

Caracterización de nanofilms basados en ácido fenil borónico depositados en el extremo de una fibra óptica para la monitorización continua de glucosa

Characterization of phenylboronic acid based nanofilms deposited on the tip of an optical fiber for glucose continuous monitoring

A. B. Socorro, J. M. Corres^(*), I. R. Matías, F. J. Arregui, C. Bariáin

Dpto. de Ingeniería Eléctrica y Electrónica, Univ. Pública de Navarra, Pamplona, Navarra.

^(*) Email: jmcortes@unavarra.es

Recibido / Received: 04/06/2009. Versión revisada / Revised version: 09/09/2009. Aceptado / Accepted: 10/09/2009

RESUMEN:

En este trabajo se presenta el desarrollo de una unidad sensora de glucosa en punta de fibra óptica basado en la técnica del Autoensamblado Electroestático Monocapa y usando el ácido fenil borónico como molécula afín a la glucosa. Como aspectos más relevantes de este sensor, se destacan el tiempo de respuesta, que se sitúa entre 2 y 6 segundos y el rango de detección de concentraciones, que se encuentra entre 1 mM y 1M, si bien es posible incrementar la sensibilidad mediante el ajuste de las características de la deposición. La principal ventaja de este dispositivo es que, al no emplear sustancias biológicas para la detección, su duración es mayor que los que existen hasta la fecha.

Palabras clave: Nanobiosensor de Glucosa, Punta de Fibra Óptica, Ácido Fenil Borónico (PBA), Hidrocloruro de Polialilamina (PAH), Autoensamblado Electroestático Monocapa (ESA).

ABSTRACT:

In this work the development of an optical fiber glucose sensor based in Electrostatic Self Assembly technique using phenylboronic acid as glucose's related molecule is shown. Two important characteristics of this sensor are the response time, which is located between 2-6 seconds and the range of detection, which goes from 1mM to 1M, although it is possible to increase the sensivity by adjusting some parameters of the deposition. The main advantage of this device is the fact of not using biological substances to detect, since its life time is higher than others which exist nowadays.

Key words: Glucose Nanobiosensor, Tip of an Optical Fiber, Phenylboronic Acid (PBA), Poly(allylamine) Hydrochloride (PAH), Electrostatic Self Assembly (ESA).

REFERENCIAS Y ENLACES

- [1] T. D. Chung, R. A. Jeong, S. K. Kang, H. C. Kim, "Reproducible fabrication of miniaturized glucose sensors: preparation of sensing membranes for continuous monitoring", *Biosens. Bioelectron.* **16**, 1079–1087 (2001).
- [2] S. Kabilan, J. Blyth, M. C. Lee, A. J. Marshall, A. Hussain., X.-P. Yang, C. R. Lowe, "Glucose-sensitive holographic sensors", *J. Mol. Recognit.* **17**, 162–166 (2004).
- [3] J. Wang, "In vivo glucose monitoring: Towards 'Sense and Act' feedback-loop individualized medical systems", *Talanta* **75**, 636–641 (2008).
- [4] C. T. S. Ching, P. Connolly, "A novel diffusion cell ideal for the study of membrane extraction/permeation processes and for device/sensor development", *Sensor. Actuat. B-Chem.* **129**, 30–34 (2008).

