

Biosensores multienzimáticos para el análisis multiparamétrico con un solo dispositivo Multi-enzyme biosensors for multi-parameter analysis with a single device

E. González-López ^a, C. A. Galán-Vidal ^{a*}, J. A. Rodríguez-Ávila ^a, L. H. Mendoza-Huizar ^a, M. E. Páez-Hernández ^a

^a Área Académica de Química, ICBI, Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Col. Carboneras, 42184 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

Resumen

En el presente trabajo se reporta la simulación de la respuesta voltamperométrica y cronoamperométrica de un biosensor multienzimático para la cuantificación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos con un solo dispositivo. Los resultados fueron procesados mediante regresión lineal múltiple MLR, regresión de componentes principales PCR y regresión de mínimos cuadrados parciales PLS, encontrando que se obtienen los mejores resultados con MLR procesando la información voltamperométrica, obteniendo porcentajes de error relativo menores al 10% en promedio

Palabras Clave:

Biosensores electroquímicos, análisis multiparamétrico, glucosa, colesterol, triglicéridos.

Abstract

In this work, the simulation of the voltammetric and chronoamperometric response of a multi-enzyme biosensor for the simultaneous analysis of glucose, cholesterol and triglycerides with a single device is reported. The results were processed using MLR multiple linear regression, PCR principal components regression and PLS partial least squares regression, finding that the best results are obtained with MLR processing the voltammetric information, obtaining relative error percentages less than 10% on average

Keywords:

Electrochemical biosensors, multiparametric analysis, glucose, cholesterol, triglycerides.

1. Introducción

El incremento en la ingesta de alimentos indulgentes y del sedentarismo ha provocado un aumento alarmante en la prevalencia del síndrome metabólico en la población mexicana. Estos padecimientos, claramente asociados a hiperglucemia y dislipidemia, se han convertido en una de las principales causas de muerte y discapacidad en México (INEGI, 2018), por lo que la prevención, el diagnóstico y el tratamiento oportuno de estas enfermedades es de gran relevancia (Wacher-Rodarte, 2009). En este sentido es necesario contar con alternativas para la monitorización de glucosa, colesterol y triglicéridos que permitan cuantificar estos analitos en sangre de manera sencilla y económica en el consultorio y en el hogar.

Los biosensores amperométricos se han constituido en la actualidad como una de las alternativas analíticas más fiables para la cuantificación en campo de glucosa, colesterol y triglicéridos; sin embargo, los dispositivos desarrollados hasta el momento son monoparamétricos, lo que implica un incremento en el costo y tiempo para llevar a cabo la cuantificación de los tres analitos (Eggin, 2002), (del Valle, 2010).

En el presente trabajo se presenta la simulación de una propuesta de cuantificación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos con base en un biosensor multienzimático mediante análisis multivariante.

*Autor para la correspondencia: galanv@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: shesgar@gmail.com (Edgar González-López), galanv@uaeh.edu.mx (Carlos Andrés Galán-Vidal), josear@uaeh.edu.mx (José Antonio Rodríguez-Ávila), huizar@uaeh.edu.mx (Luis Humberto Mendoza-Huizar), paezh@uaeh.edu.mx (María Elena Páez-Hernández).

2. Materiales y métodos

Los biosensores enzimáticos electroquímicos utilizan transductores voltamperométricos y cronoamperométricos; por lo tanto, para obtener los voltamperogramas y cronoamperogramas se modeló un biosensor multienzimático construido a partir de un electrodo de carbón vítreo (0.0707 cm^2) sobre el que se depositó una capa de 7,7,8,8-tratrancianoquinodimetano (TCNQ) como mediador y sobre ésta una membrana enzimática formulada con glucosa oxidasa, colesterol oxidasa, lipasa, glicerol quinasa y glicerol fosfato oxidasa. Así, al interactuar el biosensor con una mezcla de glucosa, colesterol y triglicéridos, se producirá una intensidad de corriente cuya magnitud es la suma de las intensidades generadas por los tres analitos por separado.

Tabla 1. Datos y parámetros de entrada para la simulación de un biosensor multienzimático.

