



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL DE FI DE MÀSTER

BIOSENSORS "WEARABLE" DE PAPER PER DETECTAR BIOMARCADORS EN SUOR

Andreu Vaquer Vadell

Màster Universitari en Ciència i Tecnologia Química

(Especialitat/Itinerari de Química Biològica)

Centre d'Estudis de Postgrau

Any Acadèmic 2020-21

BIOSENSORS "WEARABLE" DE PAPER PER DETECTAR BIOMARCADORS EN SUOR

Andreu Vaquer Vadell

Treball de Fi de Màster

Centre d'Estudis de Postgrau

Universitat de les Illes Balears

Any Acadèmic 2020-21

Paraules clau del treball:

Biosensor, wearable, química bioanalítica, enzim, glucosa, lactat

Nom del tutor del treball: Roberto de la Rica Quesada

Agraïments

En primer lloc vull agrair tota l'ajuda i el recolzament que m'ha donat el meu tutor, Roberto de la Rica, que sempre ha sabut donar-me la motivació necessària per seguir treballant i aprenent.

També m'agradaria donar les gràcies als meus companys del Grup Multidisciplinar de Sèpsia de l'IdISBa. De manera especial a n'Enrique que, des d'un principi sempre m'ha ajudat amb tot i m'ha donat bons consells, però sense oblidar als altres companys i companyes del laboratori, n'Ale, na Cristina, na Giulia, en Toni, na Mar i n'Steven, que sempre em fan treure una rialla i m'han animat molt durant tots aquests mesos.

Ja a nivell més personal, voldria agrair a tota la meva família, sobretot als meus pares i a la meva padrina la paciència que han tingut durant aquests mesos i tota l'ajuda que m'han donat. També vull donar les gràcies a na Marga, per acompanyar-me en la vida i suportar els meus moments d'estrès durant aquests darrers mesos.

Per últim, m'agradaria fer una menció especial pel meu padrí, que ens va deixar fa un parell de mesos, el qual sempre em va recolzar en les meves decisions i que, per això li dedico aquest treball, perquè si ho pogués veure, segur que estaria orgullós.

Índex

Agraïments.....	5
Resum/ Abstract	9
1. Introducció	10
1.1. Biosensors: tendències actuals	10
1.2. POC: mesures en sang i necessitat de no invasives	11
1.3. Suor com a matriu biològica	12
1.4. Biosensors “wearable”	12
1.4.1. Paper com a material de suport	14
1.4.2. Microfluídica ens els biosensors wearable	14
1.4.3. Els biosensors enzimàtics	15
1.4.4. Amperometria o colorimetria	16
1.5. Mètodes de validació de biosensors.....	19
2. Objectius	21
3. Materials i mètodes.....	22
3.1. Materials.....	22
3.2. Mètodes.....	22
3.2.1. Fabricació del sensor lactat	22
3.2.2. Determinació de lactat en placa	23
3.2.3. Fabricació sensor glucosa.....	23
3.2.4. Fabricació del sensor de volum.....	24
3.2.5. Plataforma analítica: Lactat/glucosa + volum	24
4. Resultats	27
4.1. Sensor lactat.....	27
4.1.1. Calibrat	27
4.1.2. Correcció pel volum	29
4.1.3. Estimació dels nivells de lactat variant el volum de mostra	29
4.1.4. Validació en exercici.....	30
4.1.5. Selectivitat i interferències.....	32
4.2. Sensor de glucosa	34
4.2.1. Calibrat	34
4.2.2. Correcció de lluminositat i volum.....	35
4.2.3. Selectivitat i interferències.....	37
4.2.4. Validació en una rutina d'exercici.....	38
5. Conclusions	41
6. Annexes.....	42

Índex

7. Bibliografia 44

Abreviacions

PoC	Point of Care (punt d'atenció mèdica)
μPAD	Microfluidic Paper Analytical Devices (Dispositiu analític de microfluídica en paper)
PDMS	Poli(dimetilsiloxà)
AuNPs	Gold Nanoparticles (nanopartícules d'or)
HRP	Horseradish Peroxidase (peroxidasa del rave)
LOX	Lactat oxidasa
GOX	Glucosa oxidasa
TMB	2, 3', 5, 5'- Tetrametilbenzidina
PSS	Poli(estirensulfonat) de sodi
PBS	Phosphate-buffered saline (Tampó fosfat salí)
BSA	Bovine Serum Albumin (albúmina sèrica bovina)
SD	Standard deviation (desviació típica)

Resum/ Abstract

Els biosensors estan dissenyats per mesurar un analit amb alta especificitat mitjançant un element de reconeixement biològic o biomimètic d'origen biològic, ja sigui una molècula, un patògen o una cèl·lula. A més, hi ha una línia d'investigació molt important que desenvolupa biosensors Point of Care (PoC) que es puguin emprar en llocs amb pocs recursos i que no requereixin un laboratori clínic per dur a terme la mesura. Es poden aplicar a diferents matrius biològiques, com sang, orina, suor o saliva. Un tipus especial de dispositius PoC són els biosensors wearable que s'apliquen directament sobre la pell i permeten mesures en suor no invasives, sense un tractament previ de la mostra.

En aquest treball es presenta el disseny i la validació de dues plataformes analítiques diferents. La primera permet mesurar per colorimetria L-lactat i volum de suor i té un rang lineal modulable. Això ens permet mesurar lactat en el rang fisiològic (10 – 30 mM). Al mateix temps, el sensor de volum de suor basat en nanopartícules d'or ens permet saber el volum de mostra mesurant la distància recorreguda per les AuNPs. D'aquesta manera podem corregir la senyal obtinguda amb el biosensor de lactat pel volum de mostra. El segon dispositiu està compost per un biosensor colorimètric de glucosa i un sensor de volum de suor. El biosensor de glucosa presenta una alta sensibilitat (Límit de detecció, LOD: 0,01 mM) que ens permet detectar glucosa en el rang fisiològic en suor (0,03 – 0,1 mM). També es corregeix la senyal analítica pel volum de mostra mesurat amb el sensor de volum de suor.

Les dues plataformes analítiques presentades han estat validades aplicant-les en una rutina d'exercici en voluntaris sans i comparant les concentracions d'analit obtingudes amb un mètode de referència.

1. Introducció

1.1. Biosensors: tendències actuals

El primer concepte de biosensor va ser publicat l'any 1962 per Clark i Lyons¹. Demostrava la utilitat de l'elèctrode d'oxigen de Clark com a transductor per la detecció d'una reacció enzimàtica. Des d'aquell moment i fins a l'actualitat, s'han desenvolupat innumerables biosensors amb aplicacions en camps molt diferents, com poden ser la indústria alimentària, la monitorització mediambiental o les aplicacions mèdiques i de diagnòstic clínic².

Segons la definició, un biosensor és "un dispositiu analític en el qual un element de reconeixement biològic és lligat a un transductor per permetre la mesura quantitativa d'un analit". Per tant, en els biosensors es farà servir una cèl·lula, una biomolècula (enzims, anticossos o àcid nucleics) o un biomimètic com a element de reconeixement³.

Els biosensors enzimàtics comprenen tots aquells que usen una o diverses reaccions enzimàtiques per la detecció específica d'una molècula. Entre els enzims més emprats en aquest sentit, es troben la glucosa oxidasa, la ureasa, la lactat oxidasa i la peroxidasa del rave. El funcionament d'aquests biosensors serà descrit en apartats posteriors.

Els immunosensors usen anticossos per la detecció específica. Així, són una eina molt versàtil, perquè ens permeten la detecció d'antígens molt diversos, des de proteïnes petites⁴ a cèl·lules bacterianes⁵, passant per estructures cel·lulars grans, com poden ser orgànuls⁶.

Dins la darrera dècada s'ha fet molta feina per desenvolupar sensors que usen una seqüència de DNA com a molècula de reconeixement específic. Així, es dissenyen oligonucleòtids que presenten una afinitat alta per alguna biomolècula (aptàmers) o que són complementaris a la seqüència que es vol detectar^{7,8}.

Pel que fa al mètode de detecció de la senyal, els biosensors es poden classificar depenent del tipus de transductor utilitzat. Els més comuns són els biosensors òptics i els elèctrics o electroquímics. Els biosensors òptics mesuren una senyal analítica basada en un canvi d'alguna propietat òptica. En general, poden ser quimioluminiscents, si és una reacció química que produeix una coloració, colorimètrics si mesuren un canvi de color (d'absorbància) o d'intensitat de color (densitometria), o fluorimètrics si, en canvi, la presència de l'analit fa que canviï la fluorescència del sistema, ja sigui per augment o disminució⁹. Pel que fa als sensors elèctrics, mesuren un canvi en alguna propietat elèctrica del sistema quan és present l'analit. Els més estesos són els

Introducció

potenciomètrics (mesuren un canvi de potencial) i els amperomètrics (mesuren un canvi d'intensitat)¹⁰.

En la *figura 1* s'il·lustren els tipus de biosensors, els transductors i els camps d'aplicació més importants.

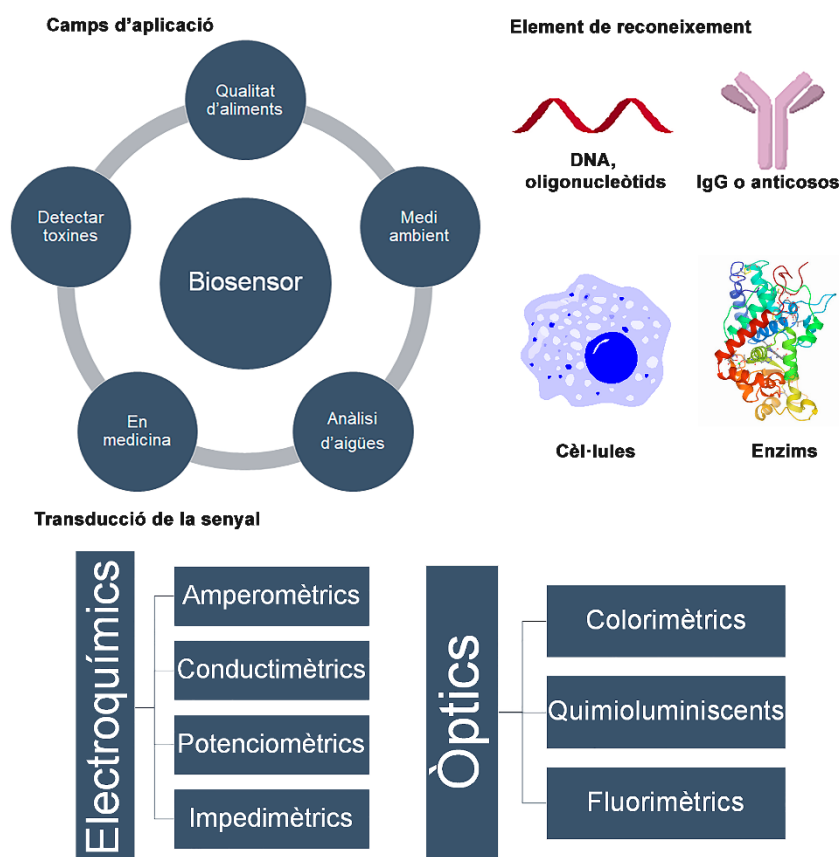


Figura 1: Biosensors: camps d'aplicació, elements de reconeixement i mètodes de transducció

1.2. POC: mesures en sang i necessitat de no invasives

Tornant a les aplicacions dels biosensors, un dels camps en què s'han desenvolupat més biosensors és en medicina. En aquesta direcció, les proves analítiques dels laboratoris clínics es volen complementar amb l'aplicació de proves ràpides que es denominen PoC (Point of Care). Els dispositius dissenyats per dur a terme aquest tipus de mesures han de ser senzills i han de poder ser emprats per persones no qualificades. A més, ens han de permetre obtenir un resultat ràpid i sense una instrumentació molt complicada. Aquest tipus de mesures ens permeten obtenir una informació ràpida i prendre una primera decisió que pot ser molt útil, per exemple, en una situació d'emergència o en països en procés de desenvolupament, on l'accés a un laboratori clínic és més complicat¹¹.

Dins el marc dels dispositius PoC, els més àmpliament usats són els que detecten l'analit en sang o bé en plasma ja que són fluids biològics molt complexos i dels quals es pot obtenir una gran quantitat d'informació¹². Tot i això, el mateix fet de tenir una matriu molt complexa ens pot complicar l'anàlisi, ja que ens pot produir desviacions en la senyal analítica per efecte matriu o interaccions no específiques entre la matriu i l'element de reconeixement. A més, l'extracció de sang és un procés invasiu i poc agradable pel pacient, sobretot si s'ha de fer de forma reiterada, com en el cas de persones diabètiques. És per això que s'intenten cercar alternatives a les mesures en sang, que ens permetin determinar les mateixes biomolècules sense tenir els inconvenients esmentats. Algunes alternatives poden ser l'orina, les llàgrimes, la saliva o la suor, que s'ha demostrat la seva validesa per determinar alguns biomarcadors d'interès com per exemple lactat, citocines¹³ o glucosa.

