



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO
EN ELECTROQUIMICA



**“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE HIDROGELES
ENZIMÁTICOS BASADOS EN BPEI/GOX PARA SU
APLICACIÓN EN BIOSENSORES DE GLUCOSA”**

TESIS PRESENTADA POR:

(M. en EQ.) JAN-CARLO MIGUEL DÍAZ GONZÁLEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORADO EN ELECTROQUÍMICA

FEBRERO, 2024

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

REALIZADO POR:

M. en EQ. JAN-CARLO MIGUEL DÍAZ GONZÁLEZ

DIRIGIDA POR

Dr. Jannu Ricardo Casanova Moreno

CODIRIGIDA POR

Dr. Luis Gerardo Arriaga Hurtado

SINODALES

Dr. Yunny Meas Vong
Presidente

Firma

Dr. Luis Antonio Ortiz Frade
Secretario

Firma

Dra. Beatriz Liliana España Sánchez
Vocal

Firma

Dr. Fernando Battaglini
Vocal

Firma

Dr. Walter Noé Velázquez Arjona
Vocal

Firma

Dr. Goldie Harikrishna Oza
Suplente

Firma

Resumen

En este trabajo, se estudió la morfología, propiedades mecánicas, respuesta electroquímica y degradación de biosensores enzimáticos de primera generación. Estos biosensores se basaron en hidrogeles conformados por glucosa oxidasa (GOx) y polietilenimina ramificada (BPEI), usando glutaraldehído (GA) o etilenglicol diglicidil éter (EGDGE) como entrecruzadores. La morfología de los hidrogeles se investigó por microscopía de campo claro y fluorescencia, ya sea mediante el etiquetado de los componentes del hidrogel con fluoróforos, como fue el caso de los entrecruzados con EGDGE, o aprovechando la fluorescencia intrínseca posterior al entrecruzamiento, como sucedió con GA. En general, se observó que el GA produjo hidrogeles más homogéneos y estables mientras que con EGDGE se pudo observar una segregación entre la enzima y el polímero. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles se caracterizaron mediante nanoindentación, termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los hidrogeles entrecruzados con GA presentaron valores más altos de módulo de elasticidad, dureza y rigidez en comparación con los hidrogeles entrecruzados con EGDGE, lo que se relacionó con la formación de redes más compactas por parte del GA. Los análisis de TGA y DSC revelaron distintas etapas de descomposición siendo los hidrogeles entrecruzados con GA, los que presentaron un mayor número de etapas, posiblemente debido a la complejidad molecular de esta sustancia en medios acuosos. Por otro lado, se analizó el proceso de hinchamiento de los hidrogeles, destacando un incremento notable en el hinchamiento y solubilidad de los hidrogeles con EGDGE. Lo anterior se atribuyó a la presencia de grupos polares como -OH y a una mayor absorción de agua dentro de las redes tridimensionales poliméricas. Asimismo, se observó que la estabilidad de ambos tipos de hidrogeles experimentó un significativo aumento cuando se depositaron sobre superficies de oro en comparación con las superficies de vidrio. Los hidrogeles con EGDGE presentaron una mayor densidad de corriente al incrementar la concentración del entrecruzador, mientras que, en los hidrogeles con GA, la densidad de corriente disminuyó drásticamente, debido a la limitación en el transporte de masa ocasionada por las redes compactas que se formaron. También, se analizó la fotoreactividad de los hidrogeles preparados con GA iluminándolos con luz de diferentes longitudes de onda, lo que permitió caracterizar tanto los procesos de polimerización

como de degradación. Finalmente, se demostró que la pérdida de la señal electroquímica de los hidrogeles después de un uso repetido no se debe a la inestabilidad de los enlaces del entrecruzamiento. Este trabajo, contribuye significativamente a la comprensión de los efectos derivados de la identidad y concentración de los entrecruzadores empleados para la formación de los hidrogeles enzimáticos para biosensado de glucosa. La aplicación de esta y otras estrategias de investigación similares, que no suelen abordarse de manera sistemática, facilita la comprensión de los mecanismos de degradación y proporciona conocimientos para el diseño de mejores biosensores enzimáticos.

Abstract

In this work, the morphology, mechanical properties, electrochemical response and degradation of first-generation enzymatic biosensors were studied. These biosensors were based on hydrogels made up of glucose oxidase (GOx) and branched polyethyleneimine (BPEI), using glutaraldehyde (GA) or ethylene glycol diglycidyl ether (EGDGE) as cross-linkers. The morphology of the hydrogels was investigated by bright-field and fluorescence microscopy, either by labeling the hydrogel components with fluorophores, as was the case for those cross-linked with EGDGE, or by taking advantage of the intrinsic fluorescence after cross-linking, as was the case with GA. In general, it was observed that GA produced more homogeneous and stable hydrogels while with EGDGE a segregation between the enzyme and the polymer could be observed. The mechanical properties of the hydrogels were characterized by nanoindentation, thermogravimetry (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). GA-based hydrogels presented higher values of elastic modulus, hardness and stiffness compared to EGDGE-based hydrogels, which was related to the formation of more compact networks by GA. The TGA and DSC analyzes revealed different stages of decomposition, with the hydrogels cross-linked with GA presenting a greater number of stages, possibly due to the molecular complexity of this substance in aqueous media. On the other hand, the swelling process of the hydrogels was analyzed, highlighting a notable increase in the swelling and solubility of the hydrogels with EGDGE. The above was attributed to the presence of polar groups such as -OH and a greater absorption of water within the three-dimensional polymeric networks. Likewise, it was observed that the stability of both types of hydrogels experienced a significant increase when they were deposited on gold surfaces compared to glass surfaces. EGDGE-based hydrogels presented a higher current density when increasing the concentration of the cross-linker, while, in the GA-based hydrogels, the current density decreased drastically, due to the limitation in mass transport caused by the compact networks that were formed. Also, the photoreactivity of the GA-based hydrogels was analyzed by illuminating them with light of different wavelengths, which allowed characterization of both the polymerization and degradation processes. Finally, it was shown that the loss of electrochemical signal of the hydrogels after repeated use is not due to the instability of the cross-linking bonds. This work contributes significantly to the understanding of the effects derived from the identity and

concentration of the cross-linkers used for the formation of enzymatic hydrogels for glucose biosensing. The application of this and other similar research strategies, which are not usually addressed systematically, facilitates the understanding of degradation mechanisms and provides insights for the design of better enzymatic biosensors.



Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección del Dr. Jannu Ricardo Casanova Moreno y codirección del Dr. Luis Gerardo Arriaga Hurtado

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONAHCYT por la beca de doctorado otorgada y por el financiamiento de del proyecto LN-293442 del Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica (LABMyN). Así mismo, agradezco al CIDETEQ por darme la oportunidad de poder realizar mis estudios de posgrado y formar profesionales altamente capacitados.

Quiero agradecer a mi madre, Diego, y mis hermanos Vanessa y Bryan por siempre estar motivándome y confiar en mí hasta el final. Agradezco a Dios por todo y por la dicha de ser papá durante este proceso. A mi hijo Luca, por ser mi motor y motivación más grande para poder culminar este proceso tan largo y difícil, que al fin todo lo hago por él.

Especialmente quiero agradecer al Dr. Jannu por siempre creer en mí y por la persona que ha sido a lo largo de estos más de seis años de conocernos y trabajar juntos. Quiero que sepa que es un gran ser humano y la motivación de muchos de nosotros para ser grandes investigadores y personas.

Agradezco a todos y cada una de las personas, los cuales son grandes amigos hoy en día, que formaron parte de este proceso de aprendizaje y que aportaron mucho durante mi formación. Todos los del grupo de trabajo: Carlos, Roberto, Gilberto, Diana, Dariel y especialmente a ti Lulú, que has sido un gran apoyo para mí y me has ayudado bastante.

Resumen	I
Abstract	III
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XIII
1 Introducción	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Hipótesis	4
1.3 Objetivo	4
1.3.1 Objetivos específicos.....	4
2 Marco teórico	5
2.1 Biosensores electroquímicos enzimáticos	5
2.1.1 Biosensores de primera generación para la detección de glucosa.....	6
2.2 Métodos de inmovilización enzimática	7
2.3 Hidrogeles.....	9
2.4 Cinética de hinchamiento de hidrogeles	10
2.5 Patrones de formación y propiedades físicas de hidrogeles	15
2.5.1 Formación de anillos	15
2.5.2 Inestabilidad morfológica en materiales suaves	17
2.6 Espectroscopía de fluorescencia	18
2.6.1 Fotoblanqueo (<i>photobleaching</i>).....	19
3 Antecedentes	21
4 Metodología experimental	26
4.1 Reactivos y soluciones.....	26
4.2 Instrumentación y procedimientos.....	26
4.2.1 Diseño de celda electroquímica.....	26
4.2.2 Etiquetado fluorescente de la glucosa oxidasa y polietilenimina ramificada	
27	
4.2.3 Preparación de hidrogeles.....	28
4.2.4 Evaluaciones ópticas.....	29
4.2.5 Determinación de la relación de hinchamiento de los hidrogeles	30
4.2.6 Análisis por espectroscopia FT-IR.....	31

4.2.7	Análisis por perfilometría de contacto, microscopia de fuerza atómica y nanoindentación.....	31
4.2.8	Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido.....	32
4.2.9	Evaluaciones electroquímicas	32
5	Resultados y discusión	34
5.1	Caracterización morfológica de los hidrogeles.....	34
5.2	Medición de las propiedades mecánicas y térmicas de los hidrogeles	38
5.2.1	Microscopía de fuerza atómica y nanoindentación.....	38
5.2.2	Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido.....	42
5.3	Caracterización del proceso de hinchamiento de los hidrogeles	46
5.4	Efecto de la naturaleza y concentración del entrecruzador en la respuesta electroquímica	53
6	Caracterización de los procesos de fotopolimerización y fotodegradación en hidrogeles BPEI/GOx/GA.....	64
6.1	Caracterización de la degradación del enlace imina en los hidrogeles BPEI/GOx/GA.....	67
6.2	Efecto de los procesos de fotopolimerización y fotodegradación en la respuesta electroquímica	69
7	Conclusiones generales.....	72
8	Anexos	75
9	Referencias.....	76

Índice de figuras

Fig. 1. Clasificación de biosensores electroquímicos enzimáticos.	6
Fig. 2. Mecanismos de reacción del glutaraldehído (a) y etilenglicol diglicidil éter (b) con grupos funcionales amino.	9
Fig. 3. Proceso de hinchamiento de un hidrogel catiónico. La incorporación de moléculas de agua dentro de la estructura tridimensional conduce a una expansión de las regiones de unión y cadenas poliméricas, lo que resulta en un aumento de la distancia (d) entre ellas. Además, la presencia de iones en el medio favorece un mayor grado de hinchamiento.	12
Fig. 4. Sección transversal de un hidrogel no denso con estructura de poro abierto. ξ es el tamaño de malla de la red de entrecruzamiento, Dv y Dw son el tamaño de poro y el tamaño de las interconexiones entre poros, respectivamente. " Reimpreso (adaptado) con permiso de (Foudazi R, Zowada R, Manas-Zloczower I, Feke DL (2023) Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities. Langmuir 39:2092–2111). Copyright (2023) American Chemical Society".....	14
Fig. 5. Modo de área de contacto constante (a) y ángulo de contacto constante (b) que describen el movimiento de la línea de contacto trifásica (LCT) durante el proceso de secado de una gota.....	16
Fig. 6. Tipos de flujos dominantes en el secado de una gota que favorecen el movimiento y difusión de moléculas para la formación de patrones.....	17
Fig. 7. Tipos de inestabilidades morfológicas en materiales suaves. " Reimpreso (adaptado) con permiso de (Li B, Cao YP, Feng XQ, Gao H (2012) Mechanics of morphological instabilities and surface wrinkling in soft materials: A review. Soft Matter 8:5728–5745). Copyright (2012) Royal Society of Chemistry ".	17
Fig. 8. Diagrama de Jablonski y su asociación con los espectros de excitación y emisión de una molécula.	19
Fig. 9. Celda electroquímica basada en sistema de gota.....	27
Fig. 10. Estructura química de las sondas fluorescentes FITC (a) y TRITC (b).	27

Fig. 11. Elementos utilizados para la obtención del hidrogel basado en BPEI/GOx (a) y representación gráfica de un corte transversal del hidrogel depositado sobre el electrodo de oro (b).....	28
Fig. 12. Imágenes de campo claro y fluorescencia de hidrogeles entrecruzados con diferentes concentraciones de EGDGE y GA, depositados sobre superficies de vidrio. Se ajustó el contraste de manera óptima para cada una de las imágenes, por lo que tanto no se pueden comparar las intensidades entre ellas. Las líneas punteadas indican las áreas donde se realizaron las perfilometrías que se muestran en la Fig. 13.	35
Fig. 13. Perfilometrías (a, c) e intensidades de fluorescencia (b, d) de hidrogeles entrecruzados con 3.33 mM de EGDGE (a, b) y GA (c, d) sobre sustratos de vidrio. Ambos análisis se realizaron con base en las áreas señaladas en la Fig. 12 (líneas punteadas).	36
Fig. 14. Caracterización espectroscópica de hidrogeles entrecruzados con GA. Espectro de absorción UV-Vs (a), Espectros de excitación y emisión en tres longitudes de onda determinadas por el espectro UV-Vis (b-d).En las gráficas (b) y (c) se incluyen los espectros de transmisión normalizados de los conjuntos de filtros utilizados.	38
Fig. 15. Micrografías de AFM (amplitud) con un barrido de 10x10µm en hidrogeles BPEI/GOx/GA (a-b) y BPEI/GOx/EGDGE (c-d).	39
Fig. 16. Imágenes de fase de hidrogeles BPEI/GOx/GA (a-b) y BPEI/GOx/EGDGE (c-d).	41
Fig. 17. Curvas carga-profundidad de penetración realizadas (n=9) en la zona central y periférica (izquierda-derecha) de los hidrogeles BPEI/GOx/GA (a-b) y BPEI/GOx/EGDGE (c-d).....	41
Fig. 18. Observación macroscópica de las propiedades físicas/mecánicas de los hidrogeles BPEI/GOx/GA (a) y BPEI/GOx/EGDGE (b).	42
Fig. 19. Curvas de TGA y sus primeras derivadas correspondientes a BPEI (a), GOx (b), BPEI/GOx/GA (c) y BPEI/GOx/EGDGE (d).....	44
Fig. 20. Curvas de TGA de los hidrogeles y reactivos individuales evaluados en un rango de temperatura de 30-650 °C.....	45
Fig. 21. Curvas DSC y primeras derivadas de TGA de BPEI (a), GOx (b), BPEI/GOx/GA (c) y BPEI/GOx/EGDGE (d).	46

Fig. 22. Micrografías de campo claro de hidrogeles BPEI/GOx entrecruzados con 33.3 mM de EGDGE y GA para el análisis de estabilidad sobre superficies de vidrio y oro después de su proceso de hinchamiento.	48
Fig. 23. Influencia de la concentración de EGDGE en la morfología de los hidrogeles BPEI/GOx mediante la absorción de agua. Hidrogeles en su estado deshidratado (a-c) e hidratado (d-f), entrecruzados con concentraciones ascendentes de EGDGE.	49
Fig. 24. Efecto de la concentración de EGDGE en el proceso de hinchamiento y propiedades mecánicas de hidrogeles BPEI/GOx. Los incisos (a-c) representan el estado deshidratado y los incisos (d-f) el estado hidratado de los hidrogeles.	50
Fig. 25. Influencia de la concentración de GA en la morfología y propiedades físicas de los hidrogeles BPEI/GOx formados. Hidrogeles en su estado deshidratado (a-c) e hidratado (d-f), entrecruzados con concentraciones ascendentes de GA.	51
Fig. 26. Apariencia física de hidrogeles sumergidos en PB 0.1 M pH 7.4 durante 1 h para el cálculo de la relación de hinchamiento por masa (<i>SRm</i>).....	53
Fig. 27. Curvas de calibración de los sistemas BPEI/GOx/GA (a) y BPEI/GOx/EGDGE (b) en PB 0.1 M pH 7.4 con un rango de concentración de glucosa de 0-100 mM. (n=3).	56
Fig. 28. Evaluación de la cinética enzimática (<i>K_m</i> <i>app</i>) en función de la concentración y tipo de entrecruzador en un rango de concentración de 0-10 mM de glucosa.....	61
Fig. 29. Efecto de diferentes luces sobre la fluorescencia roja de hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA. Micrografías de fluorescencia de regiones de un hidrogel antes (a) y después (b) de la exposición a la luz verde (izquierda), azul (centro) y UV (derecha). Imagen de fluorescencia normalizada (c) a partir de las subfiguras (a) y (b). Perfil de intensidad (d) de la línea discontinua en la subfigura (c).	65
Fig. 30. Variación de la intensidad de la fluorescencia roja de hidrogeles recién preparados y antiguos bajo 15 minutos de exposición a luz verde o UV. Las líneas continuas presentes en las gráficas de los hidrogeles expuestos a luz verde corresponden al ajuste no lineal de decaimientos mono y biexponenciales, respectivamente.	66

Fig. 31. Espectros FT-IR de la enzima GOx (a), polímero BPEI (b), hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA antes (c) y después (d) de la exposición a la luz verde durante 15 minutos y de un hidrogel expuesto a 10 mM de NABH ₄ durante 2 h (e).	68
Fig. 32. Posibles formas estructurales que puede adoptar el glutaraldehído en solución acuosa. Reproducido de Bioanálisis. (2004) 37(5), 790-802 con autorización de Future Science Group.	69
Fig. 33. Evaluación simultánea de la respuesta electroquímica (a) y fluorescencia (b) de hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA expuestos a diferentes luces. Las evaluaciones electroquímicas (EQ1-3) representan tres curvas de calibración independientes en PB 0.1 M pH 7.4 utilizando un rango de concentración de glucosa de 0-100 mM.	70
Fig. A1. Zonas centrales y periféricas para análisis de microscopía de fuerza atómica de hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA (a) y EGDGE (b).	75

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de hidrogeles según su tamaño de malla/tamaño físico del poro. 15	
Tabla 2. Reactivos usados para la formación de hidrogeles entrecruzados con GA. ... 29	
Tabla 3. Reactivos usados para la formación de hidrogeles entrecruzados con EGDGE. 29	
Tabla 4. Filtros usados para la obtención de imágenes de fluorescencia. 30	
Tabla 5. Características superficiales de los hidrogeles BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE..... 40	
Tabla 6. Propiedades mecánicas de los hidrogeles BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE evaluadas por nanoindentación. 42	
Tabla 7. Evaluación de la adherencia de hidrogeles entrecruzados con diferentes concentraciones de GA y EGDGE sobre sustratos de vidrio y oro. 48	
Tabla 8. Comparación de los parámetros analíticos de hidrogeles entrecruzados con diferentes concentraciones de GA y EGDGE..... 63	

1 Introducción

La necesidad de monitorear diversos analitos de interés biomédico ha impulsado el desarrollo de múltiples dispositivos a lo largo de décadas. Con el surgimiento de nuevas tecnologías, estos dispositivos se han vuelto cada vez más compactos y portátiles. Una estrategia muy atractiva es la incorporación de elementos biológicos y tecnológicos en un solo sistema, dando como resultado un dispositivo conocido como biosensor. Estos dispositivos no solo mejoran la selectividad y sensibilidad, sino que también permiten realizar tareas habituales con mayor facilidad y rapidez.

Según su aplicación y número de usos, los biosensores pueden clasificarse en dos categorías principales: de un solo uso y de uso continuo. Los dispositivos de uso único no son capaces de monitorear la concentración de analitos con el tiempo, y su bajo costo se debe a su proceso de fabricación en masa. Los dispositivos de uso continuo, por otro lado, se caracterizan por su reutilización, ya que pueden regenerarse rápidamente después de cada análisis, permitiendo mediciones in situ y emitiendo lecturas continuas del analito en función del tiempo [1].

El elemento de biorreconocimiento de un biosensor puede ser tan sencillo como la superficie del transductor o tan complejo como el uso de matrices tridimensionales, como los hidrogeles [2, 3]. El uso de hidrogeles presenta oportunidades para el estudio científico, ya que su morfología, comportamiento y respuesta pueden verse afectados por múltiples variables del entorno. Para entender su comportamiento en condiciones específicas de análisis y evaluación, se utilizan técnicas de caracterización, como la microscopía, UV-vis, fluorimetría y pruebas de determinación de propiedades mecánicas y cinéticas, entre otras [4, 5].

1.1 Justificación

En la sección anterior se mencionó que el uso de plataformas de sensado continuo ha aumentado gracias al desarrollo de tecnologías emergentes. Estas plataformas incluyen *organ-on-a-chip* (OOC), *lab-on-a-chip* (LOC) y dispositivos implantables que permiten monitorear diferentes analitos en matrices simples y complejas. En la actualidad, los métodos electroquímicos combinados con enzimas como elementos de biorreconocimiento son muy utilizados debido a su versatilidad y alta selectividad en comparación con otras metodologías.

Para los dispositivos de monitoreo continuo, es necesario inmovilizar el elemento de biorreconocimiento en la superficie de los electrodos para evitar su pérdida debido a los flujos constantes y las múltiples variables presentes en el entorno. Uno de los métodos más utilizados es la inmovilización por entrecruzamiento con polímeros conjugados y no conjugados, lo que da como resultado hidrogeles enzimáticos. Este método ofrece una alta densidad de corriente y protección para las enzimas. Sin embargo, si los parámetros de entrecruzamiento no son los adecuados, el desempeño del dispositivo puede verse afectado. Esto puede provocar la modificación estructural de las enzimas, disminuyendo su actividad catalítica, limitaciones en la transferencia de masa y de carga, entre otros problemas. Debido a la complejidad inherente de este método de inmovilización, resulta más práctico emplear sistemas que involucren un menor número de moléculas en el mecanismo de detección, como ocurre en el caso de los biosensores de primera generación. Esto simplifica la tarea de caracterizar y entender todos estos mecanismos, vinculándolos con el rendimiento del dispositivo. Este conocimiento permitirá en un futuro, la aplicación en sistemas más complejos, promoviendo mejoras para el desarrollo de dispositivos capaces de operar en las condiciones deseadas.

Adicionalmente, la microscopía de fluorescencia es una herramienta altamente efectiva para ampliar las perspectivas de aplicación de los hidrogeles, ya que permite realizar análisis morfológicos con miras a futuras aplicaciones en estructuras miniaturizadas. En comparación con otras técnicas, la microscopía de fluorescencia tiene la capacidad de visualizar y caracterizar de manera precisa, rápida y no invasiva las microestructuras de los hidrogeles funcionalizados, ofreciendo imágenes de alto contraste. Estas características permiten la observación en tiempo real de los cambios estructurales, la

distribución espacial de los componentes y la relación entre la estructura-función de los hidrogeles en diversos entornos.

1.2 Hipótesis

Los hidrogeles basados en BPEI/GOx entrecruzados con glutaraldehído (GA) presentarán una mayor estabilidad en comparación con los entrecruzados con etilenglicol diglicidil éter (EGDGE). Esta mayor estabilidad se atribuye a las propiedades físicas y químicas de los agentes entrecruzadores, destacando la menor longitud de la cadena y la mayor reactividad química de los grupos aldehído hacia aminas primarias presentes en las estructuras químicas del polímero y la enzima.

1.3 Objetivo

Estudiar cómo la identidad y concentración de los agentes entrecruzadores GA y EGDGE afectan la morfología, estabilidad y respuesta electroquímica de los hidrogeles BPEI/GOx usados en biosensado de glucosa, empleando técnicas de microscopía, espectroscopía y electroquímica.

1.3.1 Objetivos específicos

- Estudiar la morfología y propiedades fisicoquímicas de hidrogeles basados en BPEI/GOx entrecruzados con diferentes concentraciones de glutaraldehído (GA) y etilenglicol diglicidil éter (EGDGE) sobre superficies de vidrio y oro policristalino.
- Evaluar la estabilidad de los hidrogeles conformados por BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE sobre superficies de oro policristalino y vidrio.
- Estudiar los posibles mecanismos de degradación de los sistemas BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE.
- Evaluar el desempeño electroquímico de hidrogeles enzimáticos BPEI/GOx como sistema de detección amperométrico para cuantificación de glucosa.

2 Marco teórico

2.1 Biosensores electroquímicos enzimáticos

Un sensor electroquímico es un dispositivo analítico que traduce procesos químicos a señales eléctricas como corriente, voltaje, impedancia, etc. En estos dispositivos, un electrodo es el componente clave para su funcionamiento, el cual tiene la capacidad de favorecer el flujo de electrones [6]. El elemento transductor (electrodo) puede ser o no modificado de acuerdo con las necesidades de cada análisis y analito a evaluar. Cuando el electrodo es modificado con moléculas biológicas como enzimas, anticuerpos, ADN, células, entre otros, es denominado como biosensor [7]. Un biosensor electroquímico ahora tendrá la capacidad de traducir procesos bioquímicos en una señal eléctrica y se vuelve un dispositivo más selectivo, debido a la alta especificidad de las biomoléculas hacia su analito o molécula diana.

Los biosensores electroquímicos más populares son los basados en enzimas. Las enzimas son moléculas grandes con un rango entre 10-400 kDa y son clasificadas en seis categorías de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, ligasas e isomerasas [8]. Dentro de esta categorización, el grupo de las oxidorreductasas es el grupo enzimático más atractivo y popular para su incorporación en biosensores para la detección y cuantificación de glucosa.

A partir del primer biosensor enzimático descrito por Clark y Lyon [9], se han desarrollado cronológicamente distintos dispositivos, los cuales podemos clasificar en tres generaciones: primera, segunda y tercera (Fig. 1). Cabe mencionar, que esta clasificación es exclusiva para los dispositivos que se encuentran dentro de las características de un biosensor electroquímico enzimático y se fundamenta en el mecanismo de transferencia de electrones desde el sitio activo de la enzima hasta la superficie del electrodo [10].

En la primera generación, los electrones transferidos al electrodo se obtienen a partir de un subproducto de la reacción enzimática, comúnmente de la oxidación de H_2O_2 , usando como aceptor de electrones el O_2 disuelto [11]. Para la segunda generación, se incorpora una molécula redox al sistema, con un sobrepotencial menor con respecto al sitio activo

de la enzima (en comparación al O₂) y así favorecer la transferencia electrónica [12]. La más reciente y llamada tercera generación, se fundamenta en la transferencia directa de electrones (DET, por sus siglas en inglés), usando materiales conductores para generar un “puente directo” entre el sitio activo de la enzima y el electrodo [13].

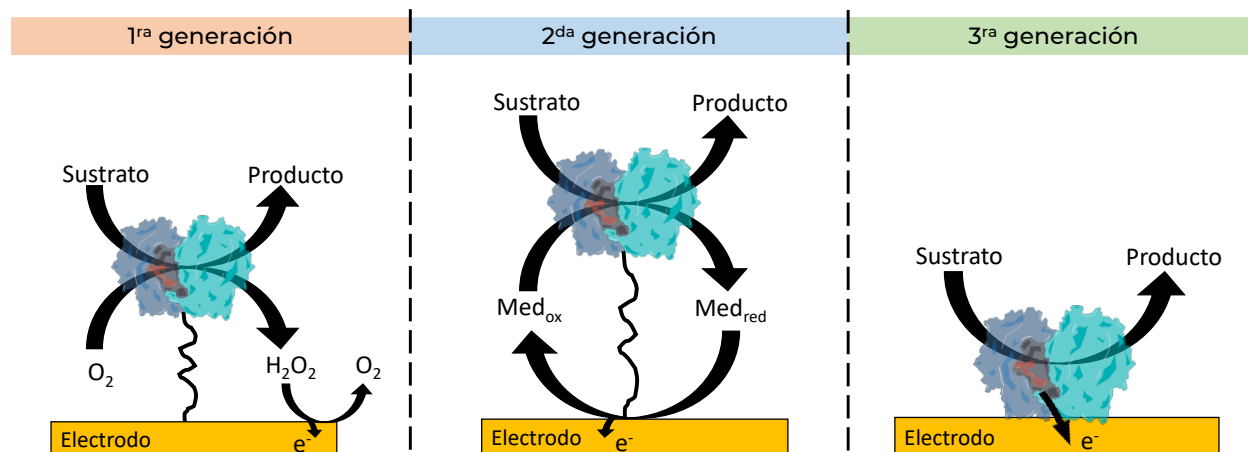
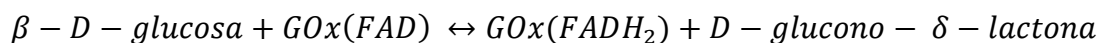


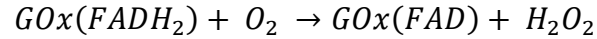
Fig. 1. Clasificación de biosensores electroquímicos enzimáticos.