Parámetro	Valor	Ref.
Área superficial	0.0707 cm^2	-
Potencial de oxidación del TCNQ (SCE)	0.127 V	(Chaubey <i>et al.</i> , 2002)
Constante heterogénea de velocidad de transferencia electrónica TCNQ sobre carbón vítreo (k_s)	$1.3 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	(Albery <i>et al.</i> , 1985)
Coefficiente de difusión de glucosa (D_{Glucosa})	$6.77 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)
Coefficiente de difusión de colesterol ($D_{\text{Colesterol}}$)	$1.8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Cussler, 2009)
Coefficiente de difusión de trioleína ($D_{\text{Trioleína}}$)	$1.04 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Ababneh <i>et al.</i> , 2009)

Para realizar la simulación se utilizó el software DigiElch 7 considerando en el caso de la voltamperometría lineal una velocidad de barrido de 0.020 V s^{-1} en una ventana de potencial de -0.1 V hasta 1.0 V . Para la obtención de los cronoamperogramas se consideró un potencial impuesto de 0.3 V . Al igual que en el caso de la voltamperometría lineal, se asume que se cumple la ley de aditividad, donde la señal analítica de una mezcla de analitos es la suma de las señales generadas individualmente para cada uno de ellos; por lo

tanto, estas señales (intensidad de corriente) son sumadas para generar el comportamiento de las diferentes mezclas de concentración conocida. La información generada fue procesada y evaluada mediante el software Minitab 17. Los parámetros alimentados al programa para realizar la simulación se presentan en la Tabla 1.

3. Resultados y discusión

Para cada concentración se simuló un barrido voltamperométrico desde -0.1 V hasta 1.0 V (Fig. 1) y posteriormente se sumaron las señales de acuerdo a la matriz de concentraciones ordenada al azar dentro de los intervalos lineales encontrados en la literatura a valores equidistantes. A partir de los voltamperogramas generados se obtuvieron las intensidades de corriente para $0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$ y 0.5 V , obteniéndose la matriz de resultados de 10×6 (Tabla 2). Esta matriz de variables de respuesta es utilizada en los tres modelos de regresión multivariante.

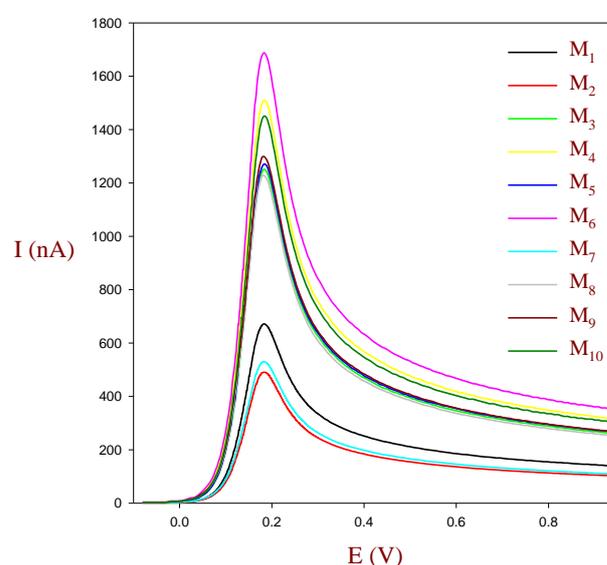


Figura 1. Voltamperogramas lineales de las mezclas de concentraciones de los analitos.

Tabla 2. Matriz de concentraciones y de respuestas de las mezclas de los analitos para un transductor voltamperométrico.

Mezcla	Concentración (mM)			Intensidad de corriente (nA)					
	GLU	COL	TG	I (0.0V)	I (0.1V)	I (0.2V)	I (0.3V)	I (0.4V)	I (0.5V)
M ₁	1.90	5.00	0.70	4.4	155.5	600.8	328.6	251.0	213.1
M ₂	1.20	4.00	0.45	2.9	115.1	439.9	241.9	183.0	154.7
M ₃	5.40	6.00	1.45	7.7	263.8	1146.6	622.5	474.0	401.1
M ₄	6.10	8.00	2.45	9.8	333.2	1389.1	758.8	577.0	487.9
M ₅	3.30	10.00	1.20	8.7	306.0	1141.8	626.1	474.0	403
M ₆	6.80	9.00	1.7	10.3	360.0	1534.3	839.3	637.0	538.3
M ₇	2.60	2.00	0.95	3.2	113.2	497.3	274.9	204.0	170.5
M ₈	4.70	7.00	1.95	7.6	280.3	1127.8	614.2	468.0	395.0
M ₉	0.50	3.00	0.20	2.0	75.4	273.6	151.6	116.0	98.1
M ₁₀	4.00	11.00	2.20	9.9	354.8	1311.0	719.7	552.0	467.2

GLU = glucosa, COL = colesterol, TG = triglicéridos.