- [5] Y. I. Kima, T. S. Park, J. H. Kanga, M. C. Lee, J. T. Kimb, J. H. Park, H. K. Baik, "Biosensors for label free detection based on RF and MEMS technology", *Sensor. Actuat. B-Chem.* **119**, 592–599 (2006).
- [6] I. del Villar, I. R. Matías, F. J. Arregui, J. M. Corres, "Fiber optic glucose biosensor", *Opt. Eng.* **45**, 104401 (2006).
- [7] S. Takahashi, J.-I. Anzai, "Phenylboronic acid monolayer-modified electrodes sensitive to sugars", *Langmuir*, **21**, 5102-5107 (2005).
- [8] S.-B. Zhang, L.-Y. Chu, D. Xuly, J. Zhangl, X.-J. Ju, R. Xie, "Poly(N-isopropylacrylamide)-based comb-type grafted hydrogel with rapid response to blood glucose concentration change at physiological temperature", *Polym. Advan. Technol.* **19**, 937–943 (2008).
- [9] T. Kawanishi, M. A. Romey, P. C. Zhu, M. Z. Holody, S. Shinkai, "A study of boronic acid based fluorescent glucose sensors", *J. Fluoresc.* **14**, 499-512 (2004).
- [10] B. G. de Geest, A. M. Jonas, J. Demeester, S. C. de Smedt, "Glucose – responsive polyelectrolyte capsules", *Langmuir* **22**, 5070-5074 (2006).
- [11] I. del Villar, I. R. Matías, F. J. Arregui, R. O. Claus, "Fiber-optic hydrogen peroxide nanosensor", *IEEE Sens. J.* **5**, 365-371 (2005).
- [12] F. J. Arregui, K. L. Cooper, Y. Liu, I. R. Matías, R. O. Claus, "Optical fiber humidity sensor with a fast response time using the ionic self-assembly method", *IEICE T. Electron.* **E83-C**, 360-364 (2000).
- [13] F. J. Arregui, I. R. Matías, K. L. Cooper, R. O. Claus, "Simultaneous measurement of humidity and temperature by combining a reflective intensity-based optical fiber sensor and a fiber Bragg grating", *IEEE Sens. J.* **2**, 482-487 (2002).
- [14] F. J. Arregui, R. O. Claus, K. L. Cooper, C. Fernández-Valdivieso, I. R. Matías, "Optical fiber gas sensor based on self-assembled gratings", *J. Lightwave Technol.* **19**, 1932-1937 (2001).
- [15] F. J. Arregui, I. R. Matías, Y. Liu, K. L. Cooper, R. O. Claus, "Optical fiber nanometer-scale Fabry–Perot interferometer formed by the ionic self-assembly monolayer process", *Opt. Lett.* **24**, 596-598 (1999).
- [16] J. M. Corres, F. J. Arregui, I. R. Matías, "Design of humidity sensors based on tapered optical fibers", *J. Lightwave Technol.* **24**, 4329-4336 (2006).
- [17] A. B. Socorro, J. M. Corres, I. R. Matías, F. J. Arregui, C. Bariáin, "Caracterización de nanofilms basados en ácido fénil borónico depositados en el extremo de una fibra óptica para la monitorización continua de glucosa", Libro de Actas de la *VI Reunión Española de Optoelectrónica - Optoel'09*, pp. 515-519, Málaga (2009)

1. Introducción

La detección de glucosa es un campo que ha tenido desde siempre un tratamiento privilegiado, ya que existen numerosos artículos escritos al respecto [1-6] y muchas maneras de caracterizar la concentración de esta sustancia, ya sea en el ámbito de la biología, como en el de la medicina o el de la alimentación.

La glucosa, en cualquiera de sus variantes, es la molécula de más presencia en los procesos biológicos, puesto que es la fuente de energía básica de las células. De todas sus propiedades, para este trabajo interesaba el hecho de que, en disolución, se desprende de los iones OH⁻ haciendo que pueda unirse a otras moléculas que quieran neutralizarse porque son de signo contrario. Precisamente en este punto, es donde se ha incidido para realizar la detección de glucosa mediante un sensor de fibra óptica.

Por otro lado, el ácido fenilborónico (en adelante, PBA) se usa en numerosas aplicaciones que tengan que ver con la formación de enlaces covalentes con polialcoholes, como por ejemplo, la glucosa [7-9]. De acuerdo con Fig. 1, en una disolución acuosa de PBA [10] coexisten, en equilibrio, moléculas neutras con moléculas cargadas negativamente. Pero cuando se añaden moléculas positivas, por ejemplo, polialcoholes en disolución, el equilibrio se desplaza hacia el predominio de moléculas enlazadas con estos, con lo que se puede aprovechar esta propiedad para detectar la concentración de glucosa.

A la vista de esta ecuación de equilibrio, es lógico pensar que si se somete al PBA a pHs altos (mayores que 7), se conseguirá una gran cantidad de moléculas negativas que puedan unirse a otras moléculas positivas. Además de esto, en disolución coexistirán con moléculas cargadas negativamente, cosa que es interesante a la hora de detectar la glucosa.

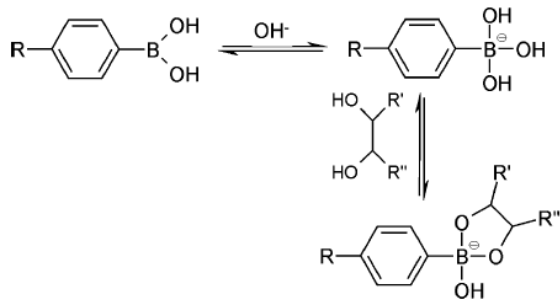


Fig. 1. Equilibrio del PBA en disolución y en presencia de polialcoholes.