1.3. Suor com a matriu biològica

Com s'ha dit a l'apartat anterior, les mesures en suor poden ser una bona alternativa no invasiva de les mesures en sang. Tant és així que, que s'ha estudiat la variació de la seva composició en diferents malalties o trastorns com, per exemple, la fibrosi quística¹⁴. També s'ha caracteritzat el seu contingut en aminoàcids i proteïnes¹⁵. A més, és molt emprada en la monitorització de la condició física durant l'esport. Dins aquest context, es mesura sobretot la variació de la quantitat d'electròlits, com sodi, clorurs i potassi per preveure la deshidratació i la quantitat de suplementes isotònics que ha de prendre un atleta després de la sessió d'entrenament¹⁶. La glucosa també és un biomarcador molt estudiat en suor i s'ha vist que el seu contingut és unes cent vegades menor que en sang¹⁷. La urea i l'àcid úric són composts que també s'han determinat en suor i que s'ha intentat correlacionar amb els valors en sang de pacients amb malalties renals¹⁸. Per últim, la detecció del lactat en suor s'empra per determinar el llindar anaeròbic en esportistes d'elit¹⁹. Tant és així, que també s'ha estudiat la relació entre el contingut de lactat en suor i en sang i s'ha vist que té una correlació positiva amb un coeficient de Pearson de 0,8²⁰. En aquest treball es va decidir abordar el disseny i la caracterització de dues plataformes analítiques, una per mesurar lactat i una altra per mesurar glucosa en suor.

1.4. Biosensors “wearable”

Si es pensa en la determinació de biomarcadors en suor mitjançant un dispositiu PoC, s'ha de tenir en compte que la recollida de suor és un procés que pot comprometre la fiabilitat de les mesures obtingudes. A més, una mesura ràpida i que permeti directament la determinació de l'analit sense un processat previ de la mostra és molt

Introducció

desitjable. Amb aquesta finalitat, durant l'última dècada hi ha hagut un augment considerable en la investigació i desenvolupament de biosensors "wearable". Aquest dispositius estan fets per proporcionar mesures per col·locació del sensor directament sobre la pell o a prop del pacient. Aquests tipus de sensors poden tenir diferents formes, com pegats, ulleres, peces de roba, embenats... A la *figura 2* es poden veure alguns tipus de dispositius portables. Tot i poder presentar dissenys molt diversos, aquests dispositius han de ser còmodes, estables i presentar una bona compatibilitat amb la pell quan es fan servir per analitzar suor²¹.

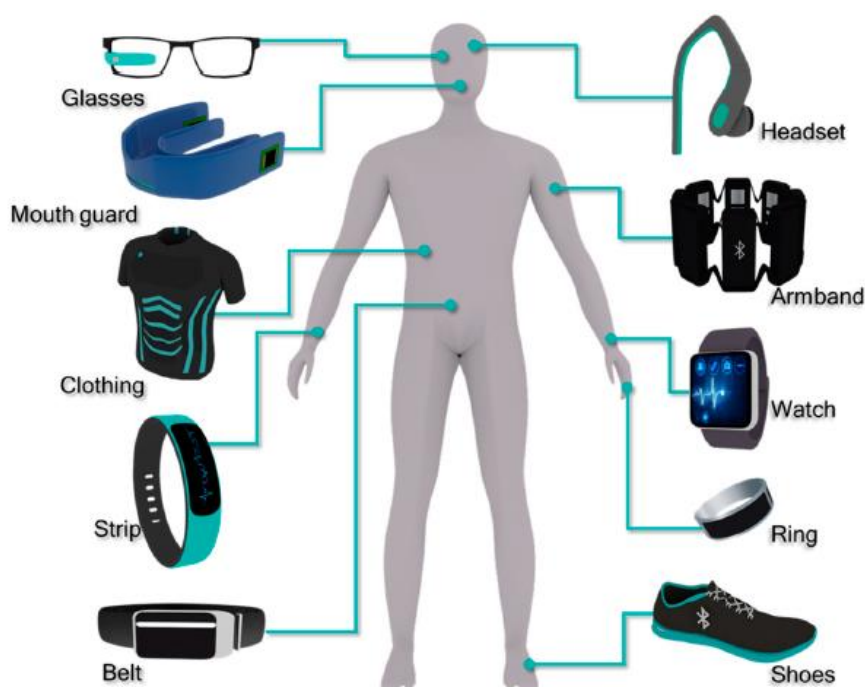


Figura 2: Exemples de dispositius "wearable" disponibles²¹.

Dins la subcategoria de biosensors wearable que són un pegat directament aferrat sobre la pell, s'empren diferents polímers i materials de suport per crear el dispositiu, com poden ser l'àcid polilàctic^{22,23}, la fibra de vidre, el polidimetilsiloxà (PDMS)²³... que, combinats amb un adhesiu mèdic es poden aferrar a la pell i que s'ha demostrat que presenten una bona biocompatibilitat. Tot i això, alguns d'ells presenten inconvenients que poden comprometre la seva aplicabilitat en sistemes a nivell industrial. Per exemple, el PDMS és molt emprat perquè és una silicona hidrofòbica amb la que es poden construir canals fàcilment, però és aquesta mateixa hidrofobicitat que no el fa adequat per la detecció de molècules apolars, ja que queden adsorbides en la seva superfície, cosa que en delimita les seves aplicacions²⁴. A més, aquests dispositius normalment són rebutjables, és a dir, d'un sol ús, per tant el cost dels materials que el formen ha de ser el més baix possible.

1.4.1. Paper com a material de suport

Una alternativa per construir un dispositiu wearable pot ser el paper de filtre, ja que presenta una sèrie d'avantatges respecte als polímers esmentats anteriorment: és lleuger, de fàcil manipulació, molt barat i assequible, és porós i pot ser usat per emmagatzemar-hi enzims i reactius. Totes aquestes qualitats fan que s'hagi triat com a material de suport per el nostre biosensor wearable. Així, en el mercat existeix una gama molt ampla de variants del paper de filtre amb característiques molt diferents, depenent de l'aplicació que es busca. Es pot triar des del gramatge del paper (o densitat) fins a la mida mitjana dels porus que presenta el paper, així segons l'estructura porosa del nostre paper ens canviarà la manera en què entra la mostra per capil·laritat²⁵. Aquesta propietat permet transportar fluids a través dels sistemes microfluídics.

1.4.2. Microfluídica ens els biosensors wearable

El fet de treballar amb la suor com a mostra biològica sumat a l'aplicació d'un biosensor directament sobre la pell ens obliga a treballar amb volums relativament petits de mostra, de l'ordre de microlitres, cosa que augmenta la importància del control de l'entrada de la mostra en el sensor, ja que ens pot comprometre la robustesa i reproduïbilitat del dispositiu²⁶.

En aquest context es pot introduir la disciplina de la microfluídica que centra els seus esforços en la manipulació de volums de fluids dins l'escala micro en un espai molt petit. La microfluídica evita la manipulació del volum de mostra i automatitza el procés analític, la qual cosa fa els biosensors més fàcils d'utilitzar fora d'entorns controlats. És per això que aquesta tecnologia s'ha aplicat en diversos camps com la biologia cel·lular, la detecció electroquímica o en l'alliberament controlat de fàrmacs.

Hi ha diverses alternatives per controlar el volum que entra en un sensor de microfluídica. Es poden emprar barreres hidrofòbiques de cera o per litografia per dissenyar els canals prioritaris per on es vol que passi el fluid, es pot emprar la fotodeposició de polímers o, fins i tot l'aplicació d'un làser per crear canals sobre el suport del sensor²⁵. Pel nostre disseny es va triar una tira simple de paper, amb un cap de detecció rectangular en el sensor de lactat i una zona circular en el sensor de glucosa (ampliat en **3.2.3. Fabricació del sensor de glucosa**)

Per tal d'intentar predir el comportament del fluid en el paper i poder fer el disseny el més acurat possible sense haver de fer una metodologia d'assaig- error totalment aleatòria es poden aplicar equacions i models teòrics, com la llei de Darcy o l'equació de Lucas-Washburn. Es va estudiar la possibilitat d'aplicar-la en el nostre disseny però

es va descartar perquè normalment s'apliquen per sensors que admeten volums molt majors i en dissenys molt més complexos²⁷.

1.4.3. Els biosensors enzimàtics

Com ja s'ha dit amb anterioritat, els biosensors necessiten un element de reconeixement per detectar l'analit amb especificitat. Quan es tracta d'algun biomarcador amb un pes molecular relativament alt, com pot ser una proteïna o bé directament es vol detectar una bactèria i es vol un reconeixement molt específic, es pot recórrer a la utilització d'anticossos que reconeguin l'antigen que es vol detectar^{4,5}. Aquesta estratègia és àmpliament emprada en el món dels biosensors. Per contra, si es vol detectar una molècula molt més petita, com un producte de rebuig del metabolisme cel·lular, la urea o l'àcid úric que per ella mateixa no pot ser detectada, es pot utilitzar un enzim que catalitzi alguna reacció que produeixi un producte que sí que pugui ser detectat. Per exemple, per detectar la urea s'empra l'enzim ureasa que en catalitza la descomposició a diòxid de carboni i amoníac que produeixen una baixada del pH del medi que sí que es detectable amb un sensor de pH²⁸. En aquest cas, és important que l'enzim reconegui l'analit amb elevada afinitat (determinada per la constant de Michaelis, K_m) i que catalitzi la reacció amb elevada eficiència (determinada pel número de recanvi, K_{cat})

En el nostre cas particular, ni la glucosa ni el lactat poden ser detectats directament però la glucosa oxidasa (GOX, Protein Data Bank: 1CF3) catalitza l'oxidació de la glucosa en presència d'oxigen i dona peròxid d'hidrogen com a producte final (*figura 3*), que és electroquímicament actiu²⁹ i, a més, pot ser detectat per colorimetria³⁰.

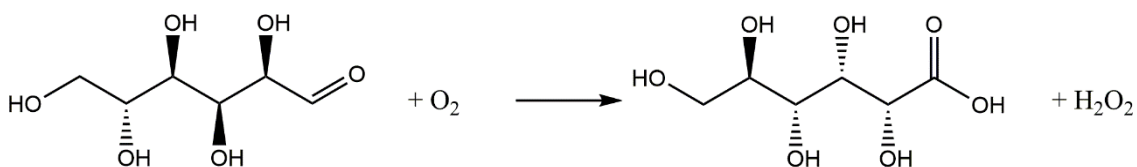
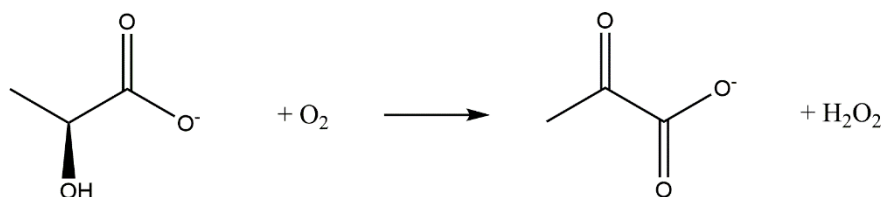


Figura 3: Reacció catalitzada per la glucosa oxidasa

Pel que fa al L-lactat, també es pot recórrer a la utilització d'un enzim que en catalitzi la seva oxidació però en aquest cas tenim dues opcions diferents. Per una banda, podem emprar la lactat oxidasa (LOX, Protein Data Bank: 2J6X) que, de forma similar a la GOX, catalitza la oxidació de lactat a piruvat amb la producció de peròxid d'hidrogen (*figura 4a*). Per altra banda, també es pot emprar la lactat deshidrogenasa (Protein Data Bank: 3H3F) que catalitza també la oxidació de lactat a piruvat però, en aquest cas, necessita el cofactor NAD^+ per dur a terme la reacció (*figura 4b*).

a) Lactat oxidasa



b) Lactat deshidrogenasa

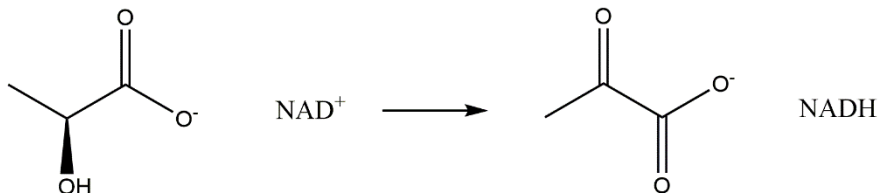


Figura 4: Reaccions catalitzades per la L-lactat oxidasa (a) i lactat deshidrogenasa (b)

En el nostre cas es va triar la LOX perquè, d'aquesta manera, es podia prescindir del cofactor NAD^+ , cosa que simplificava de manera considerable l'optimització de tot el biosensor.

1.4.4. Amperometria o colorimetria

Una vegada triat l'element de reconeixement, la GOX i la LOX, s'ha de triar el mètode de transducció de la senyal. Si es fa una recerca bibliogràfica general, es pot trobar que els dos mètodes de transducció més emprats són la colorimetria i la amperometria, per tant, triarem entre un dels dos mètodes més àmpliament estudiats^{2,3,29-31}.

L'amperometria, com ja s'ha dit anteriorment, pertany als mètodes electroquímics per tant, en la construcció del sensor s'haurà d'incloure un o més elèctrodes. La transducció per amperometria implica que en el nostre sistema tinguem un element fàcilment oxidable o reduïble que pugui reaccionar en la superfície de l'elèctrode. Aquest és el cas del peròxid d'hidrogen, que es pot oxidar a O_2 . Per tant, un sensor de lactat o glucosa amperomètric implica la utilització de l'enzim, GOX o LOX, immobilitzat o enllaçat covalentment sobre l'elèctrode de treball i es mesura la variació de la intensitat de corrent elèctrica entre aquest i un contraelèctrode. A més, normalment també és necessari incloure en el sistema un elèctrode de referència¹⁰. A la *figura 5* es pot veure l'esquema general d'un biosensor amperomètric³².

