Aplicación de un sensor alternativo de lactato no enzimático

Erick Salinas Ávila¹, Janet Ledesma-García¹, Ricardo A. Escalona-Villalpando¹

¹Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Ingeniería en Nanotecnología.

Correspondencia: erick708922@gmail.com; ricardo.escalona@uaq.edu.mx; janet.ledesma@uaq.mx.

Resumen

En este trabajo, se evaluaron electrodos para un sensor de lactato no enzimático, a partir de un compuesto bimetálico de Fe y Cu (Guo et al., 2020), denominado como un análogo al azul de Prusia (CuFe-PBA) por su estructura cristalina similar a éste. Se realizaron pruebas mediante técnicas electroquímicas como Cronoamperomentrías (CA), Voltamperometrías cíclicas (VC) y voltametrías de pulso diferencial con el fin de evaluar su desempeño. El sensor mostró un rango lineal desde 0 a 50 mM en un pH de 7.4, mientras que a un pH de 5.6 el rango fue sólo de 0 a 5.6 mM. Los estudios únicamente se realizaron en un rango de 0 a 6 Mm para pH neutro, ya que éste es el rango de concentraciones de lactato que pueden estar presentes en fluidos biológicos con este pH. Algunos parámetros obtenidos fueron rango lineal 0 a 6 mM $(R^2 = 0.983)$, límite de cuantificación de 6.381 mM y límite de detección de 1.5 mM. Lo que dio como resultado una vía alterna para el sensado del lactato. La alternativa abiótica puede ser más útil en casos específicos, puesto que el uso de este material puede avudar a mejorar o eliminar la tendencia de un sistema enzimático a perder su funcionalidad por los efectos de pH, temperatura u otros efectos inhibitorios.

Palabras clave: análogos de azul de Prusia, electroquímica, fluidos humanos, sensor abiótico, sensor de lactat

Abstract

This paper evaluates electrodes for a non-enzymatic lactate sensor from a bimetallic compound of Fe and Cu, named as an analog to Prussian blue (FeCu-PBA) due structural similarity. to its Different electrochemical techniques were used such as Chronoamperometrys (CA). Cyclic Voltameperometrys (VC) and Differential Pulse Voltammetrys in order to evaluate their performance. A linear relationship between concentration and current was found over a range of 0 to 50 mM at a pH of 7.4, while at a pH of 5.6 the range was only 0 to 5.6 mM, however the studies were only performed in a range of 0 to 6 Mm for neutral pH because of the range of lactate concentrations that can be present in biological fluids with this pH. Some parameters obtained were linearity in a linear range 0 to 6 mM (R2 = 0.983), quantification limit of 6,381 mM and detection limit of 1.5 mM. The resulting is an alternative pathway for lactate sensing. The abiotic alternative may be more useful in specific cases, for the reason that the use of this material can help to improve the tendency of an enzyme system to lose its functionality due to the effects of pH, temperature or other inhibitory effects.

Keywords: Prussian blue analogs, electrochemical, human fluids, abiotic sensing, lactate sensor

1 Introducción

Los biosensores son dispositivos de cuantificación analítica que, a diferencia de un sensor abiótico, comprenden un elemento de reconocimiento de conformación biológica, el cual está asociado a un método de cuantificación que está descrito por el tipo de interacción que se da entre el analito y el elemento de detección, con el fin de obtener información de éste en tiempo real. Existen diferentes elementos de detección biológicos como enzimas, anticuerpos, lectinas, receptores, células completas, ácidos nucleicos. áptamelos, óxidos metálicos. nanopartículas, etc. De forma general, se busca que exista una relación directa entra la concentración del analito y la corriente eléctrica o voltaje medido. Está señal puede ser amplificada de manera conveniente con el objetivo de poder ser enviada a un dispositivo que haga la conversión correspondiente para que la señal pueda ser mostrada en las unidades de concentración del analito (Jiménez C & León P, 2009).