El método que se eligió para construir la nanocavidad detectora fue el Autoensamblado Electroestático Monocapa (ESA). Gracias a esta técnica, se pueden construir nanocavidades del tipo Fabry-Perot (aunque sería más adecuado llamarles del tipo Fizeau) a partir de la atracción electrostática de capas de materiales cargados de manera opuesta sobre un sustrato, tal y como se muestra en [11-15]. Este sustrato puede ser cerámica, metal, lentes o polímeros de diversos tipos. En este caso, se empleó fibra óptica, previamente cortada, limpia y adecuadamente tratada, ya que presenta propiedades muy buenas para la detección, como la inmunidad ante las interferencias electromagnéticas y unas dimensiones reducidas.

Los pasos a seguir para fabricar la nanocavidad sensible en el extremo de la fibra fueron los siguientes, tal y como se muestra en Fig. 2. En primer lugar, se dio un baño de disolución piraña al extremo de la fibra sobre la que se iba a depositar esta cavidad (66.66% de H₂SO₄ y 33.33% de H₂O₂) de 10 minutos. Tras ello se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con agua ultrapura y así se consiguió un sustrato cargado negativamente. Seguidamente, se sumergió la fibra en una disolución de policación durante 2 minutos, se lavó durante 1 minuto con agua ultrapura para retirar las moléculas que no se habían adherido, se sumergió en una disolución de polianión durante 2 minutos y se volvió a lavar con agua ultrapura. Este proceso de policación - polianión se realizó 30 veces para conseguir un espesor de 30 bicapas (una bicapa es un par positivo - negativo). De esta forma, se crearía una cavidad interferométrica de doble haz, con un espesor de cientos de nanómetros en la punta de la fibra que, en función de dicho espesor y de su índice de refracción, reflejaría más o menos potencia según la concentración de glucosa que se adhiriera a las paredes de PBA, pudiendo, a partir

de ahí, producirse la detección del compuesto, tal y como se explica en [16].

Aunque existe un gran número de sensores basados en diferentes combinaciones del PBA con otras moléculas complejas y sobre sustratos previamente tratados con las más sofisticadas técnicas, en este trabajo se propone una forma sencilla de detectar glucosa, simplemente construyendo en la punta de una fibra óptica una nanocavidad cuyas propiedades ópticas varían en presencia de esta sustancia [17].

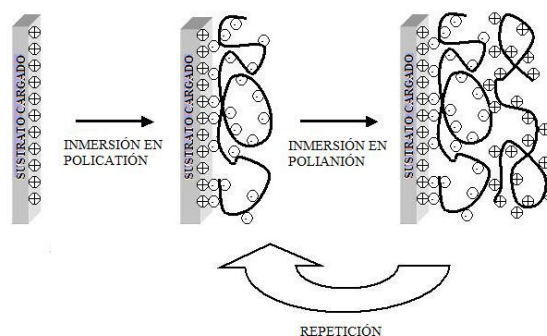


Fig. 2. Método de deposición ESA seguido para la creación de la nanocavidad en la punta de la fibra.

2. Medidas experimentales

2.1. Agentes químicos

Para estos experimentos se usaron, como parte positiva, PAH, y como parte negativa, PBA y ácido poliacrílico (en adelante PAA), todos de Sigma.

Se realizaron 3 sensores, los cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla I
Distintas unidades sensoras.

SENSOR	POLICACIÓN	POLIANIÓN
A	PAH (pH 9) 10mM	PBA (pH 9) 100mM
B	PAH (pH 7.4) 10mM	(PAA 2.5ml/100ml + PBA 50mM) (pH 7.4)
C	PAH (pH 4) 10mM	PBA (pH 9) 10mM

En todos los casos, para ajustar los pHs se empleó ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH).

2.2. Instrumentación

A la hora de medir tanto las curvas de construcción, como la detección de glucosa, las medidas de potencia se realizaron con unos emisores-receptores de luz de Nanosonic (es la caja con el LED verde encendido en la Fig. 3) a cuyo terminal emisor se conectaba la fibra depositada y a cuyo terminal receptor se conectaba un adquisidor de datos de Agilent, para luego pasar al software que lo procesara.

