

Monografía vinculada a la conferencia del Ing. Quím. Juan Bussi sobre Biosensores del 9 de marzo de 2004

Biosensores Implantables para la monitorización de Glucosa in vivo: principio de funcionamiento y dificultad de implementación.

Resumen— Este trabajo trata sobre los Biosensores Implantables. Se presenta el principio de funcionamiento de los Biosensores en general y los diferentes transductores que se utilizan. Se presentan dos tipos de Biosensores implantables, uno que mide el nivel de glucosa a partir de las lágrimas, teniendo este sensor características muy buenas de flexibilidad y de biocompatibilidad. El otro Biosensor es del tipo de aguja que no solo mide la glucosa sino que también el colesterol, con un bloque integrado de transmisión inalámbrica para los datos recabados por el sensor. Se muestran las características y detalles constructivos de estos sensores.

Términos clave—Biosensores, Transductores, Implantable, Monitorización de Glucosa.

I. INTRODUCCION

Un Biosensor es un dispositivo integrado y autocontenido que es capaz de proveer información analítica de forma cuantitativa usando un elemento biológico de reconocimiento (Bioreceptor) el cual se encuentra en contacto con un transductor para acondicionar la información a una señal medible.

El Bioreceptor transfiere la información del medio bioquímico, usualmente una concentración de cierto analito en una salida química o física. El propósito principal de este es proveer al Biosensor un alto grado de selectividad para el analito que de desea medir.

El transductor transfiere la señal de dominio de la salida del Bioreceptor al dominio deseado. Los transductores que tienen como salida una señal eléctrica se llaman transductores electroquímicos. Estos transductores son los que se utilizan comúnmente y se pueden clasificar en: Potenciométricos, Amperométricos, entre otros.

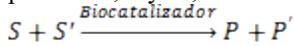
Los transductores Potenciométricos [1] están basados en electrodos selectivos de iones. Estos electrodos son capaces de medir de forma selectiva la actividad de una especie de iones en particular. En la configuración clásica, se utilizan dos electrodos uno de detección y otro de referencia. El electrodo de detección tiene su potencial dado por el entorno donde se encuentra, es decir, ese potencial está dado por la actividad de los iones a los cuales este electrodo es permeable. El otro electrodo, el de referencia, se encuentra en una solución que contiene al ion de interés en una actividad constante, fijando

de esta forma el potencial del electrodo. Dado que el potencial en el electrodo de referencia es constante, el valor de la diferencia de potencial puede relacionarse con la concentración de iones disueltos en el entorno donde se encuentra el electrodo de detección. Uno de los problemas típicos de estos transductores se da en los cambios de potencial en la unión entre el electrodo de referencia y el de detección, además de la deriva interna del electrodo de referencia y las fluctuaciones de temperatura en la muestra. Otra fuente de error puede darse por la deriva de la membrana selectiva de iones afectando de esta forma la sensibilidad y selectividad. Entre las ventajas que ofrecen de estos electrodos podemos encontrar la fácil instrumentación, la medición de la actividad iónica, respuesta gráfica y la capacidad de medir muchos iones.

El transductor Amperométrico [1], consta de dos electrodos en la muestra: un ánodo donde se produce la oxidación y un cátodo donde ocurre la reducción. Aplicando un potencial adecuado a cada uno de los electrodos causa la oxidación o reducción del analito, resultando una corriente proporcional a la concentración del analito. La corriente medida no solo depende de la concentración del analito, sino también del potencial aplicado en los electrodos y del tamaño físico del mismo y su configuración. La corriente es limitada según cuán rápido el analito se puede difundir sobre la superficie del electrodo. Por eso el factor físico puede afectar la performance del dispositivo. Temperatura, flujo, grosos y porosidad de la membrana así como su "ensuciamiento" son otros de los factores que pueden afectar la corriente a medir. La inherente selectividad de estos transductores es bastante pobre, debido que está gobernada por que tan bien se parece el potencial aplicado a los electrodos al potencial redox. Como la reacción redox no ocurre a potenciales discretos sino en un rango continuo de voltajes, es posible que algunas reacciones ocurran al mismo tiempo. Por lo tanto, la corriente a medir puede tener contribución de otras especies químicas [2].

Muchos Biosensores son basados en una reacción catalizada por macromoléculas. Un consumo continuo del substrato es logrado por el biocatalizador inmovilizado en el Biosensor. Tres tipos de Biocatalizadores son comúnmente utilizados: enzimas (los más usados), células u organelos y tejidos. Los Biosensores basados en la biocatalización son los más utilizados y estudiados por eso nos concentraremos en ellos. Dentro de ellos, son numerosas las ventajas que presentan las

enzimas para su utilización en los Biosensores, entre ellas su elevada selectividad y capacidad de respuesta rápida, la simplicidad de la configuración de los prototipos, su capacidad de auto-regenerarse y su extensa disponibilidad comercial. Uno o más analitos, llamados normalmente substratos, S y S', reaccionan en presencia del biocatalizador, obteniéndose los productos, P y P', como se muestra.