Per tant, la transducció amperomètrica implicaria els elèctrodes mencionats anteriorment amb un sistema de lectura adequat, que pot ser des d'un amperímetre convencional a un telèfon mòbil que ens doni la concentració d'analit directament. Els sensors amperomètrics tenen l'avantatge general de presentar uns límits de detecció molt baixos. Per contra, la fabricació de biosensors wearable amperomètrics és

Introducció

complexa perquè cal miniaturitzar els tres elèctrodes i requereixen d'un mètode de comunicació sense fils (wireless) amb el lector³³. A més la deriva en la senyal quan es fan mesures repetides en limita la seva vida útil^{33,34}.

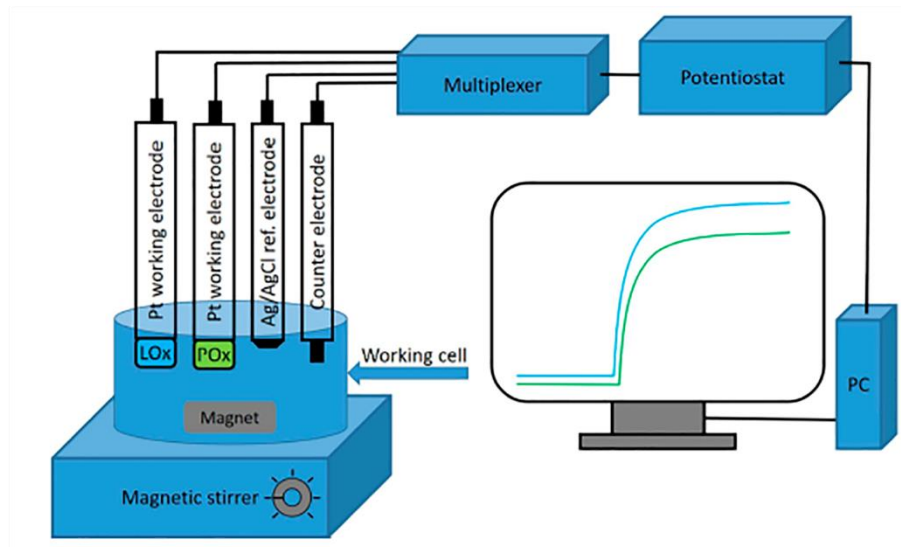


Figura 5: Esquema de biosensor per determinar lactat i piruvat per amperometria³².

La colorimetria es pot emprar també en la transducció de la senyal. Aquesta opció implica l'acoblament a la reacció enzimàtica d'una altra reacció que ens doni un producte acolorit. Així, la intensitat de color serà proporcional a la concentració d'analit. En les nostres reaccions es forma peròxid d'hidrogen, que pot reaccionar per donar un producte que tingui color³⁵. Els biosensors colorimètrics són molt desitjables en el marc dels wearable perquè ens permeten llegir el resultat amb la foto d'un mòbil. Normalment presenten un lloc de detecció, on es troben depositats o immobilitzats els enzims i el cromogen. Quan la mostra arriba a la zona de detecció, si l'analit hi és present, es produeix la reacció i es forma el producte acolorit. A la *figura 6* es pot veure un exemple d'un multisensor wearable colorimètric^{16,35,36}.

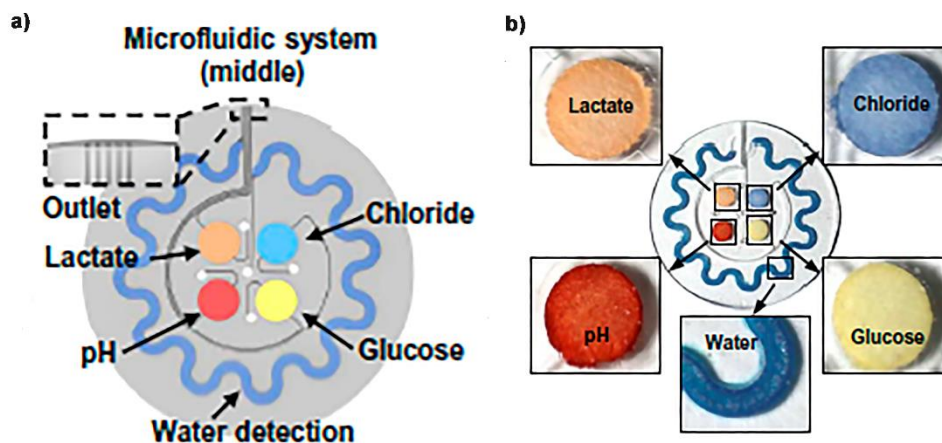


Figura 6: Esquema (a) i fotografia real (b) d'un multisensor wearable per medir lactat, glucosa, pH i clorurs en suor. Adaptat de³⁷.

En resum, en un biosensor enzimàtic colorimètric sols es necessita un material per emmagatzemar els enzims i el cromogen i la mostra que contingui l'analit. Com es pot veure, la construcció és més senzilla que en els sensors electroquímics perquè no requereix miniaturitzar els sensors i la senyal per fotografia és inherentment wireless. El principal problema que tenen els sensors colorimètrics, en alguns casos, és la baixa sensibilitat que presenten. A més, també hi pot haver falta de reproduïbilitat si el color format no és homogeni³¹.

En el nostre cas, vam triar un mètode de transducció colorimètric perquè el rang de lactat en suor (15 – 30 mM) és alt. És cert que per la detecció de glucosa sí que és necessària una alta sensibilitat perquè treballem en concentracions molt menors (0,03 – 1 mM), per això es va dissenyar un sistema colorimètric que potenciés la sensibilitat.

La peroxidasa de rave (HRP per les sigles en anglès) és un enzim que catalitza la reducció del peròxid d'hidrogen a aigua, amb conseqüent oxidació d'un altre compost. És aquest compost oxidat el que és acolorit i que ens donarà la senyal. En el mercat existeixen nombrosos substrats per la HRP. Es va triar el 3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidina (TMB) que, quan s'oxida produeix un complex de transferència de càrrega de color blau que presenta una gran sensibilitat. La reacció d'oxidació del TMB per la HRP es pot veure a la *figura 7*.

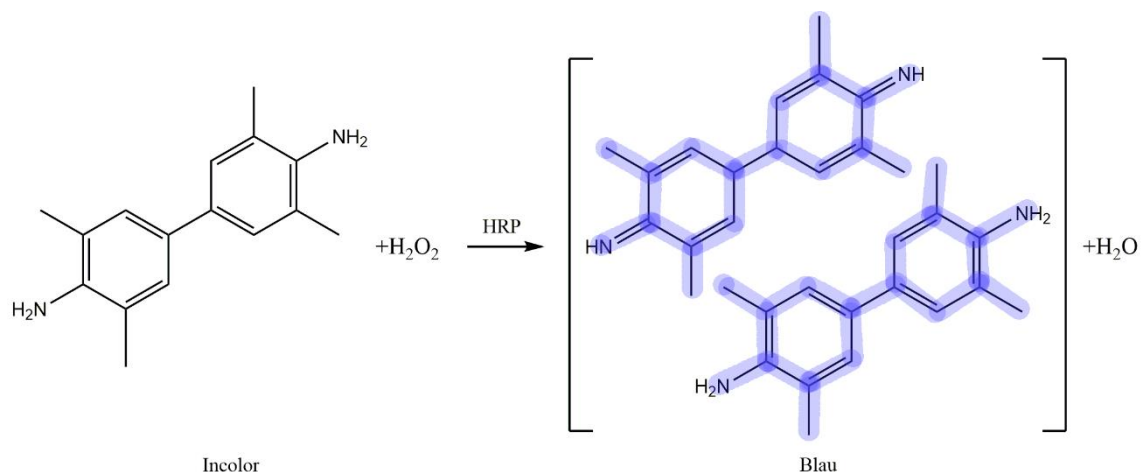


Figura 7: Oxidació del TMB per peròxid d'hidrogen catalitzada per la HRP.

1.5. Mètodes de validació de biosensors

Una vegada s'ha dut a terme la caracterització d'un biosensor per detectar un biomarcador, la glucosa i el lactat en el nostre cas, cal validar les concentracions mesurades amb el dispositiu comparant-les amb les que s'obtenen amb un mètode que es considera de referència o bé amb algun que hagi estat validat front a un de referència anteriorment³⁸.

La cromatografia líquida d'alta eficàcia acoplada a espectrometria de masses (HPLC-MS, per les sigles en anglès) és molt emprada com a tècnica de referència perquè té una gran sensibilitat i ens permet arribar a límits de detecció molt baixos. A més, també és molt robusta i canviant les condicions de la columna i l'eluent ens permet una separació selectiva en cas de tenir matrius molt complexes. En casos especials, la detecció per ultravioleta (UV) també s'accepta com a mètode referència tot i ser menys sensible³⁹⁻⁴¹.

Tot i ser una tècnica molt emprada, també presenta certs inconvenients com l'elevat cost dels anàlisis, ja que un sistema d'HPLC-MS és car. A més, es necessita una infraestructura adequada amb espai per poder allotjar un equip d'aquestes dimensions, ja que són equips voluminosos. Finalment, també es necessita personal qualificat que sàpiga usar l'equip o pugui dur a terme la posada a punt del mètode i preparar les mostres de forma adequada per ser injectades.

A més de la HPLC, també es poden emprar altres mètodes de referència per validar les mesures obtingudes amb un biosensor. Per exemple, es poden comparar amb les obtingudes amb un biosensor comercial si són disponibles. Una altra opció possible és

Introducció

comparar el nostre mètode amb un kit de detecció que ha estat validat per una casa comercial⁴².

Si parlem ara del cas que es tracta en aquest treball, existeixen protocols descrits per mesurar lactat i glucosa mitjançant la tècnica de HPLC-MS o similars en diferents matrius biològiques o aliments³⁹⁻⁴¹. Si més no aquesta podria ser una bona opció per validar en nostres sensors. Al no disposar d'accés fàcil a un d'aquests sistemes, es va recórrer a altres opcions per validar els biosensors.

El biosensor de lactat es va validar mitjançant la comparació de les mesures obtingudes aplicant el biosensor en una rutina d'exercici amb un mètode enzimàtic colorimètric que es va posar a punt en el propi laboratori (Veure: *Materials i mètodes: determinació de lactat en placa*).

El biosensor de glucosa es va validar comparant els valors de glucosa en suor obtinguts amb els valors de glucosa en sang mesurats amb un glucòmetre comercial.

Les dues plataformes analítiques presentades han estat validades aplicant-les en una rutina d'exercici en voluntaris sans i comparant les concentracions d'analit obtingudes amb un mètode de referència. Els resultats presentats en aquest TFM han estat publicats a ACS Sensors 6, 130 (2021)⁴³ i Analyst 146, 3273 (2021)⁴⁴.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és la fabricació i caracterització d'una plataforma analítica basada en paper capaç de detectar biomarcadors en suor mitjançant una reacció enzimàtica colorimètrica. Així, es poden distingir diversos objectius secundaris:

- Fabricació d'un biosensor enzimàtic que permeti detectar glucosa o lactat en suor per colorimetria
- Caracterització d'un sensor que ens permeti mesurar la quantitat de suor de forma senzilla, a simple vista o analitzant una fotografia.
- Ús d'un dispositiu mòbil com a transductor de la senyal.
- Anàlisi i eliminació de possibles fonts de variabilitat: volum de mostra, pH, doblegament.
- Validació del sensor en mostres de suor de voluntaris sans mitjançant la comparació del valor obtingut amb un mètode de referència.

3. Materials i mètodes

3.1. Materials

Els reactius emprats es van comprar a les següents cases marques comercials:

- Sigma Aldrich: L- lactat de sodi ($\geq 99,0\%$), D- lactat de sodi ($\geq 99,0\%$), D-(+)-glucosa ($\geq 99,5\%$), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, $\geq 99\%$), sulfonat de poliestirè sodic (PSS), TWEEN 20, lactat oxidasa (LOX) de *Aerococcus viridans* (500 U), glucosa oxidasa (GOX) de *Aspergillus Niger* (100000-250000 U·g⁻¹, tipo X-S), peroxidasa de rabe (HRP, Tipo VI-A).
- GE Healthcare Life Sciences: paper de filtre Whatman Grau 41 (20µm por, cel·lulosa, sense cendres),
- 3M, Minnesota, USA: Adhesiu mèdic
- VWR Chemicals: Albúmina bovina sèrica (BSA, lliure de proteases)

3.2. Mètodes

3.2.1. Fabricació del sensor lactat

Per la fabricació del biosensor de lactat es van tallar tires de 2 x 0,2 cm de paper Whatman (20 µm de por, grau 41). Per evitar interaccions no específiques dels enzims amb el paper, es van modificar les tires amb BSA-TWEEN (1 mg·mL⁻¹ i 0.05% en PBS). Una gota de 0,5 µL de HRP (50 µg·mL⁻¹ en PBS) i LOX (600 µg·mL⁻¹ en PBS) es van depositar 0,5 cm per damunt la zona del TMB. Una gota de 0,5 µL de TMB (10 mM) es va depositar al cap de la tira. El sensor es cobreix de adhesiu mèdic (3M, Minnesota, USA) per evitar el contacte amb la pell. L'única zona de contacte directe amb la pell és l'entrada, per on entrarà el suor. Els enzims són arrossegats per la mostra i arriben a la zona de detecció al mateix temps que el L-lactat.