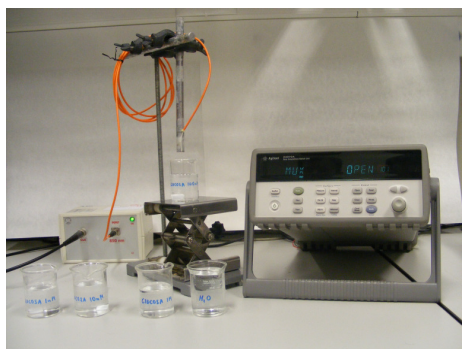


Fig. 3. Montaje experimental para la detección de la potencia óptica reflejada

2.3. Método de detección

Para detectar la glucosa, se comenzó limpiando la fibra con agua ultrapura. Tras ello, se sumergió en las correspondientes disoluciones de glucosa a diferentes concentraciones, intercalando entre ellas lavados con agua ultrapura y dejándola secar tras cada proceso de inmersión, con el fin de ver la reacción del sensor tanto en seco como, principalmente, en húmedo.

En cuanto a la medida de la potencia óptica, con la fibra depositada sumergida, se fue aumentando la concentración de las disoluciones de glucosa desde 1mM hasta 1M y luego se fue disminuyendo. En las figuras 3 y 4 se muestra el montaje experimental empleado en la realización de las pruebas.

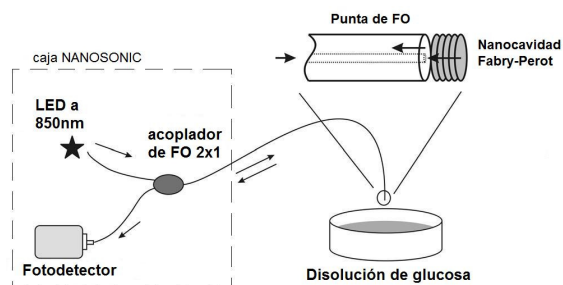


Fig. 4. Montaje experimental. Detalle del interior de las cajas Nanosonic.

3. Resultados y discusión

A continuación se muestran los resultados de acuerdo con cada una de las deposiciones realizadas.

3.1. Curvas de construcción

En la Fig. 5 se muestran las curvas de construcción, en donde se recoge la potencia óptica reflejada según se van depositando las bicapas sensibles, hasta un total de 30, en el extremo de la fibra conforme se construye la nanocavidad interferométrica.

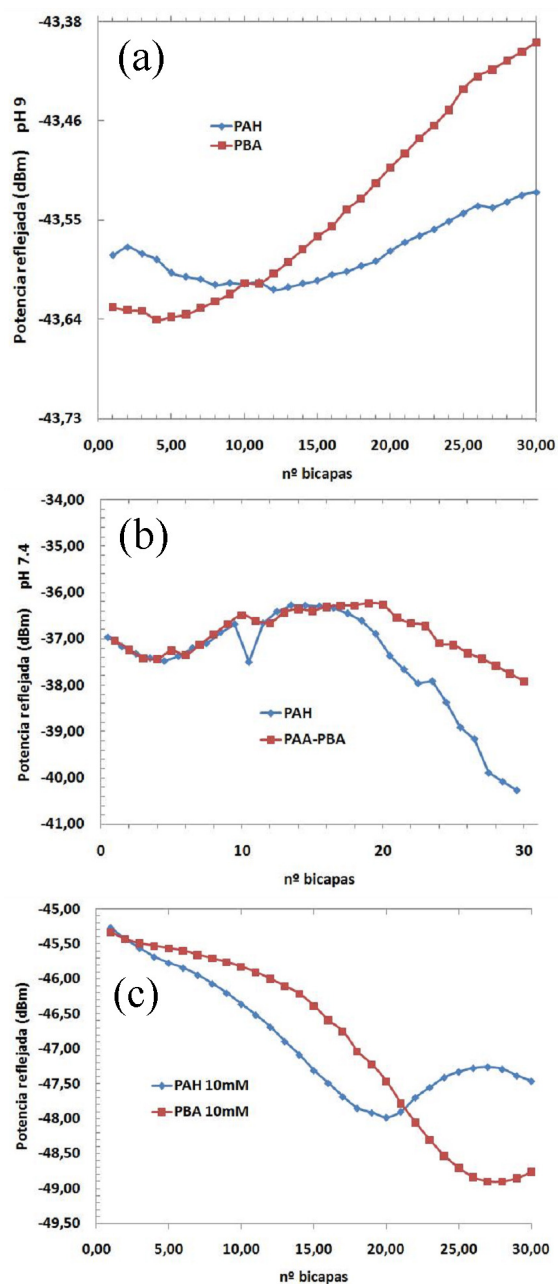


Fig. 5. Curvas de construcción para los sensores realizados A, B y C.