Hay cuatro estrategias que usan transductores adyacentes para monitorear la consumición del substrato S por la reacción biocatalizada.

Primera, detección de la consumición del co-substrato S'. Segunda, el reciclado de P, uno de los productos de la reacción. Tercera, detección del estado de del biocatalizador en presencia del substrato S, usando un mediador inmovilizado el cual reaccione suficientemente rápido con el biocatalizador y sea de fácil detección para el transductor. Cuarta, la transferencia directa de electrones entra la enzima y el transductor electroquímico.

Se muestra a continuación en la Figura 1 en forma esquemática como es un Biosensor a grandes rasgos.

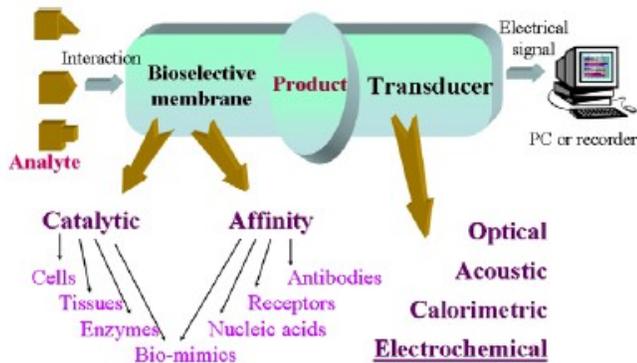
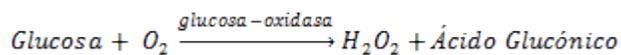


Figura 1 - Representación esquemática de un Biosensor

II. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DE LOS BIOSENSORES DE GLUCOSA

Estos Biosensores usan como Bioreceptor la enzima glucosa-oxidasa. Como se dijo anteriormente esta enzima es la encargada de catalizar la siguiente reacción



Se encuentra tres tipos de transductores que pueden ser utilizados para medir la concentración de glucosa.

Los sensores de peróxido, estos sensores proporcionan una corriente en función de la concentración de peróxido.

Sensores de oxígeno, al igual que el sensor de peróxido proporcionan una corriente en función de la concentración.

Por último están los de pH que miden la producción de ácido glucónico, convirtiendo el cambio de pH en una diferencia de potencial.

Como se puede observar los dos primeros son transductores Amperométricos y el segundo Potenciométrico.

III. BIOSENSORES IMPLANTABLES

Para el tratamiento de la diabetes sería una verdadera innovación y totalmente revolucionaria lograr una implementación exitosa de un páncreas artificial. Para lograrlo es necesario tener de forma frecuente o preferentemente medidas continua del nivel de glucosa.

Un sistema de medición de glucosa implantable es visto como un componente clave en el desarrollo de un dispositivo exitoso para el tratamiento de esta afección. Desafortunadamente, el desarrollo de sistemas de medición in vivo no son para nada sencillos. Hay numerosos problemas a resolver, donde se pueden encontrar, la sensibilidad, la selectividad, interferencia, resolución temporal, la degradación del mismo, su biocompatibilidad, entre otros problemas [3].

La sensibilidad requerida por el Bioreceptor para un analito está determinada en la concentración de este analito en el entorno donde se quiere medir. Una forma de mejorar la sensibilidad es cambiando la superficie del electrodo. Sin embargo esta estrategia además de aumentar la sensibilidad del sensor también aumenta la vulnerabilidad a las interferencias debido a que al aumentar la superficie aumenta la probabilidad de absorción de especies activas no deseadas.

La selectividad para los Biosensores es ganada gracias al empleo elementos moleculares de reconocimiento, por lo general son usadas las enzimas debido a sus características previamente mencionadas.

Interferencias sobre la medida, este factor de error se da sobre todo cuando se usa transductores del tipo Amperométricos. Este problema surge debido a que se necesita poner a un potencial determinado los electrodos, haciendo que pequeñas variaciones de este potencial hagan reaccionar a otras especies químicas afectando de esta forma la medida, ya que estas reacciones contribuirán en la corriente medida.