Se pueden clasificar los biosensores por el tipo de receptor o biorreceptor que utiliza como elemento de reconocimiento, que a su vez es la parte más importante para su especificidad. El término biorreceptor se refiere al elemento de origen biológico que mediante distintos procesos químicos o físicos logra la unión específica con el analito que nos interesa. Estos biorreceptores pueden clasificarse en 6 tipos que son: ADN o primers, enzimáticos, células, aptámeros, compuestos inmunológicos y compuestos biomiméticos (Velusamy et al., 2010). Sin embargo, en nuestro caso el elemento de reconocimiento no es de origen biológico, pero sí se busca que se pueda llegar a tener la misma selectividad en medios complejos, con la finalidad de ser utilizado como un sensor de lactato en fluidos biológicos.

Este material se denomina como un análogo del azul de Prusia (Guo et al., 2020), lo cual se refiere a un material que tienen composiciones definidas de cationes metálicos, que actúan como nodos que están unidos por grupos de cianuro que actúan a su vez como puente (Jiao et al., 2017). En este caso, se espera que esta estructura esté conformada por cobre, hierro y cianuro de manera similar a como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Estructura de $Cu_3[Fe(CN)_6]_2$ (a) estructura en sistemas de tres coordenadas (b) estructura en el plano bc (Jiao et al., 2017).

Como podemos ver, este compuesto es un tanto complejo. Aunque su estructura presentada en la Figura 1 parece simplemente una estructura cúbica centrada en las caras, si estudiamos esta forma más a fondo veremos que está formada por tres tipos de enlaces: un enlace covalente en el ion cianuro, un enlace complejo entre los iones CN⁻ y Fe para formar el ion ferrocianuro (o ferricianuro) y un enlace iónico entre lo iones de ferrocianuro y Cu.

En la Figura 2 podemos ver la estructura de los orbitales moleculares del ion ferrocianuro, el cual se genera a partir de la separación de los niveles energéticos degenerados $3d^5$ del ion Fe²⁺ (Malmqvist et al., 2008). Se da lugar a un complejo octaédrico de espín bajo, denominado así ya que los ligandos CN⁻ generan una separación grande entre los estados degenerados que resulta en dos niveles energéticos diferentes para estos mismos estados. Lo anterior, hace que los electrones se coloquen dentro de los orbitales siguiendo un orden que siempre dará el valor mínimo de espín posible. A los ligandos que logran lo anterior se les denomina ligandos fuertes (Kunnus et al., 2016).



Figura 2. Diagrama cualitativo de orbitales moleculares de valencia (MO) de un complejo de hexacianuro de hierro octaédrico con CN-(Kunnus et al., 2016).

Para el caso del ion ferricianuro, la configuración sería la misma; a excepción del electrón marcado en rojo en la Figura 2, el cual no estaría existiendo. En lugar de los dos electrones apareados, sólo habría un electrón desapareado. Ésto haría a este compuesto un agente oxidante que buscaría una forma de menor energía con este electrón formando nuevamente el ferrocianuro.

Tradicionalmente, se sabe que el compuesto PB existe en al menos dos formas estables; rico en alcalinos (soluble), AFe^{III} [Fe^{II} (CN)₆], donde A = cationes de metales alcalinos, y libre de alcalinos (insoluble), Fe^{III}[Fe^{II}(CN)₆](Ludi & Güdel, 1973). Los términos "soluble" e "insoluble" son algo engañosos, ya que ambos compuestos son altamente insolubles en agua. En este contexto, la connotación de solubilidad fue inventada por los fabricantes de tinte y se refiere a la facilidad con la que ciertas muestras de PB pueden formar soluciones coloidales (Xing et al., 2020).

Los análogos del azul de Prusia (PBA) se pueden formular como AM[M'(CN)6], donde M y M' son iones de metales de transición; A, cuando está presente, es a menudo un catión monovalente o NH4 +. La estructura cristalina idealizada de PB generalmente se describe en el grupo espacial Fm3m $a \approx 10.2$ Å, y fue caracterizada por primera vez por Keggin y Miles en 1936, utilizando datos de difracción de polvo (Keggin & Miles, 1936). Un modelo de estructura ligeramente modificado (actualmente el aceptado) para PB libre de álcalis fue presentado en la década de 1970 por Buser y sus colaboradores. Por difracción de rayos X (Malmqvist et al., 2008).

