a +1.2 V; velocidad de barrido de 40 mV/s; por 10 ciclos.

La figura 2 (a) muestra la cobertura de color gris oscuro sobre el sustrato de ITO, lo cual es atribuido a la formación de la película de PEDOT generada por la electropolimerización del monómero EDOT sobre la superficie del material, para comparar, a la derecha de la misma figura se muestra el ITO sin modificación superficial.

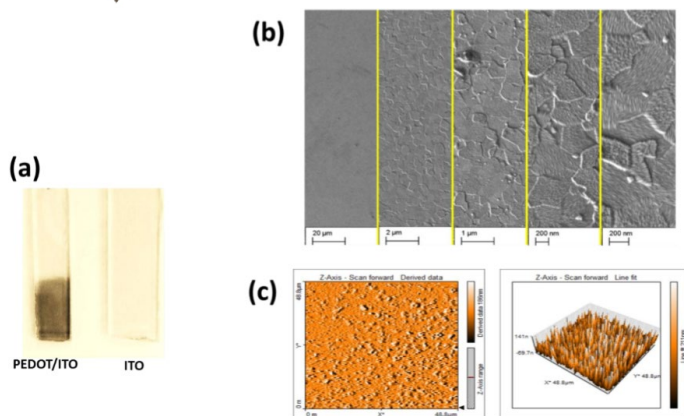


Figura 2. (a) Fotografía del ITO modificado con PEDOT (izq) y del ITO sin modificación superficial (der). (b) Imágenes SEM de los electrodos de ITO modificados con PEDOT. (c) Imágenes de AFM, la imagen de la derecha muestra la topografía de un área determinada en 2D y la imagen de la izquierda muestra la misma área, pero en 3D.

La figura 3 muestra la permeabilidad del PEDOT a posibles interferentes del anión superóxido, como el peróxido de hidrógeno, el ácido ascórbico, el ácido úrico y la xantina. Se observa que a pesar de la señal registrada para SOK, el UME modificado sigue siendo selectivo para H_2O_2 , esto por la considerable y significativa señal de intensidad de corriente que se obtiene ($I_{pc} = 293 \text{ nA}$) a $E_{cat} = -248 \text{ V}$, lo cual indica la alta sensibilidad del ultramicroelectrodo modificado para la detección y cuantificación del H_2O_2 .

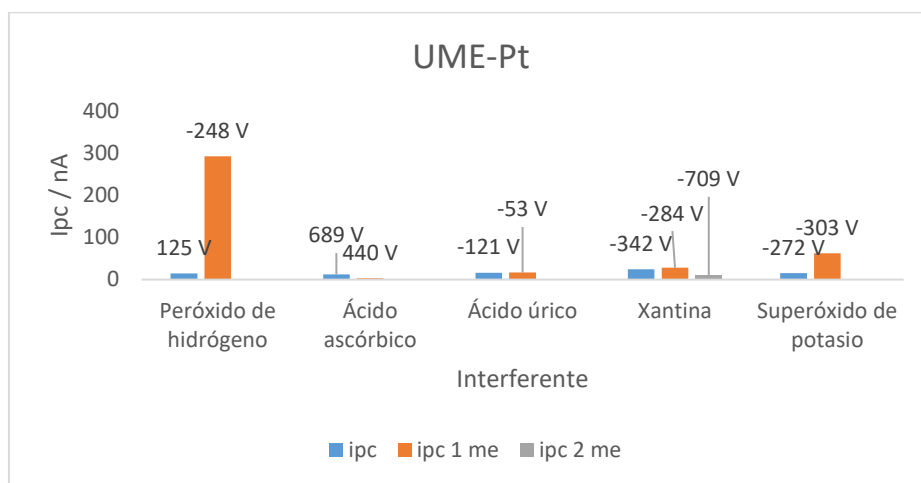
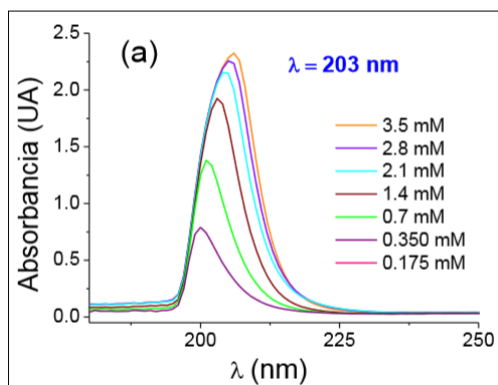