De igual manera, se simularon registros cronopotamperométrico durante 70 segundos a 0.3 V a las concentraciones de los analitos individualmente, para posteriormente sumar las señales de las mezclas de los analitos. Mediante los cronopotamperogramas se obtuvieron las intensidades de corriente a 5, 10, 20, 35, 50 y 65 segundos (Fig. 2), generándose igualmente una matriz de resultados de 10x6 (Tabla 3).

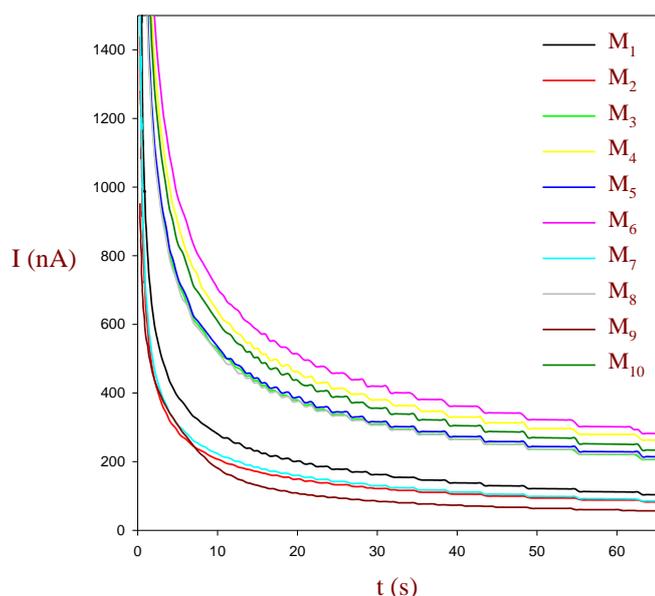


Figura 3. Cronopotamperogramas de las mezclas de concentraciones de los analitos.

3.1. Regresión lineal múltiple

Los resultados de intensidad de corriente para los datos voltamperométricos y cronopotamperométricos simulados

fueron procesados primeramente por RLM, encontrándose una buena predicción de las concentraciones de trabajo para los datos voltamperométricos para glucosa y colesterol dado que los porcentajes de error promedio son de 1.1 y 1.3 % respectivamente. En el caso de los triglicéridos, sus porcentajes de error son superiores al 10.0 % debido a que sus concentraciones son menores que para glucosa y colesterol; además que su coeficiente de difusión es el menor de los tres analitos (Tabla 4).

En el caso de los datos generados por cronopotamperometría, los resultados de porcentajes de error promedio superan el 10 % para los tres analitos. No obstante, en algunas simulaciones logran predecir correctamente la concentración de los analitos, por lo que sería posible optimizar este proceso de transducción cronopotamperométrica.

Para conocer la idoneidad del modelo de regresión con las variables modificadas se calculan los coeficientes de correlación ($R_{x,y}^2$, R_{aj}^2 y R_{Pred}^2) correspondientes para cada analito, así como los parámetros de multicolinealidad (Tablas 5 y 6).

En la tabla 5 se observa que al comparar los coeficientes de determinación predichos (R_{Pred}^2), éstos son mayores en la detección voltamperométrica en al menos dos analitos. Esto quiere decir que el transductor voltamperométrico tendrá los mejores resultados y un menor porcentaje de error en la predicción de las concentraciones para nuevas mediciones.

Las variables seleccionadas presentan valores de FIV muy por encima del criterio establecido, es decir, las variables son multicolineales, por lo que es posible reducir el número de éstas sin una pérdida importante de información en el proceso.

Tabla 3. Matriz de concentraciones y de respuestas de las mezclas de los analitos para un transductor cronopotamperométrico.