El presente trabajo tiene como objetivo hacer la síntesis de un material mediante el cual se plantea hacer el desarrollo de electrodos abióticos para la detección de lactato en medios acuosos. caracterizando electrodos los por métodos fisicoquímicos y electroquímicos, optimizando los mismos a diferentes condiciones de pH y evaluando su selectividad frente a diferentes interferentes.

2 Metodología

2.1 Síntesis de partículas de CuFe-PBA

Se preparó una solución $Cu(NO_3)_2$ y K₃Fe[CN₆] 1:1 v/v y 4.0 g de PVP en 50 mL de agua DI. Se agitó durante 30 minutos, se centrifugó y posteriormente fue lavado con agua y etanol varias veces. El precipitado se dejó secar a 60° C durante 24 h (Guo et al., 2020).

2.2 Preparación de electrodos de CuFe-PBA

Se dispersaron 2.5 mg de nanopartículas de FeCu en isopropanol y nafión en una relación de 10.5 veces, posteriormente se agitó por 1 minuto en el vortex y se colocó en baño ultra sónico por 30 segundos, repitiendo estos últimos dos procesos al menos tres veces para lograr una dispersión correcta de las partículas. Una vez lograda una buena dispersión se depositó 20 μ L sobre la superficie de los electrodos de 0.25 cm² de área y se dejó secar al menos 1h.

2.3 Evaluación de los electrodos por métodos electroquímicos.

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, excepto los especificados. Los

experimentos electroquímicos fueron realizados con o sin agitación usando un potenciostato marca Epsilon y BioLogic SAS Science Instrument VSP. Los electrodos fueron evaluados en distintas soluciones buffer a diferentes pH con el fin de evaluar la actividad del sensor en estos diferentes valores de pH, usando un electrodo de calomel o Ag/AgCl como electrodo de referencia y grafito como contra electrodo. Las voltamperometrías cíclicas (VC) se realizaron a una velocidad de barrido de 10 mV·s⁻¹ y un rango de potencial variable, mientras que los experimentos de amperometría se realizaron aplicando diferentes voltajes específicos para cada material de manera constante para cada prueba. Por último, las pruebas de voltametría de pulso diferencial fueron realizadas de un potencial inicial de -0.3 V a un potencial de 0.4 V, teniendo como parámetros una amplitud de 10 mV, un ancho de pulso de 100 ms, un incremento de potencial de 2 mV y un tiempo de muestreo de 300 ms (ver Figura 3).



Figura 3. Acomodo de electrodos usado para la realización de pruebas electroquímicas. Fuente: elaboración propia.

3 Resultados

Este material se probó por medio de VC, amperometrías y Voltametría de pulso diferencial (DPV). Las VC fueron de ayuda para determinar a primera instancia el comportamiento de los electrodos a la presencia de lactato, Se realizaron en un rango de -0.4 a 0.6 V con una velocidad de barrido de 10 mV·s⁻¹, en PBS a un pH de 5.6. Esto mostró picos de oxidación notables ante la presciencia de lactato cercano a 0.05V (vs Ag/AgCl) llevando los valores de la corriente desde valores ligeramente negativos hasta valores cercanos a los 100 μ A para el mismo potencial. Un cambio también notable se puede ver en la parte de reducción, la cual, aunque no muestra picos bien definidos a un potencial, es evidente para cada concentración de lactato que la corriente aumenta y lo hace esta vez de manera correspondiente con cada adición a un potencial de -0.3 V.