2.1.1 Biosensores de primera generación para la detección de glucosa

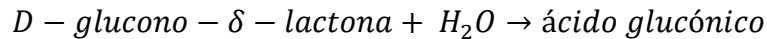
En los biosensores de glucosa de primera generación, se utilizan técnicas amperométricas donde la detección se basa en medir el aumento de la corriente anódica (oxidación de H₂O₂) en la celda electroquímica mediante un barrido de potencial o a un potencial fijo. El principio básico de estos biosensores consiste en cuantificar la glucosa mediante la detección electroquímica del H₂O₂ liberado enzimáticamente, donde la corriente generada es proporcional a su concentración [14]. La enzima más utilizada en biosensores amperométricos para la detección de glucosa es la glucosa oxidasa (GOx), la cual es útil para medir la glucosa total, ya que la α-glucosa se convierte en β-glucosa debido a una mutarrotación en el equilibrio. La GOx es altamente específica y cataliza la oxidación de la glucosa a gluconolactona utilizando el oxígeno molecular (O₂) como aceptor de electrones [15]. Al igual que otras oxidasas, la GOx sigue un proceso enzimático en dos etapas, comenzando con la oxidación enzimática de la glucosa por su cofactor dinucleótido de flavina y adenina (FAD), que luego se reduce a FADH₂:



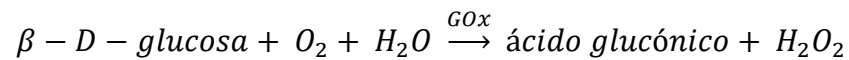
La segunda etapa consiste en la re-oxidación/regeneración del cofactor por el O_2 , produciendo H_2O_2 :



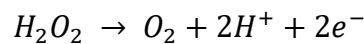
La *D - glucono - δ - lactona* producida en la primera etapa es un inhibidor competitivo débil de la glucosa que se hidroliza espontáneamente, convirtiéndose en ácido glucónico:



Entonces, la reacción general se puede expresar de la siguiente manera:



Finalmente, la reacción electroquímica de oxidación de H_2O_2 en la superficie de un electrodo se expresa de la siguiente manera:



2.2 Métodos de inmovilización enzimática

En la fabricación de biosensores, es común unir enzimas a la superficie de los electrodos para evitar su pérdida [16]. Existen diversos métodos de inmovilización que ofrecen altos porcentajes de retención de enzimas, estabilidad operacional, conservación estructural y reutilización del dispositivo, reduciendo así el costo. Sin embargo, si los parámetros de inmovilización no son adecuados, existe el riesgo de perder la actividad catalítica de la enzima [17]. Los métodos de inmovilización se dividen en dos clases: físicos y químicos [18]. Los métodos físicos son más débiles y no comprometen la actividad enzimática.

Estos métodos incluyen interacciones de puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas o hidrofóbicas. Mientras que los métodos químicos implican la formación de enlaces covalentes, lo que puede causar impedimentos estéricos o

modificaciones estructurales que comprometan la actividad enzimática. Los ejemplos más representativos de ambos métodos de inmovilización incluyen el atrapamiento, la adsorción, los enlaces covalentes y el entrecruzamiento.

El entrecruzamiento es un método comúnmente utilizado para la inmovilización enzimática en electrodos, que consiste en unir dos o más moléculas mediante enlaces covalentes. Para llevar a cabo este proceso, se necesitan moléculas que posean dos o más grupos terminales altamente reactivos hacia aminas, hidroxilos, ácidos carboxílicos u otros grupos funcionales específicos. Estas moléculas, conocidas como entrecruzadores, tienen la capacidad de interactuar con dichos grupos funcionales presentes en las enzimas y/o soportes. La elección del entrecruzador adecuado se basa en varios factores, como la longitud de la cadena, la reactividad del entrecruzador y los grupos funcionales presentes en la(s) molécula(s) a entrecruzar.

Entre los entrecruzadores más populares se encuentran los dialdehídos y diepóxidos, así como los entrecruzadores denominados *zero length*, como el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) en combinación con N-hidroxisuccinimida (NHS). Dentro del grupo de los dialdehídos, el glutaraldehído (GA) es el entrecruzador más reportado debido a su alta reactividad con aminas primarias (-NH₂) [19]. La reacción de estos dos grupos puede dar lugar a varios mecanismos de reacción, pero normalmente se favorece el mecanismo para la formación de bases de Schiff (Fig. 2a) [20]. Aunque el GA es muy eficaz para generar redes tridimensionales muy estables, su toxicidad ha motivado la búsqueda de nuevas alternativas. En este sentido, los diepóxidos, como el etilenglicol diglicidil éter (EGDGE) y el poli(etilenglicol) diglicidil éter (PEGDGE), se han establecido como los agentes entrecruzadores de referencia [21, 22]. Así mismo, aunque sus grupos terminales son menos reactivos hacia el grupo -NH₂, en comparación con el GA, presentan la ventaja de ser biocompatibles. Una de las ventajas prácticas de los diepóxidos, es su capacidad de reaccionar con una variedad de grupos funcionales en un amplio rango de pH [23]. Bajo condiciones alcalinas (pH > 10) los grupos epóxidos reaccionan predominantemente con grupos hidroxilo (-OH) para producir un enlace éter estable. En condiciones de pH neutro, se favorece la reacción hacia aminas primarias (-NH₂), para la formación de aminas secundarias y grupos hidroxilo (Fig. 2b). Por último, a

pH alcalino ($\text{pH} < 4$) la reacción con ácidos carboxílicos ($-\text{COOH}$) se favorece para generar enlaces éster que pueden degradarse fácilmente por hidrólisis [23].

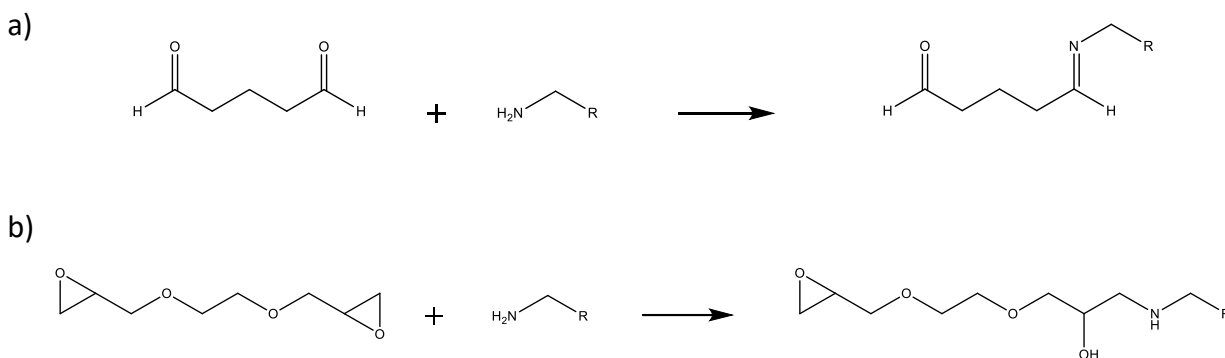


Fig. 2. Mecanismos de reacción del glutaraldehído (a) y etilenglicol diglicidil éter (b) con grupos funcionales amino.

2.3 Hidrogeles

El entrecruzamiento de polímeros en medios acuosos mediante el proceso de gelación conduce a la formación de hidrogeles. Estas estructuras jerárquicas son de gran valor e interés en la investigación debido a las propiedades y microambientes favorables que pueden crear para las enzimas [24]. Desde su descubrimiento por Wichterle [25] en los años 1960s, el término “hidrogel” se ha modificado ligeramente hasta definirse actualmente como una red 3D polimérica de comportamiento hidrofílico capaz de absorber o retener grandes cantidades de agua en sus poros [26]. Desde sus inicios hasta la actualidad, el término ha ido creciendo exponencialmente en la literatura científica, aplicándose en un gran número de áreas científicas y tecnológicas dentro de las que sobresalen la ingeniería de tejidos, liberación de fármacos, biosensores, entre otras [27].

Los hidrogeles tienden a ser insolubles debido a la presencia de grupos funcionales hidrofílicos en sus cadenas poliméricas y pueden hincharse más de 100 veces su propio peso, sin disolverse. Los hidrogeles son clasificados de muchas maneras usando diferentes criterios, teniendo una lista extensa dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas [28]. Sin embargo, una de las clasificaciones más relevantes es la que considera el tipo de reacción por la cual se forman las estructuras tridimensionales, las cuales pueden ser de manera física o química [29]. Si en la reacción de entrecruzamiento

se forman enlaces covalentes, se refiere a un hidrogel químico. Por el contrario, si el entrecruzamiento involucra interacciones débiles (interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, etc.) se considera como un hidrogel físico.

Las combinaciones de diferentes entrecruzadores y polímeros no conjugados pueden dar lugar a estructuras que varían desde hidrogeles suaves hasta membranas poliméricas rígidas, según el grado de entrecruzamiento utilizado [2]. La rigidez obtenida afectará la capacidad de hincharse de la matriz, lo que impactará en el transporte de masa y carga a través de ella [30]. Algunos ejemplos de entrecruzadores y polímeros no conjugados incluyen quitosano, poli(alilamina), poli(etilenimina) lineal o ramificada, poli(vinil piridina) y otros. Todos estos polímeros contienen grupos amino que facilitan la reacción de entrecruzamiento a temperatura ambiente.

2.4 Cinética de hinchamiento de hidrogeles

Los hidrogeles poliméricos poseen la propiedad de hincharse al interactuar con un fluido. Muchos de estos hidrogeles se encuentran en estado deshidratado o seco (estado vítreo), y al hidratarse, atraviesan una transición hacia un estado gomoso [31]. Es importante destacar que cuando un hidrogel se encuentra en su estado vítreo, la difusión del agua es muy lenta debido a su densidad. Cuando se refiere al término "hinchamiento", se asocia a un cambio volumétrico en el hidrogel. No obstante, se debe tener en cuenta que este fenómeno no solo implica una variación en el volumen, sino también un aumento en la masa del hidrogel debido a la incorporación de moléculas del solvente. Dada la dificultad que puede surgir al medir estos cambios volumétricos, especialmente en muestras de área/peso reducido, la práctica común para cuantificar este proceso de hinchamiento es la medición de la masa antes y después del mismo, utilizando la siguiente ecuación:

$$SR_m = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (1)$$

dónde W_s es la masa del hidrogel después de estar sumergido durante un tiempo dado, y W_d es la masa del hidrogel seco.

El proceso de hinchamiento de un hidrogel se puede dividir en tres fases fundamentales. En la primera fase, los grupos hidrofílicos presentes en las cadenas poliméricas se solvatan, formando enlaces primarios de agua (EPA). Posteriormente, se produce una segunda fase de hinchamiento en la que los grupos hidrofóbicos de las cadenas poliméricas quedan expuestos al agua, formando enlaces secundarios de agua (ESA). Finalmente, para reducir la energía libre de Gibbs, la fuerza osmótica de las cadenas poliméricas impulsa agua adicional hacia el hidrogel, la cual, se conoce como agua libre (AL) y llena los espacios vacíos existentes entre las cadenas y poros del hidrogel [32].

La teoría de Flory-Rehner describe el proceso de expansión de un hidrogel y señala que este puede alcanzar un estado de equilibrio. Según esta teoría, cuando el hinchamiento de la red polimérica se encuentra cerca del equilibrio, solo actúan dos fuerzas opuestas: la fuerza de mezcla termodinámica y la fuerza retráctil del polímero. El equilibrio se alcanza cuando estas dos fuerzas opuestas se igualan. A medida que más solvente entra en la red polimérica, su volumen aumenta, lo que a su vez provoca el alargamiento y expansión de las regiones de unión de la red (Fig. 3). Así, el hinchamiento reduce efectivamente la entropía configuracional de la cadena[33]. La condición de equilibrio se puede explicar a través de la energía libre de Gibbs, tal como se muestra en la Ec. (2):

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{elastic} + \Delta G_{mixing} \quad (2)$$

dónde, $\Delta G_{elastic}$ es la contribución debida a las fuerzas de atracción elásticas desarrolladas dentro del gel, y ΔG_{mixing} es el resultado de la mezcla espontánea de las moléculas del fluido con las cadenas del polímero (interacción polímero-disolvente).

Derivando la Ec. (2) con respecto al número de moléculas de disolvente, manteniendo constantes la temperatura y la presión, se obtiene la Ec. (3):

$$\mu_l - \mu_{l,o} = \Delta\mu_{elastic} + \Delta\mu_{mixing} \quad (3)$$

dónde $\Delta\mu$ es el potencial químico del solvente penetrante, μ_l es el potencial químico del solvente en el gel polimérico. y $\mu_{l,o}$ es el potencial químico del disolvente puro. En el

equilibrio, la diferencia entre los potenciales químicos del solvente dentro y fuera del gel debe ser cero.

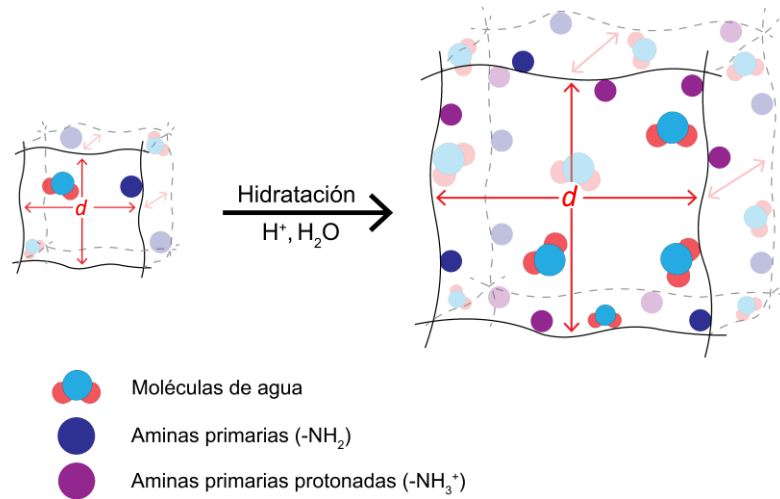


Fig. 3. Proceso de hinchamiento de un hidrogel catiónico. La incorporación de moléculas de agua dentro de la estructura tridimensional conduce a una expansión de las regiones de unión y cadenas poliméricas, lo que resulta en un aumento de la distancia (d) entre ellas. Además, la presencia de iones en el medio favorece un mayor grado de hinchamiento.

Sin embargo, cuando el sistema contiene fracciones iónicas dentro del hidrogel (polielectrolitos), los grupos iónicos presentes en el polímero hacen que la teoría del hinchamiento sea más compleja. En este caso, además de $\Delta G_{elastic}$ y ΔG_{mixing} , existe una contribución adicional al cambio total en la energía libre de Gibbs debido a la naturaleza iónica del polímero, ΔG_{ionic} . Las modificaciones a las Ec. (2) y (3) por esta tercera contribución, conducen a las Ec. (4) y (5).

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{elastic} + \Delta G_{mixing} + \Delta G_{ionic} \quad (4)$$

$$\mu_l - \mu_{l,o} = \Delta\mu_{elastic} + \Delta\mu_{mixing} + \Delta\mu_{ionic} \quad (5)$$

Las modificaciones de estas dos ecuaciones dan como resultado una fuerte dependencia de los hidrogeles a la fuerza iónica del medio circundante y la naturaleza de los iones presentes en el disolvente. Además, el potencial químico depende en gran medida de

los iones circundantes y de la fuerza iónica del medio. Una ecuación derivada para el hinchamiento de un hidrogel catiónico en presencia de un solvente es la siguiente:

$$\frac{V_l}{4l} \left(\frac{V_{2,s}}{\bar{v}} \right)^2 \left(\frac{K_b}{10^{pOH} - K_a} \right)^2 =$$

$$\left[\ln(l - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_l v_{2,s}^2 \right] + v_{2,s} \left(\frac{V_l}{\bar{v} \bar{M}_c} \right) \left(l - \frac{2\bar{M}_c}{\bar{M}_n} \right) \times \left[\left(\frac{V_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{1/3} - \left(\frac{v_{2,s}}{2v_{2,r}} \right) \right] \quad (6)$$

y para el hinchamiento de un hidrogel aniónico:

$$\frac{V_l}{4l} \left(\frac{V_{2,s}}{\bar{v}} \right)^2 \left(\frac{K_a}{10^{-pH} - K_a} \right)^2 =$$

$$\left[\ln(l - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_l v_{2,s}^2 \right] + v_{2,s} \left(\frac{V_l}{\bar{v} \bar{M}_c} \right) \left(l - \frac{2\bar{M}_c}{\bar{M}_n} \right) \times \left[\left(\frac{V_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{1/3} - \left(\frac{v_{2,s}}{2v_{2,r}} \right) \right] \quad (7)$$

dónde \bar{v} es el volumen específico del hidrogel antes de hincharse, V_l es el volumen molar del disolvente, $v_{2,s}$ es la fracción volumétrica del polímero en el estado hinchado, determinada aproximadamente como la inversa de la relación de hinchamiento de equilibrio, $v_{2,r}$ es la fracción volumétrica del polímero en el estado relajado (inmediatamente después del entrecruzamiento, pero antes del hinchamiento), l es la fuerza iónica, \bar{M}_n es el peso molecular del polímero no entrecruzado, \bar{M}_c es el peso molecular medio del polímero entre dos puntos de entrecruzamiento adyacentes, χ_l es el parámetro de Flory-Huggins que describe la interacción polímero-disolvente, K_a y K_b son las constantes de disociación de las moléculas ácidas y básicas del polímero.

Entre los parámetros más relevantes que definen la estructura y propiedades del hidrogel hinchado, se encuentran $v_{2,s}$ y \bar{M}_c y su correlación con la distancia entre dos enlaces transversales adyacentes, conocido como tamaño de malla molecular, ξ . La relación entre estos tres parámetros está ampliamente descrita por la teoría de la elasticidad del caucho (*rubber-elasticity theory*) [34] y la teoría del equilibrio del hinchamiento (*equilibrium-swelling theory*) [35, 36]. En este sentido, ξ se refiere a la distancia entre puntos de unión sucesivos, que representa el espacio disponible entre las cadenas

macromoleculares para la difusión de las moléculas, y se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$\xi = v_{2,s}^{-1/3} \times l \times \left(\frac{C_n 2 \bar{M}_c}{M_r} \right)^{1/2} \quad (8)$$

dónde C_n es la relación característica de Flory (es una constante para un sistema polímero-disolvente dado), l es la longitud del enlace carbono-carbono, y M_r es el peso molecular de las unidades repetitivas de la cadena polimérica.

Además, el tamaño de la malla puede tener espacios libres entre las hebras de la red polimérica, resultando en estructuras denominadas poros (Fig. 4). La propuesta de Foudazi *et al.* [32] en combinación con la clasificación de la IUPAC, indican que los hidrogeles se pueden clasificar taxonómicamente en microporosos, supermicroporosos, mesoporosos y macroporosos según su tamaño de malla/tamaño físico de poro (Tabla 1).

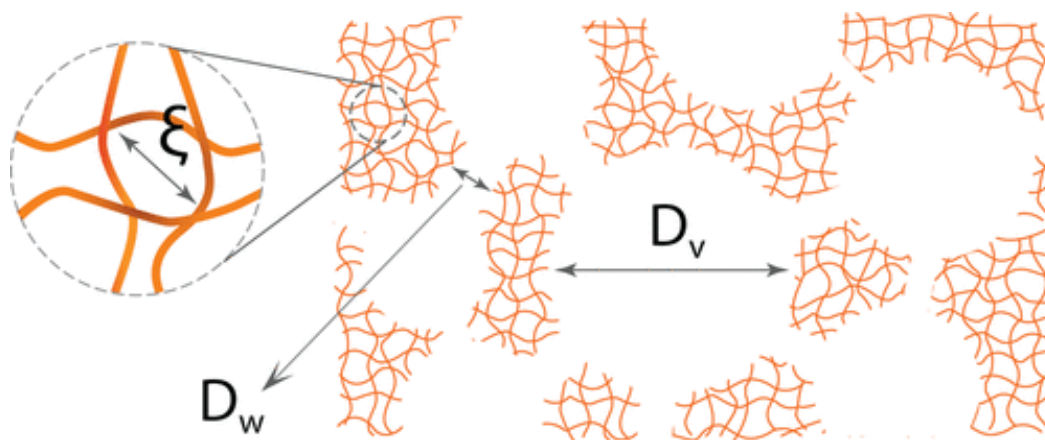


Fig. 4. Sección transversal de un hidrogel no denso con estructura de poro abierto. ξ es el tamaño de malla de la red de entrecruzamiento, D_v y D_w son el tamaño de poro y el tamaño de las interconexiones entre poros, respectivamente. "Reimpreso (adaptado) con permiso de (Foudazi R, Zowada R, Manas-Zloczower I, Fekete DL (2023) Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities. Langmuir 39:2092–2111). Copyright (2023) American Chemical Society".

Tabla 1. Clasificación de hidrogeles según su tamaño de malla/tamaño físico del poro.

Tipo de hidrogel	Tamaño de malla/tamaño físico del poro	Estado dominante del agua
Microporoso	< 1.4 nm	Principalmente EPA
Supermicroporoso	1.4 - 3 nm	EPA y ESA
Mesoporoso	3 - 50 nm	EPA, ESA y AL
Macroporoso	> 50 nm	Principalmente AL

* EPA: enlaces primarios de agua; ESA: enlaces secundarios de agua; AL: agua libre.

2.5 Patrones de formación y propiedades físicas de hidrogeles

2.5.1 Formación de anillos

El proceso de gelación que conduce a la formación de hidrogeles puede considerarse una mezcla coloidal, que depende del tipo de microestructuras formadas y su velocidad de reacción. Si se deposita esta mezcla en un sustrato sólido mediante técnicas como el *drop casting*, la gota depositada se encuentra en un estado lejos del equilibrio. Durante la interacción gota-sustrato, las fuerzas de cohesión y adhesión permitirán que la gota se extienda por la superficie del sustrato. Al alcanzar el equilibrio, la gota dejará de extenderse y formará un ángulo de contacto dependiente de la línea de contacto trifásica (LCT) entre la gota, el sustrato y el aire. Durante el secado de la gota, existen dos modos que describen el movimiento de la LCT: el modo de área de contacto constante, en el que la LCT permanece fija y el radio de la gota se mantiene constante (Fig. 5a); y el modo de ángulo de contacto constante, en el que la LCT se retrae a medida que el líquido se evapora, lo que provoca la disminución del radio de la gota (Fig. 5b). Sin embargo, en la mayoría de las gotas coloidales ambos procesos ocurren sucesivamente [37].

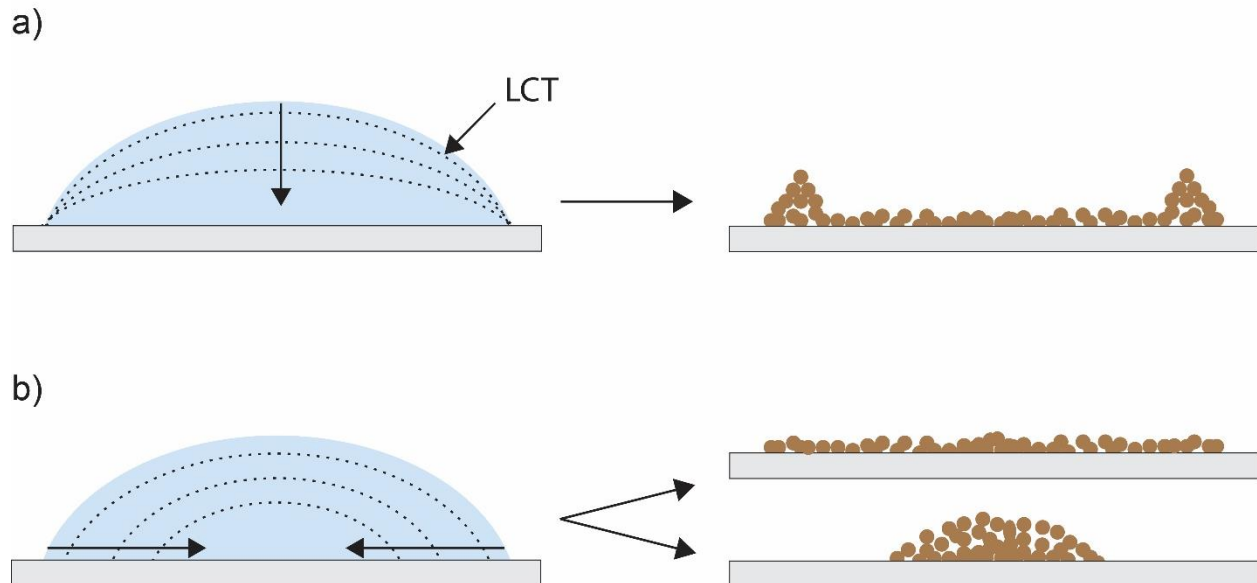


Fig. 5. Modo de área de contacto constante (a) y ángulo de contacto constante (b) que describen el movimiento de la línea de contacto trifásica (LCT) durante el proceso de secado de una gota.

La evaporación natural de la gota es un fenómeno crucial en la formación de estructuras en los hidrogeles. Durante este proceso, las moléculas en el líquido se difunden y crean convecciones de calor y masa dentro de la gota, generando un campo de flujo local. Dos flujos locales importantes en estos casos son el flujo capilar y el flujo de Marangoni. El flujo capilar es causado por las tasas de evaporación diferencial a lo largo de la gota, mientras que el flujo de Marangoni se produce debido a la distribución no uniforme del campo de temperatura local y/o la concentración de sustancias. Este último está impulsado por el gradiente de tensión superficial en la gota, creando un flujo de convección (Fig. 6) [37, 38]. Además, el transporte de masa dentro de la gota también se ve afectado por el flujo local. Un fenómeno comúnmente observado durante el secado es el efecto "*coffee ring*", en el cual la fase sólida se transporta hacia el borde de la gota debido a los flujos capilares [39–41]. Con la evaporación simultánea, la fase sólida se concentra en el borde formando un anillo. Sin embargo, si la gota sigue el modo de ángulo de contacto constante, la fase sólida se desplazará hacia el interior de la gota por la retracción de la LCT, evitando así la formación de anillos [42, 43].

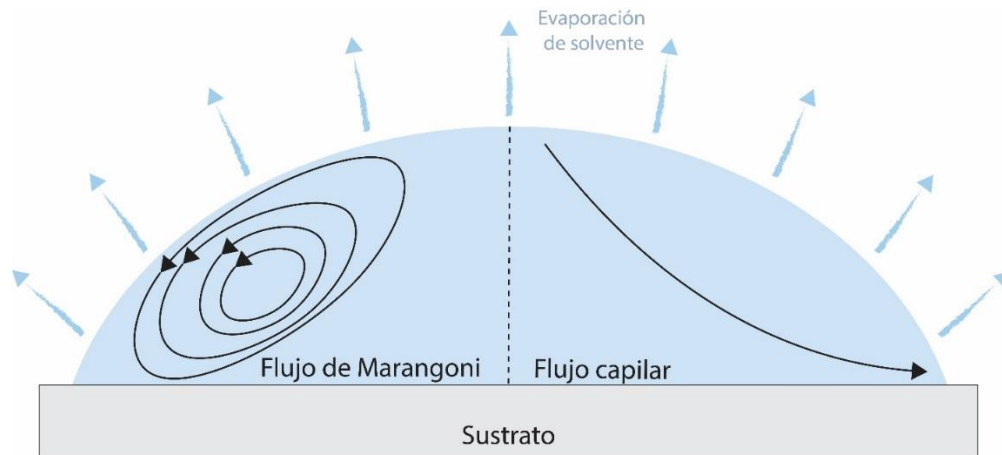


Fig. 6. Tipos de flujos dominantes en el secado de una gota que favorecen el movimiento y difusión de moléculas para la formación de patrones.

2.5.2 Inestabilidad morfológica en materiales suaves

Los hidrogeles, por su naturaleza suave, son susceptibles a inestabilidades morfológicas cuando se someten a diferentes tipos de estrés y condiciones ambientales. Entre las tres inestabilidades más comunes se encuentran el *wrinkling*, *folding* y *creasing*, como se muestra en la Fig. 7. El *wrinkling* se refiere a la aparición de ondulaciones periódicas en una superficie originalmente plana, mientras que el *folding* se caracteriza por la formación de valles localizados y profundos en la superficie del material. Por último, el *creasing* se produce cuando el material se pliega sobre sí mismo, generando formas afiladas o surcos [44]. Es importante tener en cuenta estas inestabilidades, ya que los hidrogeles pueden experimentar cambios volumétricos significativos debido a los fenómenos de hidratación o deshidratación. El hinchamiento o encogimiento no homogéneo debido a las propiedades fisicoquímicas del material, puede generar tensiones en la estructura y desestabilizarla.

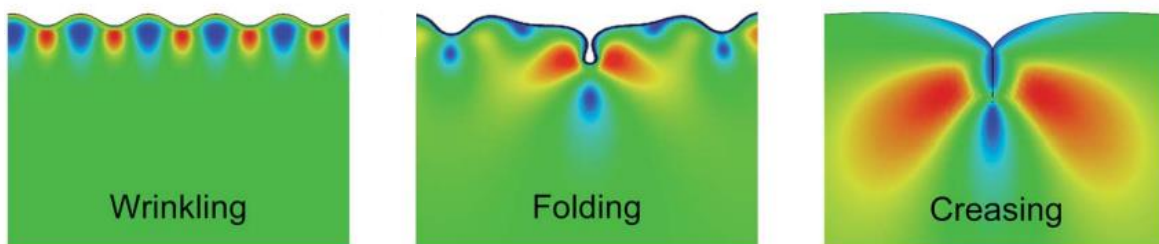


Fig. 7. Tipos de inestabilidades morfológicas en materiales suaves. " Reimpreso (adaptado) con permiso de (Li B, Cao YP, Feng XQ, Gao H (2012) *Mechanics of morphological instabilities and surface wrinkling in soft materials: A review*. *Soft Matter* 8:5728–5745). Copyright (2012) Royal Society of Chemistry ".

2.6 Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un tipo de fotoluminiscencia donde la incidencia de fotones (haz de luz) a una molécula eleva uno de sus electrones a un estado excitado [45]. A temperatura ambiente, la mayoría de las moléculas ocupan el estado de energía más bajo, conocido como estado fundamental (*ground state*), dentro del cual existen niveles vibratorios. Cuando las moléculas absorben los fotones de una longitud de onda específica, adoptan un estado de energía vibratorio más alto. En seguida, las moléculas chocan con otras moléculas y pierden su energía vibracional, regresando al nivel vibratorio más bajo del estado excitado. Esto puede permitir que la molécula vuelva a los niveles vibratorios del estado fundamental. En este punto, la molécula emite un fotón a una longitud de onda diferente a la cual fue excitada, lo que se conoce como fluorescencia (Fig. 8) [46].