Mezcla	Concentración (mM)			Intensidad de corriente (nA)					
	GLU	COL	TG	I (5s)	I (10s)	I (20s)	I (35s)	I (50s)	I (65s)
M ₁	1.90	5.00	0.70	397.5	290.0	205.5	157.4	124.3	106.1
M ₂	1.20	4.00	0.45	301.9	212.5	151.9	118.3	95.7	83.9
M ₃	5.40	6.00	1.45	755.5	544.6	388.5	301.1	242.4	211.4
M ₄	6.10	8.00	2.45	924.9	665.9	478.1	367.5	306.4	271.8
M ₅	3.30	10.00	1.20	769.8	551.4	394.2	307.3	248.7	218.3
M ₆	6.80	9.00	1.70	1012.2	735.3	524.9	399.8	328.6	287.1
M ₇	2.60	2.00	0.95	324.4	233.5	166.1	128.3	102.4	88.5
M ₈	4.70	7.00	1.95	756.1	540.0	386.6	301.2	244.3	214.9
M ₉	0.50	3.00	0.20	184.8	135.3	97.0	76.0	61.9	54.8
M ₁₀	4.00	11.00	2.20	881.6	634.6	451.5	342.2	278.1	240.5

GLU = glucosa, COL = colesterol, TG = triglicéridos.

Tabla 4. Resultados de porcentajes de error en la determinación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos mediante cronoamperometría y voltamperometría utilizando RLM.

Mezcla	% error (Cronoamperometría)			% error (Voltamperometría)		
	GLU	COL	TG	GLU	COL	TG
M ₁	5.6	3.5	5.6	3.4	4.0	24.9
M ₂	18.8	8.6	50.4	2.1	2.8	53.5
M ₃	1.1	1.6	3.7	0.7	1.3	3.5
M ₄	1.9	3.0	6.2	0.3	1.3	12.2
M ₅	5.5	3.1	5.5	0.2	0.3	5.2
M ₆	4.7	5.8	11.5	0.4	1.2	8.4
M ₇	35.2	85.5	31.7	0.3	0.3	6.6
M ₈	0.6	1.1	7.0	0.4	0.8	1.4
M ₉	176	52.7	23.9	2.2	0.8	9.2
M ₁₀	13.4	8.5	3.3	0.6	0.6	<0.1
% EP	26.3	17.3	14.9	1.1	1.3	13.9

GLU = glucosa, COL = colesterol, TG = triglicéridos, % EP = porcentaje de error promedio.

Tabla 5. Coeficientes de determinación múltiple, de determinación ajustado y de determinación predicho para detección voltamperométrica y cronoamperométrica de GLU, COL y TG encontrados en la regresión RLM.

Detección	$R_{x,y}^2$			R_{aj}^2			R_{Pred}^2		
	GLU	COL	TG	GLU	COL	TG	GLU	COL	TG
Voltamperométrica	0.999	0.999	0.960	0.999	0.999	0.880	0.996	0.980	0.158
Cronoamperométrica	0.948	0.917	0.950	0.843	0.750	0.860	0.374	0.804	0.353

GLU = glucosa, COL = colesterol, TG = triglicéridos.

Tabla 6. Valores del FIV para la determinación simultánea de GLU, COL y TG de las variables de respuesta seleccionadas para voltamperometría y cronoamperometría.

Detección	Variable	FIV
Voltamperométrica	0.0 V	606.42
	0.1 V	333.35
	0.2 V	33,446.10
	0.3 V	25,957.35
	0.4 V	39,846.39
	0.5 V	49,970.85
Cronoamperométrica	5 s	7,277.21
	10 s	4'458,665.05
	20 s	4'358,795.3
	35 s	3,845.69
	50 s	2'925,5193.47
	65 s	12'192,114.99

3.2. Regresión sobre componentes principales

Para reducir la multicolinealidad de las variables predictoras con el propósito de obtener mejores modelos de predicción, se realiza un análisis de componentes principales para transformar las variables originales en nuevas variables no correlacionadas. Este procedimiento es aplicado para ambos tipos de detección. Las variables "z_i", encontradas se muestran en la tabla 7 y se observa que éstas no son colineales entre sí.