En todas ellas, la tendencia es senoidal (como es de esperar en una cavidad interferométrica de doble haz) conforme el número de bicapas va aumentando [16]. A diferencia de lo que ocurre en las unidades sensoras B y C, en donde las curvas caen del orden de 4.5 dB, en el primer caso las variaciones son de décimas de dB.

En la unidad sensora correspondiente a la deposición B, se puede ver cómo la potencia reflejada cuando se está adsorbiendo la monocapa positiva varía según lo esperado, no así con la deposición de las monocapas negativas. La explicación a esto puede ser que, probablemente, existen dos moléculas negativas diferentes (PAA y PBA) compitiendo por enlazarse con las positivas (PAH), haciendo que la tasa de deposición del material sensible (PBA) disminuya. Sin embargo, el hecho de haber introducido el polianión PAA que es muy afín al polianión PAH, hace que se construya de manera clara la nanocavidad.

En el caso de la unidad sensora correspondiente a la deposición C, construida a pHs 4 y 9 respectivamente, se observa una construcción mejor en cuanto a rango de potencia reflejada y en cuanto a uniformidad en la tendencia senoidal. De los 3 sensores propuestos, éste es el mejor desde el punto de vista de la construcción. El hecho de haber ajustado los pHs de las disoluciones de manera que cada poli-ión esté dispuesto a neutralizarse con otro de signo opuesto, ha generado unos buenos enlaces que, a su vez, repercute en la construcción de la propia unidad sensora.

3.2. Sensibilidad de potencia y tiempos de respuesta

Tras realizar las pruebas de variación de la potencia óptica reflejada en función de la concentración de

glucosa en disolución, se obtuvo el gráfico que se muestra en la Fig. 6. Todas las medidas se han referenciado con respecto al caso de una fibra óptica sin depositar.

Se observa cómo la potencia varía de forma distinta en cada una de las tres unidades sensoras fabricadas. Cuando se trata de detectar concentraciones bajas de glucosa, la unidad sensora correspondiente a la nanocavidad fabricada siguiendo el proceso marcado como A en la tabla I (sensor A en la Fig. 6), es el más adecuado. Por el contrario, en el sensor B es el que tiene el mayor rango, llegando hasta 0.7 dB.

En cuanto a los tiempos de respuesta, el sensor B es el que muestra tiempos de respuesta más homogéneos, independientemente de la concentración de glucosa. Dicha respuesta puede apreciarse en la Fig. 7. El resto de tiempos de los demás sensores son muy similares. La unidad sensora cuyos tiempos de respuesta oscilan más en función de la concentración de glucosa es la C, en un rango entre 3 y 6 segundos. Esto posibilita que, a la hora de detectar la concentración de glucosa, se tenga en cuenta este factor adicional además de la potencia óptica reflejada. Sin embargo, por el momento, la unidad optoelectrónica que se ha utilizado para recuperar la información de las unidades sensoras se basa simplemente en la potencia óptica recibida, lo que simplifica mucho su diseño.

Se observa, así mismo, en la Fig. 7, que los transitorios se estabilizan más rápido cuando se aumenta la concentración que cuando se disminuye. En torno a 3 o 4 décimas de segundo más que en el caso de la fibra óptica sin depositar.