Per tal de modificar l'interval dinàmic lineal del nostre sensor, es va depositar D-lactat en dos reservoris diferents dels biosensors. El reservori R1 és circular i es troba situat per damunt del enzims, mentre que el reservori R2 conté els enzims (*figura 8C*). El grau d'inhibició que s'aconsegueix depèn del nombre de la concentració i del gotes depositades en R1 i R2.

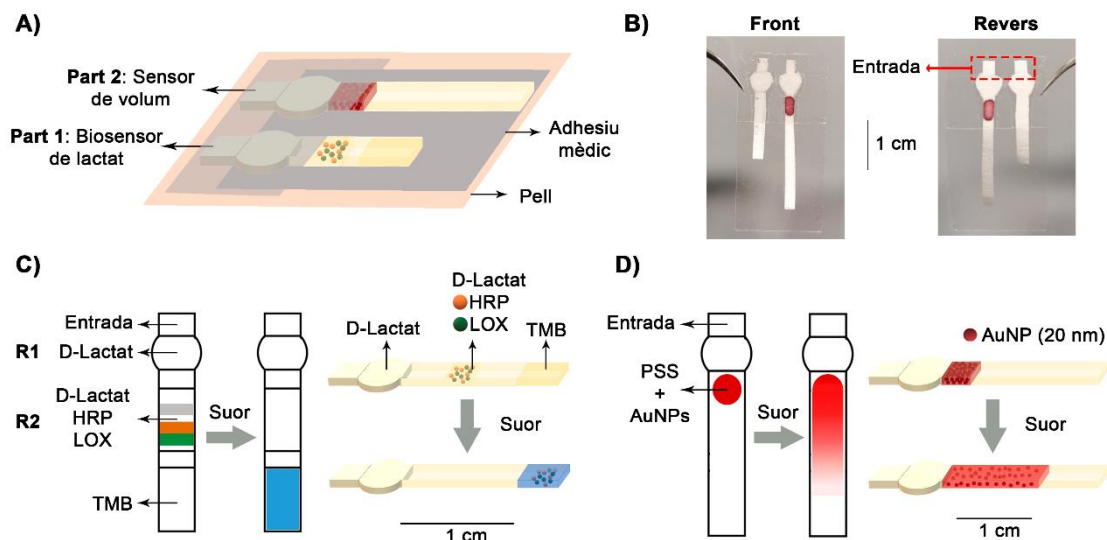


Figura 8 Representació esquemàtica (A) i fotografia (B) de la plataforma analítica per detectar L-lactat. La zona de contacte dels sensors amb la pell està ressaltada en vermell. La resta dels sensors es troba recoberta amb adhesiu mèdic que evita el contacte amb la pell. (C) Biosensor de lactat abans i després de fer la mesura. La zona circular situada per davall de l'entrada és el reservori R1 i conté D-lactat. Una zona que conté HRP, LOX i D-lactat es troba situada al costat de la zona circular, i l'anomenem reservori R2. El TMB es deposita a la zona de detecció. (D) Sensor de suor abans i després de la mesura. Una zona que conté sulfonat de poliestirè (PSS) i nanopartícules d'or (AuNPs) es troba per davall de l'entrada.

3.2.2. Determinació de lactat en placa

Per poder comparar els valors de L-lactat determinats amb el nostre biosensor amb un mètode de referència, es va dur a terme un calibrat per determinar L-lactat per espectrofotometria UV-Vis. El mètode consisteix en afegir 100 μL de mostra diluïda 1:40 en un pouet d'una placa de 96 pouets i després afegir una solució que conté TMB (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), LOX (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) i HRP (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El L-lactat és oxidat a piruvat i H_2O_2 , que és emprat per la HRP per oxidar el TMB. Després de 2 minuts s'atura la reacció amb 100 μL de H_2SO_4 2M. Finalment s'obté una solució groga i es mesura l'absorbància (A) a 450 nm amb un lector de plaques.

El mètode va ser validat en laboratori. Es van avaluar la linealitat, la precisió i la reproduïbilitat del mètode. Per veure els resultats, mirar la *figura 23 en els annexes*.

3.2.3. Fabricació sensor glucosa

El disseny rectangular es va fabricar retallant manualment tires de 1,5 cm x 0,2 cm de paper Whatman (20 μm de por, grau 41) i, posteriorment, modificant amb BSA-TWEEN (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ i 0,05% en PBS) per evitar interaccions no específiques entre els enzims i el paper. En el disseny circular, es va incloure un cercle de 0,5 cm de diàmetre. La

Materials i mètodes

longitud total del sensor és de 1,5 cm. El TMB va ser depositat a la zona circular (1 μL). La GOX (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS) i la HRP (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS)

El lloc d'entrada de suor és de 0,3 cm x 0,2 cm i es troba en contacte amb la pell. La resta del sensor es recobreix d'adhesiu mèdic (3M, Minnesota, USA) perquè no entri en contacte amb la pell. A causa de l'entrada de la mostra en el sensor els enzims són arrossegats i arriben a la zona de detecció al mateix temps que la glucosa (*figura 9*). La concentració de glucosa oxidasa es va optimitzar per aconseguir la major sensibilitat.

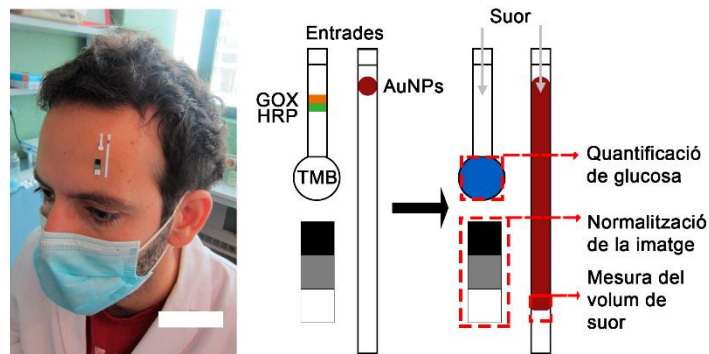


Figura 9: Disseny del sensor wearable per detectar glucosa El suor entra per l'entrada, que és l'única part que es troba en contacte amb la pell. El patró de color ens permet corregir les diferències de lluminositat entre les diferents mesures. Fotografia de l'aplicació del sensor sobre el front d'un voluntari.

3.2.4. Fabricació del sensor de volum

Es van retallar tires de 3,5 cm x 0,2 cm de paper Whatman (20 μm de por, grau 41) i es van modificar amb BSA-TWEEN (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ i 0,05% en PBS) per evitar interaccions no específiques. Es van afegir 0,5 μL de PSS 10% a 2 mm per davall de l'entrada i es van deixar assecar. En el mateix punt, es van afegir 0,5 μL de AuNPs (dilució 1:2). El suor entra per un inlet de 0,3 cm x 0,2 cm mitjançant capil·laritat. El sensor es va calibrar mesurant la distància recorreguda per les nanopartícules quan s'afegeix un volum concret. La resta del dispositiu es cobreix amb adhesiu mèdic per aïllar-lo de la pell

3.2.5. Plataforma analítica: Lactat/glucosa + volum

3.2.5.1. Muntatge

Els dos sensors es col·loquen enmig de dos adhesius mèdics (3M, Minnesota) amb una separació de 1 mm entre ells. La capa anterior aferra el dispositiu a la pell, evitant-ne el contacte directe amb la pell, exceptuant les entrades. La cara posterior cobreix també les entrades i s'encarrega que el seu contacte amb la pell sigui òptim perquè entri la suor per capil·laritat. La zona de detecció es cobreix durant l'emmagatzemat per evitar

la oxidació del TMB, però es descobreix durant les mesures ja que la reacció enzimàtica necessita O₂.

3.2.5.2. Detecció colorimètrica

Les imatges es van obtenir amb un telèfon mòbil Huawei P30 lite. Per tal de compensar les variacions de llum es va usar un patró de referència de tres colors. Els patrons d'intensitat de píxel (PI) es van obtenir amb el programa ImageJ. En escala de grisos, la màxima intensitat de píxel (255) correspon al blanc, mentre que el mínim (0), correspon al color negre. La senyal colorimètrica (S) es va obtenir restant la PI a 255 i no té unitats.

3.2.5.3. Mesures de glucosa/lactat en suor

Es van aplicar els dos dispositius, per separat, en voluntaris sans mentre duen a terme una rutina de bicicleta estàtica. El protocol va ser aprovat pel comitè d'Ètica de les Illes Balears (IB 4053/19) i tots els participants van signar un consentiment informat. La rutina va consistir en 15 minuts d'escalfament, seguits d'increments graduals de la càrrega de treball per tal d'augmentar la freqüència cardíaca.

En el cas de la plataforma de lactat, es va aplicar a cinc voluntaris i s'intentà obtenir tres condicions de mesura definides segons els batecs per minut (bpm): baixa (< 110 bpm), mitjana (130 bpm), alta (>150 bpm). Els valors de lactat en suor i sang canvien depenent de si el cos es troba en treball aeròbic (110–130 bpm) o anaeròbic (>150 bpm). Una vegada el sensor de suor arribà al volum desitjat (6-8 µL), es va treure el dispositiu de la pell i es va mesurar la senyal colorimètrica com s'indica a l'apartat "3.2.5.2 Detecció colorimètrica". Els valors de lactat obtinguts per cada mesura es van comparar amb els determinats de les mostres de suor recollides directament amb un Eppendorf i analitzades amb un mètode de placa validat amb suor artificial.

En el cas del dispositiu per detectar glucosa, es va emprar un glucòmetre comercial (Free-Style Optimum Neo, Abbott) per fer les mesures de glucosa en sang a diferents temps. Després de mesurar el nivell basal de glucosa, es va anar augmentant la càrrega d'exercici cada 10 min per tal d'augmentar la sudoració. Una vegada feta la primera mesura de glucosa en suor, el voluntari es prengué un gel energètic comercial que conté una quantitat alta de glucosa (4 g). Així es va poder confirmar que el nostre dispositiu pot mesurar canvis de glucosa en suor i que, a més, aquests estan correlacionats amb la variació de glucosa en sang.

3.2.5.4. Calibrat a 37 °C

Durant el desenvolupament i caracterització dels biosensors de glucosa i lactat, tots els calibrats es van dur a terme a temperatura ambient. Ja que l'activitat enzimàtica pot canviar dràsticament amb la temperatura, es van dur a terme calibrats a 37 °C per simular les condicions de temperatura corporal. D'aquesta manera es va comprovar que es mantenia la linealitat en el rang de concentracions desitjats i es va descartar el possible biaix de les mesures en l'aplicació real. Els calibrats de lactat i glucosa a 37 °C es poden veure a les *figures 24 i 25* dels annexes, respectivament.

4. Resultats

El funcionament de les dues plataformes analítiques, per detectar glucosa o lactat, és similar i s'explica a continuació.

El dispositiu, que conté el biosensor enzimàtic de glucosa/lactat i el sensor de volum es col·loca aferrat al front del subjecte emprant un adhesiu mèdic. A mesura que el suor entra pel canal d'entrada del biosensor enzimàtic, es produeix la mobilització dels enzims amb el líquid, que arriben a la zona de detecció, on es produeix una senyal colorimètrica depenent de la concentració d'analit. Simultàniament, a causa de l'escassa distància que separa els dos sensors (2 mm), es produeix l'entrada de suor en el sensor de volum i, d'aquesta manera, les nanopartícules d'or flueixen a través dels porus del paper una distància concreta i totalment depenent del volum que ha entrat per l'entrada. Això ens permet controlar el volum que entra en el dispositiu i retirar-lo quan ha entrat volum suficient per dur a terme una mesura correcta.

Una vegada s'ha tret el dispositiu del subjecte, s'espera un temps concret i es fa una foto amb un telèfon mòbil per determinar, posteriorment, la senyal colorimètrica. El valor de senyal obtingut es corregeix pel volum estimat, determinat amb el sensor de volum.

4.1. Sensor lactat

4.1.1. Calibrat

El disseny del biosensor de lactat està basat en el flux d'enzims cap a una zona que conté un cromogen. Aquest plantejament innovador va sorgir de la necessitat de separar enzims i cromògens perquè si es depositaven en el mateix lloc, es produïa una senyal colorimètrica espontània en absència d'analit (*figura 10*).

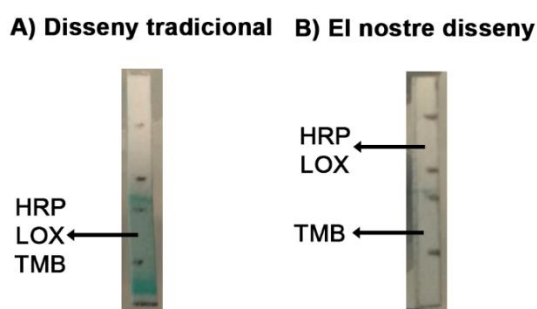


Figura 10: Generació de senyal espontània quan es depositen enzims i cromogen en el mateix reservori. (A) Enzims i TMB depositat en el mateix reservori. (B) Enzims i TMB depositats en llocs diferents.