En los espectros de fluorescencia, se relaciona la intensidad (fotones emitidos) de las moléculas excitadas en función de la longitud de onda, λ . Para cada molécula existe un espectro de excitación y emisión específico, que son imágenes especulares entre sí. Típicamente, el espectro de emisión ocurre en longitudes de onda de menor energía (más altas) que el espectro de excitación. El espectro de fluorescencia es análogo al espectro de absorbancia, siendo el primero más sensible en términos de límites de detección y especificidad molecular.

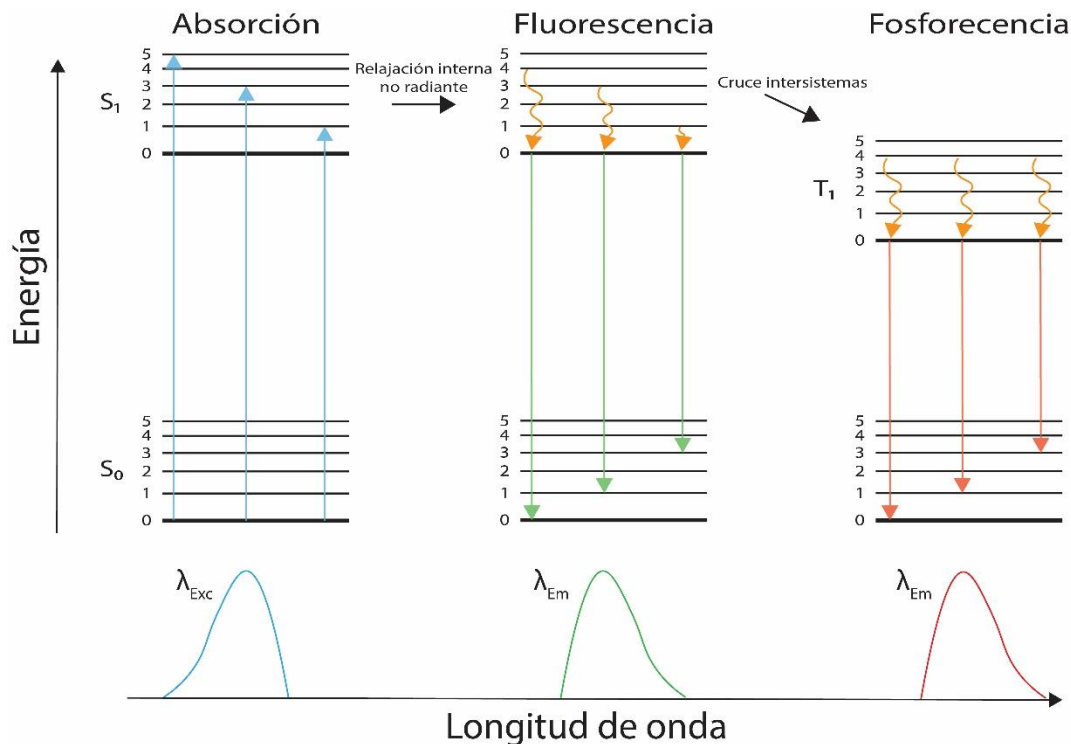


Fig. 8. Diagrama de Jablonski y su asociación con los espectros de excitación y emisión de una molécula.

Los espectros de fluorescencia son útiles para ver cómo cambia una muestra. Tanto la intensidad espectral como la longitud de onda máxima pueden modificarse con variantes como la concentración, temperatura e interacción con otras moléculas [47]. Así mismo, algunos fluoróforos pueden ser sensibles a propiedades del medio en el que se encuentran, como, por ejemplo, el pH, iones y polaridad. Por último, las moléculas y materiales fluorescentes exhiben diversas formas, tamaños y características. Algunas moléculas, como las enzimas, son intrínsecamente fluorescentes debido a la presencia de residuos de aminoácidos triptófano, fenilalanina y tirosina en su estructura [48]. Además, existen moléculas sondas o "etiquetas" fluorescentes, como la fluoresceína, rodamina y sus derivados, que se encuentran disponibles en amplios catálogos comerciales.

2.6.1 Fotoblanqueo (*photobleaching*)

Las moléculas fluorescentes emiten luz que se desvanece continuamente con el tiempo, un proceso conocido como fotoblanqueo o fotólisis. Esto conlleva a modificaciones fotoquímicas de la molécula que afectan su capacidad de fluorescencia, en la mayoría de los casos, de manera irreversible [49]. Muchos sistemas para la obtención de

imágenes de fluorescencia, como el microscopio de fluorescencia, utilizan láseres de alta potencia, lo que puede causar fotodaño adicional de la muestra y reducir gravemente la señal detectada. Debido a que el fotoblanqueo puede asociarse a múltiples razones lineales y no lineales, el proceso es complicado. Algunas de estas razones incluyen colisiones moleculares, transferencia de energía o un estado triplete metaestable [47]. Por lo tanto, es importante comprender el mecanismo subyacente de degradación y encontrar formas de reducirlo.

3 Antecedentes

Desde 1960, cuando Wichterle [3] sintetizó por primera vez una estructura "plástica" denominada gel hidrofílico o hidrogel con el propósito de su implantación en el cuerpo humano, estos materiales han representado un área de gran potencial en la investigación, contribuyendo en campos como la ingeniería de tejidos, cultivos celulares y la liberación controlada de fármacos [5, 50–52]. Con el paso de las décadas, se descubrió que los hidrogeles poseen la capacidad de responder a diversos estímulos fisicoquímicos, como cambios de temperatura, pH, fuerza iónica, entre otros. Asimismo, han servido para estudiar procesos de moleculares bioquímicos, y que también pueden adoptar múltiples estructuras. Esta versatilidad condujo a que, en la década de los años 90, los hidrogeles adquirieran popularidad al ser integrados en dispositivos sensores diseñados para monitorear procesos biológicos tanto en tiempo real como in vitro.

En este contexto, en el año 2012, Buenger et al. [53] publicaron el primer artículo de revisión en el cual describen las aplicaciones de los hidrogeles en sensores. Ellos abordando aspectos clave como la naturaleza fisicoquímica del gel, la composición y estructura del dispositivo, el mecanismo de detección y el analito de interés. A partir de esto, los hidrogeles han sido ampliamente incorporados en elementos transductores de distintas naturalezas, tales como óptica, piezoeléctrica, electroquímica, entre otras. En particular, los sensores electroquímicos han sobresalido gracias a sus ventajas de bajo costo, rápida respuesta, alta sensibilidad y precisión en la detección de analitos. Además, su requerimiento de instrumentación mínima los convierte en dispositivos de fácil miniaturización, integración y accesibles, como lo evidenció la introducción del sensor de glucosa por parte de Clark y Lion en 1962.

La integración de hidrogeles como interfaz en sensores electroquímicos ha sido una estrategia para modificar electrodos con características únicas, aprovechando la matriz tridimensional permeable que forman. Esta matriz facilita la difusión de los analitos y el transporte de electrones, lo cual ha resultado beneficioso en el desarrollo de biosensores de primera y segunda generación [54]. Por otro lado, es común modificar la superficie de los electrodos mediante la técnica de drop-casting debido a su simpleza, pero uno de los principales desafíos encontrados radica en su alta variabilidad [55].

Los hidrogeles empleados en esta aplicación incluyen una amplia gama de polímeros, tanto naturales como sintéticos. Además, muchos de estos polímeros presentan propiedades conductoras o redox que favorecen el transporte de electrones hacia el elemento de transducción. Ejemplos de estos polímeros incluyen la polianilina (PANI), polipirrol (PPy), poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), polietileniminas lineales o ramificadas con grupos colgantes de ferroceno u osmio con propiedades conductoras y redox, de origen natural como el quitosano, quitina, celulosa, y de origen sintético como la poliacrilamida, polivinilimidazol, poli(N-isopropilacrilamida), poli(vinilpirrolidona), polietilenglicol y polietilenimina, entre otros [56]. Todos contienen grupos funcionales polares e hidrofílicos como -OH, -NH₂, -COOH que les dan la capacidad de absorber agua, servir como puntos para formación de enlaces débiles o covalentes y para su funcionalización con otras moléculas. Este último punto es aprovechado para dar o mejorar la especificidad de los dispositivos hacia algún analito en particular, incorporando elementos de biorreconocimiento, tales como enzimas, anticuerpos y ácidos nucleicos. En particular, la inclusión de enzimas en hidrogeles ha experimentado un aumento significativo, ya que se ha observado que la retención de agua y componentes del medio en los espacios intersticiales (poros), crea microambientes favorables para estas biomoléculas, conservando su estructura y actividad catalítica [57]. La amplia combinación de enzimas con polímeros de diferente naturaleza y propiedades ha generado hidrogeles con propiedades únicas e interesantes.

A pesar del creciente uso de polímeros conductores en la formación de hidrogeles enzimáticos, los polímeros aislantes siguen siendo valiosos en biosensores electroquímicos de primera generación. Su principal función radica en actuar como matrices de soporte para las enzimas y aumentar significativamente el área superficial en comparación con los métodos 2D utilizados con este propósito [58, 59]. En este contexto, el quitosano se destaca como uno de los polímeros más utilizados para este tipo de plataformas de biosensado [60, 61]. No obstante, es relevante destacar el potencial de las polietileniminas (PEI) en el campo de los biosensores, a pesar de la limitada investigación en esta área ya que han demostrado buena sensibilidad, biocompatibilidad y protección enzimática [62–64]. Las PEI pueden clasificarse en dos tipos: lineales (LPEI) y ramificadas (BPEI). Aunque, se ha observado que las LPEI, en la mayoría de los casos, muestran una baja estabilidad debido a su estructura lineal que

ofrece menos sitios de unión [65]. En contraste, las BPEI se destacan por tener una alta densidad de grupos amino en su estructura química, con aproximadamente un 25% de aminas primarias, 50% de aminas secundarias y 25% de aminas terciarias. Esta abundancia de grupos amino en las BPEI permite la incorporación de un mayor número de enzimas y la formación de redes más estables al tener una mayor cantidad de sitios de unión en comparación con otros polímeros.

Los métodos químicos son preferibles en la formación de hidrogeles y la inmovilización enzimática en comparación con los métodos físicos, ya que ofrecen una mayor estabilidad gracias a la formación de enlaces covalentes. El entrecruzamiento es uno de los métodos químicos más comunes en este contexto. Las carbodiimidias, como el clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), en combinación con la N-hidroxisuccinimida (NHS), suelen emplearse para generar intermediarios altamente reactivos para la formación de enlaces amida [66–68]. Sin embargo, los dialdehídos y diepóxidos son los dos grupos de agentes entrecruzadores preferidos para la formación de hidrogeles enzimáticos mediante entrecruzamiento [68–71]. El GA, aunque ha sido ampliamente utilizado en el pasado, ha sido sustituido por otros agentes entrecruzadores en la actualidad debido a su toxicidad y a la complejidad de los mecanismos de reacción que puede presentar debido a las múltiples formas que puede adoptar en solución [72]. Por lo tanto, los diepóxidos se han convertido en una alternativa efectiva al GA, a pesar de que su cinética de reacción es más lenta a temperatura ambiente [68]. En la actualidad, los éteres diglicídicos de etilenglicol (EGDGE) y polietilenglicol (PEGDGE) son los agentes entrecruzadores más estudiados de este grupo [21, 68].

Diversos estudios han demostrado que la estructura final y las propiedades de los hidrogeles se ven afectadas en función del tipo de agente entrecruzador y su concentración. De la misma manera se ha descrito que, en el caso de los agentes entrecruzadores más cortos, como el GA, pequeñas variaciones en la concentración provocan cambios drásticos en la respuesta electroquímica. En este contexto, técnicas de caracterización de naturaleza electroquímica y de fluorescencia han resultado útiles para observar los cambios y propiedades generados. En cuanto a la caracterización electroquímica de los hidrogeles, es común evaluar exclusivamente el impacto del agente entrecruzador en relación con la corriente eléctrica generada. Por lo general, en estos

estudios se exploran diversos rangos de concentraciones de los agentes entrecruzadores para identificar un valor óptimo que se empleará en los experimentos posteriores [73–77]. Adicionalmente, en conjunto con la variación del agente entrecruzador, se realiza una modificación de múltiples parámetros como el pH, temperatura y fuerza iónica del medio para optimizar el sistema.

La caracterización de hidrogeles ha dependido durante varias décadas de técnicas como la microscopía electrónica de barrido (MEB) y la microscopía de fluorescencia. En particular, la microscopía de fluorescencia tiene un impacto significativo en la caracterización de estos materiales, ya que es una técnica de obtención de imágenes no invasiva que permite visualizar/analizar la distribución espacial de moléculas o estructuras dentro de los hidrogeles [78]. Para llevar a cabo esta caracterización, se emplean diversos fluoróforos comerciales que abarcan un amplio espectro que va desde el ultravioleta-visible hasta el infrarrojo cercano (NIR). La reacción más común es la de grupos reactivos, como isotiocianato, ésteres activos, aminas reactivas y carboxilatos, hacia aminas primarias. Entre los grupos de fluoróforos más representativos se encuentran los benzopirilios, xantenos, carbocianinas, complejos de difluoroboro, AIEgens, push-pulls y NIR-II. De estos grupos, los xantenos destacan como los más populares debido a su brillo y estabilidad química, siendo la rodamina y la fluoresceína los más usados [79].

Por otra parte, los fluoróforos pueden estar intrínsecamente presentes en la muestra debido a la conjugación π - π de las cadenas poliméricas o a grupos funcionales que se forman durante la reacción de entrecruzamiento. Un ejemplo común de esto es la fluorescencia intrínseca que se produce por la formación de bases de Schiff en hidrogeles que contienen unidades repetidas de grupos amino en presencia de aldehídos [80, 81]. Otro ejemplo interesante se encuentra en los hidrogeles de quitosano entrecruzados con genipina, donde la genipina puede generar fluorescencia después del proceso de entrecruzamiento, aunque en la actualidad aún no se comprende completamente el mecanismo de esta fluorescencia [82, 83]. Ya sea de manera deliberada o intrínseca, la presencia de estos fluoróforos en la muestra permite la adquisición de imágenes para investigar aspectos críticos de estos sistemas, como la difusión de moléculas, la porosidad y la degradación. A pesar de estas valiosas

contribuciones en el campo de los hidrogeles, la microscopía de fluorescencia se ha enfocado principalmente en la investigación del comportamiento celular y de tejidos [84–87], así como en la liberación de fármacos [52, 88, 89], lo que ha tenido un impacto significativo en los avances científicos en estas áreas.

A pesar de ser herramientas poderosas y útiles para la caracterización de hidrogeles, las técnicas electroquímicas y de fluorescencia no se han aprovechado conjuntamente. La combinación de estas técnicas puede ofrecer información de gran valor para establecer relaciones entre la respuesta electroquímica y las estructuras/propiedades al utilizar diferentes agentes entrecruzadores y concentraciones. Esto representa un área de oportunidad, especialmente cuando se evalúa el rendimiento y la estabilidad de dispositivos de biosensado basados en estos sistemas como elementos de biorreconocimiento.

4 Metodología experimental

4.1 Reactivos y soluciones

La glucosa oxidasa (*Aspergillus niger* tipo X-S; 100.000 - 250.000 U/g), poli(etilenimina) ramificada (Mw ~ 25,000 Da), glucosa (β -D-glucosa $\geq 99.5\%$), fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), tetrametilrodamina-5-isotiocianato, isómero-G (TRITC, G-Isomer) y glutaraldehído (50 wt% en agua) fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El amoníaco al 28-30% y el peróxido de hidrógeno al 30% se adquirieron de J. T. Baker. El éter diglicídico de etilenglicol (100 wt%) se adquirió de Polysciences, Inc. La solución de buffer de fosfatos (PB) 0.1 M pH 7.4 fue preparada a partir de sales KH_2PO_4 (2.28 g/L) y $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (21.74 g/L). Así mismo, se prepararon soluciones de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4 con un rango de concentraciones de 0-100 mM. Las soluciones se prepararon en agua ultrapura con una resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a partir de un sistema de purificación Merck Millipore (Simplicity UV) con un filtro de 0.22 μm . El PB 0.1 M pH 7.4 se almacenó a temperatura ambiente, mientras que las soluciones de glucosa fueron almacenadas a una temperatura de 2-8 °C. Adicionalmente, las soluciones de glucosa fueron preparadas 24 h antes de su uso para que los anómeros α y β de la glucosa alcanzaran el equilibrio.

4.2 Instrumentación y procedimientos

4.2.1 Diseño de celda electroquímica

En las evaluaciones ópticas se utilizaron portaobjetos de vidrio suministrados por *Henso Labware Manufacturing Co.* (Hangzhou, China) y portaobjetos de vidrio recubiertos con oro. La celda electroquímica empleada consistió en un dispositivo sensor basado en gotas que se había desarrollado previamente, tal y como se muestra en la Fig. 9. Los chips fabricados para las pruebas electroquímicas contenían dos electrodos de oro policristalino depositados sobre un sustrato de vidrio mediante evaporación por haz de electrones y la técnica de *lift-off*. La composición de los electrodos consistió en dos capas metálicas: una capa de 20 nm de titanio para mejorar la adhesión al sustrato, seguida de una capa de 200 nm de oro que constituía el área electroactiva del contraelectrodo (CE) y electrodo de trabajo (WE). Para establecer una configuración de tres electrodos convencional, se incorporó un alambre de $\text{Ag} | \text{AgCl}$ a la celda como electrodo de pseudo-

referencia. Este electrodo se denomina así debido a que la concentración de cloruros depende del buffer de fosfatos.

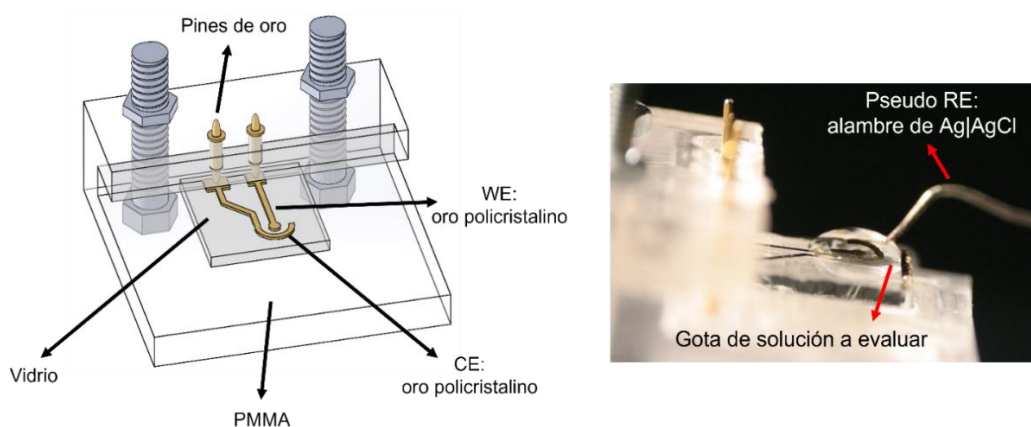


Fig. 9. Celda electroquímica basada en sistema de gota.

4.2.2 Etiquetado fluorescente de la glucosa oxidasa y polietilenimina ramificada

Para preparar las sondas fluorescentes de FITC y TRITC (Fig. 10), se disolvió 1 mg de cada fluoróforo en 2 ml de una solución de $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.1 M en un baño de agua a 25 °C durante 10 minutos. A continuación, se mezclaron 2 ml de las soluciones de GOx o BPEI con 1 ml de FITC y TRITC, respectivamente, y se dejaron reaccionar por 30 min evitando la luz. Una vez finalizada la reacción, las mezclas se purificaron siguiendo el protocolo del proveedor mediante una columna cromatográfica GE Healthcare PD-10 Sephadex™ G-25 M.

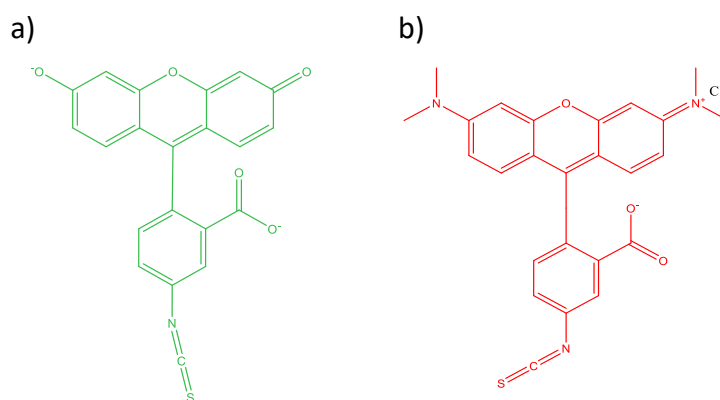


Fig. 10. Estructura química de las sondas fluorescentes FITC (a) y TRITC (b).

4.2.3 Preparación de hidrogeles

Previamente a cualquier modificación, se llevó a cabo un proceso de limpieza con solución RCA-1 (agua ultrapura, amoníaco y H₂O₂ en proporción 5:1:1 v/v, respectivamente), seguido del enjuague con agua ultrapura y finalmente se secó a presión con nitrógeno. Una vez que los sustratos fueron limpiados, se utilizó el método de entrecruzamiento para crear hidrogeles enzimáticos como se muestra en la Fig. 11. La formación de los hidrogeles se realizó mezclando los componentes y volúmenes indicados en las Tabla 2 y 3, con el objetivo de obtener hidrogeles entrecruzados con GA y EGDGE, con un rango de concentración final entre 3.33 – 33.30 mM para cada entrecruzador. La mezcla final se depositó inmediatamente sobre superficies de vidrio, oro y electrodos de trabajo por el método de *drop-casting*, tomando una alícuota de 0.15 µl. Posteriormente, se dejó secar la solución durante 20 min a 30°C en un horno de convección. Como paso final, se enjuagó el hidrogel con agua ultrapura para eliminar el exceso, siempre y cuando no interfiriera con el análisis a realizar.

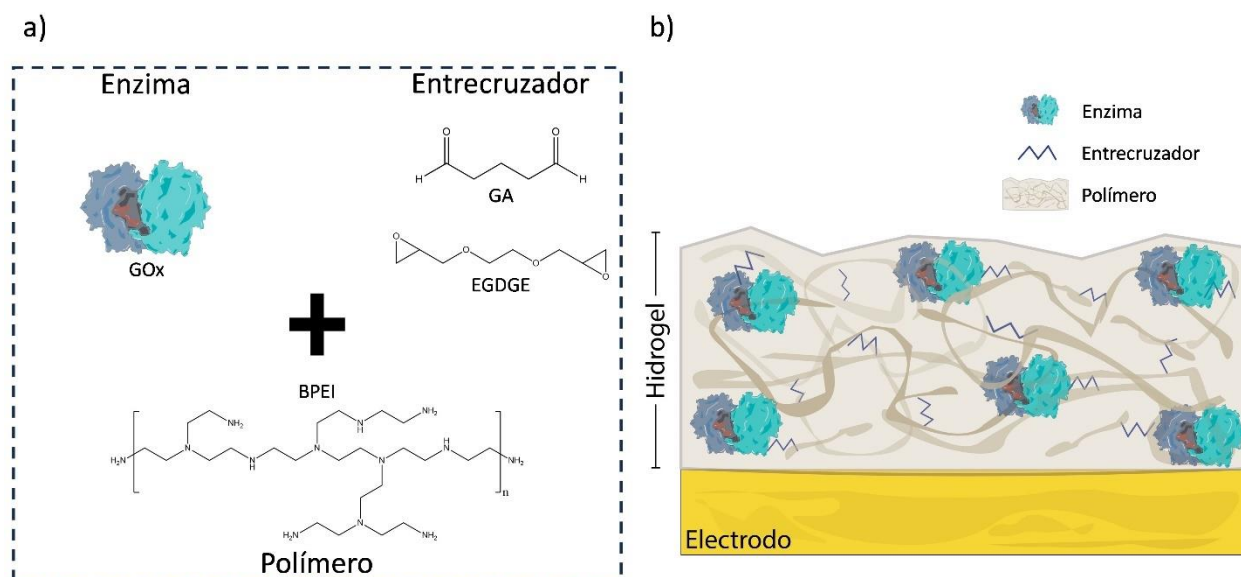


Fig. 11. Elementos utilizados para la obtención del hidrogel basado en BPEI/GOx (a) y representación gráfica de un corte transversal del hidrogel depositado sobre el electrodo de oro (b).

Tabla 2. Reactivos usados para la formación de hidrogeles entrecruzados con GA.

Solución	Concentración final del entrecruzador en el hidrogel		
	3.33 mM	16.65 mM	33.30 mM
BPEI 10 mg/ml	8.75 μ l	8.75 μ l	8.75 μ l
PB 0.1 M pH 7.4	1.07 μ l	1.07 μ l	1.04 μ l
Agua ultrapura	0.81 μ l	0.44 μ l	0.0 μ l
GOx 5 mg/ml	2.68 μ l	2.68 μ l	2.68 μ l
GA 476 mM	0.11 μ l*	0.46 μ l	0.93 μ l

* Partiendo de una solución de GA 400 mM. Volumen total de la mezcla: 13.40 μ l

Tabla 3. Reactivos usados para la formación de hidrogeles entrecruzados con EGDGE.

Solución	Concentración final del entrecruzador en el hidrogel		
	3.33 mM	16.65 mM	33.30 mM
BPEI 10 mg/ml	17.50 μ l	17.50 μ l	17.50 μ l
PB 0.1 M pH 7.4	2.31 μ l	2.31 μ l	1.47 μ l
Agua ultrapura	0.78 μ l	0.06 μ l	0.0 μ l
GOx 5 mg/ml	5.19 μ l	5.19 μ l	5.19 μ l
EGDGE 480 mM	0.17 μ l	0.89 μ l	1.79 μ l

Volumen total de la mezcla: 25.95 μ l

4.2.4 Evaluaciones ópticas

Se llevó a cabo la evaluación de los hidrogeles entrecruzados mediante el uso de un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-U, utilizando como fuente de iluminación una lámpara de arco de mercurio Lumen Dynamics 200W y el acoplamiento de una cámara modelo OptiMOS (QImaging) controlada por el software OCULAR. Todas las imágenes adquiridas fueron analizadas con el software ImageJ con el paquete de procesamiento Fiji. Se realizaron micrografías de fluorescencia y campo claro para evaluar los cambios físicos antes y después del proceso de hinchamiento en cada sistema. Se empleó un set de luz blanca y tres filtros de fluorescencia que se describen en la Tabla 4, los cuales se denominaron luz UV, azul y verde, en referencia a la longitud de onda de excitación. Las imágenes se tomaron con un objetivo de 4x, empleando un tiempo de exposición de 10 ms, mientras que las imágenes de fluorescencia se adquirieron con tiempos de exposición de 50 y 500 ms. Los hidrogeles BPEI/GOx se evaluaron con diferentes concentraciones de EGDGE y GA en superficies de oro y vidrio. Además, los hidrogeles

entrecruzados con EGDGE, se etiquetaron con el procedimiento mencionado en la sección 3.2.2 para evaluar su morfología.

El espectro de absorción de electrones (UV-Vis) se obtuvo con un espectrofotómetro Hach DR 6000. Los espectros de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Agilent Technologies Cary Eclipse, usando una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. Ambos análisis se realizaron preparando una dilución 1:1 e la mezcla de reacción BPEI/GOx/GA, usando una concentración de 33.3 mM, y PB 0.1 M pH 7.4. Antes de los análisis, se dejó reaccionar dicha mezcla durante dos días para que precipitaran los agregados de mayor peso molecular formados durante el entrecruzamiento.

Tabla 4. Filtros usados para la obtención de imágenes de fluorescencia.

Luz	Número de set	Filtro de excitación	Filtro de emisión	Fabricante
UV	39000	361-389 nm	435-485 nm	Chroma
Azul	49002	450-490 nm	500-550 nm	Chroma
Verde	49005	530-560 nm	590-650 nm	Chroma

4.2.5 Determinación de la relación de hinchamiento de los hidrogeles

Se evaluó el proceso de hinchamiento de los hidrogeles BPEI/GOx entrecruzados con diferentes concentraciones de GA y EGDGE. Los hidrogeles se prepararon y se dejaron secar durante 4 y 24 horas para GA y EGDGE, respectivamente, luego se pesaron. A continuación, se sumergieron en 1 ml de PB 0.1 M pH 7.4 durante 1 hora a temperatura ambiente, y se pesaron en su estado hidratado. La relación de hinchamiento por masa (SR_m) se determinó utilizando la Ec. 9.

$$SR_m = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (9)$$

Dónde W_s es la masa del hidrogel en su estado hidratado y W_d es la masa del hidrogel seco [90, 91].

4.2.6 Análisis por espectroscopia FT-IR

Los espectros IR de la GOx, BPEI e hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA fueron analizados antes y después de su exposición a la luz verde durante 15 minutos. Asimismo, un hidrogel expuesto a 10 mM de NaBH₄ por dos horas fue analizado para observar la reducción del enlace C=N formado por el entrecruzamiento. Los espectros IR se obtuvieron usando un espectrofotómetro IRAffinity-1S equipado con el accesorio ATR. Se realizaron escaneos en un rango espectral de 4000 - 650 cm⁻¹ con una resolución de número de onda de 2 cm⁻¹ y un promedio de 45 escaneos por cada medición.