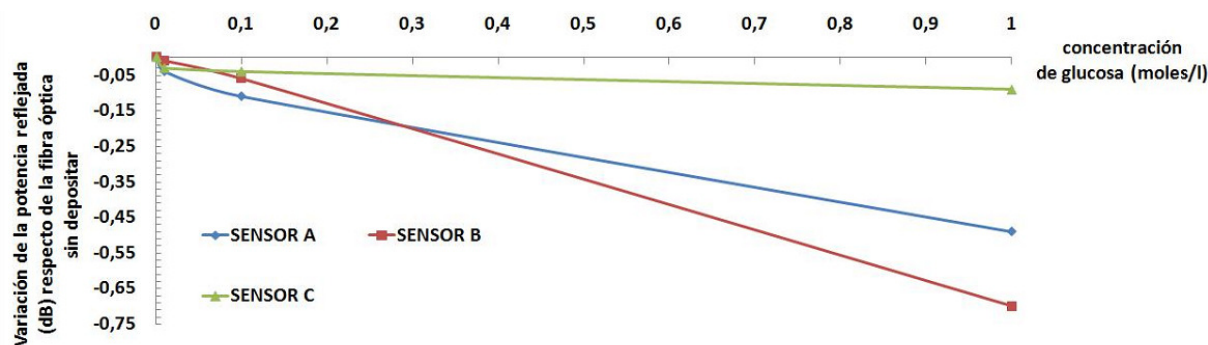


Fig. 6. Comparación de sensibilidad para las 3 unidades sensoras construidas.

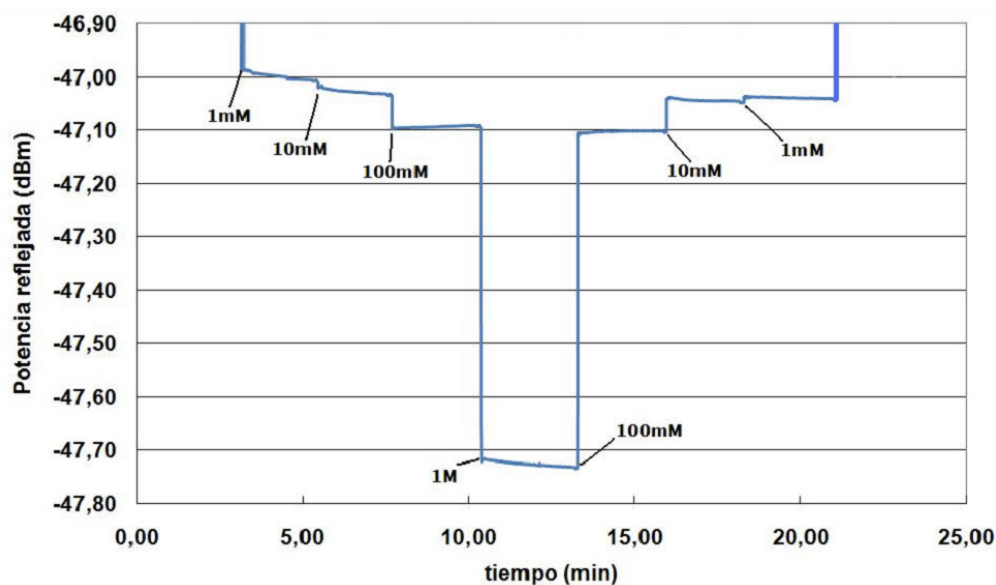


Fig. 7. Detección de glucosa del sensor B. Los tiempos de respuesta oscilan entre 2.5 y 3.5 segundos. El perfil de la potencia reflejada es similar en los otros dos sensores.

4. Conclusión

De todos los experimentos realizados hasta el momento, se ha comprobado que no hace falta conseguir unas construcciones necesariamente perfectas para que las unidades sensoras detecten mejor la potencia reflejada cuando son sumergidas en disoluciones de glucosa. La razón de esto puede encontrarse en el hecho de que el material sensible (PBA) se deposita de una forma totalmente irregular sobre la superficie del extremo de la fibra óptica, formando zonas sensibles o “islas” con gran concentración de PBA.

Desde otro punto de vista, puede decirse que, según el punto de la forma de onda en el que se haya finalizado la deposición, habrá más o menos tendencia a detectar mejor la glucosa. Así, si se finaliza en los extremos de la senoide, la variación de la potencia en función del número de bicapas es menor que si se finaliza en los flancos, puesto que, en este caso, la tendencia a captar una mayor variación de la potencia es mayor.

El rango de concentraciones detectables se encuentra entre 10mM y 1M, aunque se está trabajando para conseguir aumentar la sensibilidad en el rango 1mM-10mM con el fin de encontrar aplicación en medicina, a la hora de detectar enfermedades como la diabetes. Los tiempos de respuesta se sitúan en torno a los 2 – 6 segundos.

Por el momento no se puede asegurar la repetitividad de estos sensores y, por tanto, se sigue investigando en la mejora de la construcción manteniendo las propiedades de detección que puede proporcionar el PBA.

Agradecimientos

A IDEN Biotechnology, S.L. por su apoyo en la realización de este trabajo.