Figura 3. Gráfica de barras donde se muestra el comportamiento de PEDOT como membrana permeable a interferentes.



En la figura 4 (a) se muestran los espectros UV-vis, donde la máxima absorbancia se registra a una $\lambda = 203 \pm 3 \text{ nm}$. Dentro de la misma gráfica es posible observar la inclinación de las curvas (abs vs λ) hacia valores mayores de longitud de onda, esta ligera deformación puede estar atribuida a la degradación o dismutación espontánea del O_2^- .

Figura 4. (a) Espectros de absorción UV-vis de KO_2 a una concentración inicial de 0.175 mM a una concentración final de 3.5 mM en buffer PBS, pH 7.4

CONCLUSIONES

Se preparó UME-Pt. Se realizó la modificación de la superficie del UME-Pt con EDOT.

La electropolimerización de PEDOT sobre la superficie de platino muestra un método eficaz de recubrimiento superficial, que contribuye al incremento sinérgico de la transferencia de carga interfacial, que impacta directamente en el aumento significativo de las señales analíticas. El recubrimiento de PEDOT actúa como capa permselectiva al paso de H_2O_2 al mismo tiempo que funge como barrera para evitar el paso de especies interferentes como ácido úrico, ácido ascórbico, xantina y superóxido de potasio.

REFERENCIAS

- [1] Y. Tian, L. Mao, T. Ohsaka, (2006) *Current Analytical Chemistry*, 2, 51–58.
- [2] K. Krumova, G. Cosa, (2016), in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, Volume 1, Vol. 1, The Royal Society of Chemistry, pp. 1–21
- [3] C. M. Maier, P. H. Chan, (2002) *The Neuroscientist*, 8, 323–334.
- [4] Z. Wang, D. Liu, H. Gu, A. Zhu, Y. Tian, G. Shi, (2013) *Biosensors and Bioelectronics*, 43, 101–107.
- [5] Z. Deng, Q. Rui, X. Yin, H. Liu, Y. Tian, (2008), *Analytical Chemistry*, 80, 5839–5846.
- [6] J.T. Hancock, R. Desikan, S.J. Neill, (2001), Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochemical and biomedical aspects of oxidativemodification*, *Biochem. Soc. Trans.* 29, 345–350.
- [7] P.D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji, (2012), Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signalling, *Cell Signal.* 24 981–990.
- [8] C. J. McNeil, P. Manning, (2002) *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82, 443–455.
- [9] Y. Zhou, J. Ding, T. Liang, E. S. Abdel-Halim, L. Jiang, J.-J. Zhu, (2016) *ACS applied materials & interfaces*, 8, 6423–6430.
- [10] Y. Liu, X. Liu, Y. Liu, G. Liu, L. Ding, X. Lu, (2017), *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 39–45.
- [11] Z. Wang, L.M. Zhang, Y. Tian, (2014), *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 42, 1–9.
- [12] J. R. Harbour, M. L. Hair, (1978), *The Journal of Physical Chemistry*, 82, 1397–1399.
- [13] Z. Deng, Q. Rui, X. Yin, H.Q. Liu, Y. Tian, (2008), In vivo detection of superoxide anion in bean sprout based on ZnO nanodisks with facilitated activity for direct electron transfer of superoxide dismutase, *Anal. Chem.* 80, 5839–5846.