4.2.7 Análisis por perfilometría de contacto, microscopia de fuerza atómica y nanoindentación

Se llevó a cabo el análisis de hidrogeles BPEI/GOx entrecruzados con GA y EGDGE en un rango de concentraciones de 3.33–33.3 mM, antes y después del proceso de hinchamiento. Se realizaron mediciones de perfilometría para evaluar los cambios en la superficie de los hidrogeles. Para este propósito, se usó un perfilómetro Veeco modelo Dektak® 6M, aplicando una fuerza de medición de 1 mg.

Los análisis de microscopía de fuerza atómica (AFM) y nanoindentación se realizaron exclusivamente en el estado deshidratado de los hidrogeles. Las imágenes de AFM se adquirieron utilizando un equipo Asylum Research 3D Infinity en modo de contacto y tapping, empleando una punta de silicón estándar. Además, se utilizó el modo de mapeo viscoelástico AM-FM para analizar las propiedades del módulo elástico de los hidrogeles. Para la calibración, se utilizó una poliamida con un módulo elástico de 2.2 GPa.

Por otro lado, los experimentos de nanoindentación se realizaron en un nanoindentador Agilent Technologies G-200 con un cabezal XP y una punta Berkovich que tenía un diámetro de curvatura de 20±5 nm. La máxima carga de indentación fue de 0.2 mN con un tiempo de carga de 10 s, asumiendo una relación de Poisson de 0.18.

4.2.8 Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido

Los análisis de termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) se llevaron a cabo desde 25 hasta 700 °C bajo una atmosfera de aire (50 cm³/min) en un analizador termogravimétrico marca T.A. Instruments modelo Q-600. Las muestras fueron analizadas en un crisol de aluminio aplicando una rampa de temperatura de 10°C/min.

4.2.9 Evaluaciones electroquímicas

La exploración del sistema se hizo mediante pruebas electroquímicas utilizando la celda mencionada en el apartado 4.2.1, con un potenciostado/galvanostato de la marca Metrohm modelo Autolab PGSTAT204 con el software NOVA 2.1. Para ello, se realizaron voltamperometrías cíclicas (VC) en PB 0.1 M pH 7.4 que contenía 10 mM de H₂O₂. Se estableció una ventana de potencial desde -0.1 hasta +0.55 V vs pseudo referencia de Ag|AgCl para detectar la oxidación del H₂O₂ sobre las superficies de oro. Seguidamente el electrodo de trabajo (WE) se modificó de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 3.2.3, poniendo en contacto los tres electrodos con una gota de 35 µl de la solución a evaluar.

Por otro lado, se evaluó el transporte de masa en los hidrogeles mediante cronoamperometría (CA) siguiendo la oxidación de H₂O₂ producido por la reacción enzimática en un rango de concentración de glucosa de 0-100 mM.. Previo a cada evaluación, se realizó un pre-acondicionamiento de un minuto, durante el cual el hidrogel fue expuesto a la solución de glucosa que sería evaluada. Posteriormente, se inició la CA aplicando un paso de potencial desde el potencial de circuito abierto hasta 0.4 V vs. pseudo referencia de Ag|AgCl, este último potencial fue determinado previamente en la VC para la oxidación de H₂O₂. Finalmente, se graficó la corriente obtenida a los dos minutos de la CA vs la concentración de glucosa.

Las curvas de calibración obtenidas mediante cronoamperometrías fueron analizadas para calcular los parámetros analíticos del biosensor. La densidad de corriente máxima (J_{max}) se calculó por el análisis no lineal de Michaelis Menten usando el software de análisis de datos y gráficos Origin (Ec. 10) a partir de los datos de J_{max} vs. concentración

de glucosa. El límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$J_{max} = \frac{J_{max} * \text{Concentración de glucosa}}{K_m + \text{Concentración de glucosa}} \quad (10)$$

$$LOD = \frac{3s}{m} \quad (11)$$

$$LOQ = \frac{10s}{m} \quad (12)$$

dónde s es la desviación estándar del intercepto y m es la pendiente de la curva de calibración ($n=3$). El rango lineal fue considerado desde cero hasta la concentración más alta medida donde $R^2 \geq 0.95$. La sensibilidad fue calculada como la pendiente del análisis de regresión en el rango lineal de las curvas de calibración.

5 Resultados y discusión

5.1 Caracterización morfológica de los hidrogeles

Los hidrogeles entrecruzados con EGDGE y GA se depositaron sobre superficies de vidrio, con el propósito de evitar cualquier interferencia en la microscopía de fluorescencia causada por las superficies de oro. No obstante, se observaron las mismas morfologías en ambas superficies. En la Fig. 12, se presentan las imágenes de campo claro y fluorescencia de los hidrogeles, donde se distingue la formación de un anillo periférico (*coffee ring*) para todos los hidrogeles. Este anillo es característico de la técnica de *drop-casting*, debido al desplazamiento de una cantidad significativa de la fase sólida ocasionado por el flujo capilar y el secado de la gota, como se explicó en la sección 2.5.1. Esto se confirmó a través de las perfilometrías realizadas (Fig. 13b, d), donde se vio que los anillos son más gruesos en comparación con las zonas centrales de los hidrogeles. En ambos tipos de hidrogeles, se identificó una mínima variación en la altura de los anillos al aumentar la concentración del entrecruzador. En los hidrogeles entrecruzados con EGDGE, se apreció un incremento en el espesor de la zona central a medida que la concentración del entrecruzador aumentó. Este efecto se evidenció en la concentración de 33.3 mM durante el análisis de perfilometría (Fig. 13b), obteniendo valores muy similares de altura para la zona central y el anillo periférico. Para las concentraciones de 3.33 y 16.65 mM, se identificaron algunas regiones con alturas casi un orden de magnitud mayor en comparación con otras regiones de la zona central.

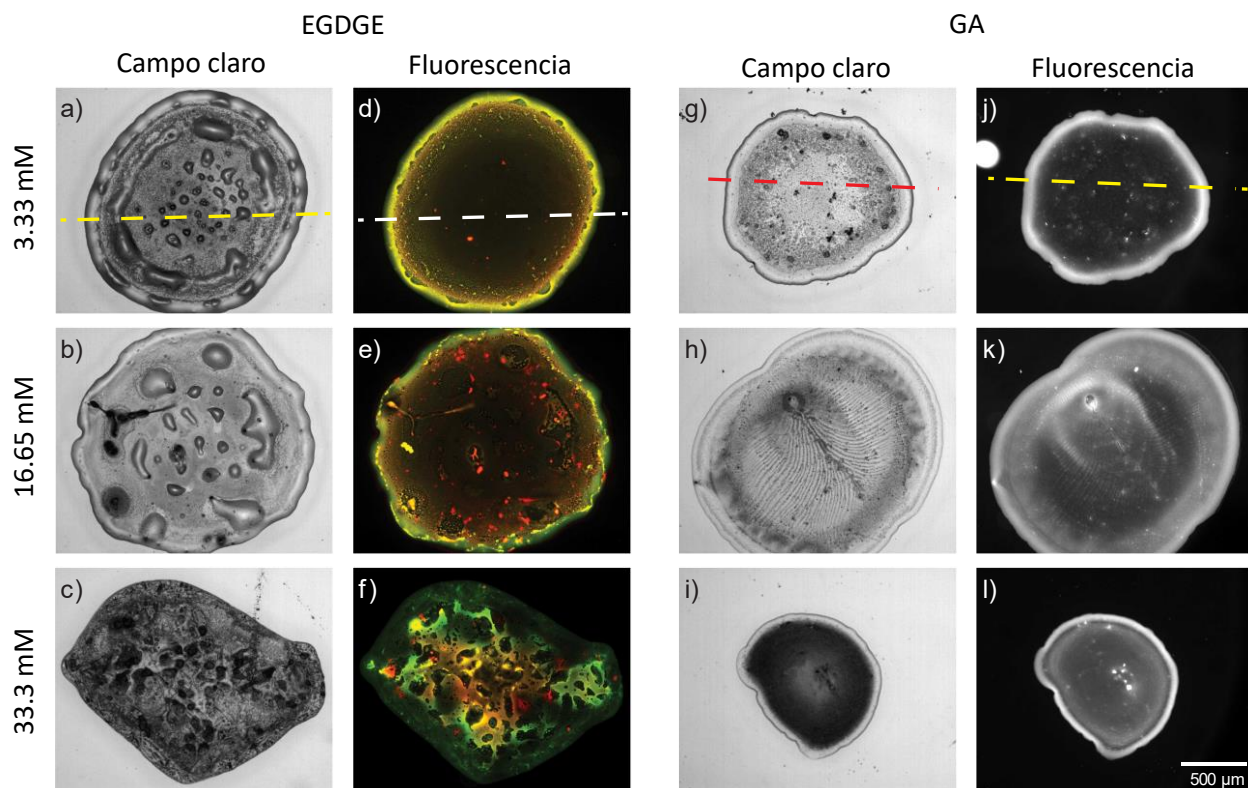


Fig. 12. Imágenes de campo claro (a-c, g-i) y fluorescencia (d-f, j-l) de hidrogeles entrecruzados con diferentes concentraciones de EGDGE y GA, depositados sobre superficies de vidrio. Se ajustó el contraste de manera óptima para cada una de las imágenes, por lo que tanto no se pueden comparar las intensidades entre ellas. Las líneas punteadas indican las áreas donde se realizaron las perfilometrías que se muestran en la Fig. 13.

En el caso de los hidrogeles entrecruzados con EGDGE, fue necesario etiquetar tanto la GOx como el BPEI con fluoróforos FITC (con emisión en verde) y TRITC (con emisión en rojo), siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.2. Las Fig. 12d-f presentan las imágenes de fluorescencia correspondientes a ambos canales, donde se aprecia una segregación de los dos componentes. Principalmente, la enzima se distribuye de manera predominante en el anillo periférico de las gotas, mientras que el polímero muestra una distribución más uniforme en toda la gota. Además, se pueden observar posibles agregados de polímero en forma de "hot spots", cuya presencia aumenta con la concentración de EGDGE. De igual manera, se observa una mayor segregación a medida que aumenta la concentración del entrecruzador, siendo evidente en el caso de la concentración de 33.3 mM, donde se identifican dominios exclusivos de enzima y otros de polímero. En las imágenes de campo claro (Fig. 12a-c) de los hidrogeles con EGDGE, también se pueden observar regiones convexas, que se confirmaron mediante perfilometría y muestran alturas superiores a otras áreas. Sin embargo, a pesar de la

altura que presentan y su forma convexa, no existe un aumento en la fluorescencia. Esto indica que no se tratan de zonas con mayor grosor, sino más bien de áreas delgadas del hidrogel que funcionan como "reservorios" de solvente. Estas áreas, al ejercer la presión durante la perfilometría, se perforan y liberan líquido. Asimismo, cabe destacar que la presencia de estas estructuras disminuye cuando aumenta la concentración del entrecruzador.

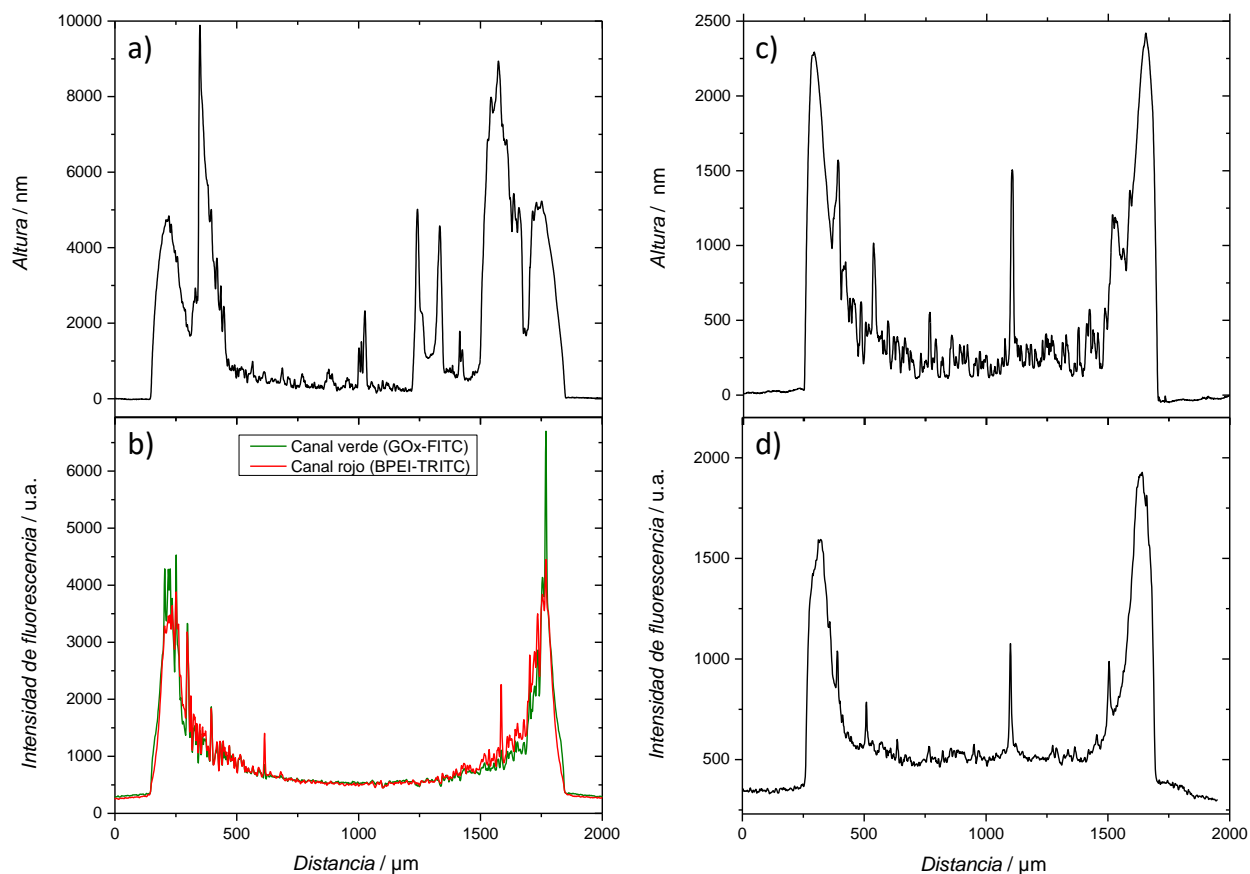


Fig. 13. Perfilometrías (a, c) e intensidades de fluorescencia (b, d) de hidrogeles entrecruzados con 3.33 mM de EGDGE (a, b) y GA (c, d) sobre sustratos de vidrio. Ambos análisis se realizaron con base en las áreas señaladas en la Fig. 12 (líneas punteadas).

Por otro lado, los hidrogeles entrecruzados con GA se caracterizan por exhibir una fluorescencia intrínseca resultante de la formación de grupos imina, producto de la reacción de entrecruzamiento entre las aminas y GA. Debido a este fenómeno, se produjo una interferencia con la fluorescencia de los fluoróforos utilizados en los hidrogeles entrecruzados con EGDGE. Por lo tanto, no fue posible aplicar la misma

estrategia para evaluar la segregación de los componentes. No obstante, las imágenes de fluorescencia (Fig. 12j-l) de estos hidrogeles proporcionaron información sobre la distribución espacial de los enlaces del entrecruzamiento. Para identificar las posibles longitudes de onda de excitación del fluoróforo, se realizó una espectroscopía de absorción electrónica (UV-Vis) en una mezcla de reacción con una concentración de 33.3 mM de GA. El espectro de absorción mostró cuatro bandas a 325, 423, 536 y 644 nm, en las cuales se llevaron a cabo espectros de excitación y emisión de fluorescencia, con la excepción de la longitud de onda de 325 nm, ya que no mostró una emisión significativa. La Fig. 14 presenta los espectros de excitación y emisión normalizados, junto con los filtros utilizados en caso de aplicar. Se observaron máximos de excitación a 466, 540 y 647 nm, con sus correspondientes máximos de emisión a 500, 559 y 663 nm. La intensidad relativa calculada para estas tres señales fue de 1:13:4, y la señal más intensa coincidió con lo reportado por Ling et al. para nanopartículas poliméricas de BPEI-GA [92], correspondiendo a la excitación en verde y emisión en rojo. Por lo tanto, esta señal se empleó en todas las posteriores caracterizaciones de los hidrogeles entrecruzados con GA.

Finalmente, las morfologías obtenidas de los hidrogeles con GA fueron más homogéneas, lo que posiblemente se deba a la alta reactividad reportada para los entrecruzadores del grupo de los dialdehídos [93, 94]. Las perfilometrías mostraron que los hidrogeles con distintas concentraciones de GA presentaron un comportamiento semejante al observado con EGDGE, en el cual el grosor de la zona central incrementa a medida que aumenta la concentración del entrecruzador. Además, se observó que al aumentar la concentración del entrecruzador, la zona central de los hidrogeles se vuelve más homogénea. Al examinar la relación entre el espesor de los hidrogeles y la fluorescencia (Fig. 13b, d), se obtuvo una proporción de 0.67 y 1.23 u.a. de fluorescencia por nanómetro de espesor para los hidrogeles con 3.33 y 33.3 mM de GA, respectivamente. Esto demuestra que tanto el espesor de los hidrogeles como el número de enlaces por unidad de volumen de hidrogel aumentan de manera no proporcional con la concentración de entrecruzador. Asimismo, existe un cambio morfológico evidente en las imágenes de campo claro con el aumento de la concentración, pasando de estructuras heterogéneas con "reservorios" en la concentración de 3.33 mM, a una estructura más homogénea en la concentración más alta. Los hidrogeles con la concentración más alta presentan consistentemente gotas con diámetros menores y

bloquean la transmisión de la luz en las imágenes de campo claro en comparación con las otras dos concentraciones.

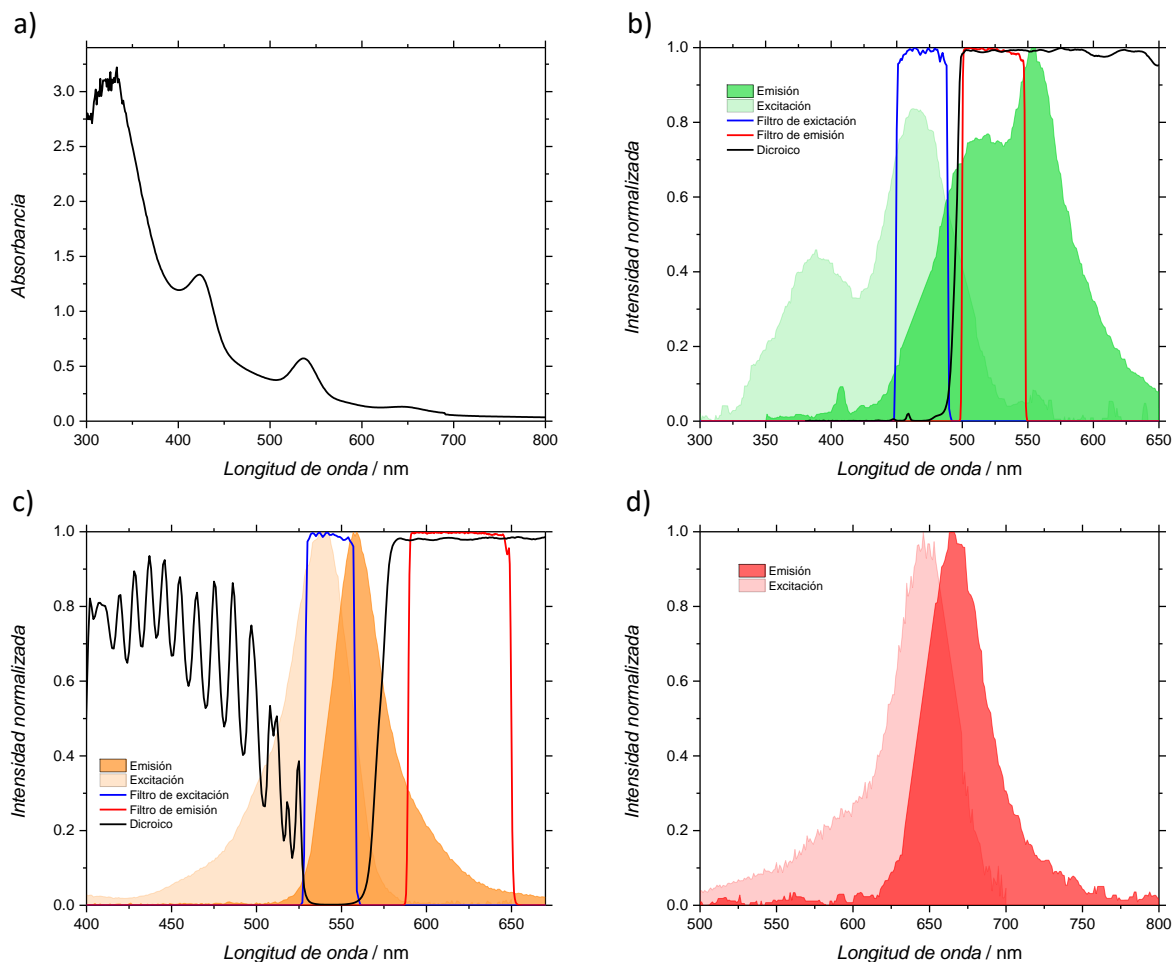


Fig. 14. Caracterización espectroscópica de hidrogeles entrecruzados con GA. Espectro de absorción UV-Vis (a), Espectros de excitación y emisión en tres longitudes de onda determinadas por el espectro UV-Vis (b-d). En las gráficas (b) y (c) se incluyen los espectros de transmisión normalizados de los conjuntos de filtros utilizados.

5.2 Medición de las propiedades mecánicas y térmicas de los hidrogeles

5.2.1 Microscopía de fuerza atómica y nanoindentación

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE con una concentración de entrecruzador de 33.3 mM se realizaron en dos zonas representativas de los hidrogeles: la zona central y zona periférica (anillo). Para el hidrogel BPEI/GOx/GA, se seleccionaron las zonas Z1 y Z2, mientras que para el

BPEI/GOx/EGDGE se eligieron las zonas Z1 y Z3. Estas zonas se pueden visualizar en la

Fig. A1. La rugosidad media (R_a) en la zona central (Z1) del sistema BPEI/GOx/GA fue de 1.64 nm, mientras que en la zona periférica (Z2) fue de 31.21 nm. Por otro lado, los hidrogeles BPEI/GOx/EGDGE mostraron una mayor rugosidad en ambas zonas, con valores de 40.48 nm para la zona central (Z1) y 113.67 nm para la zona periférica (Z3). La rugosidad observada en ambos hidrogeles se refleja en las micrografías de AFM, donde se aprecia una variación en la morfología superficial dependiendo del área escaneada.

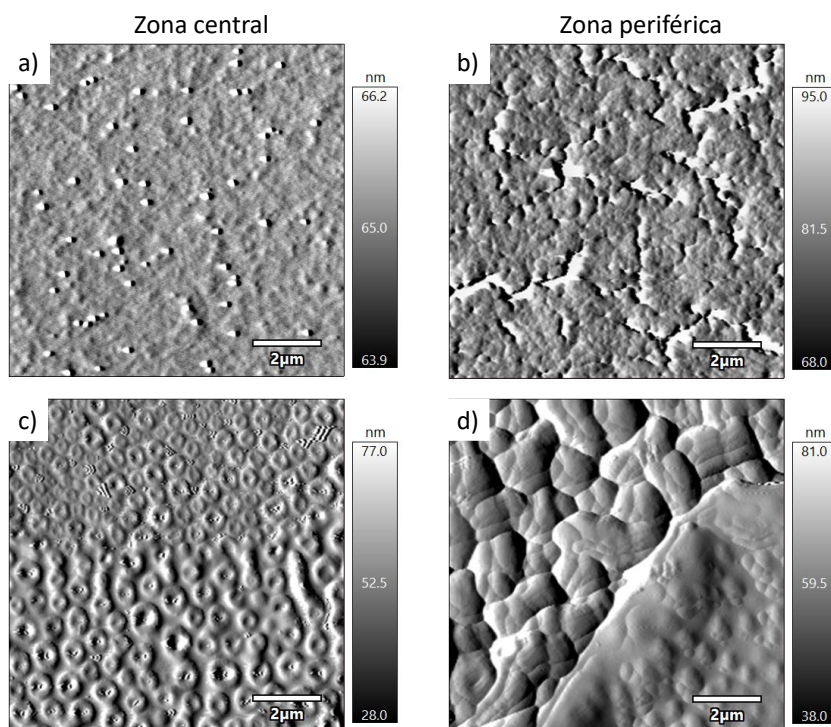


Fig. 15. Micrografías de AFM (amplitud) con un barrido de $10 \times 10 \mu\text{m}$ en hidrogeles BPEI/GOx/GA (a-b) y BPEI/GOx/EGDGE (c-d).

La Fig. 15 muestra que los hidrogeles BPEI/GOx/GA presentan una estructura homogénea en comparación con los entrecruzados con EGDGE, con alturas inferiores en la zona central y periférica, aproximadamente 17 y 1.7 veces, respectivamente. Las imágenes de fase del hidrogel BPEI/GOx/EGDGE en las áreas escaneadas (Fig. 16 y Tabla 5) muestran heterogeneidad en distintas zonas, lo que indica variaciones en las propiedades del material debido a su composición diferente. En cambio, para el hidrogel entrecruzado con GA, la imagen de fase se observa de manera homogénea. Estos resultados respaldan lo observado en la microscopía de fluorescencia, revelando una

reactividad diferente de los entrecruzadores, siendo el EGDGE menos reactivo, lo que permite una mayor dispersión de los componentes del hidrogel en el tiempo.

Tabla 5. Características superficiales de los hidrogeles BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE.

Zona de medición	Hidrogel	Espesor (nm)	Fase	Morfología
Central	BPEI/GOx/GA	4.9 ± 3.7	Homogénea	Lisa con pequeños gránulos
Periférica	BPEI/GOx/GA	82 ± 81	Homogénea	Corteza agrietada (Cracked rust or crust)
Central	BPEI/GOx/EGDGE	84 ± 82	Heterogénea	Cilíndrica
Periférica	BPEI/GOx/EGDGE	137.5 ± 107.5	Heterogénea	Granular o nodular

La Fig. 17 muestra las curvas características de carga-profundidad de penetración en diferentes áreas de los hidrogeles. La notable variación de la rigidez (S) en la zona central y periférica de los hidrogeles BPEI/GOx/EGDGE se debe a las morfologías observadas previamente en AFM, mientras que para los hidrogeles con GA se observa una menor variación, lo cual se atribuye a la homogeneidad de las muestras. Además, la Tabla 6 presenta los valores del módulo de elasticidad (E), dureza (H) y rigidez (S) obtenidos mediante nanoindentación para ambos hidrogeles. Dado el bajo espesor obtenido en la zona central de los hidrogeles (<500 nm), este puede tener un efecto en la medición de las propiedades mecánicas. Por lo tanto, se optó por tomar los datos en la zona periférica, donde los espesores son >1 μm . El hidrogel BPEI/GOx/GA presenta valores más altos, y se observa una disminución en la desviación estándar de E , H y S en comparación con el hidrogel BPEI/GOx/EGDGE. Esto está relacionado con el número de uniones por unidad de volumen, debido a las cadenas más cortas del GA en comparación con las cadenas más largas del EGDGE. Esta diferencia puede asociarse con una mayor fracción de subestructuras semirrígidas dentro del hidrogel, lo que conduce a una reducción en la movilidad segmentaria de las cadenas poliméricas. En este sentido, la Fig. 18 muestra que el hidrogel BPEI/GOx/GA exhibía una rigidez macroscópica, mientras que el hidrogel BPEI/GOx/EGDGE era más suave y dúctil al someter las muestras a una curvatura específica.

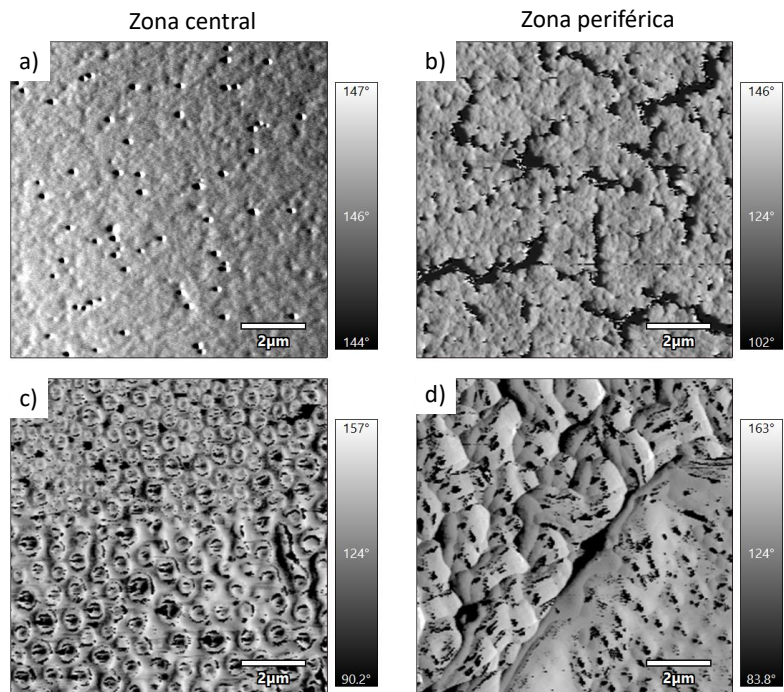


Fig. 16. Imágenes de fase de hidrogeles BPEI/GOx/GA (a-b) y BPEI/GOx/EGDGE (c-d).