Se pueden observar un par de picos redox que se deben a la oxidación y reducción del CuFe-PBA en los que sería de esperar, por su similitud con el azul de Prusia (PB) que siga un mecanismo similar. En el mecanismo conocido del PB este se reduce a PW que se re-oxida a PB y se sabe que el PB existe tanto en forma soluble como insoluble, entonces si nuestro material respeta estas formas podríamos tener un mecanismo análogo al del PB como se muestra a continuación para la forma soluble (Cinti et al., 2014).

$$ACu^{III}[Fe^{II}(CN)_6] + A^+ + e^- \rightarrow A_2Cu^{II}[Fe^{II}(CN)_6]$$

Y de la siguiente forma para su forma insoluble:

 $Cu^{III}[Fe^{II}(CN)_{6}] + 4A^{+} + 4e^{-} \rightarrow A_{4}Cu^{II}[Fe^{II}(CN)_{6}]$

Sin embargo, esta forma no nos explica completamente algunos de los fenómenos observados durante la experimentación, como por ejemplo a qué se debería entonces la diferencia entre usar este material o sólo usar el PB. Para ello, debemos hacer otras pruebas para verificar si se trata solo de este mecanismo o hay otros intermediarios en la reacción, lo que se confirmara más adelante cuando veamos que este mecanismo debe estar mediado por la presencia de oxígeno.

Posterior a esta prueba, se realizaron otras VC que muestran que este mismo comportamiento se presenta cuando la enzima no es colocada sobre el electrodo, lo que nos hace concluir que el efecto visto es producido por el material únicamente. A continuación, se presentan la Figura 4.



Figura 4. Voltamperometrías cíclicas de partículas de a) Cu-Fe PBA y b) Cu-Fe PBA y LOx a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de 10 mV·s⁻¹. Fuente: elaboración propia.

Cabe mencionar que los resultados son algo dispersos y rara vez se logró observar esta dependencia con la concentración de lactato hasta valores de 50 Mm. Por ello, se optó por utilizar técnicas de DPV con el objetivo de observar de mejor manera estos picos de oxidación mostrados en el material. Las pruebas fueron realizadas de un potencial inicial de -0.3 V a un potencial de 0.4 V, tuvieron como parámetros una amplitud de 10 mV, un ancho de pulso de 100 ms, un incremento de potencial de 2 mV y un tiempo de muestreo de 300 ms. Estas pruebas nos ayudaron a establecer de manera certera que la mayoría de los electrodos tenían como punto de saturación una concentración menor a la que suponíamos de 8 Mm, como es notable en la Figura 5.



Figura 5. Voltametría de pulso diferencial de CuFe-PBA a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M). Fuente: elaboración propia.

En la Figura 6 podemos ver de manera más clara la relación entre el aumento de la corriente y las distintas concentraciones de lactato. Así, es posible ver que alcanza la corriente más alta a una concentración de apenas 8 mM, lo que concuerda con lo visto en algunas VC vistas anteriormente.

Se realizó un duplicado de la prueba anterior de DPV de donde se obtuvo rango lineal de 0-8 mM ($R^2 = 0.958$), un límite de detección de 1.6 mM, un límite de cuantificación de 5.23 mM, una sensibilidad de 2.25 μ A·mM⁻¹, y una corriente máxima de 138.89 μ A.



Figura 6. Concentración de lactato vs diferencia de corriente obtenida de la Voltametría de pulso diferencial de CuFe-PBA a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M). Fuente: elaboración propia.

En este caso, el límite de detección usando la técnica de DPV toma valores que nos permiten la detección del lactato en el medio. Sin embargo, el límite de cuantificación se acerca bastante al rango lineal del electrodo de 0-8 mM, por lo que la cuantificación puede ser poco efectiva. Esto se debe probablemente a la irregular dispersión de las partículas sobre el electrodo. Por esa razón, para mejorar estos datos se debería cambiar el método mediante el cual se depositan las partículas sobre el electrodo.