Resultats

Amb aquest disseny de sensor, la senyal obtinguda variarà amb la concentració d'enzims (HRP i LOX) que arribi a la zona de detecció, la concentració de L-lactat i la concentració de reactiu colorimètric (TMB). Així, primer es va dur a terme un calibrat amb un volum fix d'una solució de L-lactat de concentració controlada i es va obtenir un rang lineal entre 0 i 1 mM de L-lactat (*figura 11A*). Si es calcula el límit de detecció (LOD) com tres vegades la desviació estàndard del blanc (SD, de les sigles en anglès), s'obté un valor de 0,06 mM que, comparat amb els valors bibliogràfics, és el límit de detecció més baix reportat per un sensor de lactat colorimètric. Tot i això, aquest sensor no és adequat per determinar lactat en suor, ja que el rang de concentració en què es troba el L-lactat en suor varia entre 10 mM i 25 mM. En aquesta zona, el nostre sensor es troba totalment saturat, ja que aquestes concentracions són molt majors que la K_m de la LOX i això fa que es trobi saturada, per la qual cosa un augment de concentració no es tradueix en un augment de senyal colorimètrica.

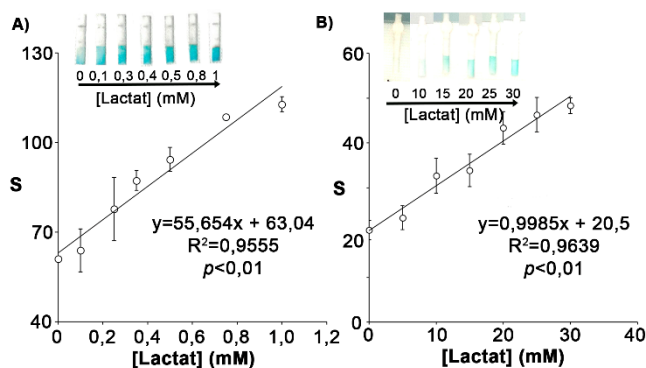


Figura 11: Calibrat del sensor de lactat amb un volum de mostra controlat (7 μ L). (A) Primer disseny de biosensor, sense inhibidor, per aconseguir el menor límit de detecció. (B) Segona generació de biosensors, modificats per poder mesurar lactat en el rang fisiològic en suor. Les barres d'error representen la desviació típica (SD, $n=3$). S: senyal colorimètrica.

Ja que en un sensor "wearable" diluir la mostra perquè la senyal que caigui dins el rang lineal del biosensor no és possible, vam haver de cercar una alternativa. L'opció que vam trobar va ser disminuir la K_m aparent de l'enzim incorporant un inhibidor competitiu de la LOX, D-lactat, en diversos reservoris del sensor. La combinació que ens va donar uns resultats de sensibilitat i linealitat millors és el següent:

- Afegir dues gotes de 1 μ L de D-lactat 1 M en el primer reservori (R1) situat en una zona circular just per davall l'entrada.
- Afegir una gota de 0,5 μ L de D-lactat 1 M en el segon reservori (R2) que també conté els enzims.

Resultats

Incorporant l'inhibidor vam aconseguir tenir un rang lineal entre 10 mM i 30 mM de L-lactat. En aquest cas, el LOD obtingut és 3,5 mM. S'ha de fer notar que, tot i haver augmentat considerablement el límit de detecció del sensor, ara el rang lineal es troba dins els valors de L-lactat fisiològics (*figura 11B*).

4.1.2. Correcció pel volum

Tots els experiments descrits a l'apartat anterior es van dur a terme amb un volum constant de mostra. En condicions reals, aquest volum variarà depenent de la quantitat de suor produïda de la persona que utilitzi el sensor. Ja que la quantitat d'enzim que arriba a la zona de detecció depèn del volum de mostra, la senyal colorimètrica obtinguda variarà tot i que contingui la mateixa concentració de L-lactat. Per aquest fet es va incorporar en la plataforma analítica un sensor que mesura la quantitat de suor mitjançant la mesura del fluxe de AuNPs a través d'un canal de paper. A la *figura 12A* es pot veure com va variant la distància recorreguda per les nanopartícules depenent del volum que entra al sensor. Així, el sensor va ser calibrat afegint diferents volums i es va obtenir un rang lineal entre 4 i 8,5 μL . S'ha de dir que el rang lineal d'aquest sensor pot ser modificat fàcilment variant el disseny de la tira de paper, perquè pugui admetre més volum o manco, depenent de les necessitats.

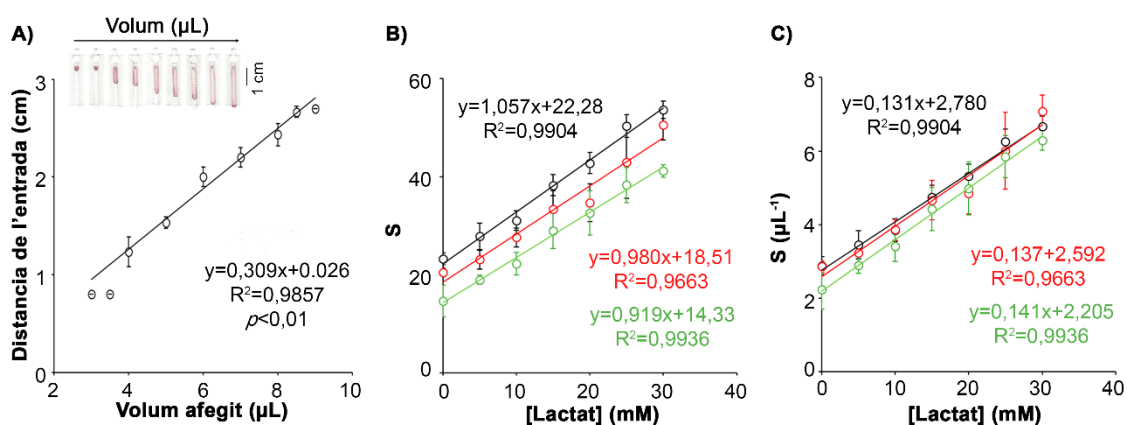


Figura 12: Sensor de volum de suor i de lactat. (A) Calibrat en funció del volum afegit (de 3 μL a 9 μL). (B) Calibrat del sensor de lactat amb diferents volums de mostra: 6,5 μL (verd), 7 μL (vermell) i 8 μL (negre). (C) Detecció de Lactat després de dividir la senyal colorimètrica S pel volum de mostra mesurat amb el sensor de volum de suor (μL). Les barres d'error representen la desviació típica (SD, $n=3$). A (C) les barres d'error representen la propagació d'errors de les mesures de lactat i volum

4.1.3. Estimació dels nivells de lactat variant el volum de mostra

Per avaluar com afecta el volum de mostra en la senyal colorimètrica obtinguda, es representen corbes de calibrat per lactat emprant 6,5 μL , 7 μL i 8 μL . Com es pot veure en la *figura 3B*, la senyal augmenta a mesura que entra més volum en el sensor. Les

Resultats

tres corbes tenen pendents similars, però la ordenada a l'origen és diferent, cosa que indica que la senyal obtinguda és dependent del volum de mostra afegit. Així, si dividim la senyal obtinguda pel volum afegit, les tres corbes de calibrat haurien de donar el mateix resultat, independentment del volum que entri pel biosensor. Per demostrar aquesta hipòtesi, es van dividir les senyals de lactat obtingudes (*figura 12B*) pel volum de mostra calculat amb el sensor adjacent (*figura 12A*). Les corbes de calibrat amb la senyal corregida pel volum es poden veure a la *figura 12C*. Per comparar les corbes de calibrat, es va calcular la desviació estàndard relativa (RSD, de les sigles en anglès) per cada punt del calibrat, tenint en compte el triplicat de cada recta de calibrat ($n=9$ per cada concentració de lactat). Així, per una concentració de lactat, una RSD alta vol dir que els tres calibrats són diferents, mentre que si la RSD és baixa, els tres calibrats són similars. A la *taula 1* es poden veure que les RSD calculades per cada punt emprant les senyals corregides (S/V) són baixes. Això indica que el fet de corregir la senyal colorimètrica pel volum de mostra ens pot ajudar a reduir l'efecte de la variació del volum de mostra en la senyal colorimètrica.

[Lactat] (mM)	0	5	10	15	20	25	30
S/V	15	11	9,2	9,3	9,7	10	6,4

Taula 1: Desviació estàndard relativa (RSD, %) de cada punt del calibrat de la corba de calibrat de lactat calculat emprant tots els replicats per cada volum (6,5 μ L, 7 μ L i 8 μ L, $n=9$)

4.1.4. Validació en exercici

Finalment, vam provar el nostre dispositiu mentre es fa exercici físic. Com es pot veure a la *figura 13A*, cinc voluntaris sans van dur a terme una rutina de bicicleta estàtica en cinc etapes dissenyades per intentar canviar els valors de lactat en suor. Els canvis de lactat observats en cada individu poden ser diferents dependent de l'estat físic de cada un, o de l'edat, entre altres paràmetres²⁰. Les *figures 13B – F* mostren la quantificació de lactat durant la rutina d'exercici emprant la nostra plataforma analítica (vermell) o un mètode de referència (negre).

Resultats

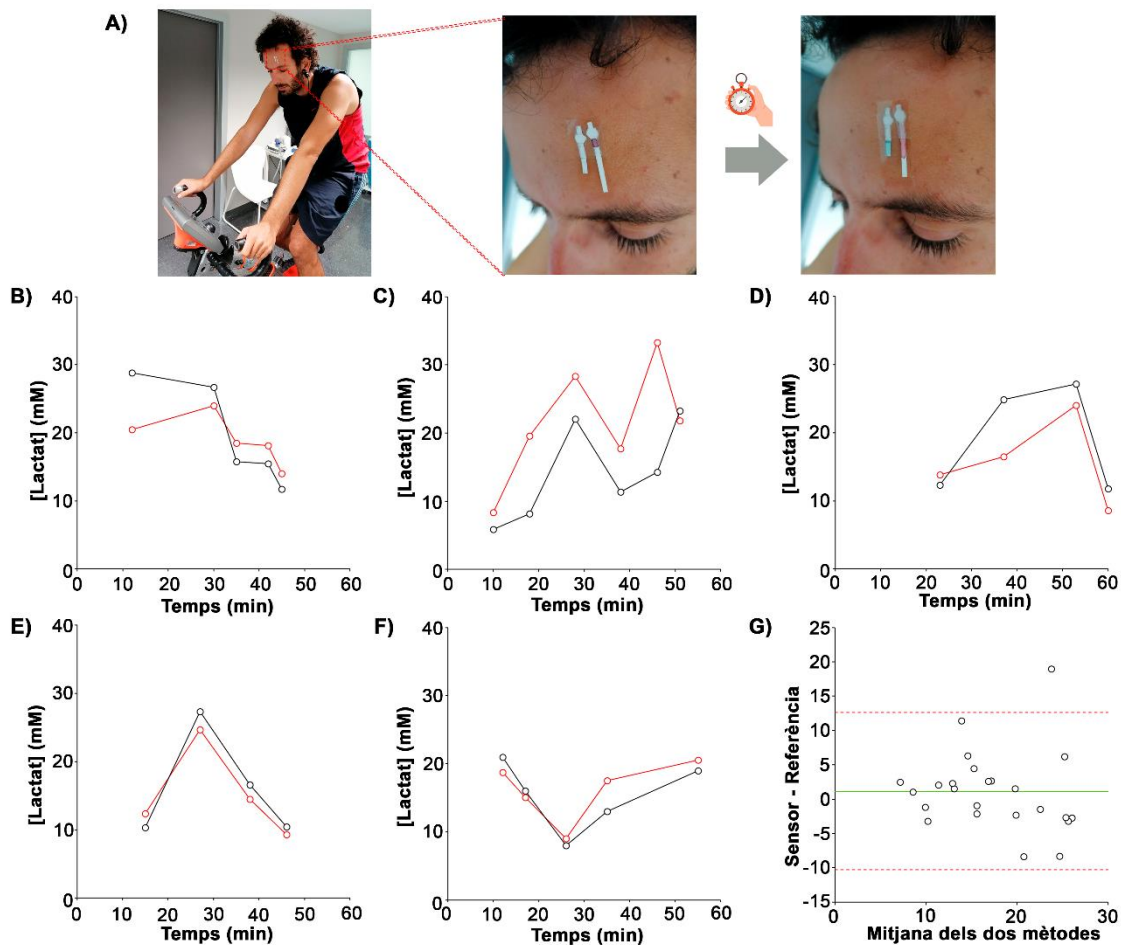


Figura 13: Mesures de Lactat en suor corregides pel volum emprant la plataforma analítica proposada. (A) Fotografies mostrant el dispositiu portat per un voluntari. (B – F) Mesures de Lactat en cinc voluntaris sans a diferents temps. Les mesures de lactat en suor es van fer amb la plataforma “wearable” proposada amb correcció del volum (vermell) i amb un mètode de laboratori (negre). (G) Gràfic de Bland – Altman representant totes les mesures fetes.

A la figura 13G es representa el gràfic de Bland – Altman plot de totes les mesures fetes i es pot veure que, exceptuant un valor atípic, les mesures fetes amb el mètode de laboratori i les obtingudes amb la plataforma analítica, segueixen la mateixa tendència i es troben dins l'àrea que representa el 95% de concordança entre els dos mètodes. També es pot observar una petita desviació (biaix), representat en verd, ja que els valors mesurats amb el nostre sensor són lleugerament superiors als mesurats amb el mètode de referència. Aquesta desviació positiva pot ser causada per la presència de glucosa en la suor (veure apartat 4.1.5. **Selectivitat i interferències**). Tot i això, la desviació no és estadísticament significativa, indicant que els dos mètodes donen mesures equivalents (*test t*, $p > 0,1$).