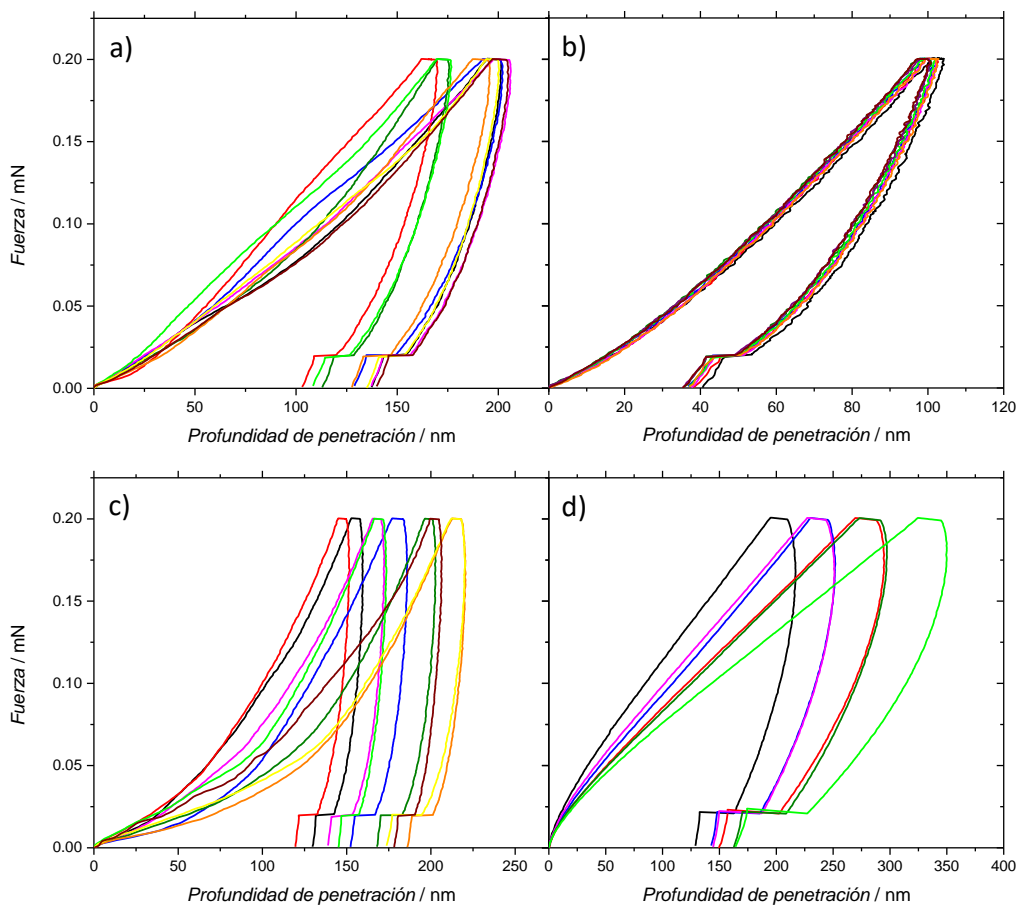


Fig. 17. Curvas carga-profundidad de penetración realizadas ($n=9$) en la zona central y periférica (izquierda-derecha) de los hidrogeles BPEI/GOx/GA (a-b) y BPEI/GOx/EGDGE (c-d).

Tabla 6. Propiedades mecánicas de los hidrogeles BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE con una concentración de entrecruzador de 33.3 mM evaluadas por nanoindentación.

Zona de medición	Hidrogel	Módulo de elasticidad, E (GPa)	Dureza, H (GPa)	Rigidez, S (N/m)
Central	BPEI/GOx/GA	5.85 ± 0.39	0.17 ± 0.024	7357 ± 273
Periférica	BPEI/GOx/GA	8.85 ± 0.083	0.51 ± 0.0099	6319 ± 72
Central	BPEI/GOx/EGDGE	21.37 ± 3.72	0.16 ± 0.034	27215 ± 2433
Periférica	BPEI/GOx/EGDGE	3.31 ± 1.26	0.1 ± 0.021	5242 ± 1455

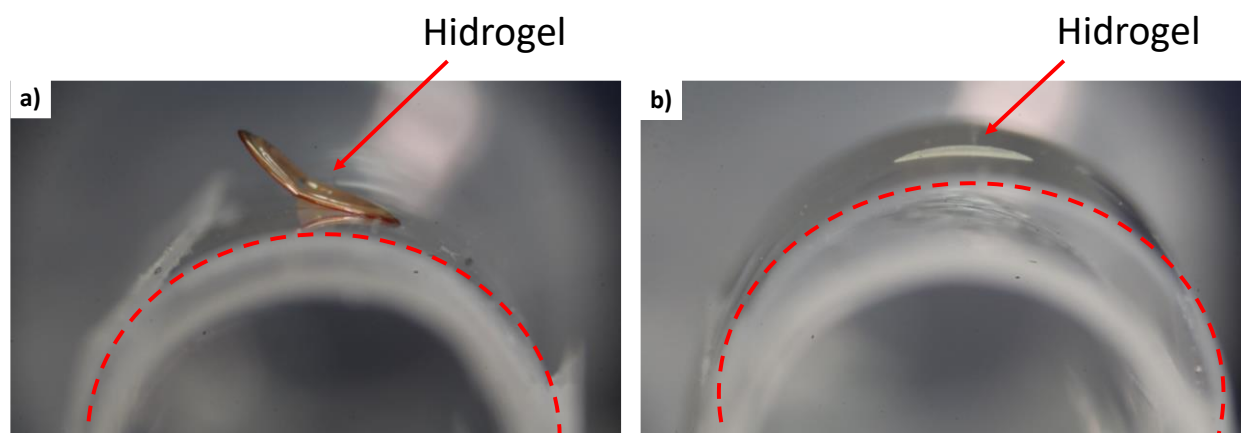


Fig. 18. Observación macroscópica de las propiedades físicas/mecánicas de los hidrogeles BPEI/GOx/GA (a) y BPEI/GOx/EGDGE (b).

5.2.2 Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido

El efecto del entrecruzador sobre la estabilidad térmica de los hidrogeles, se evaluó por TGA. La Fig. 19 muestra las curvas de TGA y sus primeras derivadas de los hidrogeles BPEI/GOx/GA, BPEI/GOx/EGDGE, así como de los reactivos puros de BPEI y GOx. Estas curvas representan la descomposición térmica de las muestras en diferentes etapas a medida que aumenta la temperatura. La pérdida de peso en las etapas I y II para las muestras de GOx y BPEI/GOx/EGDGE y la etapa I del hidrogel BPEI/GOx/GA se atribuyó a la evaporación de agua absorbida física o químicamente. En el caso del BPEI, se ha comprobado que su volatilización y/o degradación térmica varía en diferentes atmósferas, dependiendo de la longitud de su cadena. Se observa que la degradación ocurre a temperaturas más elevadas a medida que aumenta el peso molecular del polímero. Especialmente en atmósfera de aire, se registra una rápida disminución de la masa del BPEI a temperaturas superiores a 200 °C [95]. Se ha

reportado que para BPEIs de alto peso molecular (>20,000), la descomposición en atmósfera de aire es un proceso bastante complejo. Sin embargo, la detección de una banda en 1720 cm^{-1} en los espectros IR, atribuida a las oscilaciones de valencia del grupo C=O, indica la presencia de una descomposición termo-oxidativa [96]. A pesar de la complejidad de la descomposición en aire, Nedel'ko *et al.* demostraron mediante espectroscopía de masas que, en atmósfera inerte, algunos productos de la descomposición de BPEI incluyen amoniaco, etilamina, pirrol y etilpirroles sustituidos [96]. Al no detectar la presencia de monómeros o piperazina junto con la etilamina y los pirroles, sugirieron que en el mecanismo de reacción se produce la ruptura del enlace C-N, transfiriéndose el hidrógeno reactivo desde el grupo metileno a la posición de fractura. Este mecanismo conduce a la formación de un único grupo amina y un extremo terminal de cadena polimérica insaturada en cada sitio de fractura.

La diferencia en el número de etapas de descomposición entre los hidrogeles y los reactivos puros está relacionada con el método de entrecruzamiento entre el GA y EGDGE con los grupos -NH₂ del BPEI y GOx, lo cual aumenta la estabilidad térmica de los hidrogeles, evitando su completa degradación y volatilización. En el caso del hidrogel BPEI/GOx/GA (Fig. 19c), la etapa II se relacionó con la degradación de la enzima [97, 98], la cual comienza alrededor de 180 °C con una pérdida de peso de 2.57%. Sin embargo, la mayor descomposición de la enzima, alrededor de los 215 °C como se aprecia en la Fig. 19b, etapa IV, no se observa en el hidrogel debido a la retención de la estructura tridimensional de la GOx por la red compacta que genera el GA. El 36.93% de pérdida peso en el rango de temperatura de 300-430 °C, se asoció principalmente con la descomposición de las cadenas de BPEI, consistente con lo reportado con PEIs de la misma longitud [99, 100]. No obstante, la pérdida de peso constante en las etapas posteriores (IV, V y VI) podría asociarse con la descomposición de estructuras de mayores pesos moleculares donde se encuentran entrecruzados tanto BPEI como GOx, y posiblemente diferentes formas de GA [72]. En comparación, el hidrogel BPEI/GOx/EGDGE muestra una pérdida de peso del 14.12% en el rango de 180-300 °C, relacionada con la degradación gradual de la enzima. En este caso, la mayor pérdida de peso podría estar asociada a las redes menos compactas que se generan en comparación con el GA. La etapa V nuevamente se asoció con la degradación y volatilización de las cadenas del BPEI, mientras que la etapa VI se relacionó con la

degradación de partes del hidrogel entrecruzadas fuertemente con la presencia de BPEI y GOx. La comparación de las curvas de TGA de los hidrogeles exhibe que el entrecruzamiento con EGDGE muestra dos etapas marcadas en la descomposición del BPEI (etapas V y VI), posiblemente debido a la presencia de una única forma estructural en el EGDGE en comparación con múltiples formas en el GA. Finalmente, se observa un peso residual de 20.37% (GA) y 22.79% (EGDGE) a una temperatura de 650°C, lo que refleja el impacto del método de entrecruzamiento utilizado sobre la estabilidad térmica de los hidrogeles. Mientras que, los reactivos puros pierden el 100% del peso en el rango de temperatura de 450-525 °C.

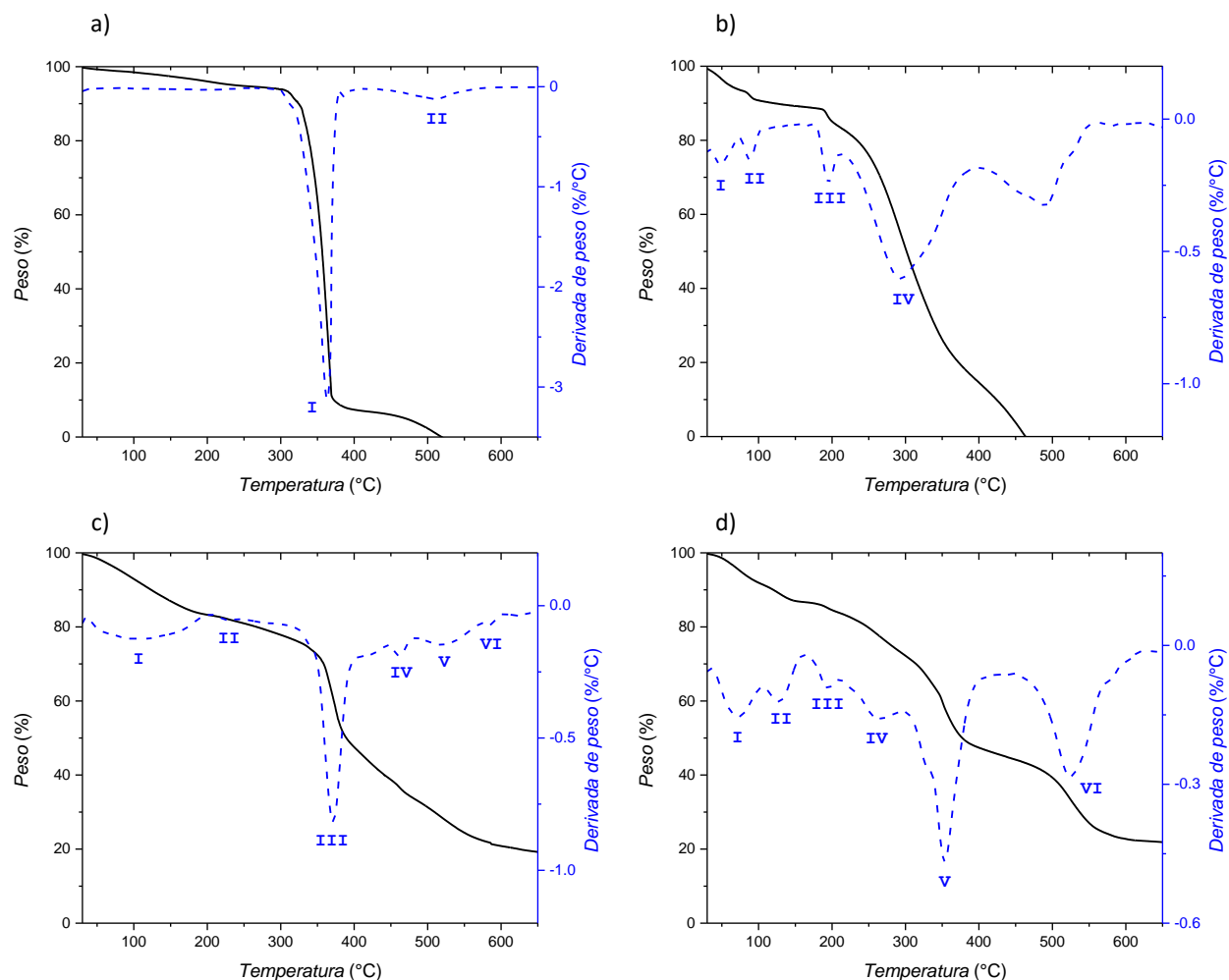


Fig. 19. Curvas de TGA y sus primeras derivadas correspondientes a BPEI (a), GOx (b), BPEI/GOx/GA (c) y BPEI/GOx/EGDGE (d).

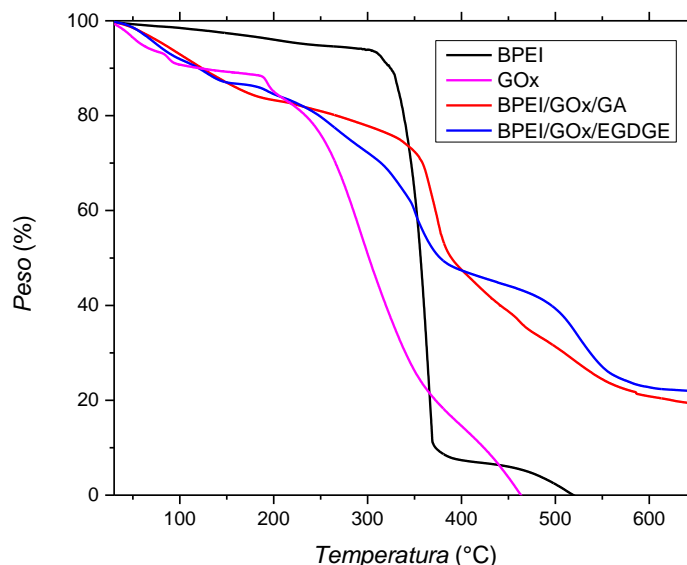


Fig. 20. Curvas de TGA de los hidrogeles y reactivos individuales evaluados en un rango de temperatura de 30-650 °C.

Las curvas DSC (Fig. 21) muestran los perfiles de descomposición térmica bajo una atmósfera de aire para los reactivos individuales y los hidrogeles, revelando distintas etapas relacionadas con reacciones exotérmicas o endotérmicas. Los picos endotérmicos en el rango de temperatura de 30-170 °C para las muestras de GOx, BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE se relacionan con la pérdida de agua absorbida, como se describió anteriormente en el análisis de TGA. Las reacciones exotérmicas que ocurren en el rango de 200-600 °C están asociadas con las etapas previamente observadas en las primeras derivadas del análisis de TGA para cada una de las muestras, ya que ocurren a las mismas temperaturas. Sin embargo, es importante destacar que la intensidad de los picos no guarda proporción entre ambos análisis, debido a que la pérdida de masa no se corresponde directamente con la energía liberada para cada reacción de descomposición. Estas reacciones exotérmicas son favorecidas por la presencia de O₂ en la cámara de evaluación, lo cual promueve la degradación oxidativa de la enzima, las cadenas poliméricas y los compuestos con distintos pesos moleculares generados por el entrecruzamiento, a medida que la temperatura aumenta.

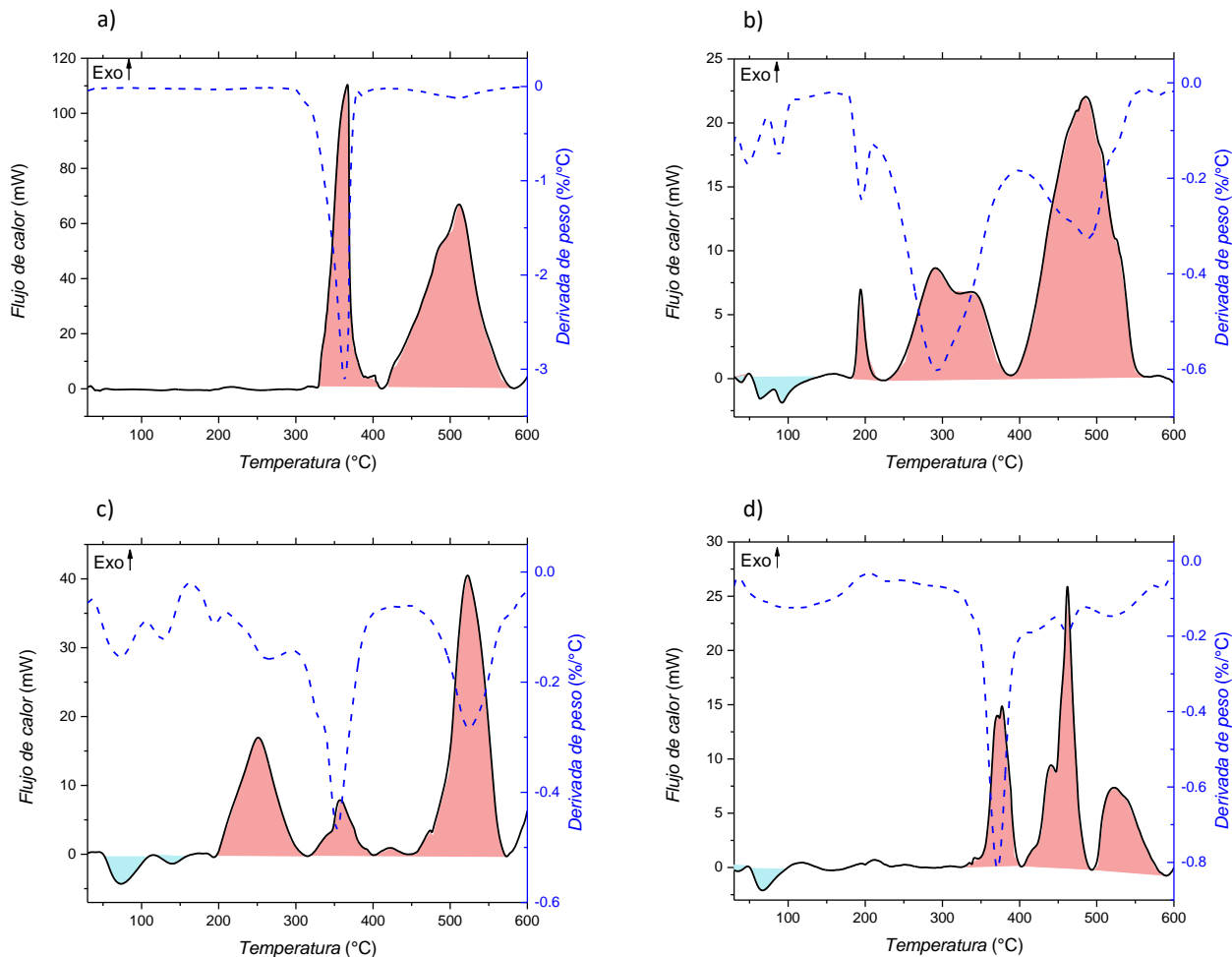


Fig. 21. Curvas DSC y primeras derivadas de TGA de BPEI (a), GOx (b), BPEI/GOx/GA (c) y BPEI/GOx/EGDGE (d).

5.3 Caracterización del proceso de hinchamiento de los hidrogeles

Como primer paso, se depositaron los hidrogeles sobre los sustratos individuales, portaobjetos de vidrio y portaobjetos recubiertos con una película de 200 nm de oro, para analizar su comportamiento en cada uno de ellos. Las evaluaciones realizadas en hidrogeles BPEI/GOx entrecruzados con 33.3 mM de EGDGE o GA, mostraron un cambio morfológico evidente debido al proceso de hinchamiento experimentado al interactuar después de 10 minutos con una gota de 30 μ l de PB 0.1 M pH 7.4. Las deformaciones se evidenciaron más en los hidrogeles entrecruzados con EGDGE, surgiendo como *folding* y *creasing*, que son consideradas modos de falla en materiales blandos cuando se exponen a un fluido, tal como se describe en la sección 2.5.2. La magnitud de estas deformaciones depende directamente del efecto de tensión-

compresión generada por el hinchamiento y la resistencia de las cadenas del polímero a volver a su estado inicial. Cuando el hidrogel está unido a una superficie rígida y la expansión causada por el hinchamiento es significativa, la estructura del hidrogel se deforma de manera no homogénea. En estas condiciones, las áreas libres o unidas débilmente a la superficie desarrollan las deformaciones percibidas [101, 102].

Se observó que los hidrogeles experimentaron un proceso de hinchamiento en diferentes grados, junto con la presencia de mecanismos de fallo, cuando se depositaron sobre cada una de las superficies. Al depositar las gotas sobre superficies de vidrio, se observó un cambio en la difracción de la luz en la estructura general de las gotas, lo que indica un cambio en la morfología (hinchamiento). Sin embargo, como se ve en la Fig. 22a y c, la estructura que sufrió mayores cambios debido al proceso de hinchamiento fue el anillo periférico de las gotas, donde se presentaron estructuras en forma de *folding* y *creasing*, así como una mayor expansión. Estos cambios podrían estar relacionados con una menor adhesión del hidrogel al vidrio. En contraste, al utilizar superficies de oro para depositar los hidrogeles, las estructuras físicas de los hidrogeles sufrieron cambios mínimos (Fig. 22b y d), lo cual podría atribuirse a una mayor interacción debido a enlaces electrostáticos y de coordinación debido a las propiedades quelantes del BPEI [103, 104].

Además, el uso de EGDGE como entrecruzador proporciona una mayor flexibilidad en las cadenas poliméricas en comparación con el glutaraldehído, debido a su estructura más larga, lo que podría favorecer la aparición de estos fenómenos. En consecuencia, las perfilometrías mostraron el cambio en la superficie de los hidrogeles, que se refleja en la disminución en la altura y rugosidad en la zona central de los hidrogeles, así como un aumento de la altura en el anillo exterior en comparación con el estado deshidratado. Siguiendo esta línea de análisis, es posible evaluar cualitativamente los mecanismos de fallo y la interacción del hidrogel con el sustrato a través de su adhesión. En este sentido, los resultados de las pruebas de adherencia de ambos sistemas sobre sustratos de vidrio y oro, expuestos durante un período de 15 días a PB 0.1 M con un pH de 7.4, se agrupan en la Tabla 7. Estos datos muestran una estabilidad inferior en los hidrogeles de EGDGE en comparación con los de GA, particularmente en las superficies de vidrio.

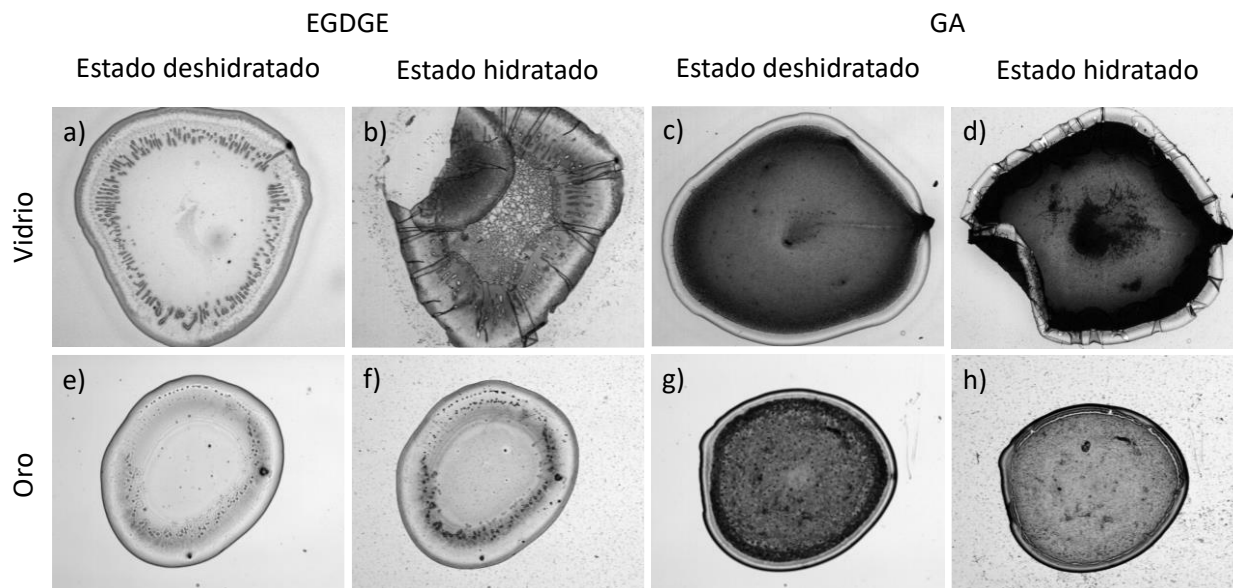


Fig. 22. Micrografías de campo claro de hidrogeles BPEI/GOx entrecruzados con 33.3 mM de EGDGE (a, b, e, f) y GA (c, d, g, h) para el análisis de estabilidad sobre superficies de vidrio (a-d) y oro (e-h) después de su proceso de hinchamiento.

Tabla 7. Evaluación de la adherencia de hidrogeles entrecruzados con diferentes concentraciones de GA y EGDGE sobre sustratos de vidrio y oro.

Entrecruzador	Concentración de entrecruzador (mM)	Fallo de adherencia	
		En sustrato de oro	En sustrato de vidrio
GA	33.30	0 de 5	0 de 5
	16.65	0 de 5	1 de 5
	3.33	0 de 5	3 de 5
EGDGE	33.30	2 de 5	4 de 5
	16.65	1 de 5	4 de 5
	3.33	1 de 5	3 de 5

Debido a la variabilidad que presenta naturalmente el sistema BPEI/GOx/EGDGE, se presentan distintos sets representativos de evaluaciones para la visualización de los fenómenos que se describen. En la Fig. 23 se puede apreciar que, durante el proceso de hinchamiento, existe una tendencia a generar un mayor número de pliegues a medida que aumenta la concentración de EGDGE. Esta respuesta puede ser atribuida a lo descrito en la literatura sobre reacciones de entrecruzamiento con epóxidos y su alta capacidad de absorción de agua [20, 105, 106]. En este caso, el diepóxido utilizado reacciona de manera favorable con las aminas primarias a pH neutro, formando aminas secundarias y grupos hidroxilo. La presencia de estos grupos polares facilita la formación

de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. En consecuencia, a medida que se incrementa la concentración de EGDGE, se observa un aumento en el número de enlaces formados con la GOx y BPEI, permitiendo una mayor capacidad de absorción de moléculas de agua en el hidrogel. A su vez, se ha observado que la absorción de agua en hidrogeles entrecruzados con epóxidos puede generar una disminución en sus propiedades, como la resistencia mecánica. Se observó esta repercusión en la mayoría de los hidrogeles con concentraciones de 16.65 y 33.3 mM de EGDGE (Fig. 24), los cuales experimentaron daños significativos en sus estructuras después del hinchamiento debido al alto grado de absorción de agua y a la tensión ejercida sobre la red polimérica para mantener la estructura.