La resolución temporal no es un problema menor, ya que si se tiene una bastante buena se puede detectar eventos de mucha importancia. Una respuesta lenta del Biosensor nos dará un promedio de los eventos ocurridos. Las dimensiones del sensor tienen un impacto muy importante en su respuesta temporal, un electrodo de mayor superficie tendrá una respuesta mucho más rápida pero con los inconvenientes aparejados a la superficie y tamaño del Bioreceptor.

Un gran problema que tienen estos sensores son los de biocompatibilidad, la función del sensor es dar un reflejo fiable de la concentración del analito, las interacciones mutuas del sensor y el medio biológico no deben afectar los resultados. Para las mediciones in vivo, el dispositivo implantable perturba su entorno y inicia una respuesta de este. Estas respuestas del entorno afectan de gran forma la sensibilidad del Biosensor. Los problemas más grandes de biocompatibilidad se puede separar en dos, la respuesta fisiológica al objeto extraño y la degradación del sensor. La respuesta al cuerpo extraño comienza con la inflamación.

La inflamación ocurre inmediatamente luego de haber sido implantado el sensor. Durante la esta respuesta inicial, sustancias y células migran hacia la zona del objeto extraño. Afectando de esta forma el entorno y además de la reacción de las células fagocitantes para destruir el Biosensor.

Este daño al implantar el sensor puede afectar los resultados de dos maneras diferentes: en primer lugar, las células dañadas

pueden no ser capaces de realizar sus funciones normales, y por lo tanto afectan los niveles de analito y en segundo lugar, si uno mide las especies químicas como la glucosa, la respuesta del sensor puede verse afectada por aumento del consumo glucosa derivado del proceso de cicatrización de la herida, los cuales pueden perturbar la respuesta del sensor.

Por último se tiene la que tener en cuenta la degradación del Biosensor, en investigaciones se detectado que estos son degradados por los efectos de la inflamación. Se han hecho prueba de biosensores implantándolos en perros para el estudio de este fenómeno. Algunos de estos los tres meses se constatan rajaduras y agujeros en las membranas protectoras afectando de esta forma la sensibilidad del sensor, su respuesta lineal y un aumento a la sensibilidad de moléculas interferentes. Muchos investigadores coinciden que no es un problema de fácil resolución y un mejoría de estos haría que los Biosensores implantables sean más populares.

Presentados los problemas de implantación que tienen se mostraran a continuación algunos Biosensores implantables mostrando sus características y funcionalidades.

IV. BIOSENSOR DE GLUCOSA EN LÁGRIMAS

Este Biosensor surge de las tendencias en las investigaciones sobre el monitoreo de continuo de los niveles de glucosa. Lo que se intenta es llegar a que se pueda monitorear el nivel de glucosa in vivo y que esto no interfiera en la vida cotidiana del paciente.

Para saber el nivel de glucosa del paciente no es necesario medir directamente en la sangre, sino medir los niveles de glucosa en otros fluidos biológicos, tales como las lágrimas, el moco, el sudor o la saliva.

Existe una correlación entre el nivel de glucosa en sangre y el nivel de esta en las lágrimas. Se sabe también que este nivel cambia en las lágrimas alrededor de cinco minutos después que lo hace en sangre. Este sensor surge del intento de medir ese nivel de glucosa y de poder implantarlo en la cuenca ocular [4]. Las innovaciones más significativas de este Biosensor son su flexibilidad y su biocompatibilidad. En particular, el polímero de fosfolípidos, lo que es la llamada polímero MPC, se utilizó para la región de detección. El polímero MPC tiene una configuración molecular, que es similar a una membrana celular, de ahí se debe su biocompatibilidad.

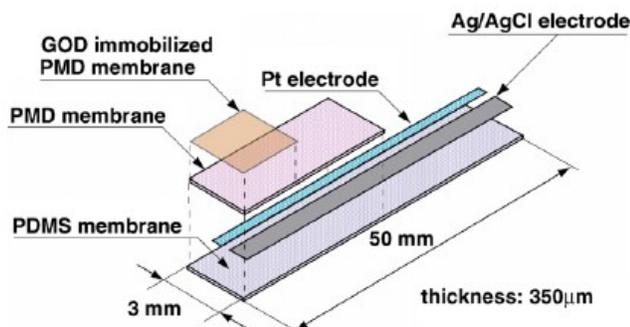


Figura 2 – Figura esquemática de la estructura del sensor de glucosa flexible usando el polímero MPC