4.1.5. Selectivitat i interferències

Per tal de descartar possibles interferències causades per altres composts presents a la suor en la generació de la senyal colorimètrica del sensor de lactat, vam fer un estudi de selectivitat. En aquest, es va emprar PBS i suor artificial com a controls negatius. Es van avaluar les interferències de urea (80 mM) i glucosa (0,1 mM) en matriu de suor artificial. El control positiu correspon a una dissolució de 15 mM de lactat en suor artificial. Es van afegir 6 μ L de les diferents solucions i es va comparar la senyal colorimètrica. A la *figura 14* es pot veure que la glucosa dona senyals lleugerament superiors al control negatiu, cosa que ens pot provocar la desviació observada en el gràfic de Bland – Altman (*figura 13G*).

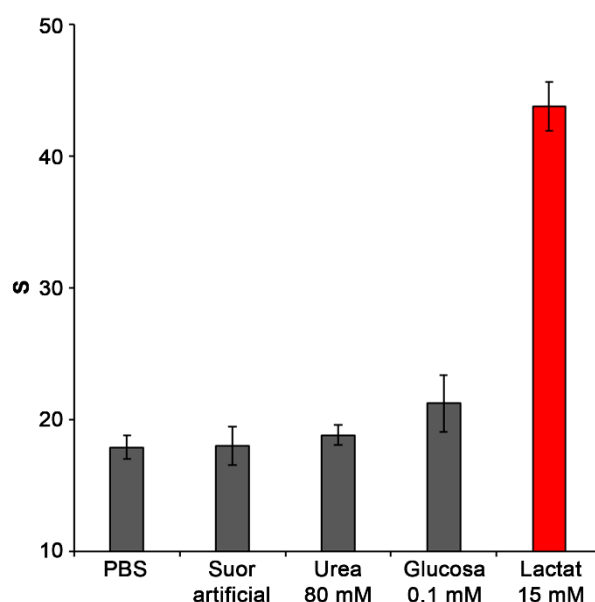


Figura 14: Estudis de selectivitat. Controls negatius: PBS i suor artificial. Controls positius: urea 80 mM, glucosa 0,1 mM i lactat 15 mM (preparats en suor artificial). Les barres d'error representen la desviació típica (SD, n=3).

Les variacions de pH en la suor poden afectar a l'activitat enzimàtica i, per tant, pot contribuir a incrementar la variabilitat entre experiments. Per avaluar la possible influència del pH en la senyal colorimètrica obtinguda, es van fer calibrats en suor artificial a diferents valors de pH (5 – 7). La representació es pot veure a la *figura 15*, on s'observa que a pH 7 (verd) la senyal disminueix lleugerament, segurament perquè el pH no està completament tamponat pels electròlits presents en dissolució.

Resultats

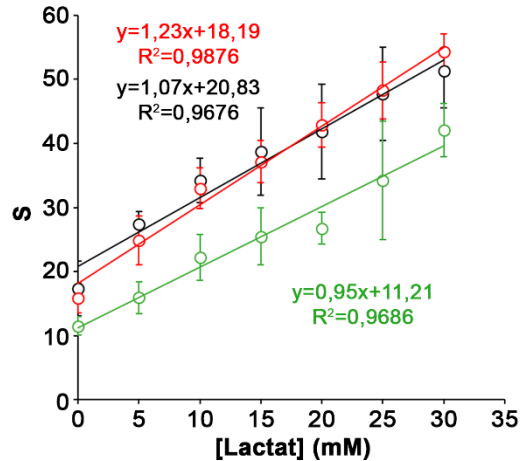


Figura 15: Influència del pH de la suor. Suor artificial amb diferents concentracions de lactat es va ajustar a pH 5 (negre), pH 6 (vermell) i pH 7 (verd). Les barres d'error representen la desviació típica (SD, n=3).

El nostre dispositiu es col·loca al front, per tal de dur a terme les mesures, per la qual cosa es troba lleugerament corbat. Per avaluar si aquest doblegament afectava a la senyal obtinguda, la plataforma analítica es va provar doblegant-la a angles de 0°, 20° i 40°. Com es pot veure a la figura 16, no es detecten diferències significatives entre les mesures pels tres angles i, per tant, queda demostrat que el doblegament no afecta al nostre dispositiu.

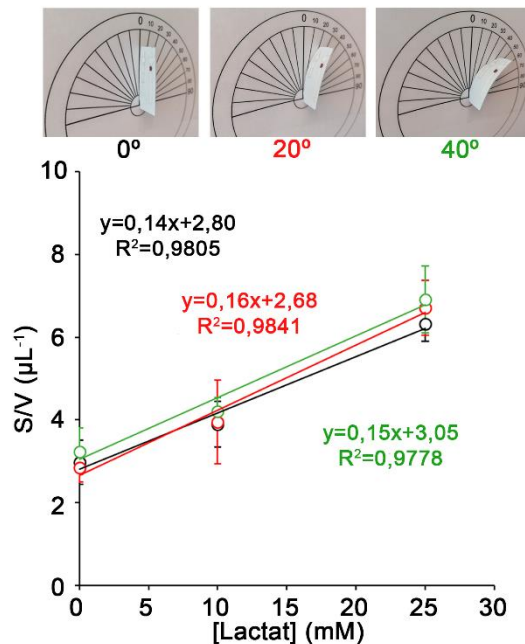


Figura 16: Experiment de doblegament. L'actuació del dispositiu es va provar a 0°, 20° i 40°. Les barres d'error representen la desviació típica (SD, n=3).

4.2. Sensor de glucosa

En el biosensor de glucosa dissenyat, el suor transporta els enzims a través dels poros del paper des d'un reservori fins a la zona de detecció. Igual que en el cas del sensor de lactat, la separació entre enzims i cromogen va ser necessària pel fet que si es mesclaven en la mateixa zona, es generava color espontàniament (*figura 17*).

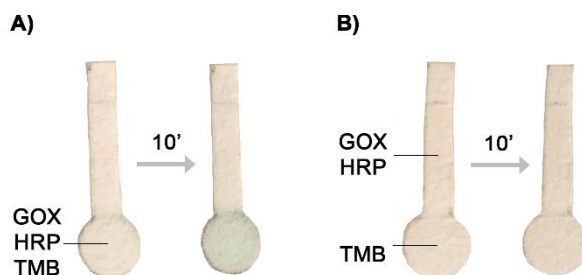


Figura 17: Generació de senyal espontània quan es depositen enzims i TMB en el mateix lloc. (A) GOX, HRP i TMB emmagatzemats en el mateix reservori. (B) Enzims depositats en una zona per damunt de la zona de detecció.

4.2.1. Calibrat

El primer prototip de sensor de glucosa consistia en una tira de paper rectangular contínua, que tenia la zona de detecció modificada amb TMB en un dels seus extrems. Els enzims eren transportats pel flux de mostra fins a la zona de detecció. Com es pot veure a la *figura 2A*, la punta rectangular torna blava a mesura que augmenta la concentració de glucosa. Aquest prototip va ser calibrat afegint un volum fix de mostra (3 μ L) que contenia glucosa a diferents concentracions en el rang entre 0 i 0,1 mM. El calibrat mostra un límit de detecció de 0,008 mM si es calcula com tres vegades la desviació típica del blanc (3SD). Tot i això, es pot veure a la *figura 18A* que la desviació de la senyal obtinguda entre diferents replicats per una mateixa concentració de glucosa és alta i, per tant, això ens limita l'ús del biosensor per detectar concentracions de glucosa de forma precisa. Vam pensar que això podria ser causat per un transport insuficient dels enzims fins a la zona de detecció causat pel petit volum que afegíem (3 μ L). Ja que no era possible fer un calibrat amb un volum major, ja que la tira de paper era incapaç d'absorbir un volum major, vam hipotetitzar que un cap circular podria solucionar aquest problema, ja que ens augmentaria la zona de detecció i, per tant, podríem acréixer el volum de mostra. D'aquesta manera també aconseguiríem elevar el transport d'enzims fins a la zona de detecció i que augmentés la senyal colorimètrica. A la *figura 18B* es mostra el calibrat de biosensors d'extrem circular amb diferents concentracions de glucosa i un volum fix de 7 μ L. En el gràfic es pot veure un augment

Resultats

de la pendent de la recta respecte al prototip rectangular (277 vs 202, respectivament). Aquest resultat confirma la nostra hipòtesi que un extrem més gran augmenta la senyal perquè pot absorbir més mostra. A més, aquest nou prototip, presenta encara un límit de detecció baix (0,01 mM) i la desviació estàndard entre diferents replicats d'un mateix punt és menor. Cal destacar que el biosensor dissenyat presenta un rang lineal (0,01 mM – 0,15 mM) que conté el rang fisiològic de glucosa en suor (0,04 – 0,1 mM) i també ens permet detectar el valor llindar de hipoglucèmia en pacients que pateixen diabetis tipus 1 (<0,03 mM)⁴⁵.

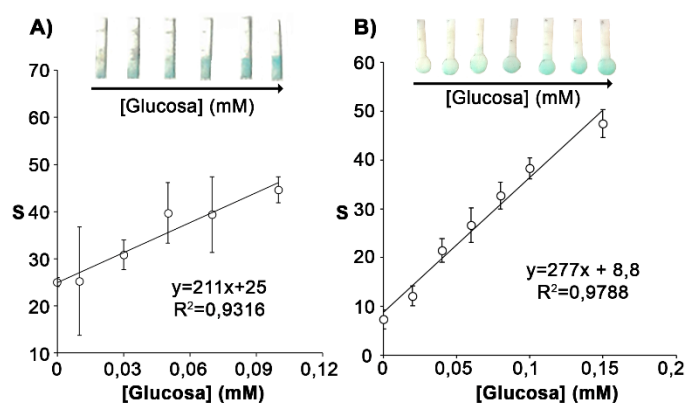


Figura 18: Influència de la forma del biosensor en la senyal colorimètrica S. (A) Calibrat en el disseny de cap rectangular. (B) Calibrat en el disseny d'extrem circular. Les barres d'error representen la desviació típica (SD, n=3).

4.2.2. Correcció de lluminositat i volum

Els resultats que es mostren a l'apartat anterior es van obtenir amb un volum de mostra fixe i escanejant el sensor amb un escàner que manté unes condicions de lluminositat controlades. Aquests dos paràmetres ens variaran en una aplicació real, cosa que ens pot comprometre la fiabilitat de les mesures de glucosa que s'obtinguin amb el sensor. Per aquest motiu, la nostra plataforma analítica incorpora un sensor que ens permet mesurar el volum de suor i un patró de color que ens ajuda a compensar els canvis de lluminositat. Com ja s'ha vist en l'apartat "**Estimació dels nivells de lactat variant el volum de mostra**" controlar el volum és clau ja que, quant més volum entra al sensor, més volum i més enzims arriben fins a la zona de detecció i, per tant, també canvia la senyal colorimètrica obtinguda per una mateixa concentració d'analit. Aquest fet es demostra, pel cas del sensor glucosa, en la *figura 19A*, en que augmentant el volum de solució que conté glucosa 0,1 mM, augmentem la senyal colorimètrica generada pel sensor. Amb aquest disseny, el volum es pot calcular amb el sensor que es mostra a la *figura 19B*. En el gràfic es pot veure la relació lineal entre la distància recorreguda per

Resultats

les nanopartícules d'or a través de la tira de paper i el volum afegit. S'ha de destacar que el sensor de volum pot mesurar canvis entre 2,5 i 8 μL .

Una vegada caracteritzat el sensor de volum, es va avaluar l'impacte que tenia la correcció pel volum en el rang dinàmic lineal i el límit de detecció del calibrat en glucosa. A la *figura 19C* es pot veure el gràfic obtingut de dividir cada una de les senyals colorimètriques obtingudes amb el sensor de glucosa, pel volum mesurat amb el sensor de volum de suor. Si es compara amb el calibrat de la *figura 18B*, es pot veure que el rang lineal no ha canviat, segueix entre 0 i 0,15 mM. És més, el LOD (criteri de 3SD) segueix sent 0,01 mM. Així queda demostrat que el fet de corregir la senyal obtinguda pel volum no compromet la validesa dels resultats obtinguts amb la plataforma analítica.