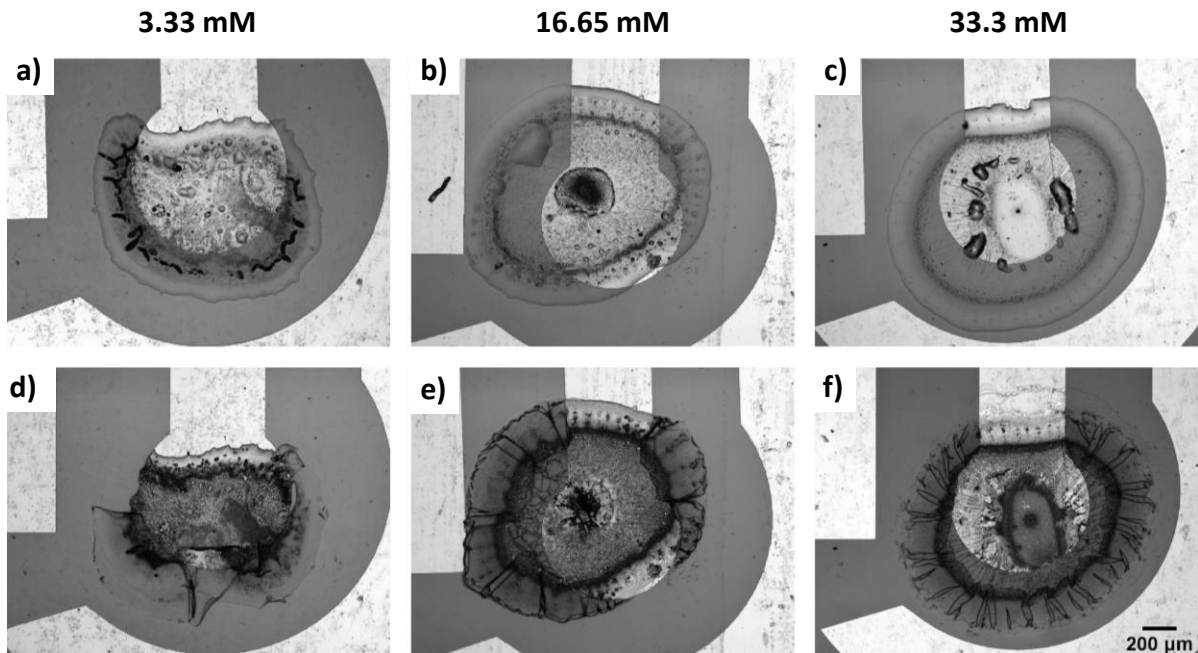


Fig. 23. Influencia de la concentración de EGDGE en la morfología de los hidrogeles BPEI/GOx mediante la absorción de agua. Hidrogeles en su estado deshidratado (a-c) e hidratado (d-f), entrecruzados con concentraciones ascendentes de EGDGE.

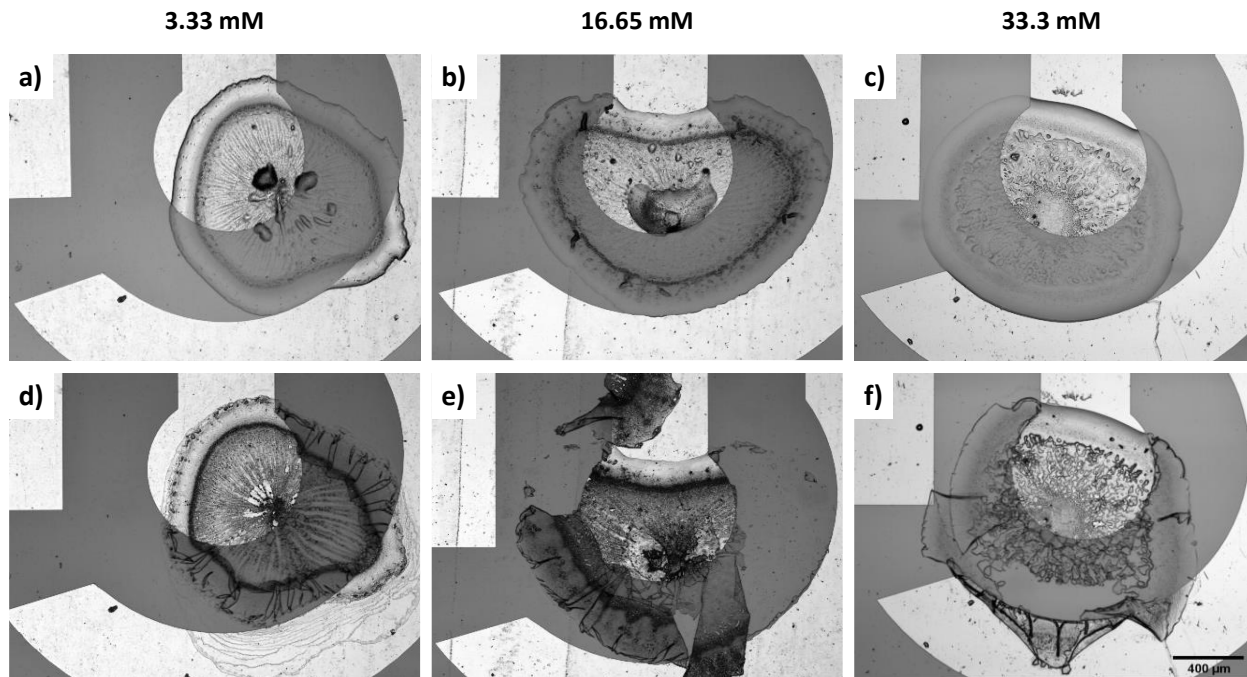


Fig. 24. Efecto de la concentración de EGDGE en el proceso de hinchamiento y propiedades mecánicas de hidrogeles BPEI/GOx. Los incisos (a-c) representan el estado deshidratado y los incisos (d-f) el estado hidratado de los hidrogeles.

En el caso de los hidrogeles entrecruzados con GA, se ha observado que el grado de entrecruzamiento es inverso al fenómeno de hinchamiento. Esto significa que, a concentraciones altas de GA la retención de agua dentro de los hidrogeles es baja, lo que resulta en un menor hinchamiento. Estos efectos se pueden apreciar en la Fig. 25, donde las concentraciones de 33.3 y 16.65 mM de GA no causan cambios estructurales significativos, mientras que en los hidrogeles entrecruzados con 3.33 mM de GA, se observa un efecto de hinchamiento macroscópico y en algunos casos, la disolución de ciertas partes del hidrogel. Además, se ha reportado que cuando se utiliza glutaraldehído como agente de entrecruzamiento en combinación con polímeros como el quitosano para la formación de hidrogeles, las redes resultantes tienden a ser más rígidas en comparación con otros aldehídos [107]. Esto se debe a la presencia de los dos grupos carbonilo (C=O) en la estructura química del GA, los cuales pueden reaccionar de manera más rápida y efectiva con los grupos amino del polímero.

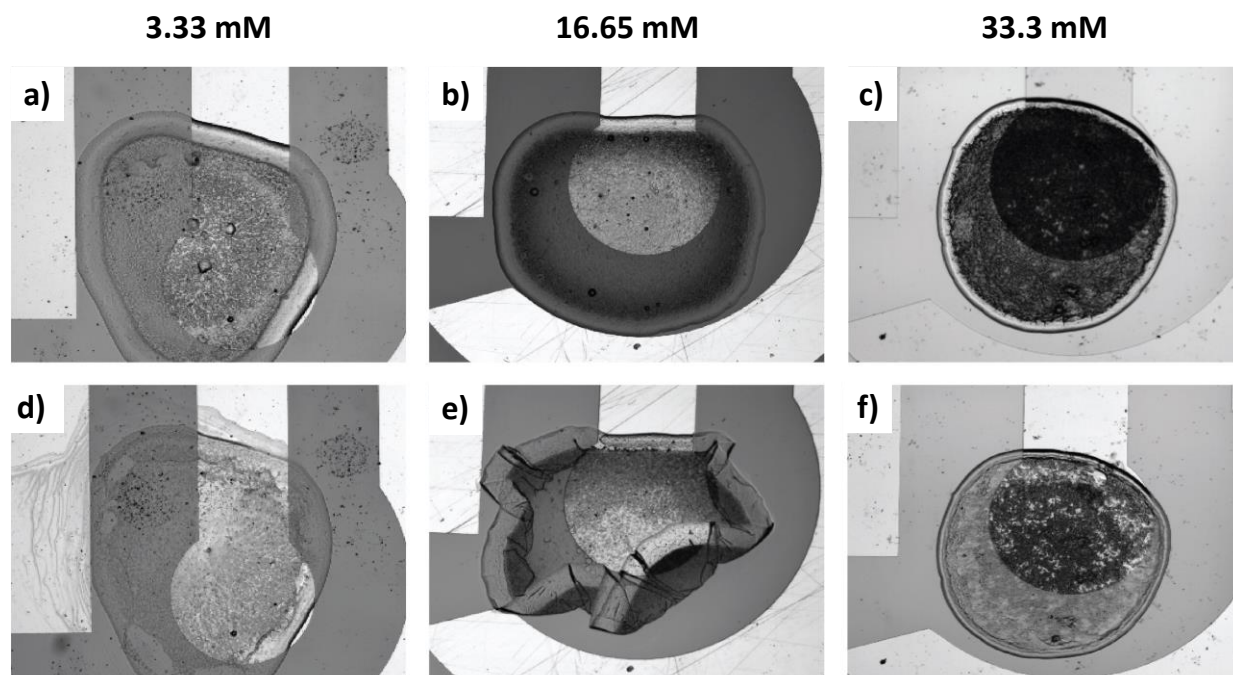


Fig. 25. Influencia de la concentración de GA en la morfología y propiedades físicas de los hidrogeles BPEI/GOx formados. Hidrogeles en su estado deshidratado (a-c) e hidratado (d-f), entrecruzados con concentraciones ascendentes de GA.

La capacidad de hinchamiento de un hidrogel también depende de su estructura química y de las características del medio circundante. En este sentido, el pH del medio desempeña un papel importante en el fenómeno de hinchamiento. En el caso de los polielectrolitos catiónicos, como las polietileniminas, se ha observado que el mayor hinchamiento ocurre a pH ácidos debido al "efecto esponja de protones". Este efecto se produce por la alta presencia de iones H^+ que protonan los grupos amino del polímero para formar $-NH_3^+$, lo que reduce la repulsión entre las cadenas poliméricas. A pH neutro, se ha estudiado que los grupos amino de las cadenas de polietileniminas se encuentran protonados en un amplio rango que varía entre el 15-60% [108–110]. Basándonos en esto, en los hidrogeles entrecruzados con EGDGE, ambos efectos podrían estar influyendo en el fenómeno de hinchamiento.

En cambio, en los hidrogeles con GA, los efectos predominantes son el hinchamiento inducido por la protonación de los grupos amino y la presencia de agua libre dentro del hidrogel. En consecuencia, se observa que los hidrogeles entrecruzados con GA presentan una mayor estabilidad en comparación con los hidrogeles entrecruzados con EGDGE. Estos resultados coinciden con lo reportado por Collins y Birkinshaw [111], al

investigar diferentes agentes entrecruzadores para la formación de geles basados en ácido hialurónico/polietilenimina. De la evaluación de cinco entrecruzadores, el GA y el EGDGE destacaron dentro de las propiedades que se evaluaron, siendo el GA el que produjo estructuras más estables en comparación con el EGDGE.

Por otra parte, se depositaron hidrogeles BPEI/GOx entrecruzados con un rango de concentración de 3.33 – 33.3 mM de GA y EGDGE sobre una hoja de teflón para facilitar su desprendimiento e incorporación a una solución de PB 0.1 M pH 7.4, con el fin de calcular la relación de hinchamiento por masa (SR_m). La Fig. 26 muestra la apariencia física de los hidrogeles en su estado hinchado después de sumergirse 1 h en el buffer de fosfatos. Es evidente el cambio en el tamaño de las estructuras de los hidrogeles en su estado hidrato en comparación de su estado original.

La SR_m para los hidrogeles con una concentración de 33.3 mM de GA revela un alto grado de hinchamiento, ya que su masa aumenta en 15.08 veces en comparación con su masa inicial. Adicional a la absorción de moléculas de agua, la presencia del polímero catiónico en el hidrogel permite la unión de aniones presentes en el electrolito soporte, en este caso fosfatos (PO_4^{3-}), que contribuyen al aumento de masa. En comparación, la concentración de 16.65 mM muestra un grado de hinchamiento muy similar, con un incremento de masa de 14.36 veces respecto a su masa inicial. Esta disminución puede atribuirse a la reducción en la concentración del entrecruzador, y ambas concentraciones mantienen su estado hidratado sin disolverse. Sin embargo, al disminuir la concentración de GA hasta 3.33 mM, parece afectar las propiedades mecánicas del hidrogel, lo que favorece su disolución parcial. Este efecto provoca que la SR_m para esta concentración disminuya a 2.66, debido al daño en la estructura tridimensional y la incapacidad de retener agua. Esta concentración es especialmente interesante, ya que, como se ha descrito en secciones anteriores, al reducir significativamente la concentración de GA, se produce una transición morfológica del hidrogel y, aparentemente, también en las propiedades mecánicas, volviéndolo más similar a los hidrogeles entrecruzados con EGDGE. En el caso de los hidrogeles con EGDGE, no fue posible calcular su SR_m , ya que, como se puede observar en la Fig. 26, se disolvieron por completo, lo que impidió su recuperación y pesaje posterior.

Los resultados obtenidos son de gran interés debido al comportamiento de los hidrogeles tanto en su estado libre como cuando están adheridos a una superficie. Basándonos en esto, parece que el depósito de los hidrogeles sobre los electrodos mediante *drop-casting* tiene un impacto significativo en su estabilidad. Esto se debe a que, al estar químicamente unidos a través de enlaces, especialmente en el caso del oro, estos enlaces limitan en cierta medida el hinchamiento del hidrogel en los ejes X, Y, Z. Además, estos enlaces también actúan como puntos de anclaje que reducen la posibilidad de disolución de los hidrogeles, como se observa en todas las evaluaciones realizadas sobre estas superficies.

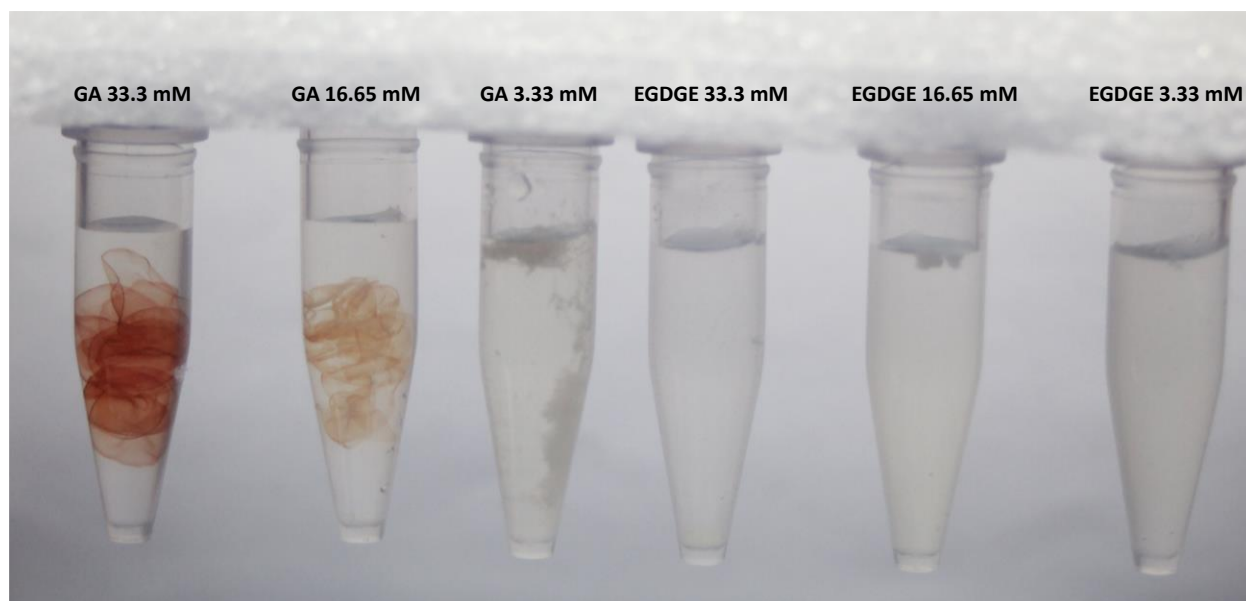


Fig. 26. Apariencia física de hidrogeles sumergidos en PB 0.1 M pH 7.4 durante 1 h para el cálculo de la relación de hinchamiento por masa (SR_m).

5.4 Efecto de la naturaleza y concentración del entrecruzador en la respuesta electroquímica

Se analizó el efecto de la concentración y la naturaleza del entrecruzador en la respuesta electroquímica de los biosensores. Se realizaron mediciones cronoamperométricas a un potencial de 0.4 V vs. Pseudo-Ag | AgCl. Este potencial fue seleccionado previamente para la oxidación de H_2O_2 por voltamperometría cíclica (Fig. 27). La respuesta amperométrica de los biosensores se registró como una función de la concentración de glucosa en un rango entre 0-100 mM, tomando la corriente medida a los dos minutos posteriores, iniciada la medición. Los parámetros analíticos de esta sección se calcularon

utilizando los valores de J_{max} en un intervalo de 0 a 10 mM de glucosa. Este rango se seleccionó debido a que, a concentraciones superiores de glucosa, se observa una disminución en la corriente en las curvas de calibración (Fig. 28a-b). Esta reducción podría estar asociada a la degradación de los hidrogeles, como se evidenció en evaluaciones anteriores mediante microscopía óptica.

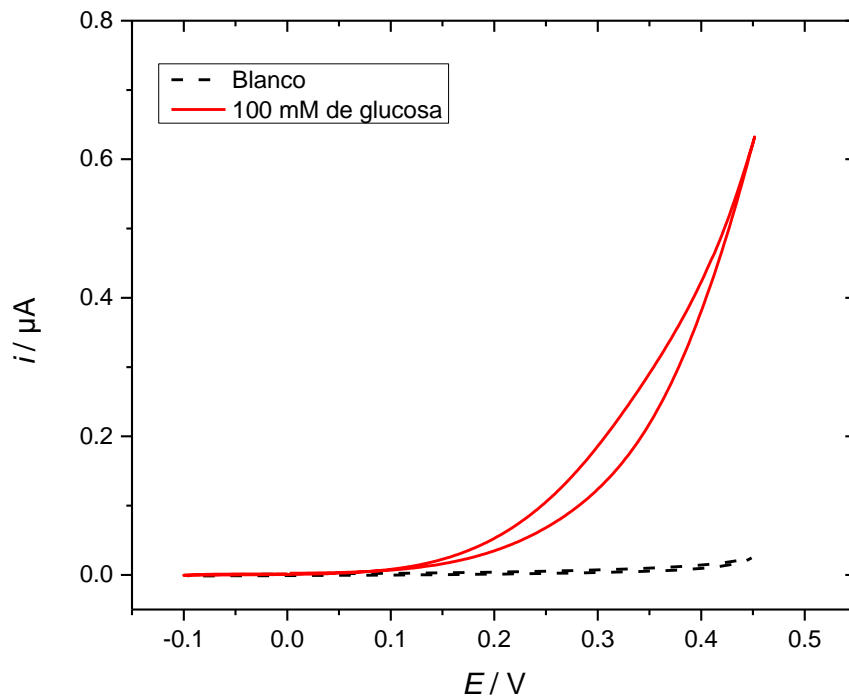


Fig. 27. Voltamperogramas cíclicos para determinar el potencial de oxidación de H_2O_2 .

Los hidrogeles basados en EGDGE exhibieron la respuesta electroquímica anticipada. Las curvas de calibración presentadas en la Fig. 28c demuestran de manera evidente una tendencia entre la concentración de EGDGE y la densidad de corriente registrada. En este sistema, la longitud del entrecruzador juega un papel importante en la formación de tamaños de malla adecuados que permiten la difusión de la glucosa a través de la red polimérica. En consecuencia, la cantidad de enzima inmovilizada en los hidrogeles, la cual es proporcional a la concentración de entrecruzador, es el factor predominante en la respuesta electroquímica como lo reportan otros autores [112]. Dicho de otro modo, un incremento en la concentración del entrecruzador, genera una mayor inmovilización de GOx en el hidrogel, que a su vez aumenta la producción de H_2O_2 y el consecuente aumento de la corriente.

En contraste, los hidrogeles entrecruzados con GA no siguieron la tendencia observada con EGDGE. Los resultados muestran que las redes generadas con GA pueden ser muy compactas dependiendo de la concentración, afectando la respuesta electroquímica. Las concentraciones de 3.33 y 16.65 mM no mostraron una limitación en el transporte de masa obteniendo $J_{max} = 56.07 \pm 2.45$ y $77.18 \pm 2.11 \mu\text{A cm}^2$, respectivamente. En este contexto, la cantidad de GOx inmovilizada en los hidrogeles podría ser el factor determinante en la respuesta amperométrica, tal como se observó en los hidrogeles de EGDGE. Sin embargo, esta tendencia se ve alterada al evaluar el hidrogel con la concentración de 33.3 mM. En este caso, planteamos la hipótesis de que un aumento de diez veces la concentración de GA afecta de manera significativa la difusión de la glucosa a través del hidrogel, provocando una disminución de la corriente registrada ($J_{max} = 66.39 \pm 4.25 \mu\text{A cm}^2$). Además, la alta concentración de GA podría potencialmente afectar la estructura tridimensional de la enzima, comprometiendo su actividad catalítica y, por ende, la respuesta del biosensor. No obstante, debido a la complejidad inherente de los sistemas evaluados en este trabajo, no sería apropiado atribuir estos efectos a una única causa, ya que múltiples fenómenos podrían estar influyendo simultáneamente en las señales medidas.

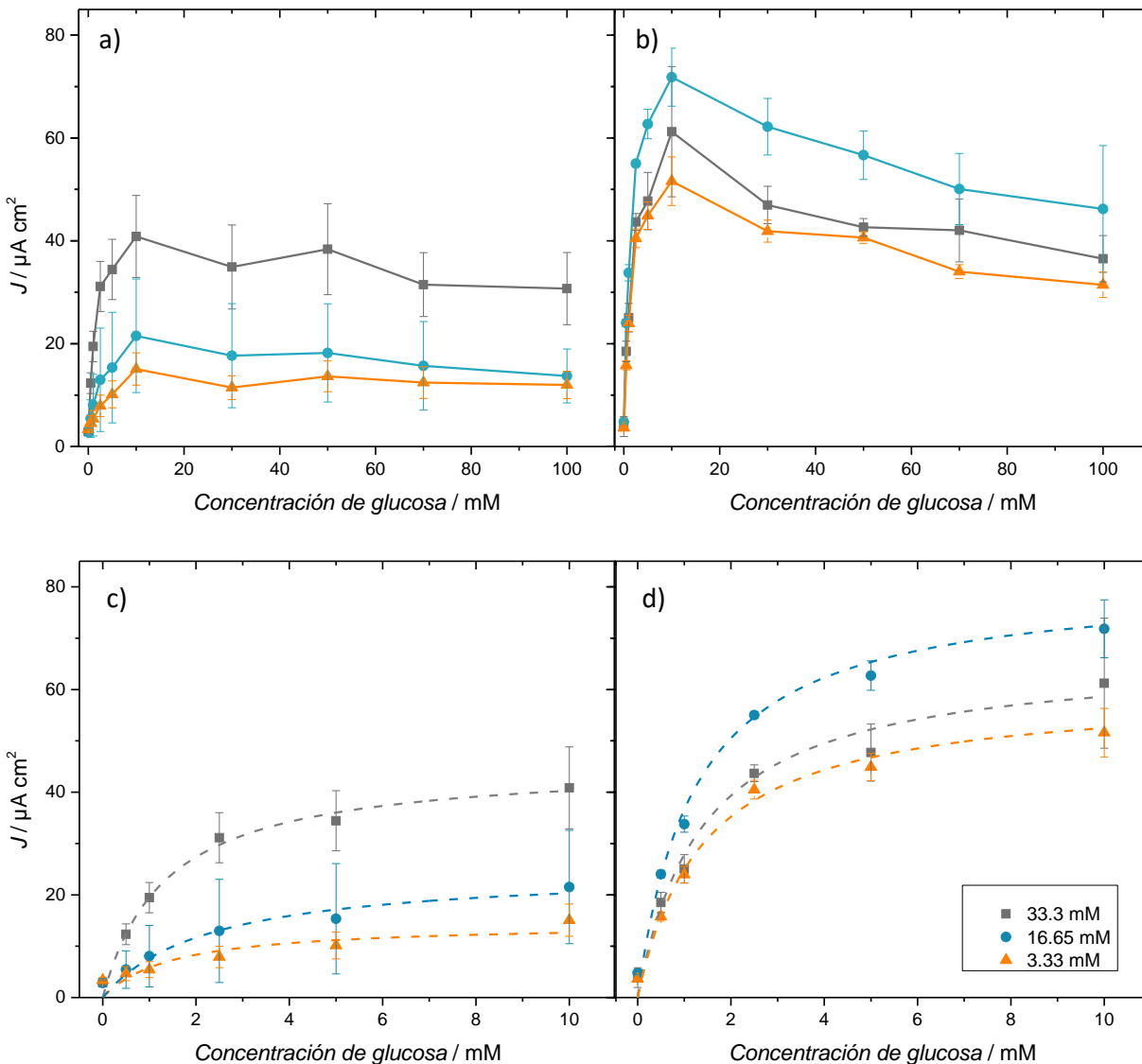


Fig. 28. Curvas de calibración ($n=3$) de hidrogel entrecruzados con un rango de concentraciones de 3.33-33.3 mM de EGDGE (a-c) y GA (b-d) en PB 0.1 M pH 7.4 con una concentración de 0-100 (a-b) o 0-10 (c-d) mM de glucosa. Las líneas punteadas de las gráficas c-d representan el ajuste no lineal para el cálculo de la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m^{app}) y la densidad de corriente máxima (J_{max}).

Se realizó un análisis detallado para evaluar el comportamiento de los cronoamperogramas asociados a las curvas de calibración. Al representar la ecuación de Cottrell en una escala logarítmica, se anticipa la obtención de una línea recta, ya que la corriente disminuye inversamente proporcional a $\frac{1}{\sqrt{t}}$. Los resultados derivados de las diferentes concentraciones de EGDGE y GA (Fig. 29 y Fig. 30) indican que, al saturar el sistema con el sustrato (100 mM de glucosa), la concentración de 16.65 mM para EGDGE, así como las concentraciones de 16.65 y 33.3 mM para GA presentan la linealidad esperada, siguiendo la ecuación de Cottrell. Esta linealidad, sugiere que los

espesores de los hidrogeles son mayores que la capa de difusión. No obstante, en concentraciones de 33.3 mM para EGDGE y 3.33 mM para GA, se observa una desviación negativa de la linealidad a tiempo largo (aproximadamente 85 s). Esta desviación puede atribuirse a un comportamiento de capa delgada. En este contexto, cuando la capa de difusión alcanza o supera el espesor del hidrogel en un momento dado, la concentración de H_2O_2 comienza a disminuir a medida que la reacción electroquímica agota la glucosa disponible en el sistema, resultando en una disminución subsiguiente de la corriente.

A medida que la concentración de glucosa disminuye, los efectos inherentes al sistema se vuelven más relevantes, manifestándose en un cambio en el comportamiento previamente descrito. Estos efectos generan que un gran porcentaje de las curvas logarítmicas presenten una desviación positiva de la linealidad. Debido a la complejidad de los sistemas estudiados y la presencia de múltiples factores, aislarlos resulta difícil. A pesar de esto, se plantea la hipótesis de que el transporte de masa y la liberación de sitios activos de las enzimas podrían estar contribuyendo en mayor medida. La confirmación de estos resultados se obtuvo al graficar la corriente vs $\frac{1}{\sqrt{t}}$, donde nuevamente se observa este comportamiento a tiempo largo (*Fig. 31*). Sin embargo, al analizar los datos a 21 segundos y dos minutos, no existió una diferencia significativa en los valores, por lo cual, se decidió tomar los datos a un tiempo de dos minutos para todos los resultados reportados.

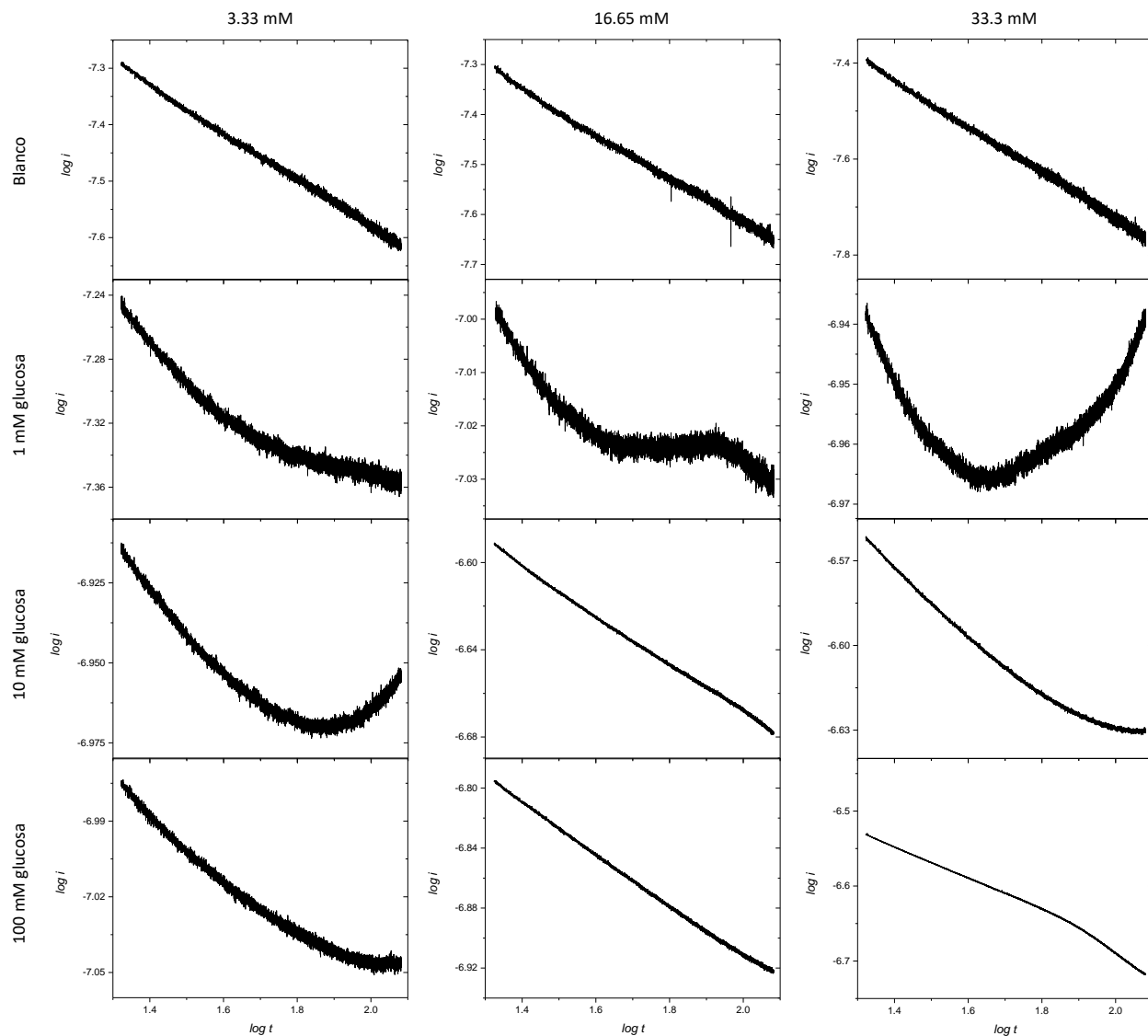


Fig. 29. Curvas $\log i$ vs $\log t$ de cronoamperogramas a 0, 1, 10 y 100 mM de glucosa en un rango de concentración de 3.33-33.3 mM de EGDGE.