Este material fue evaluado posteriormente por cronoamperometría, con la consideración del hecho que presenta una saturación a los 8 mM que puede ser útil para evaluarlos en fluidos biológicos como lágrimas, sudor o sangre. Por lo anterior, se realizaron en condiciones que coincidieron mejor con estos medios, ya que estos tienen un pH neutro y como concentración máxima de lactato pueden contener alrededor de 6 mM. Se realizaron adiciones de lactato cada sesenta segundos en distintos rangos de concentración de lactato. De 0 a 1.6 mM se hicieron 16 adiciones de 0.1mM, de 1.6 a 3.6 mM se hicieron diez adiciones de 0.2mM y finalmente de 3.6 a 6 se realizaron seis adiciones de 0.4 mM. En la Figura 7 pueden observarse estos 3 rangos de adiciones que comienzan alrededor de los 380 segundos.



Figura 7. a) Cronoamperometría de FeCu NP's a con adiciones de ácido láctico en PBS pH 7.4 (0.1 M) a un potencial de -300mV b) corriente en función de la concentración de lactato. Fuente: elaboración propia.

Se realizó un triplicado de estas pruebas de cronoamperometría y se obtuvo un rango lineal de 0 mM a 6 mM con una $R^2 = 0.983$ y la siguiente ecuación lineal $y = -5 \times 10^{-8} x \ 4 \times 10^{-6}$.



Figura 8. Triplicado de pruebas cronoamperometricas del electrodo de CuFe-PBA con adiciones de lactato. Fuente: elaboración propia.

La sugerencia del mecanismo redox es conocer si la reacción procede como dependencia de oxígeno. Para ello, se planteó el experimento de cronoamperometría

en ausencia y presencia de oxígeno. Como se puede observar en la Figura 9. con la adición de lactato, hay un aumento de la corriente de 0.25 μ A en sentido negativo, cuando se nitrógeno la solución se puede observar un decaimiento en la corriente y cuando se administra oxígeno la corriente es mayor, lo que indica que la reacción depende del oxígeno, sugiriendo que pudiera seguir el mecanismo por oxidación de lactato por radicales libres.



Figura 9 Efecto de la nitrogenación y oxigenación en el electrodo de CuFe-PBA. Fuente: elaboración propia.

En este caso, se hizo una prueba de interferentes con 1 mM de lactato (Lac), 3 mM de glucosa (Glu), 0.1 mM de ácido ascórbico (AA), 0.1 mM de ácido úrico (AU), 0.1 mM de Urea (U) y 0.2 nM de dopamina. En la Figura 10, podemos ver que solamente la adición de lactato produce un aumento de la corriente en el sentido negativo. Todas los demás interferentes probados causan el efecto contrario, de disminución de la corriente, cada uno con una magnitud distinta siendo la dopamina la que tuvo el efecto menos notorio, casi imperceptible y el ácido úrico y el ácido ascórbico los que causaron un mayor cambio en la corriente, en el caso de la primera adición de ácido ascórbico se vio un cambio de 0.9 µA, mucho mayor que los cambios de corriente vistos anteriormente para las adiciones de lactato, con lo que no sería posible medir de manera precisa la concentración de lactato presente en la solución en la presencia de alguno de estos interferentes. En otras palabras, se puede decir que el material no es selectivo, sino que más bien pueda catalizar reacciones redox de distintos materiales orgánicos.



Figura 10. Prueba de interferentes de CuFe-PBA. Fuente: elaboración propia.

En el caso del XRD para este material podemos observar prácticamente la misma estructura cristalina que la reportada en la literatura para el azul de Prusia en la Figura 11. (Shiba et al., 2019), indicándonos que la estructura cristalina del material sintetizado es muy similar a la estructura cristalina del Azul de Prusia. Esto sugiere que la estructura del material sintetizado efectivamente es como se mostró en la Figura 1.



Figura 11. XRD de CuFe-PBA sintetizado y PB reportado en la literatura (Shiba et al., 2019) "elaboración propia".