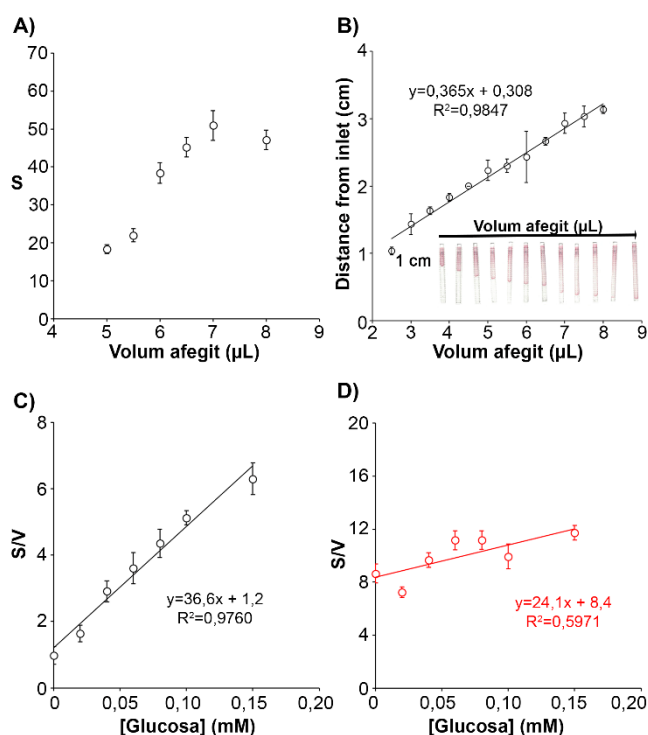


Figura 19: Influència de la correcció de color i volum en la detecció de glucosa. (A) Senyal colorimètrica, S, obtinguda amb el sensor de glucosa després d'afegir diferents volums de la mateixa concentració de glucosa. (B) Calibrat del sensor de volum. (C) Calibrat del sensor de glucosa amb diferents concentracions de glucosa dividint la senyal obtinguda del volum mesurat amb el sensor de volum de suor. (D) Mateix calibrat que en (C) però sense corregir la lluminositat. Les barres d'error representen la desviació típica (SD, n=3).

La senyal colorimètrica de la *figura 19C* es va calcular a partir de les imatges que es van fer amb la càmera d'un telèfon mòbil en condicions de llum canviants i, posteriorment, corregint la lluminositat amb l'ajuda d'un patró de color. A la *figura 19D* es poden veure les dades obtingudes amb les mateixes imatges sense corregir la lluminositat. Com es

pot veure, s'obté una recta amb una pendent molt menor i amb un coeficient de regressió molt més baix, cosa que deixa palesa la importància de corregir la lluminositat.

4.2.3. Selectivitat i interferències

Després de les correccions de lluminositat i volum, vam avaluar l'existència d'altres possibles interferents com podrien ser les variacions en el pH de la suor, el doblegament del sensor en diferents angles i el temps que transcorre entre la generació de la senyal colorimètrica i la lectura. Normalment, en sistemes enzimàtics, la generació de senyal augmenta amb el temps fins a arribar a un punt de saturació. Això ens pot provocar variabilitat en la senyal obtinguda si no es controla bé el temps de mesura. Com es pot veure a la *figura 20A*, en el nostre biosensor de glucosa, la senyal colorimètrica es manté constant quan han passat 3 min des que la mostra ha entrat en el sensor, per la qual cosa no és necessari controlar el temps de mesura de forma precisa.

Com ja s'ha discutit prèviament (veure l'apartat: "biosensor de lactat: selectivitat i interferències") l'angle de doblegament del biosensor pot afectar a la capil·laritat i el transport de fluids a través del paper, per la qual cosa es va avaluar també en aquest cas, l'actuació del biosensor quan es doblegava en diferents angles (0° , 20° i 40°). Com es pot veure en la *figura 20B*, el biosensor es comporta de forma similar en els tres casos. Encara que quan es doblega 40° la disminució de la pendent de la recta és del 16%, la diferència no és estadísticament significativa ($p > 0,05$). Aquest fet indica que sotmetre el biosensor a doblegaments molt acusats podria comprometre la detecció correcta de biomarcadors en suor.

Atès que els enzims, tant GOX com HRP, poden variar la seva activitat enzimàtica depenent del pH es va avaluar també l'efecte d'un canvi de pH com a font de variabilitat en la senyal. Així, el rang de pH en què es troba la suor és de 4,5 a 7, per la qual cosa es van dur a terme calibrats amb diferents dilucions de glucosa preparades en una matriu de suor artificial que s'havia ajustat a pH 5, 6 o 7. Els calibrats que es poden veure a la *figura 20C* presenten una pendent pràcticament idèntica, per la qual cosa es pot descartar el pH com a possible font de variabilitat.

Resultats

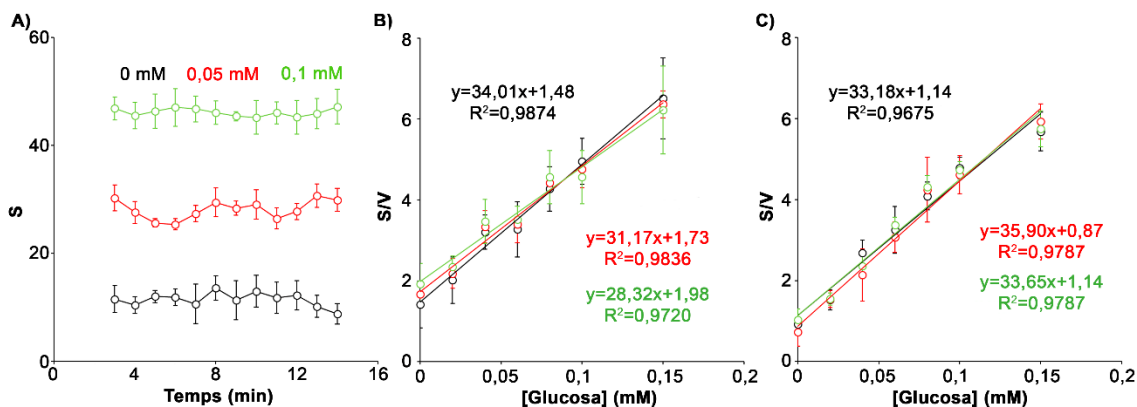


Figura 20: Influença del temps d'adquisició de la senyal, l'angle de doblegament i el pH en la senyal colorimètrica. (A) Variació de senyal S a diferents temps d'adquisició de la senyal (de 3 a 14 min) per tres concentracions de glucosa diferents. (B) Rectes de calibrat per tres angles de doblegament diferents: 0° (negre), 20° (verd) i 40° (vermell). (C) Corbes de calibrat a tres valors de pH diferents: 5 (vermell), 6 (verd), 7 (negre). Les barres d'error representen la desviació típica (SD, n=3).

4.2.4. Validació en una rutina d'exercici

El dispositiu dissenyat es va aplicar per mesurar glucosa en nou voluntaris sans durant una rutina de bicicleta estàtica. En la correcció pel volum de suor es considera que les entrades dels dos sensors (glucosa i volum) estan tant junts que el volum que entra en els dos és equivalent. La rutina d'exercici comença amb un escalfament de 15 min, seguit d'augments de càrrega progressius cada 10 min. El valor de glucosa va ser mesurat abans de prendre un gel energètic que ens puja el nivell de glucosa en sang i que, per tant, ens duu a pujar també el nivell de glucosa en suor. Per obtenir la concentració de glucosa en suor, les senyals colorimètriques del biosensor de glucosa es van corregir amb el patró de color i es van dividir pel volum de suor. Després, es va interpolar la corresponent senyal colorimètrica en la recta de calibrat.

Resultats

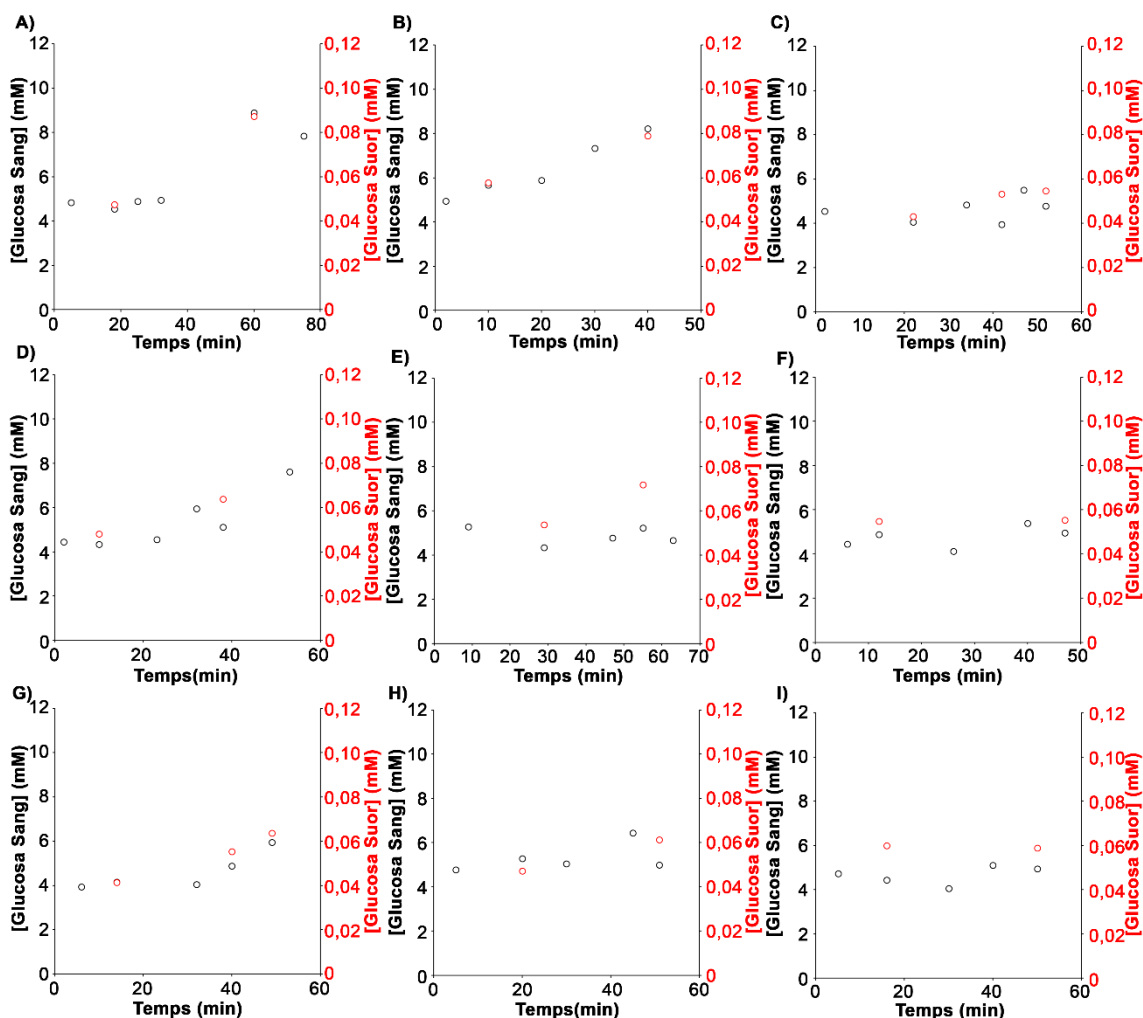


Figura 21: Detecció de glucosa en suor amb la plataforma analítica proposada (vermell) i de glucosa en sang amb un glucòmetre comercial (negre) en nou voluntaris sans (A – I).

En la *figura 21* es poden veure els gràfics obtinguts de comparar els valors de glucosa mesurats amb el nostre dispositiu “wearable” i els valors mesurats en sang amb un glucòmetre comercial en cada un dels voluntaris. S’observa que els dos mètodes donen valors de glucosa comparables, amb una concentració de glucosa en suor de l’ordre de 100 vegades menor que en sang. Així, les mesures de glucosa en sang durant exercici podrien ser substituïdes per mesures menys invasives de glucosa en suor. A la *figura 22* es pot veure una correlació estadísticament significativa entre els valors de glucosa en sang mesurats amb el glucòmetre comercial i els valors de glucosa en suor mesurats amb la nostra plataforma analítica.

Resultats

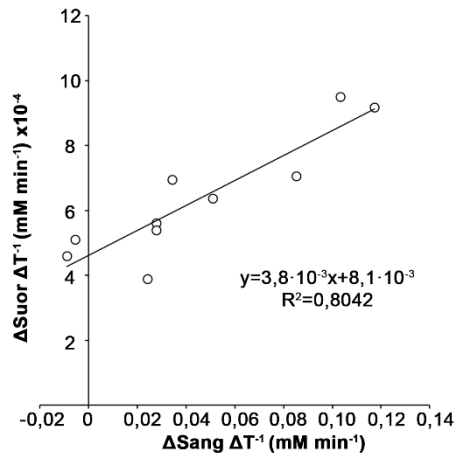


Figura 22: Correlació entre la concentració de glucosa en suor (el nostre dispositiu) i en sang (glucòmetre comercial).

5. Conclusions

En aquest treball s'han desenvolupat dos dispositius wearable basats en paper per detectar biomarcadors en suor. El primer ens permet detectar L-lactat i volum de mostra. Té un rang dinàmic lineal entre 0 i 30 mM de lactat i ens permet corregir la senyal colorimètrica obtinguda pel volum de suor. El rang lineal és modulable, depenent de la quantitat d'inhibidor de la lactat oxidasa que es deposita en el biosensor. La plataforma ha estat aplicada a un grup de voluntaris sans que van dur a terme una rutina de bicicleta i s'han comparat els valors de lactat mesurats amb el biosensor amb les obtinguts amb un mètode de referència⁴³.

El segon dispositiu dissenyat ens permet detectar glucosa en suor per colorimetria. Presenta una alta sensibilitat (LOD: 0,01 mM) i té un rang dinàmic lineal entre 0,01 mM i 0,15 mM, cosa que ens permet mesurar glucosa en suor en el rang fisiològic. A més, la plataforma analítica també conté un sensor de volum que ens permet mesurar el volum de mostra que entra en el dispositiu i corregir la senyal colorimètrica pel volum. També s'ha validat en exercici, per aplicació del biosensor en nou voluntaris sans. Els valors de glucosa obtinguts s'han correlacionat amb els mesurats en sang amb un glucòmetre comercial⁴⁴.