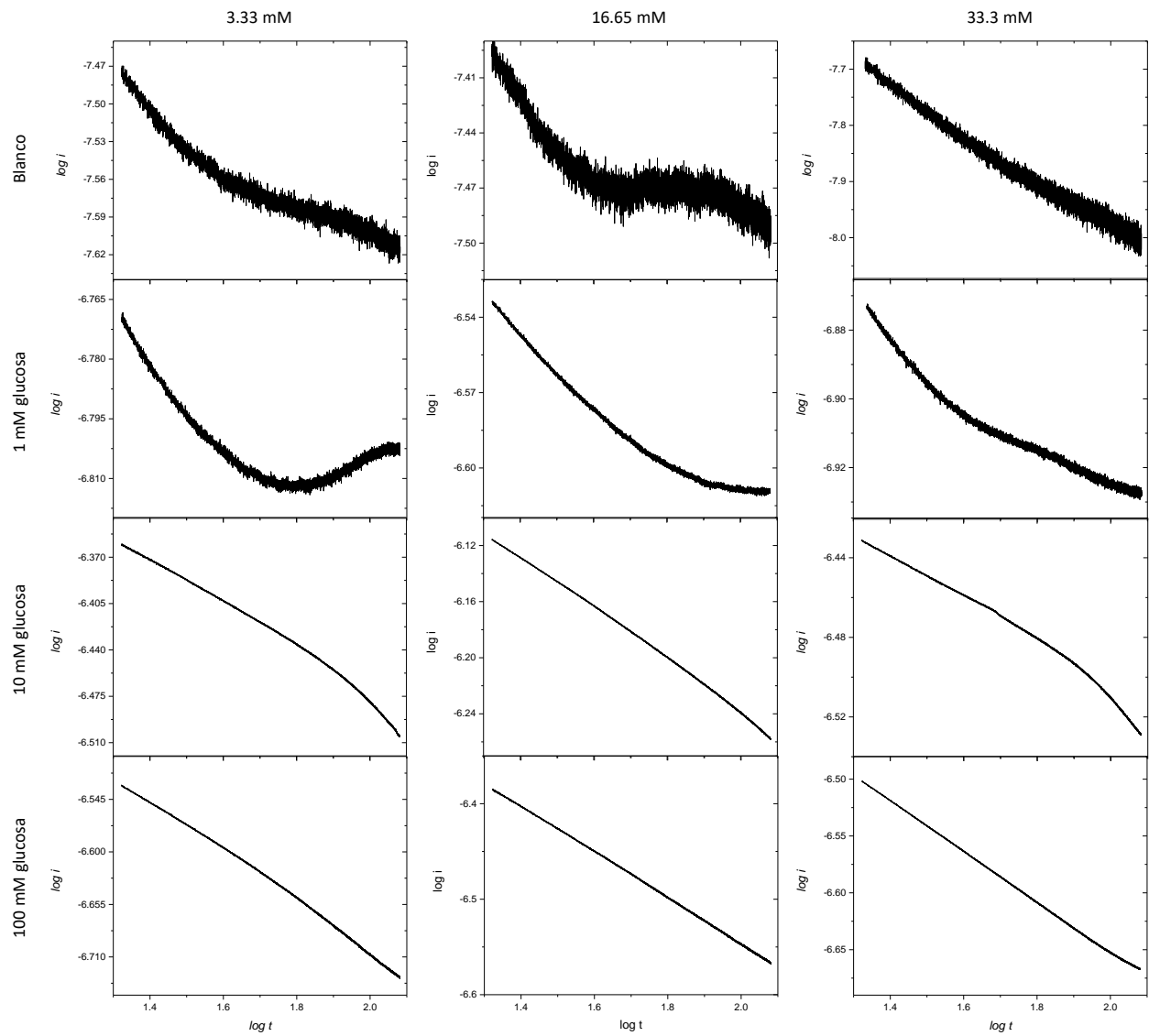


Fig. 30. Curvas $\log i$ vs $\log t$ de cronoamperogramas a 0, 1, 10 y 100 mM de glucosa en un rango de concentración de 3.33-33.3 mM de GA.

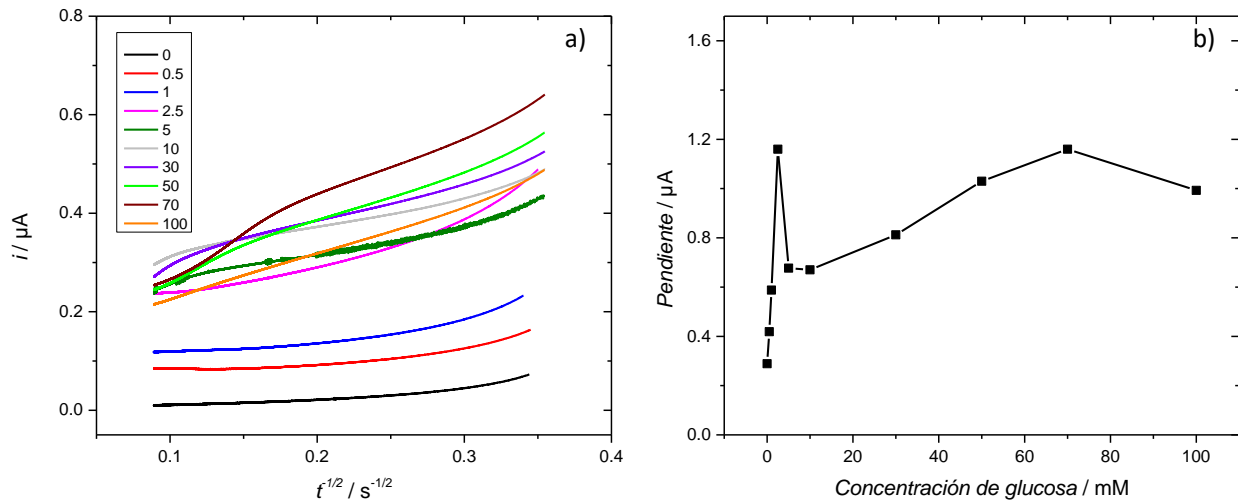


Fig. 31. (a) Curvas i vs $t^{1/2}$ y (b) sus respectivas pendientes tomadas a $0.25 \text{ s}^{1/2}$ de una curva de calibración completa para un hidrogel BPEI/GOx entrecruzado con 33.3 mM de GA.

La actividad catalítica de la GOx inmovilizada en los hidrogeles, se evaluó mediante la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 13). En el contexto de biosensores enzimáticos electroquímicos, es posible aproximarse a la cinética enzimática al establecer una correlación entre la corriente y la concentración. Esto se debe a que cada molécula de sustrato libera una cantidad equivalente, obteniendo una constante aparente de Michaelis-Menten (K_m^{app}) y una densidad de corriente máxima (J_{max}) (Ec. 14). Estos parámetros se estimaron mediante un ajuste no lineal utilizando los datos de las curvas de calibración después de restar la corriente del blanco (sin glucosa). La Fig. 32, muestra los valores de K_m^{app} y J_{max} para los hidrogeles entrecruzados con GA y EGDGE. Los valores de J_{max} muestran una tendencia consistente con observaciones anteriores para ambos hidrogeles. En cuanto a K_m^{app} , se presenta una relación inversa con la concentración de EGDGE, con un valor de 13.43 ± 3.51 para la concentración de 3.33 mM, disminuyendo hasta 1.61 ± 0.20 para la concentración de 33.3 mM. En todos los casos, los valores de K_m^{app} se sitúan por debajo de los K_m reportados para la GOx libre (26-30 mM) [113]. Esta disminución de K_m^{app} es coherente con la literatura que indica una disminución cuando la GOx está inmovilizada. Cabe destacar que la K_m^{app} no solo refleja la cinética de la enzima, sino que también se ve influenciada por diversos factores, como la difusión del sustrato a través de la matriz de inmovilización, la concentración de O_2 (particularmente en el caso de biosensores de primera generación), la partición, cambios conformacionales, entre otros [113]. En nuestro caso, es posible que la reducción en los valores de K_m^{app} se derive de la preconcentración del sustrato, resultado de los equilibrios

de partición en el hidrogel, como se ha observado en casos previos [114, 115]. En contraste, los hidrogeles con GA presentan valores aún más bajos de K_m^{app} , incluso con la concentración de 3.33 mM, lo cual refleja un mayor grado de entrecruzamiento cuando se utiliza GA. De hecho, la concentración de 33.3 mM muestra un ligero aumento en K_m^{app} , atribuible a un sistema donde la difusión del sustrato se ve notablemente impedida.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (13)$$

$$J = \frac{J_{max}[S]}{K_m^{app} + [S]} \quad (14)$$

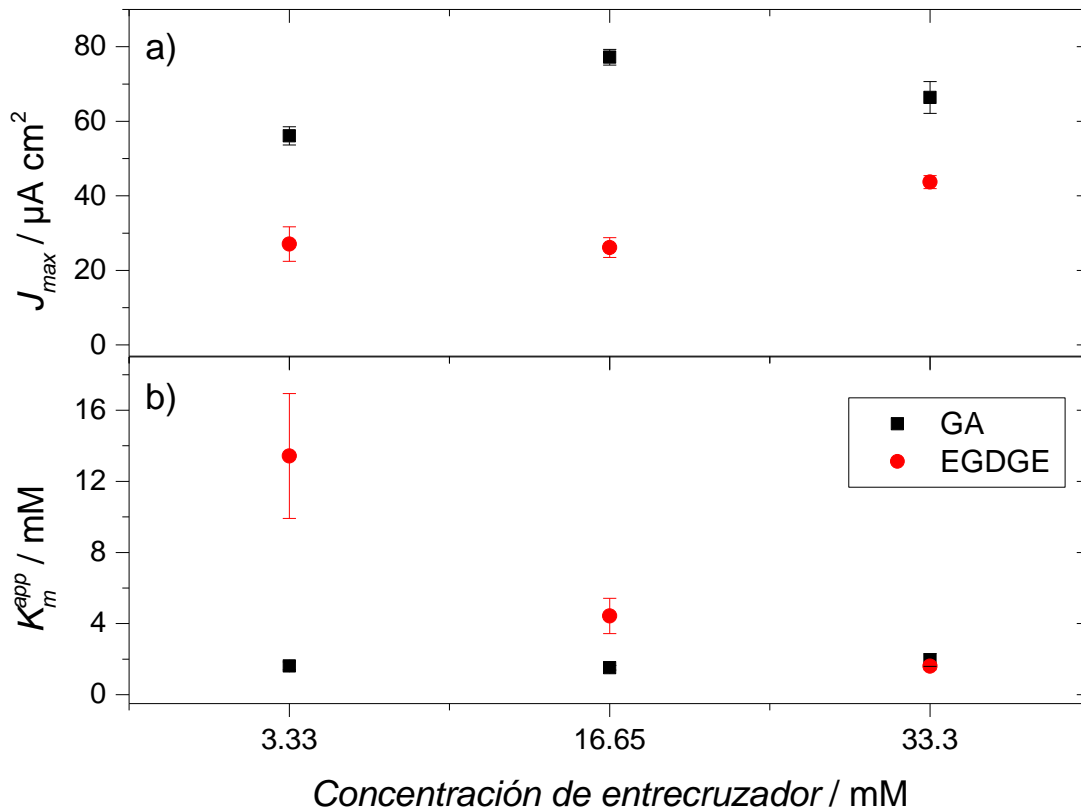


Fig. 32. a) Densidades de corriente máximas (J_{max}) y (b) constantes aparentes de Michaelis-Menten (K_m^{app}) determinadas para geles reticulados ($n=3$) con diferentes concentraciones de EGDGE y GA.

La Tabla 8 presenta las variaciones de los parámetros analíticos en relación con la concentración y el tipo de entrecruzador. La concentración de 33.3 mM de ambos hidrogeles mostraron la mejor estabilidad perdiendo únicamente el 23.39 y 23.27% de su J_{max} inicial para EGDGE y GA, respectivamente. Como es notable, esto diverge con los resultados obtenidos en secciones anteriores entre los dos entrecruzadores, donde el EGDGE tenía menor estabilidad. Esta discrepancia, puede ser atribuida a la duración de los experimentos, donde para estos experimentos fueron sumergidos solo 2 h, equivalente a tres curvas de calibración consecutivas, en comparación con los periodos de 15 y 30 días evaluados para la estabilidad estructural sobre superficies de vidrio y oro. En el sistema BPEI/GOx/EGDGE, el hidrogel con la concentración de 33.3 mM registró los valores más destacados de LOD (0.11 mM) y LOQ (0.39 mM) con una sensibilidad de 10.76 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^2/\text{mM}$, superando a las otras dos concentraciones. En contraste, en el sistema BPEI/GOx/GA, a pesar de que la concentración de 33.3 mM mostró la mejor estabilidad, tanto el LOD como el LOQ se vieron afectados, presentando valores más altos en comparación con las demás concentraciones. La concentración de 16.65 mM destacó como la de mejor rendimiento analítico, con valores de 0.03 mM y 0.12 mM para LOD y LOQ, respectivamente. Sin embargo, se observó que su estabilidad y rango lineal se comprometieron, perdiendo un 57.88% de su J_{max} inicial y limitando su rango lineal entre 0-1 mM.

Como se observa en la Tabla 8, el rango lineal de la mayoría de los hidrogeles no es lo suficientemente grande para aplicaciones comunes de detección de glucosa. Lo anterior, es una problemática frecuente al inmovilizar enzimas sobre electrodos, pero esto es solucionado industrialmente con la incorporación de membranas de difusión. Basándonos en los resultados obtenidos del comportamiento electroquímico y la estabilidad de las concentraciones más altas de ambos entrecruzadores, es posible considerarlas como opciones prometedoras para su evaluación e integración en sistemas futuros de detección de glucosa. Es importante destacar que, en general, los hidrogeles del sistema BPEI/GOx/GA presentaron una mayor estabilidad sobre la superficie de los electrodos, así como características interesantes. Por aspecto, en el siguiente capítulo se abordará de manera más detallada la caracterización de estos hidrogeles. Es relevante señalar que las imágenes de fluorescencia del Capítulo 6 corresponden a la fluorescencia intrínseca de los hidrogeles y no a componentes etiquetados.

Tabla 8. Comparación de los parámetros analíticos de hidrogeles entrecruzados con diferentes concentraciones de GA y EGDGE.

Hidrogel	Rango lineal (mM)	R ²	LOD (mM)	LOQ (mM)	Estabilidad* (%)	Sensibilidad (μA·cm ² /mM)
BPEI/GOx/GA 33.3 mM	0 - 2.5	0.96	0.39	1.32	23.27	14.50
BPEI/GOx/GA 16.65 mM	0 - 1.0	0.96	0.03	0.12	57.88	28.96
BPEI/GOx/GA 3.33 mM	0 - 2.5	0.96	0.06	0.21	57.17	14.05
BPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	0 - 2.5	0.95	0.11	0.39	23.39	10.76
BPEI/GOx/EDGGE 16.65 mM	0 - 2.5	0.98	0.60	2.03	39.09	3.96
BPEI/GOx/EGDGE 3.33 mM	0 - 10	0.98	1.51	5.04	49.13	1.12

* La estabilidad está reportada como el porcentaje de pérdida con respecto a la J_{max} inicial después de tres curvas de calibración.

6 Caracterización de los procesos de fotopolimerización y fotodegradación en hidrogeles BPEI/GOx/GA

Como se mencionó en la sección 4.1, los hidrogeles entrecruzados con GA presentan fluorescencia intrínseca con longitudes de onda de excitación y emisión principales ubicadas en 540 y 559 nm. En esta sección, se describen experimentos en los que los hidrogeles se irradiaron adicionalmente con luz UV, azul o verde, y se monitoreó su efecto utilizando la excitación verde y la emisión roja habituales.

Inicialmente, se irradiaron áreas de aproximadamente 100 μm de diámetro en un hidrogel entrecruzado con 33.3 mM de GA con los tres tipos diferentes de luces. Las Fig. 33a y b muestran la intensidad de fluorescencia roja antes y después de exponer el hidrogel durante 15 minutos a los diferentes tipos de luces. La luz azul no causó cambios en el área expuesta en comparación con las áreas circundantes no expuestas. En cambio, las áreas expuestas a la luz UV y verde tuvieron un aumento y una disminución en la fluorescencia roja, respectivamente. Esta variación en la fluorescencia es más evidente cuando se divide la intensidad después de la exposición con la intensidad antes de la misma (Fig. 33c y d). Para comprender mejor estos procesos, se irradiaron hidrogeles recién preparados con las mismas luces, y se tomaron imágenes de fluorescencia roja cada minuto. Cuando se irradió con luz verde, se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia (Fig. 34). Esta respuesta puede describirse mediante un decaimiento monoexponencial ($R^2=0.9680$), con una constante de tiempo de desintegración (τ) de 1.97 minutos, asociada a un proceso de fotoblanqueo. Por otro lado, cuando la luz UV incidió en el área del hidrogel, la fluorescencia inicial fue similar, pero aumentó 5.4 veces después de 15 minutos de exposición. Una exposición prolongada a la luz UV resultó en una disminución de 41% de la fluorescencia roja inicial en un tiempo de 60 minutos. Sin embargo, se planteó la hipótesis de que esta disminución podría deberse a la inevitable exposición a la luz verde necesaria para realizar las mediciones de fluorescencia roja (5 segundos por medición). Para confirmar esta hipótesis, se repitió el experimento en un hidrogel nuevo reduciendo la frecuencia de medición a una vez cada dos minutos.

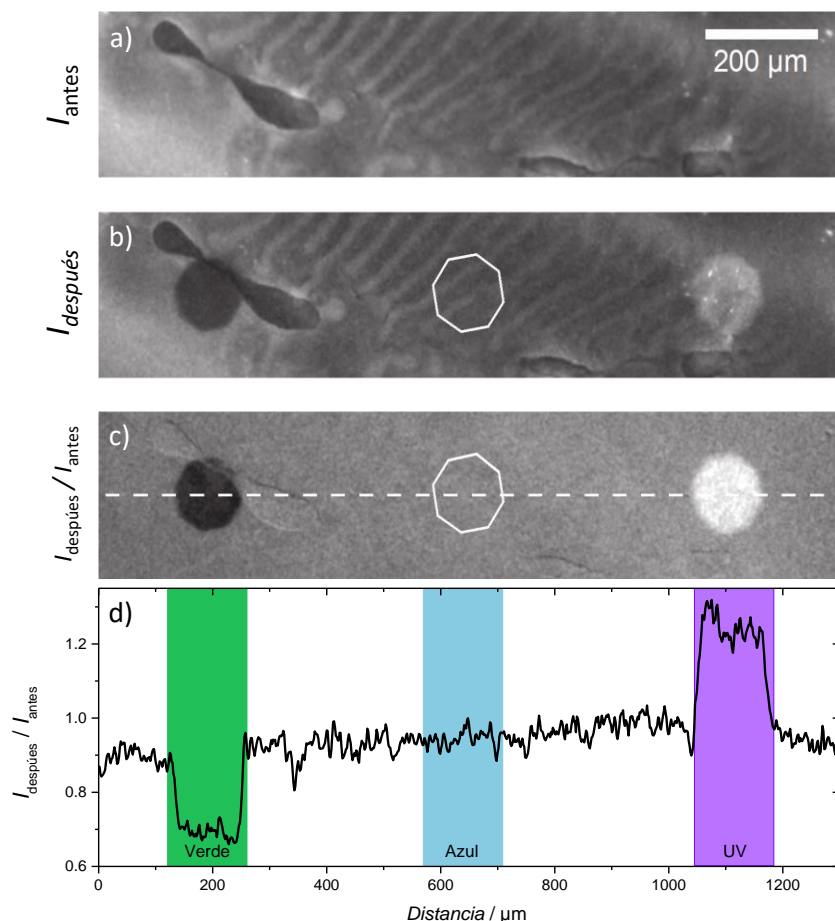


Fig. 33. Efecto de diferentes luces sobre la fluorescencia roja de hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA. Micrografías de fluorescencia de regiones de un hidrogel antes (a) y después (b) de la exposición a la luz verde (izquierda), azul (centro) y UV (derecha). Imagen de fluorescencia normalizada (c) a partir de las subfiguras (a) y (b). Perfil de intensidad (d) de la línea discontinua en la subfigura (c).

En un segundo paso, se expusieron hidrogeles antiguos, con varios meses desde su preparación, a las mismas condiciones que los recién preparados. En estos, la fluorescencia inicial fue 5.8 veces mayor en comparación con los hidrogeles recién preparados y comparable a la fluorescencia máxima alcanzada por estos últimos. Al irradiarlos con luz verde, nuevamente se observó una disminución en la fluorescencia, pero esta vez no siguió un decaimiento monoexponencial, sino que se acopló a un proceso biexponencial ($R^2=0.9997$) con dos constantes de tiempo de desintegración, $\tau_1=2.83$ minutos y $\tau_2=15.74$ minutos. Este comportamiento es común en las curvas de fotoblanqueo y generalmente se explica en términos de la presencia de más de una población de fluoróforos con tasas de fotodegradación diferentes [116].

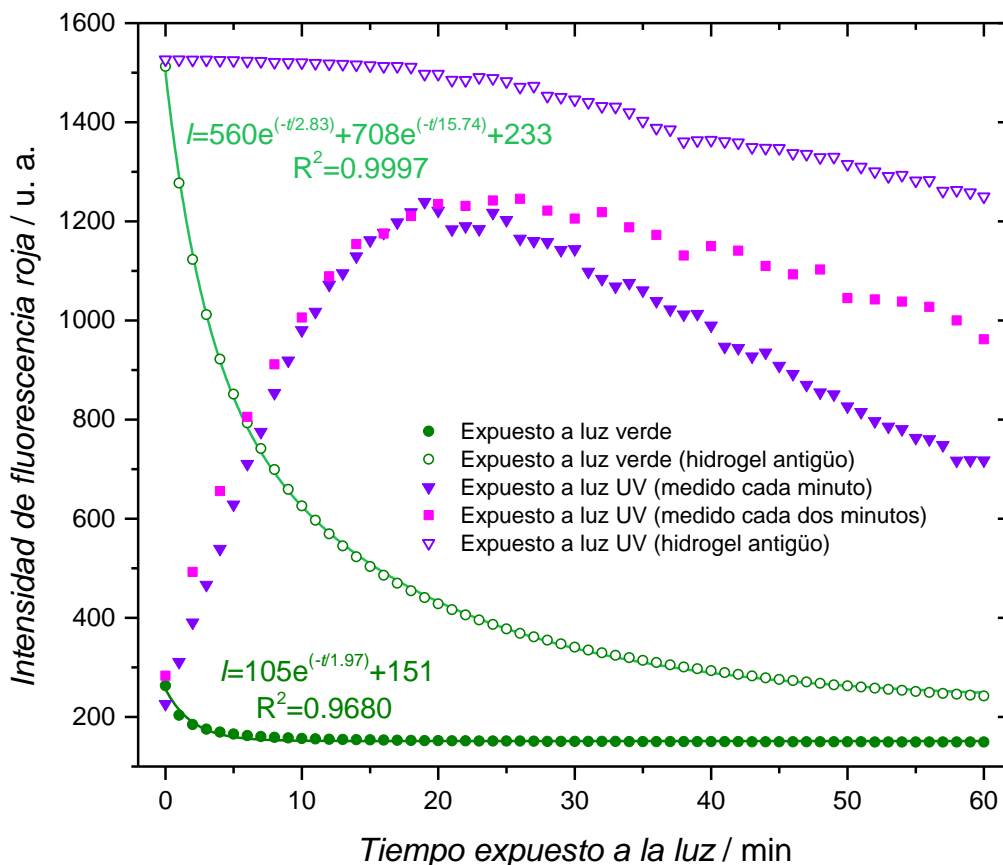


Fig. 34. Variación de la intensidad de la fluorescencia roja de hidrogel recién preparados y antiguos bajo 15 minutos de exposición a luz verde o UV. Las líneas continuas presentes en las gráficas de los hidrogel expuestos a luz verde corresponden al ajuste no lineal de decaimientos mono y biexponenciales, respectivamente.

Estos resultados sugieren que el entorno se vuelve más complejo a medida que avanza la reacción de entrecruzamiento. Al exponer el hidrogel antiguo a la luz UV, no se observó un aumento correspondiente en la fluorescencia, pero nuevamente se apreció una lenta disminución, que se puede atribuir a la exposición a la luz verde durante las mediciones, como sucedió previamente para los geles recién preparados. Basándonos en estos resultados, podemos sugerir que la luz UV podría aumentar la energía de la mezcla de reacción, promoviendo la formación de bases de Schiff. Esto se puede observar fácilmente en los hidrogel recién preparados, ya que la reacción de entrecruzamiento aún no se ha completado después del tiempo de secado inicial. En contraste, en los hidrogel antiguos, la reacción de entrecruzamiento parece haberse completado, como lo indica la falta de aumento en la fluorescencia cuando se exponen a la luz UV. Los experimentos realizados demuestran la utilidad de monitorear la fluorescencia de las bases de Schiff como una evaluación del progreso de la reacción de entrecruzamiento

entre el GA y las aminas. Además, es posible lograr el mismo nivel de entrecruzamiento con la luz UV, reduciendo los tiempos de secado/reacción, lo que es de gran relevancia en procesos de fabricación industrial de este tipo de electrodos. Por otro lado, la luz verde parece degradar los fluoróforos mediante fotoblanqueo. Curiosamente, existen reportes donde las bases de Schiff se hidrolizan o degradan con la exposición a la luz UV. Sin embargo, creemos que esta discrepancia puede explicarse en función de las propiedades de absorción de las diferentes bases de Schiff. Mientras que la mayoría de los fluoróforos reportados absorben en el rango UV o violeta [92, 117, 118], la excitación principal de los fluoróforos en nuestros geles tiene lugar en la región verde del espectro. Ling et al. observaron un comportamiento similar en nanopartículas formadas por BPEI y GA [92]. Por lo tanto, la principal fotodegradación del fluoróforo ocurre cuando se expone a la luz verde en lugar de la luz UV. Esta característica de los geles permite que la luz ultravioleta mejore la reacción de entrecruzamiento sin dañarlos.

6.1 Caracterización de la degradación del enlace imina en los hidrogeles BPEI/GOx/GA

Inicialmente, supusimos que la degradación tras la exposición a la luz verde se debía a la ruptura del enlace imina. Para verificar esta hipótesis, se llevaron a cabo mediciones de espectro ATR-IR. Los picos observados en los espectros ATR-IR de la GOx y BPEI (Fig. 35a y b, respectivamente) a 3361 y 3280 cm^{-1} se relacionaron con el estiramiento de N-H de las aminas primarias y secundarias [119, 120]. Cuando se forma el hidrogel (Fig. 35c), estos picos cambian de una forma aguda a un pico más amplio, debido a la aparición de grupos -OH durante la reacción de entrecruzamiento y la presencia de agua adsorbida. Además, el pico presente a 1525 cm^{-1} en los espectros de la GOx y BPEI se atribuyó a las vibraciones de flexión N-H de aminas primarias y secundarias. Sin embargo, al formarse el hidrogel entrecruzado con GA, este pico desaparece y en su lugar surge un nuevo pico a 1566 cm^{-1} . Este último se relaciona con el estiramiento C=N de la imina generada por la reacción entre GA y aminas primarias. Esta asignación se confirmó mediante la desaparición del pico a 1566 cm^{-1} cuando el hidrogel a base de GA se sumergió en una solución de NaBH_4 10 mM durante 2 horas para reducir los grupos imina (Fig. 35e) [121].

Sin embargo, al analizar el espectro ATR-IR del hidrogel degradado con luz verde, no se observó una disminución o ausencia del pico a 1566 cm^{-1} , lo que indica que no hubo ruptura ni degradación del enlace C=N. Estos resultados sugieren que el fluoróforo presente en estos hidrogeles es más complejo de lo que comúnmente se describe en la literatura. La mayoría de los autores que trabajan con entrecruzamiento del glutaraldehído en moléculas que contienen aminas, como GOx y/o BPEI, atribuyen directamente la fluorescencia a la base de Schiff [119, 122, 123]. No obstante, es probable que la base de Schiff forme parte de un fluoróforo de mayor tamaño en lugar de ser el propio fluoróforo. Se sabe que el GA en soluciones acuosas no se limita a su forma monomérica (Fig. 36, estructura I), sin que puede adoptar al menos diez formas diferentes, algunas de las cuales son cíclicas o poliméricas [72]. Es posible que algunas de estas formas, junto con la base de Schiff, contribuyan a la formación de un fluoróforo de mayor tamaño. Esto también podría explicar por qué las longitudes de onda de absorción y emisión se desplazan significativamente hacia el extremo rojo en comparación con sistemas similares preparados con aldehídos más simples [92].