Se puede ver en la figura 1 como es constructivamente el Biosensor. El sensor se puede estirar. El sensor puede ser operado normalmente luego de expandirse a un 120% más largo que su longitud normal. Se ajusta a la forma redondeada del cuerpo humano y la superficie del sensor es absorbente. Los electrodos no se colapsan cuando se dobla el Biosensor. El proceso de fabricación del Biosensor flexible se divide en dos partes. Uno es la formación de electrodos utilizando un proceso de microfabricación y la otra es la formación de "estructura y funciones" apilando capas funcionales del polímero. Estos polímeros funcionales no sólo la constituyen la "estructura" del sensor, sino también determinan la "función" del sensor. En resumen, estos polímeros proveen permeabilidad gaseosa, biocompatibilidad, sensibilidad a la glucosa y la flexibilidad. Aparte de las características físicas del Biosensor se tienen las siguientes características como sensor. La corriente de salida del peróxido de hidrógeno del electrodo relaciona linealmente con la concentración de peróxido de hidrógeno en un rango de 0.20-2.00 mmol/l. El tiempo de respuesta al 90% fue de 5,9 s. Como resultado de la medición de la glucosa en PBS (pH 7,0, 50 mmol / l), la corriente de salida del sensor de relaciona el nivel de glucosa en un rango de 0.06-2.00 mmol/l, con un coeficiente de correlación de 0,997. El rango de calibración para una solución de glucosa incluye la rotura de la concentración de glucosa en sujetos normales (0,14 mmol / l).

Los investigadores que han desarrollado este sensor actualmente se encuentran desarrollando un sensor de oxígeno con similares características que este (flexibilidad y biocompatibilidad) y analizando la forma de instrumentar de forma práctica este Biosensor.

V. BIOSENSOR DE TIPO AGUJA CON UN CIRCUITO RF WIRELESS INTEGRADO

En esta sección se presenta un Biosensor implantable multifuncional (capaz de medir tanto glucosa y colesterol) de tipo aguja con un circuito RF wireless integrado para monitoreo continuo in vivo [5].

Primero se describirá el mecanismo de sensado del Biosensor. La figura 2 muestra el diseño de la micro aguja de cuatro electrodos sobre un sustrato de silicio, los dos electrodos de sensado son de platino (Pt), uno más de Pt como electrodo de contraste y por último un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Se utilizan transductores Amperométricos para los dos analitos.

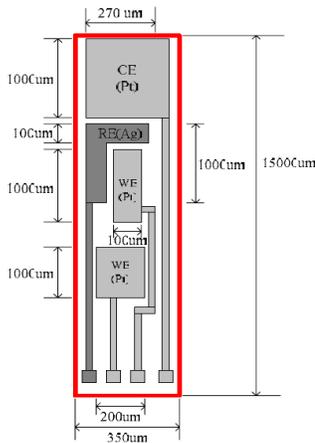


Figura 3 – Sensor subcutáneo de micro aguja

Se diseña e implementa un circuito pre-amplificador, el cual incluye características de baja tensión de offset y bajo consumo.

En la figura 4 se muestra un diagrama de bloques del dispositivo de transmisión, que consiste en los bloques funcionales donde podemos encontrar, un transmisor ASK que contiene un oscilador de clase C, un convertor analógico digital de aproximaciones sucesivas de 7 bits, un circuito que pase la información digital de paralelo a serial y un amplificador de trans-impedancia.

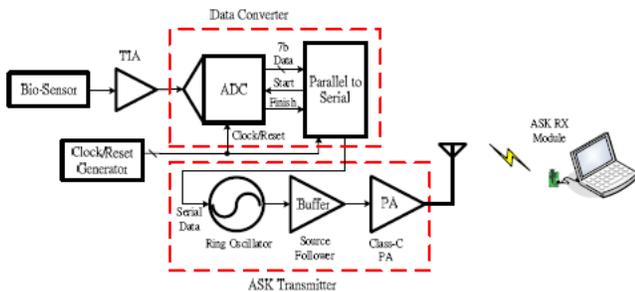


Figura 4 – Diagrama de bloques del sistema de transmisión

Para que el Biosensor sea lo menos invasivo posible se debe tener realmente cuidado a la hora de elegir los materiales y de los métodos de fabricación para lograr una respuesta predecible tanto in vitro como in vivo. El micro dispositivo se diseña para aplicaciones multi-enzimáticas (se desea censar tanto glucosa como colesterol) con forma de micro aguja para la inserción en los vasos sanguíneos. En la figura 5 se muestra como es el proceso de fabricación.