Los coeficientes de correlación ($R_{x,y}^2$, R_{aj}^2 y R_{Pred}^2) correspondientes para cada analito se muestran en la tabla 8, donde se observa que estos parámetros tienen valores

inferiores a los encontrados para RLM. Se puede afirmar que los porcentajes de error serán mayores, tanto para recalculas las concentraciones de trabajo como para la estimación de nuevas mediciones.

Al procesar la información cronoamperométrica y voltamperométrica mediante RCP, se encontraron porcentajes de error promedio más elevados en comparación con los calculados mediante RLM (Tabla 9). Estos porcentajes de error indican que las nuevas variables generadas han perdido gran parte de la información útil para obtener un modelo robusto para la regresión.

Tabla 7. Variables predictoras transformadas a partir de componentes principales para datos voltamperométricos y cronoamperométricos.

Detección	Variable	FIV
Voltamperométrica	z_1^V	1.00
	z_2^V	1.00
	z_3^V	1.00
Cronoamperométrica	z_1^C	1.00
	z_2^C	1.00
	z_3^C	1.00

Tabla 8. Coeficientes de determinación múltiple, de determinación ajustado y de determinación predicho para detección voltamperométrica y cronoamperométrica de GLU, COL y TG calculados en la regresión RCP.

Detección	$R^2_{x,y}$			R^2_{aj}			R^2_{pred}		
	GLU	COL	TG	GLU	COL	TG	GLU	COL	TG
Voltamperométrica	0.992	0.980	0.804	0.989	0.970	0.706	0.959	0.891	0.039
Cronoamperométrica	0.884	0.814	0.816	0.826	0.720	0.724	0.714	0.555	0.319

GLU = glucosa, COL = colesterol, TG = triglicéridos.

Tabla 9. Resultados de porcentajes de error en la determinación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos mediante cronoamperometría y voltamperometría utilizando RCP.

Mezcla	% error (Cronoamperometría)			% error (Voltamperometría)		
	GLU	COL	TG	GLU	COL	TG
M ₁	10.5	7.6	1.4	3.1	3.8	20.4
M ₂	2.1	2.8	49.0	11.2	8.1	23.0
M ₃	19.7	30.8	11.5	0.3	1.1	10.4
M ₄	1.0	0.1	17.5	1.5	3.5	18.9
M ₅	32.2	20.3	45.0	5.0	4.9	30.8
M ₆	3.4	3.7	20.4	3.3	6.5	29.5
M ₇	39.2	95.4	35.6	11.0	29.3	38.9
M ₈	10.4	13.0	10.8	6.5	8.3	19.4
M ₉	145.0	43.3	26.9	16.0	5.9	80.2
M ₁₀	18.1	10.8	15.5	3.8	3.4	10.1
% EP	28.2	22.7	26.2	6.2	7.5	28.2

GLU = glucosa, COL = colesterol, TG = triglicéridos, % EP = porcentaje de error promedio.

Tabla 10. Resultados de porcentajes de error en la determinación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos mediante cronoamperometría y voltamperometría utilizando MCP.

Mezcla	% error (Cronoamperometría)			% error (Voltamperometría)		
	GLU	COL	TG	GLU	COL	TG
M ₁	10.2	11.8	12.6	3.4	4.0	16.9
M ₂	22.3	10.8	27.1	2.1	2.9	24.4
M ₃	17.3	26.5	10.7	0.7	1.4	9.4
M ₄	7.3	14.9	17.7	0.3	1.3	19.2
M ₅	38.4	22.7	36.8	0.2	0.3	38.8
M ₆	9.1	10.0	29.3	0.4	1.1	27.9
M ₇	37.6	88.7	34.2	0.3	0.4	34.6
M ₈	4.8	8.7	17.5	0.4	0.8	18.7
M ₉	52.4	12.7	64.3	2.2	0.8	60.2
M ₁₀	30.4	21.8	15.2	0.6	0.6	11.8
% EP	23	22.9	26.5	1.1	1.4	26.2

GLU = glucosa, COL = colesterol, TG = triglicéridos, % EP = porcentaje de error promedio.

Tabla 11. Resumen de resultados para la determinación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos mediante voltamperometría, cronoamperometría y regresión multivariante.