4 Discusión y conclusiones

El material se logró caracterizar por XRD, con lo que se lograron observar picos pertenecientes a la estructura cristalina del PB reportada en la literatura (Shiba et al., 2019), pues muestran una gran similitud en su estructura cristalina con las estructuras propias de estos materiales reportadas en la literatura y mostrando composiciones acordes a lo que se esperaba obtener,

La evaluación a diferentes medidas de pH de las partículas de CuFe-PBA muestra rangos lineales significativamente más grandes, pues mientras que a un pH de 5.6 el rango lineal no pasa de 8 mM para un pH más neutro de 7.4 este rango supera los 50 mM. Lo anterior, nos da información acerca de los posibles mecanismos mediante los cuales sucede la oxidación y la reducción de lactato en la presencia de este material, lo cual posiblemente pueda darse por medio de radicales libres. Además, se pudo observar en este mismo material que dicha reacción está mediada por oxígeno, pues al desplazar el oxígeno con nitrógeno, las corrientes disminuyen drásticamente y al oxigenar nuevamente el medio, se observa un aumento notable en la corriente. Este material es novedoso y no se ha reportado para la oxidación de lactato, por lo que fue un logro en el trabajo demostrar que mediante pruebas electroquímicas puede identificarse la presencia de lactato en medios complejos sin la utilización de electrodos enzimáticos.

5 **Referencias**

- Cinti, S., Arduini, F., Moscone, D., Palleschi, G., & Killard, A. J. (2014). Development of a hydrogen peroxide sensor based on screenprinted electrodes modified with inkjet-printed Prussian blue nanoparticles. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *14*(8), pp. 14222– 14234. DOI: https://doi.org/10.3390/s140814222
- Guo, R., Chen, Y., Nengzi, L., Meng, L., Song, Q., Gou, J., & Cheng, X. (2020). In situ preparation of carbon-based Cu-Fe oxide nanoparticles from CuFe Prussian blue analogues for the photoassisted heterogeneous peroxymonosulfate activation process to remove lomefloxacin. *Chemical Engineering Journal*, 398. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125556
- Jiao, S., Tuo, J., Xie, H., Cai, Z., Wang, S., & Zhu, J. (2017). The electrochemical performance of Cu3[Fe(CN)6]2 as a cathode material for sodium-ion batteries. *Materials Research Bulletin*, *86*, pp. 194–200. DOI: https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2016.10.019
- Jiménez C, C., & León P, D. E. (2009). Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios . *In Vitae*, *16*, pp. 144–154.
- Kunnus, K., Zhang, W., Delcey, M. G., Pinjari, R. V, Miedema, P. S., Schreck, S., Quevedo, W., Schröder, H., Föhlisch, A., Gaffney, K. J., Lundberg, M., Odelius, M., & Wernet, P. (2016). Viewing the Valence Electronic Structure of Ferric and Ferrous Hexacyanide in Solution from the Fe and Cyanide Perspectives. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(29), pp. 7182–7194. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b04751
- Ludi, A., & Güdel, H. U. (1973). Structural chemistry of polynuclear transition metal cyanides BT Inorganic Chemistry, pp. 1–21.
- Malmqvist, P. Å., Pierloot, K., Shahi, A. R. M., Cramer, C. J., & Gagliardi, L. (2008). The restricted active space followed by second-order perturbation theory method: Theory and application to the study of CuO2 and Cu2O2 systems. *The Journal of Chemical Physics*, *128*(20). DOI: https://doi.org/10.1063/1.2920188
- Shiba, F., Mameuda, U., Tatejima, S., & Okawa, Y. (2019). Synthesis of uniform Prussian blue nanoparticles by a polyol process using a polyethylene glycol aqueous solution. *RSC Advances*, *9*, pp. 34589–34594. DOI: https://doi.org/10.1039/C9RA07080J

- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28(2), pp. 232–254. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004
- Xing, X., Song, Y., Jiang, W., & Zhang, X. (2020). CuFe–P from a Prussian blue analogue as an electrocatalyst for efficient full water splitting. *Sustainable Energy & Fuels*, 4(8), pp. 3985–3991. DOI: https://doi.org/10.1039/D0SE00402B