Figura 5 – Proceso de Fabricación de la micro aguja

En el primer paso se sobre una oblea de silicio de $1.4\mu m$ se ponen los electrodos de Pt con un espesor de 500\AA y un electrd de Ag de 1000\AA de espesor. Luego se coloca una capa de $10\mu m$ de parileno para proteger los electrodos. Y Finalmente una capa de polipirrol para modificar la superficie e inmovilización de enzimas en la superficie del sensor. El amplificador de transimpedancia (TIA) convierte las corrientes de oxidación en señales de voltajes. El TIA usa sola fuente de alimentación de +3.3V y disipa menos de 10mW. Se utiliza Multiplexación por división de tiempo (TDM) para cambiar entre las diferentes corrientes de oxidación (una correspondiente a la medida de glucosa y otra a la medida de colesterol). Cada señal de corriente está asociada solamente a su “time slots”. El bloque TIA-TDM y la micro aguja se muestran en la figura 6

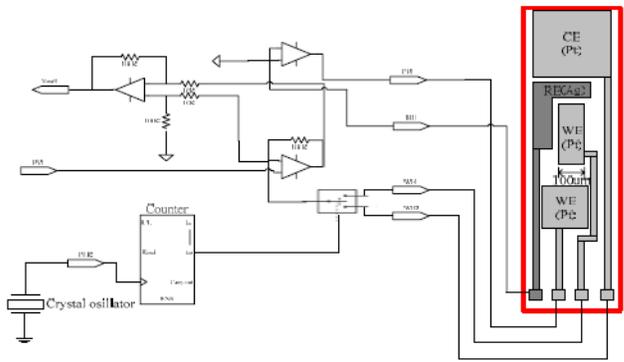


Figura 6 – TIA-TDM y sensor de micro aguja

La figura 4 muestra el diagrama de bloques del sistema de wireless, que consiste en un chip de transmisión ASK, un convertor ADC de 7bits y un circuito de paralelo a serie. El convertor consume alrededor de 3.3mW a 3.3V de tensión de alimentación y una frecuencia de muestreo por encima de 374k bps. La portadora del transmisor ASK es 433MHz en banda ISM y un consumo de 26mW a 2.16V.

En la figura 7 se muestran prototipos de estos Biosensores.

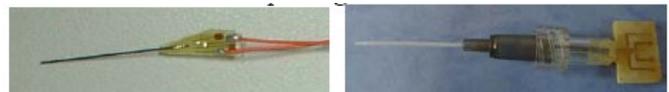


Figura 7 – Prototipos de los sensores de micro aguja

Los rangos de medida este Biosensor se dependen de las curvas de calibración que muestra en la figura 8.

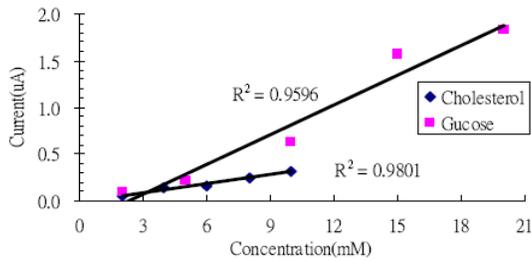


Figura 8 – Medidas de Clucosa y Colesterol.

Se puede observar de estos resultados que este Biosensor tiene una buena exactitud y por los test que se le han realizado por parte de sus desarrolladores una buena estabilidad.

VI. CONCLUSIONES

Se presentaron dos Biosensores implantables sus aspectos constructivos y principio de funcionamiento de estos. También se presentaron problemas que surgen al intentar implantar el Biosensor en el entrono de estudio, aparte de otros aspectos que se deben resolver para lograr un sensor útil y con buenas características.

VII. BIBLIOGRAFIA

- [1] Continuous Ex Vivo and in Vivo Monitoring with Chemical Sensors, Eric J. Fogt. Clin. Chem. 36/8, 1990.
- [2] Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, D. Theavenot, K. Toth, R. Durst, G. Wilson. Pure Appl. Chem., Vol. 71, No. 12, pp. 2333±2348, 1999.
- [3] Biosensors for real-time in vivo measurements. George S. Wilson, Raeann Gifford, Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 2388–2403.
- [4] A flexible and wearable glucose sensor based on functional polymers with Soft-MEMS techniques, H. Kudo, T. Sawada, E. Kazawa, H. Yoshida, Y. Iwasaki, K. Mitsubayashi. Biosensors and Bioelectronics 22 (2006) 558–562
- [5] An Implantable Multifunctional Needle Type Biosensor with Integrated RF Capability, Nan-Fu Chiu, Jmin-Min Wang, Cheng-Wei Liao, Chun-Hao Chen, Hsiao-Chin Chen, Lung-Jieh Yang, Shey-Shi Lu, Chii-Wann Lin, Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference, Shanghai, China, September 1-4, 2005.

Martín Cáceres Real nació en Tacuarembó el 28 de diciembre de 1987. Actualmente se encuentra cursando el noveno semestre de la carrera Ingeniería Eléctrica en la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la República Oriental del Uruguay.