Detección	Regresión	% Error promedio		
		Glucosa	Colesterol	Triglicéridos
Voltamperometría	RLM	1.1	1.3	13.9
	RCP	25.6	24.2	20.6
	MCP	1.1	1.4	26.2
Cronoamperometría	RLM	26.3	17.3	14.9
	RCP	22.9	22.9	26.2
	MCP	23.0	22.9	26.5

3.3. Regresión sobre mínimos cuadrados parciales

En el caso de la regresión MCP, los porcentajes de error relativo alcanzados disminuyeron en el caso voltamperométrico y fueron del mismo orden en el cronoamperométrico (Tabla 10). Debido a que se usaron las mismas variables que las utilizadas en RLM y RCP los resultados son muy similares.

En la mayoría de las determinaciones se encuentra sistemáticamente que la concentración de triglicéridos reporta mayores errores en su predicción, tanto para datos voltamperométricos como cronoamperométricos; situación debida a la menor contribución en la intensidad de corriente del biosensor debido a su menor movilidad en disolución acuosa y su menor concentración analítica en los sistemas (Tabla 11).

4. Conclusiones

El presente trabajo demuestra que es posible desarrollar un biosensor amperométrico multienzimático para cuantificar simultánea y eficientemente glucosa y colesterol con un solo dispositivo mediante el procesamiento de la información voltamperométrica mediante RLM o MCP; no obstante, para los triglicéridos se obtuvieron errores elevados debido a su menor contribución en la señal del dispositivo. En el caso de los datos cronoamperométricos, el porcentaje de error promedio para la determinación de los tres analitos es mayor al 10.0 % en las tres técnicas de análisis multivariante, por lo que en un proceso experimental empleando estas técnicas, no se esperan resultados tan aceptables como los obtenidos mediante voltamperometría.

Para el desarrollo de un biosensor multienzimático capaz de analizar muestras reales, se sugiere comenzar con un biosensor que determine la concentración de dos analitos simultáneamente empleando un transductor voltamperométrico y realizando el tratamiento de los datos mediante RLM y MCP; ya que la RCP reportó porcentajes de error promedio mayores.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido realizado gracias al financiamiento de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y del CONACyT (Ref. CB-2014-242677). EGL agradece al CONACyT la beca otorgada para realizar sus estudios de posgrado (Ref. 596467). CAGV, JARA, LHMH y MEPE agradecen el apoyo y distinción recibida del SNI.

Referencias

- Ababneh, Z. Q., Berde, C. B., Ababneh, A. M., Maier, S. E., Mulkern, R. V., 2009. In vivo lipid diffusion coefficient measurements in rat bone marrow, *J. Magn. Reson.*, 27, 859-864.
DOI: 10.1016/j.mri.2008.11.004
- Albery, W. J., Bartlett, P. N., y Craston, D. H., 1985. Amperometric enzyme electrodes part II. Conducting salts as electrode materials for the oxidation of glucose oxidase. *J. Electroanal. Chem.* 194, 223-235.
DOI: 10.1016/0022-0728(85)85006-3
- Chaubey, A., Malhotra, B. D., 2002 Mediated biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 17, 441-456.
DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00313-X
- Cussler, E. L., 2009. Diffusion; mass transfer in fluid systems, Cambridge University Press, Reino Unido.
- del Valle, M., 2010. Electronic tongues employing electrochemical sensors. *Electroanalysis* 22, 1539-1555.
DOI: 10.1002/elan.201000013
- Eggins, B. R., 2002. Chemical sensors and biosensors. John Wiley & Sons, Gran Bretaña.
- INEGI, 2018. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Recuperado el 18 de mayo de 2020 de <https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- Ribeiro, A. C. F., Ortona, O., Simoes, S. M. N., Santos, C. I. A., Prazeres, P. M. R. A., Valente, A. J. M., Lobo, V. M. M., Burrows, H. D., 2006. Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of sucrose, lactose, glucose and fructose in the temperature range from (298.15 to 328.15) K. *J. Chem. Eng. Data* 51, 1836-1840.
DOI: /10.1021/jc0602061
- Wacher-Rodarte, N., 2009. Epidemiología del síndrome metabólico, *Gac. Méd. Méx.*, 145, 384-391.