Les plataformes analítiques presentades deixen palès que els seus components poden ser fàcilment adaptats a les necessitats de l'usuari. Per exemple, el sensor de volum de suor pot ser adaptat per mesurar volums en diferents rangs just canviant la forma i la llargària del disseny de microfluídica. A més, el fet d'aplicar-se a dos biomarcadors diferents obri la possibilitat de ser aplicat en la detecció d'altres analits simplement canviant la oxidoreductasa present en el biosensor. També, en un futur, es podria aplicar el mateix concepte per fer un dispositiu microfluídic wearable que permeti mesures seqüencials separades un cert interval de temps.

6. Annexes

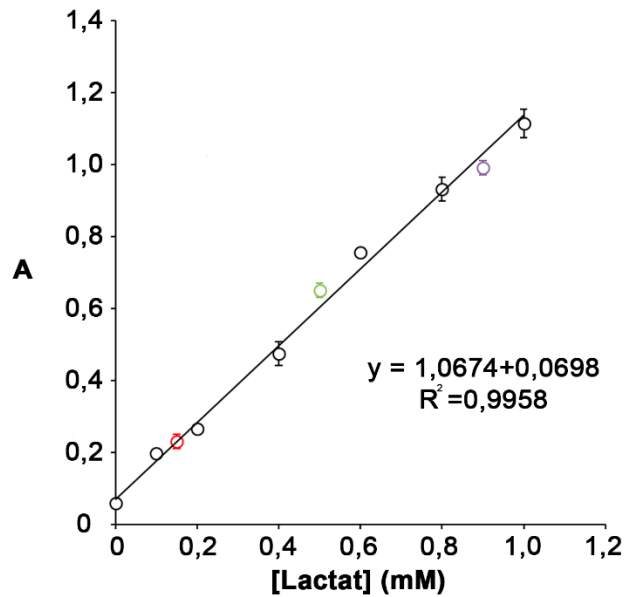


Figura 23: Detecció espectrofotomètrica de lactat. El mètode va ser validat de la següent manera: la linealitat es va avaluar emprant una recta de calibrat de 0 a 1 mM de lactat (representat en negre). La precisió, entesa com la concordància entre una mostra quantificada i el valor teòric va ser avaluada emprant tres preparacions independents de 0,15 mM (vermell), 0,5 mM (verd) i 0,9 mM (lila). Els resultats compleixen els criteris d'acceptació amb valors de 100%, 102% i 98%, respectivament. La reproduïbilitat va ser avaluada emprant la desviació estàndard relativa (RSD, %) de tres replicats de cada punt. Els resultats van ser 8%, 4% i 2%, respectivament, que van ser considerats apropiats per un mètode de referència.

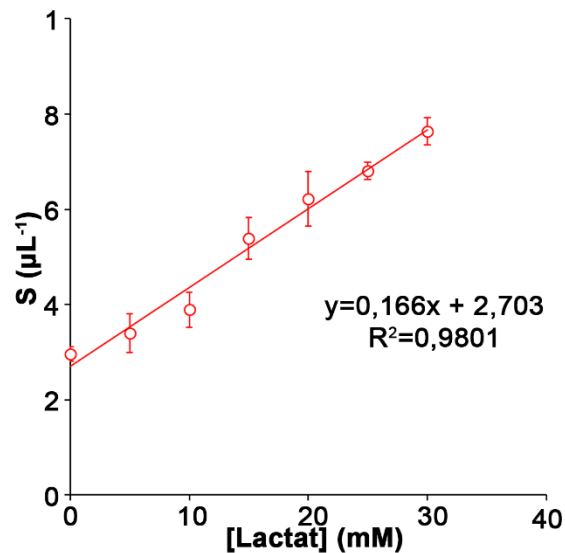


Figura 24: Calibració del biosensor de lactat a 37 °C.

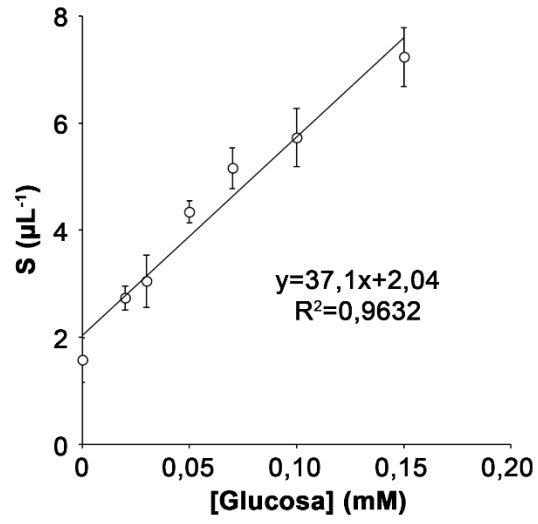


Figura 25: Calibrat del biosensor de glucosa a 37 °C

7. Bibliografia

1. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
2. Mehrotra, P. Biosensors and their applications - A review. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* **6**, 153–159 (2016).
3. Malhotra, B. D. & Pandey, C. M. *Book-Biosensors: Fundamentals and Applications.* (2017).
4. Wu, J. *et al.* Streptavidin-biotin-peroxidase nanocomplex-amplified microfluidics immunoassays for simultaneous detection of inflammatory biomarkers. *Anal. Chim. Acta* **982**, 138–147 (2017).
5. Clemente, A. *et al.* Rapid Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms via Enzymatic Liquefaction of Respiratory Samples. *ACS Sensors* **5**, 3956–3963 (2020).
6. Gong, H. *et al.* Nanomaterial Biointerfacing via Mitochondrial Membrane Coating for Targeted Detoxification and Molecular Detection. *Nano Lett.* **21**, 2603–2609 (2021).
7. Xiang, W., Lv, Q., Shi, H., Xie, B. & Gao, L. Aptamer-based biosensor for detecting carcinoembryonic antigen. *Talanta* **214**, 120716 (2020).
8. Zhou, W., Jimmy Huang, P. J., Ding, J. & Liu, J. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst* **139**, 2627–2640 (2014).
9. Damborský, P., Švitel, J. & Katrlík, J. Optical biosensors. *Essays Biochem.* **60**, 91–100 (2016).
10. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. & Reimhult, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors* **8**, 1400–1458 (2008).
11. Nayak, S., Blumenfeld, N. R., Laksanasopin, T. & Sia, S. K. Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age. *Anal. Chem.* **89**, 102–123 (2017).
12. Sachdeva, S., Davis, R. W. & Saha, A. K. Microfluidic Point-of-Care Testing: Commercial Landscape and Future Directions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1–14 (2021).
13. Hladek, M. D. *et al.* Using sweat to measure cytokines in older adults compared

Bibliografia

- to younger adults: A pilot study. *J. Immunol. Methods* **454**, 1–5 (2018).
14. Quinton, P. M. Cystic fibrosis: Lessons from the sweat gland. *Physiology* **22**, 212–225 (2007).
 15. Mark, H. & Harding, C. R. Amino acid composition, including key derivatives of eccrine sweat: Potential biomarkers of certain atopic skin conditions. *Int. J. Cosmet. Sci.* **35**, 163–168 (2013).
 16. Baker, L. B. *et al.* Skin-interfaced microfluidic system with personalized sweating rate and sweat chloride analytics for sports science applications. *Sci. Adv.* **6**, 17–19 (2020).
 17. Hong, Y. J. *et al.* Multifunctional Wearable System that Integrates Sweat-Based Sensing and Vital-Sign Monitoring to Estimate Pre-/Post-Exercise Glucose Levels. *Adv. Funct. Mater.* **28**, (2018).
 18. Al-Tamer, Y. Y., Hadi, E. A. & Al-Badrani, I. E. I. Sweat urea, uric acid and creatinine concentrations in uraemic patients. *Urol. Res.* **25**, 337–340 (1997).
 19. Foxdal, P., Sjodin, B., Sjodin, A. & Ostman, B. The validity and accuracy of blood lactate measurements for prediction of maximal endurance running capacity. Dependency of analyzed blood media in combination with different designs of the exercise test. *Int. J. Sports Med.* **15**, 89–95 (1994).
 20. Karpova, E. V., Laptev, A. I., Andreev, E. A., Karyakina, E. E. & Karyakin, A. A. Relationship Between Sweat and Blood Lactate Levels During Exhaustive Physical Exercise. *ChemElectroChem* **7**, 191–194 (2020).
 21. Guk, K. *et al.* Evolution of wearable devices with real-time disease monitoring for personalized healthcare. *Nanomaterials* **9**, 1–22 (2019).
 22. Jeon, S. & Chua, B. Conductive polylactic-acid filament for dose monitoring in syringe-less wearable infusion pump. *Sensors Actuators, B Chem.* **258**, 1080–1089 (2018).
 23. Ray, T. R. *et al.* Bio-integrated wearable systems: A comprehensive review. *Chem. Rev.* **119**, 5461–5533 (2019).
 24. Toepke, M. W. & Beebe, D. J. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab Chip* **6**, 1484–1486 (2006).
 25. Singhal, H. R., Prabhu, A., Giri Nandagopal, M. S., Dheivasigamani, T. & Mani, N.

Bibliografia

- K. One-dollar microfluidic paper-based analytical devices: Do-It-Yourself approaches. *Microchem. J.* **165**, 106126 (2021).
26. Komatsu, T. *et al.* Dip-Type Paper-Based Analytical Device for Straightforward Quantitative Detection without Precise Sample Introduction. *ACS Sensors* **6**, 1094–1102 (2021).
27. Modha, S., Castro, C. & Tsutsui, H. Recent developments in flow modeling and fluid control for paper-based microfluidic biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **178**, 113026 (2021).
28. Prats-Alfonso, E., Abad, L., Casañ-Pastor, N., Gonzalo-Ruiz, J. & Baldrich, E. Iridium oxide pH sensor for biomedical applications. Case urea-urease in real urine samples. *Biosens. Bioelectron.* **39**, 163–169 (2013).
29. Yoo, E. H. & Lee, S. Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors* **10**, 4558–4576 (2010).
30. Luo, X., Xia, J., Jiang, X., Yang, M. & Liu, S. Cellulose-Based Strips Designed Based on a Sensitive Enzyme Colorimetric Assay for the Low Concentration of Glucose Detection. *Anal. Chem.* **91**, 15461–15468 (2019).
31. Roda, A. *et al.* A challenge in biosensors: Is it better to measure a photon or an electron for ultrasensitive detection? *Biosens. Bioelectron.* **155**, 112093 (2020).
32. Kucherenko, I. S., Soldatkin, O. O., Topolnikova, Y. V., Dzyadevych, S. V. & Soldatkin, A. P. Novel Multiplexed Biosensor System for the Determination of Lactate and Pyruvate in Blood Serum. *Electroanalysis* **31**, 1625–1631 (2019).
33. Rassaei, L., Olthuis, W., Tsujimura, S., Sudhölter, E. J. R. & Van Den Berg, A. Lactate biosensors: Current status and outlook. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 123–137 (2014).
34. Cheng, H., Hu, C., Ji, Z., Ma, W. & Wang, H. Biosensors and Bioelectronics A solid ionic Lactate biosensor using doped graphene-like membrane of Au-. *Biosens. Bioelectron.* **118**, 97–101 (2018).
35. Choi, J. *et al.* Soft, skin-integrated multifunctional microfluidic systems for accurate colorimetric analysis of sweat biomarkers and temperature. *ACS Sensors* **4**, 379–388 (2019).
36. Gao, B. *et al.* Bioinspired Kirigami Fish-Based Highly Stretched Wearable

Bibliografia

- Biosensor for Human Biochemical–Physiological Hybrid Monitoring. *Adv. Mater. Technol.* **3**, 1–8 (2018).
37. Koh, A. *et al.* A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat. *Sci. Transl. Med.* **8**, (2016).
38. Onor, M. *et al.* Potentiometric sensor for non invasive lactate determination in human sweat. *Anal. Chim. Acta* **989**, 80–87 (2017).
39. Zhang, P. *et al.* A combined NMR- and HPLC-MS/MS-based metabolomics to evaluate the metabolic perturbations and subacute toxic effects of endosulfan on mice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**, 18870–18880 (2017).
40. Crha, T. & Pazourek, J. Rapid HPLC method for determination of isomaltulose in the presence of glucose, sucrose, and maltodextrins in dietary supplements. *Foods* **9**, (2020).
41. Ma, C., Sun, Z., Chen, C., Zhang, L. & Zhu, S. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC-ELSD. *Food Chem.* **145**, 784–788 (2014).
42. Karon, B. S., Scott, R., Burritt, M. F. & Santrach, P. J. Comparison of lactate values between point-of-care and central laboratory analyzers. *Am. J. Clin. Pathol.* **128**, 168–171 (2007).
43. Vaquer, A., Barón, E. & De La Rica, R. Wearable Analytical Platform with Enzyme-Modulated Dynamic Range for the Simultaneous Colorimetric Detection of Sweat Volume and Sweat Biomarkers. *ACS Sensors* **6**, 130–136 (2021).
44. Vaquer, A., Barón, E. & De La Rica, R. Detection of low glucose levels in sweat with colorimetric wearable biosensors. *Analyst* **146**, 3273–3279 (2021).
45. Cox, D. J. *et al.* Hypoglycemia anticipation, awareness and treatment training (HAATT) reduces occurrence of severe hypoglycemia among adults with type 1 diabetes mellitus. *Int. J. Behav. Med.* **11**, 212–218 (2004).