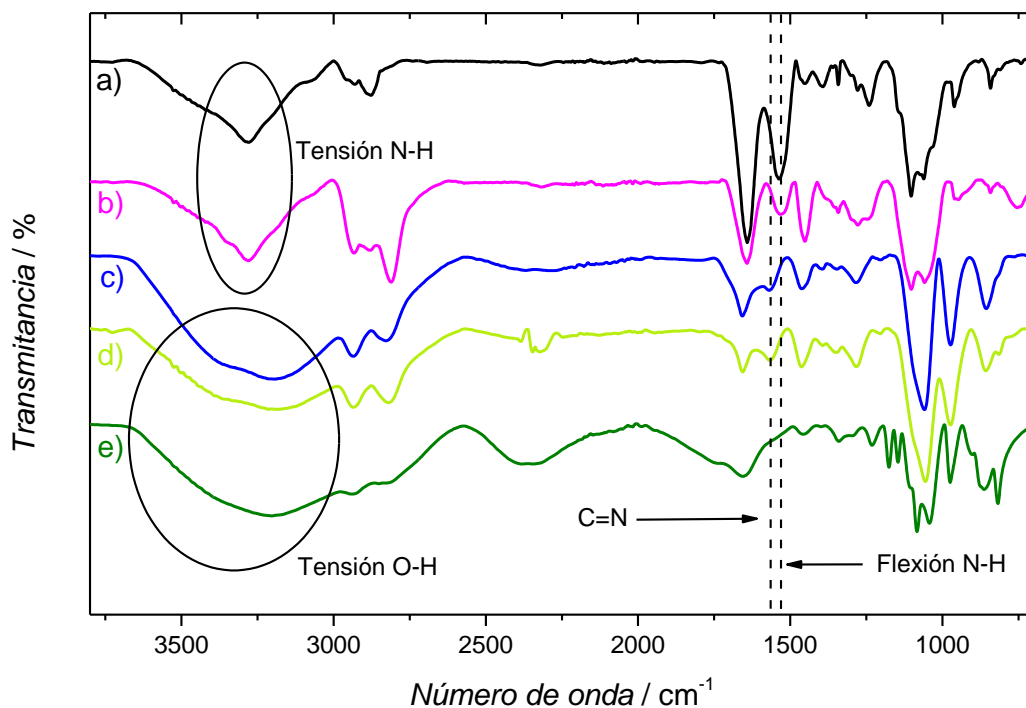


Fig. 35. Espectros FT-IR de la enzima GOx (a), polímero BPEI (b), hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA antes (c) y después (d) de la exposición a la luz verde durante 15 minutos y de un hidrogel expuesto a 10 mM de NABH_4 durante 2 h (e).

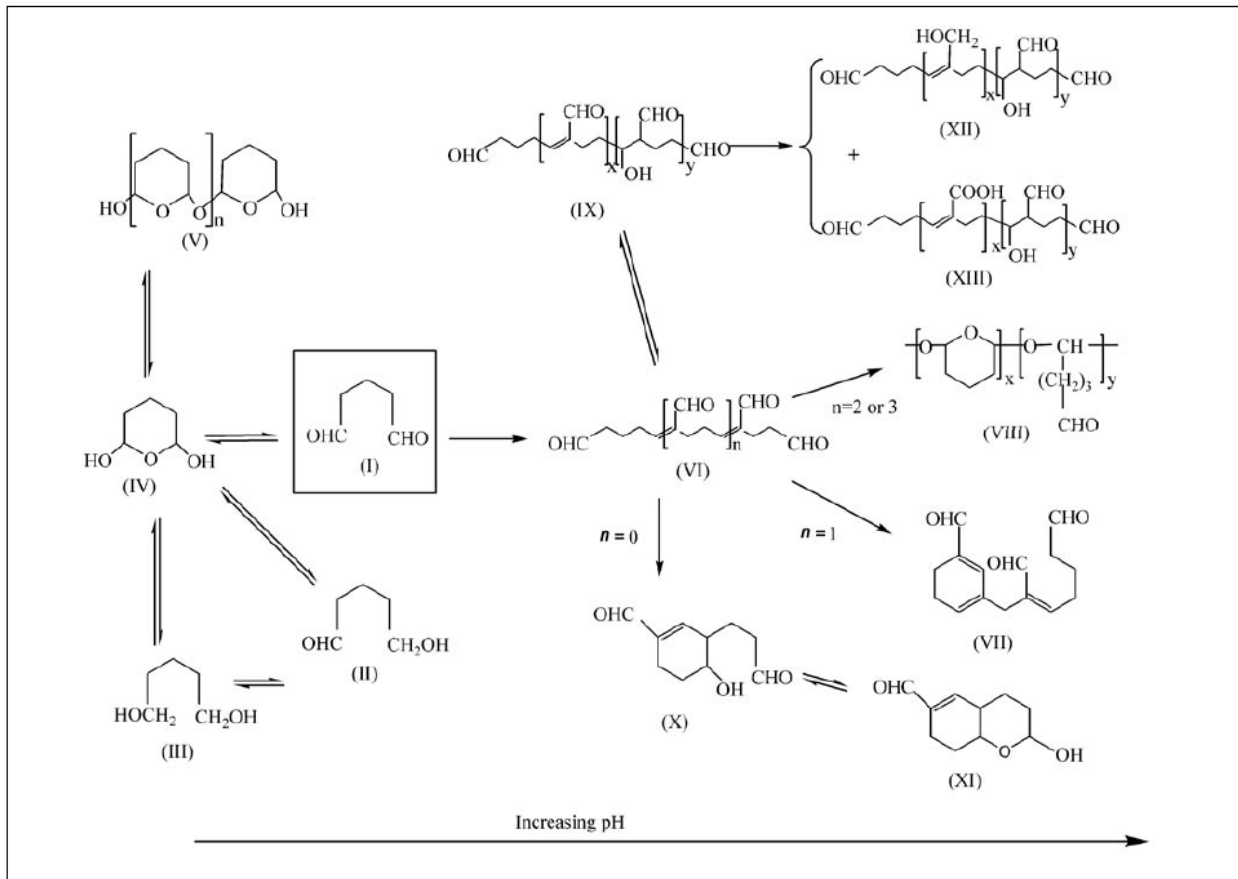


Fig. 36. Posibles formas estructurales que puede adoptar el glutaraldehído en solución acuosa. Reproducido de *Bioanálisis*. (2004) 37(5), 790-802 con autorización de Future Science Group.

6.2 Efecto de los procesos de fotopolimerización y fotodegradación en la respuesta electroquímica

En la etapa final, se prepararon hidrogeles utilizando una concentración de 33.3 mM de GA bajo diversas condiciones: uno de los geles se mantuvo en la oscuridad, mientras que los otros dos se expusieron a luz UV o luz verde durante 15 minutos después del proceso de secado y antes del enjuague inicial. Estos hidrogeles se sometieron a evaluaciones desde una perspectiva electroquímica, mediante curvas de calibración, como en términos de fluorescencia. La Fig. 37a presenta los resultados de la respuesta electroquímica. El hidrogel que se mantuvo en la oscuridad registró la mayor densidad de corriente, seguido por los hidrogeles expuestos a luz UV y luz verde, con valores de $J_{\max} = 48.79, 31.67$ y $15.79 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. En la segunda evaluación, se observó una disminución significativa de la densidad de corriente en todos los hidrogeles,

perdiendo más del 50% de su J_{\max} inicial. Posteriormente, en la tercera evaluación, se evidenció una pérdida aún más sustancial en la J_{\max} inicial, superando el 90%.

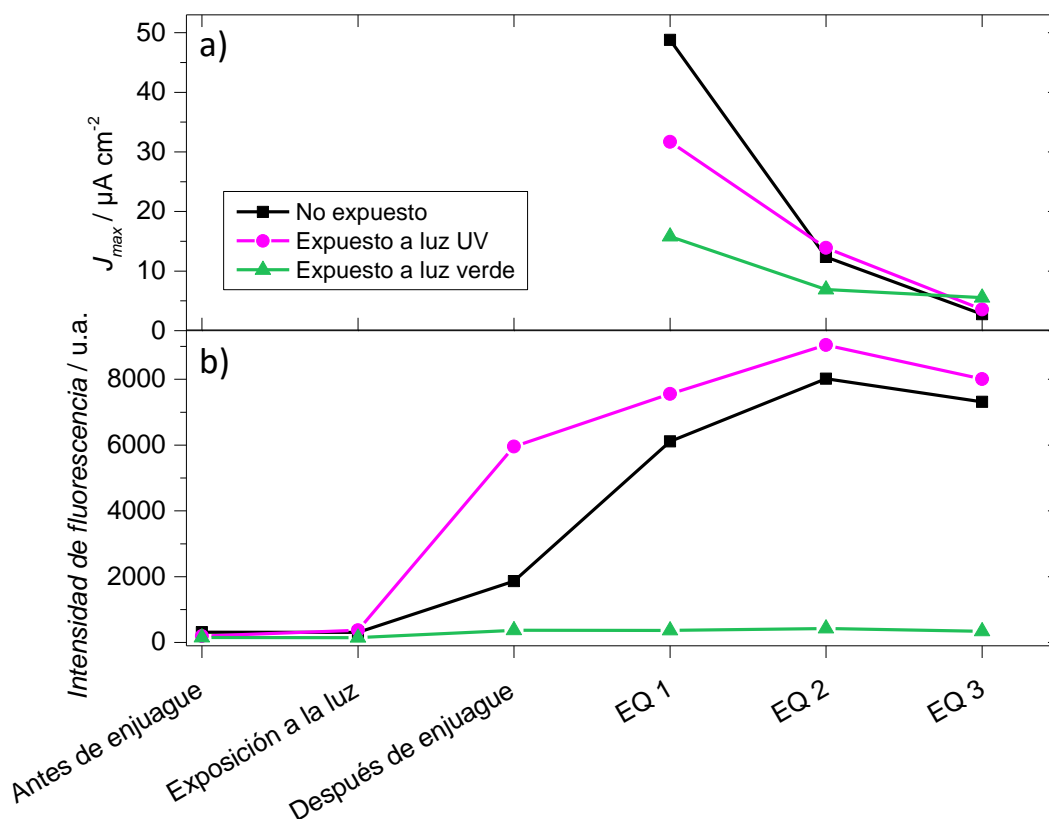


Fig. 37. Evaluación simultánea de la respuesta electroquímica (a) y fluorescencia (b) de hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA expuestos a diferentes luces. Las evaluaciones electroquímicas (EQ1-3) representan tres curvas de calibración independientes en PB 0.1 M pH 7.4 utilizando un rango de concentración de glucosa de 0-100 mM.

En las evaluaciones de fluorescencia (Fig. 37b), se observaron cambios similares a los descritos previamente después de las exposiciones de 15 minutos. Tras el proceso de hidratación/hinchamiento durante la etapa de enjuague, todos los geles mostraron un aumento en la intensidad de la fluorescencia. Este cambio podría ser atribuible a las variaciones en el índice de refracción entre el medio (0.1 M PB pH 7.4 vs. aire). Además, el proceso de hinchamiento podría reducir los fenómenos de autoextinción (*self-quenching*), debido a la mayor separación entre las moléculas de fluoróforos en el estado hidratado en comparación con el estado deshidratado, amplificando las intensidades de fluorescencia, como se puede observar. También, es importante destacar que la degradación inicial del hidrogel expuesto a la luz verde resultó en una intensidad de fluorescencia menor que la de los otros dos hidrogeles durante todas las evaluaciones

posteriores. Después del proceso de hinchamiento, se aprecia una diferencia notable entre los hidrogeles expuestos a la luz UV y aquel que se mantuvo en la oscuridad, diferencia que se redujo a medida que avanzó la reacción de entrecruzamiento en el hidrogel mantenido en la oscuridad. En contraste con la densidad de corriente, en ambos hidrogeles se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia entre la primera y la segunda evaluación electroquímica. Incluso después de la tercera evaluación electroquímica, cuando se había perdido la mayor parte de la corriente, la fluorescencia seguía siendo comparable a la obtenida durante la primera evaluación electroquímica. Estos resultados excluyen la hipótesis de que la degradación observada se deba a la pérdida o ruptura de los enlaces imina, lo que sugiere que el mecanismo de degradación de los geles está directamente relacionado con la enzima.

7 Conclusiones generales

Se llevó a cabo la caracterización morfológica de los hidrogeles basados en BPEI/GOx entrecruzados con EGDGE y GA mediante dos enfoques distintos. El etiquetado de los hidrogeles entrecruzados con EGDGE permitió la identificación de la distribución espacial de la enzima y el polímero en el hidrogel. En cuanto a los hidrogeles entrecruzados con GA, la fluorescencia intrínseca proporcionó información sobre la distribución espacial de los enlaces de entrecruzamiento y su densidad por unidad volumétrica de hidrogel.

Se investigó el efecto de la naturaleza y concentración de ambos entrecruzadores en la morfología de los hidrogeles. Cuando se entrecruzó con EGDGE, hubo una mayor segregación de los componentes. Para el GA, al disminuir la concentración del entrecruzador, la morfología tuvo una transición desde una estructura homogénea y gruesa hacia una estructura más heterogénea y delgada, similar a los hidrogeles con EGDGE. Las diferencias morfológicas observadas en la perfilometría y microscopía de fluorescencia se correlacionaron con los resultados de las propiedades mecánicas de los hidrogeles. Se observó que los hidrogeles entrecruzados con GA presentaron valores más altos de módulo de elasticidad, dureza y rigidez en comparación con los hidrogeles entrecruzados con EGDGE, lo que puede estar asociado con las redes más compactas que forma el GA.

Los análisis de TGA y DSC mostraron que, al formar los hidrogeles, se produjeron diversas etapas de descomposición con diferentes procesos endotérmicos y exotérmicos. En el caso de los hidrogeles con EGDGE, se observaron únicamente dos etapas, posiblemente debido a la presencia de una única forma estructural en el EGDGE en comparación con las múltiples formas en el GA (cuatro etapas de descomposición). Se identificó que los hidrogeles entrecruzados con EGDGE presentan un mayor hinchamiento y disolución debido a la presencia de grupos polares como -OH en comparación con los entrecruzados con GA. Sin embargo, el depósito de los hidrogeles sobre un sustrato, mediante drop-casting, permitió retener su estructura tridimensional, lo que se favoreció en superficies de oro en comparación con las de vidrio, logrando una mayor estabilidad.

En cuanto a la respuesta electroquímica, se observó que la red polimérica más compacta de los hidrogeles entrecruzados con GA limita la difusión del transporte de masa de la glucosa. En los hidrogeles con EGDGE, la señal depende principalmente del número de enzimas inmovilizadas, lo cual está relacionado con la concentración del entrecruzador. Asimismo, aunque la mayoría siguen una tendencia con respecto a la ecuación de Cottrell, las concentraciones de 33.3 mM para EGDGE y 3.33 mM para GA, se observa una desviación negativa de la linealidad a tiempo largo, lo cual puede atribuirse a un comportamiento de capa delgada. Debido a la complejidad de los sistemas estudiados y la presencia de múltiples factores, aislarlos resulta difícil. A pesar de esto, se plantea la hipótesis de que el transporte de masa y la liberación de sitios activos de las enzimas podrían estar contribuyendo en mayor medida en este sistema.

Los parámetros analíticos muestran que los hidrogeles de GA muestran una mejor estabilidad, reproducibilidad y precisión con respecto a los hidrogeles entrecruzados con EGDGE. Sin embargo, para este trabajo los parámetros analíticos obtenidos no definen si un sistema es mejor que el otro, sino que abren la posibilidad de diferentes aplicaciones para cada uno. En este sentido, de acuerdo con los resultados obtenidos, los hidrogeles basados en EGDGE pueden ser candidatos potenciales para aplicarlos en biosensores electroquímicos que pudieran ser autodegradables debido a la baja estabilidad y biocompatibilidad que presentan. En el caso de los hidrogeles basados en GA, su potencial uso sería en sistemas de detección electroquímica para monitoreo continuo de glucosa, como por ejemplo sistemas microfluídicos *organ-on-a-chip*.

Con los resultados de este trabajo, se abrió la posibilidad de futuros estudios para mejorar la estabilidad de los sistemas, para un monitoreo continuo. De la misma manera, surge como trabajo a futuro comprender mejor la estructura y los mecanismos de los fluoróforos presentes en estos sistemas, ya que los resultados sugieren que la fluorescencia intrínseca de los hidrogeles podría ser el resultado de un fluoróforo más complejo que la base de Schiff. Finalmente, se demostró la fotoactividad de la luz UV y verde sobre los hidrogeles entrecruzados con GA, lo que permitió caracterizar parte del fluoróforo responsable de la fluorescencia intrínseca de estos hidrogeles. Estos experimentos destacaron la utilidad de monitorear la fluorescencia de las bases de Schiff como una evaluación del progreso de la reacción de entrecruzamiento entre el GA y las

aminas. Asimismo, se logró un nivel de entrecruzamiento similar con la luz UV, en comparación con un tiempo prolongado de reacción, lo que es relevante en aplicaciones industriales de este tipo de electrodos. Además, se evidenció que la disminución en la respuesta electroquímica no se debió a la ruptura o pérdida de enlaces imina, sino que podría estar relacionada directamente con la enzima.

8 Anexos

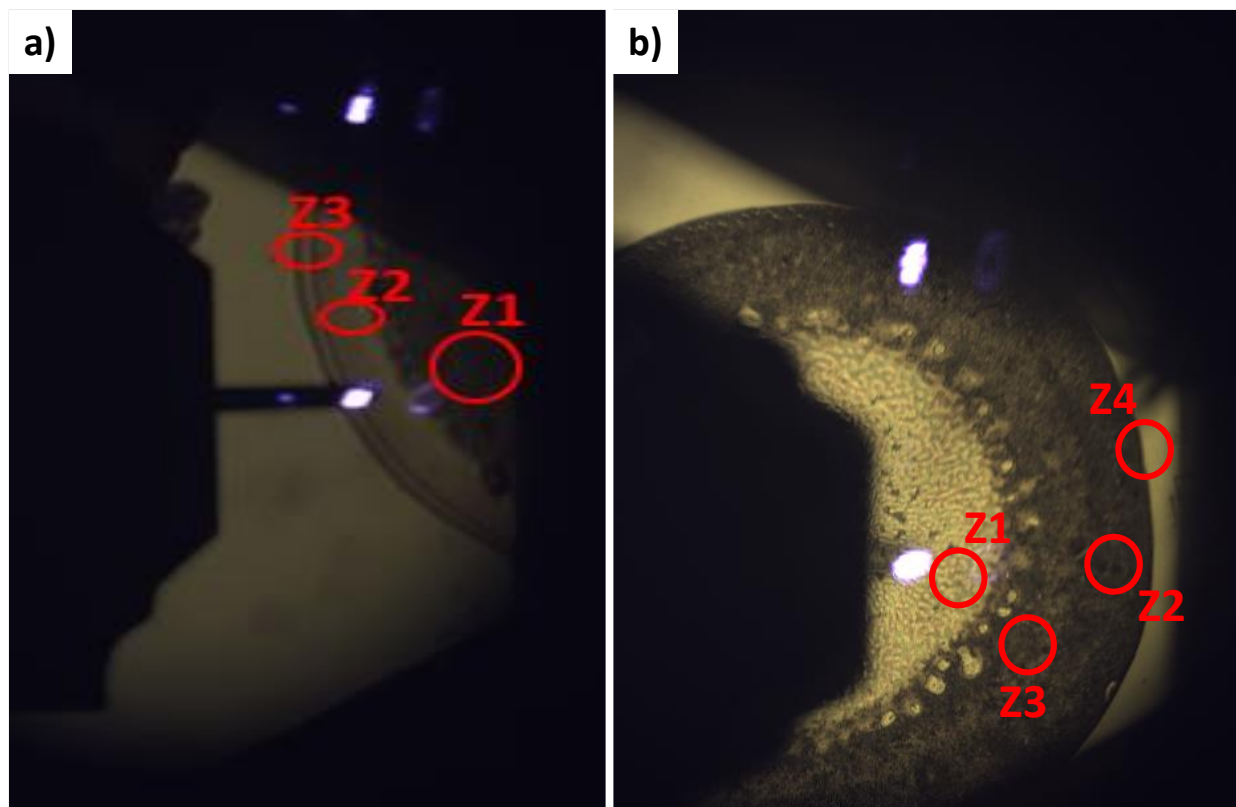


Fig. A1. Zonas centrales y periféricas para análisis de microscopía de fuerza atómica de hidrogeles entrecruzados con 33.3 mM de GA (a) y EGDGE (b).

9 Referencias

1. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* 16:121–131. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00115-4)
2. Bashir S, Hina M, Iqbal J, et al (2020) Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications. *Polymers (Basel)* 12:1–60. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>
3. Pal K, Banthia AK, Majumdar DK (2009) Polymeric hydrogels: Characterization and biomedical applications. *Des Monomers Polym* 12:197–220. <https://doi.org/10.1163/156855509X436030>
4. Saini A, Kisley L (2019) Fluorescence microscopy of biophysical protein dynamics in nanoporous hydrogels. *J Appl Phys* 126:. <https://doi.org/10.1063/1.5110299>
5. Rahman MS, Islam MM, Islam MS, et al (2019) Morphological Characterization of Hydrogels
6. Baranwal J, Barse B, Gatto G, et al (2022) Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. *Chemosensors* 10:. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>
7. Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E (2008) Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel)* 8:1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>
8. Pemberton RM, Cox T, Tuffin R, et al (2014) Fabrication and evaluation of a micro(bio)sensor array chip for multiple parallel measurements of important cell biomarkers. *Sensors (Switzerland)* 14:20519–20532. <https://doi.org/10.3390/s141120519>
9. Clark Jr. LC, Lyons C (1962) Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann N Y Acad Sci* 102:29–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
10. Bollella P, Katz E (2020) Enzyme-based biosensors: Tackling electron transfer issues. *Sensors (Switzerland)* 20:1–32. <https://doi.org/10.3390/s20123517>
11. Kumar H, Neelam (2016) Enzyme-based electrochemical biosensors for food safety: a review. *Nanobiosensors Dis Diagnosis* 29. <https://doi.org/10.2147/ndd.s64847>

12. Silveira CM, Almeida MG (2013) Small electron-transfer proteins as mediators in enzymatic electrochemical biosensors. *Anal Bioanal Chem* 405:3619–3635. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6786-4>
13. Mazurenko I, Hitaishi VP, Lojou E (2020) Recent advances in surface chemistry of electrodes to promote direct enzymatic bioelectrocatalysis. *Curr Opin Electrochem* 19:113–121. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.11.004>
14. Yoo EH, Lee SY (2010) Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors* 10:4558–4576. <https://doi.org/10.3390/s100504558>
15. Juska VB, Pemble ME (2020) A critical review of electrochemical glucose sensing: Evolution of biosensor platforms based on advanced nanosystems. *Sensors (Switzerland)* 20:1–28. <https://doi.org/10.3390/s20216013>
16. Nguyen HH, Lee SH, Lee UJ, et al (2019) Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials (Basel)* 12:1–34. <https://doi.org/10.3390/ma12010121>
17. Ganesh V, Muthurasu A (2012) Strategies for an enzyme immobilization on electrodes: Structural and electrochemical characterizations. *J Phys Conf Ser* 358:. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/358/1/012003>
18. Maghraby YR, El-Shabasy RM, Ibrahim AH, Azzazy HMES (2023) Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega* 8:5184–5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
19. López-Gallego F, Guisan JM, Betancor L (2020) Immobilization of Enzymes on Supports Activated with Glutaraldehyde: A Very Simple Immobilization Protocol
20. Poursamar SA, Lehner AN, Azami M, et al (2016) The effects of crosslinkers on physical, mechanical, and cytotoxic properties of gelatin sponge prepared via in-situ gas foaming method as a tissue engineering scaffold. *Mater Sci Eng C* 63:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.034>
21. Lu X, Xu Y, Zheng C, et al (2006) Ethylene glycol diglycidyl ether as a protein cross-linker: a case study for cross-linking of hemoglobin. *J Chem Technol Biotechnology* 81:767–775. <https://doi.org/10.1002/jctb>
22. Vasylieva N, Barnych B, Meiller A, et al (2011) Covalent enzyme immobilization by poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE) for microelectrode biosensor preparation. *Biosens Bioelectron* 26:3993–4000. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.03.012>
23. Leach JB, Wolinsky JB, Stone PJ, Wong JY (2005) Crosslinked α -elastin

- biomaterials: Towards a processable elastin mimetic scaffold. *Acta Biomater* 1:155–164. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2004.12.001>
24. Chelu M, Musuc AM (2023) Polymer Gels: Classification and Recent Developments in Biomedical Applications. *Gels* 9:. <https://doi.org/10.3390/gels9020161>
 25. Wichterle O, Lím D (1960) Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 185:117–118. <https://doi.org/10.1038/185117a0>
 26. Pinelli F, Magagnin L, Rossi F (2020) Progress in hydrogels for sensing applications: a review. *Mater Today Chem* 17:100317. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100317>
 27. Correa S, Grosskopf AK, Lopez Hernandez H, et al (2021) Translational Applications of Hydrogels. *Chem Rev* 121:11385–11457. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01177>
 28. Varaprasad K, Raghavendra GM, Jayaramudu T, et al (2017) A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Mater Sci Eng C* 79:958–971. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.096>
 29. Cao H, Duan L, Zhang Y, et al (2021) Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *Signal Transduct Target Ther* 6:1–31. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00830-x>
 30. Sánchez-Cid P, Jiménez-Rosado M;, Romero A, Pérez-Puyana V (2022) Novel Trends in Hydrogel Development for Biomedical Applications: A Review. *Polymers (Basel)* 3023
 31. Bae J, Park J, Kim S, et al (2020) Tailored hydrogels for biosensor applications. *J Ind Eng Chem* 89:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.05.001>
 32. Foudazi R, Zowada R, Manas-Zloczower I, Feke DL (2023) Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities. *Langmuir* 39:2092–2111. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02253>
 33. Pal K, Paulson AT, Rousseau D (2009) Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems
 34. Flory PJ (1985) Molecular theory of rubber elasticity. *Polym J* 17:1–12. <https://doi.org/10.1295/polymj.17.1>
 35. Richbourg NR, Peppas NA (2020) The swollen polymer network hypothesis: Quantitative models of hydrogel swelling, stiffness, and solute transport. *Prog Polym Sci* 105:101243.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101243>
36. Bruck SD (1961) Extension of the Flory-Rehner theory of swelling to an anisotropic polymer system. *J Res Natl Bur Stand Sect A Phys Chem* 65A:485. <https://doi.org/10.6028/jres.065a.051>
 37. Giorgiutti-Dauphiné F, Pauchard L (2018) Drying drops: Drying drops containing solutes: From hydrodynamical to mechanical instabilities. *Eur Phys J E* 41:.. <https://doi.org/10.1140/epje/i2018-11639-2>
 38. Yang X, Wu M, Doi M, Man X (2022) Evaporation Dynamics of Sessile Droplets: The Intricate Coupling of Capillary, Evaporation, and Marangoni Flow. *Langmuir* 38:4887–4893. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c00130>
 39. Dugyala VR, Lama H, Satapathy DK, Basavaraj MG (2016) Role of particle shape anisotropy on crack formation in drying of colloidal suspension. *Sci Rep* 6:1–7. <https://doi.org/10.1038/srep30708>
 40. Hertaeg MJ, Tabor RF, Routh AF, Garnier G (2021) Pattern formation in drying blood drops. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* 379:.. <https://doi.org/10.1098/rsta.2020.0391>
 41. Kočiřová E, Petr M, Šípová H, et al (2017) Drop coating deposition of a liposome suspension on surfaces with different wettabilities: “coffee ring” formation and suspension preconcentration. *Phys Chem Chem Phys* 19:388–393. <https://doi.org/10.1039/c6cp07606h>
 42. Rey M, Walter J, Harrer J, et al (2022) Versatile strategy for homogeneous drying patterns of dispersed particles. *Nat Commun* 13:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30497-z>
 43. Yunker PJ, Still T, Lohr MA, Yodh AG (2011) Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions. *Nature* 476:308–311. <https://doi.org/10.1038/nature10344>
 44. Li B, Cao YP, Feng XQ, Gao H (2012) Mechanics of morphological instabilities and surface wrinkling in soft materials: A review. *Soft Matter* 8:5728–5745. <https://doi.org/10.1039/c2sm00011c>
 45. Fleming KG (2010) Fluorescence Theory. In: Lindon JCBT-E of S and S (Second E (ed) *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2nd ed. Academic Press, Oxford, pp 628–634
 46. Bagatolli LA (2016) *Fluorescence Spectroscopy: Basic Foundations and Methods*.

- In: Müllertz A, Perrie Y, Rades T (eds) *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*. Springer New York, New York, NY, pp 29–59
47. Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer New York, New York, NY
 48. Galbán J, Andreu Y, Sierra JF, et al (2001) Intrinsic fluorescence of enzymes and fluorescence of chemically modified enzymes for analytical purposes: A review. *Luminescence* 16:199–210. <https://doi.org/10.1002/bio.633>
 49. Kalies S, Kuetemeyer K, Heisterkamp A (2011) Mechanisms of high-order photobleaching and its relationship to intracellular ablation. *Biomed Opt Express* 2:805. <https://doi.org/10.1364/boe.2.000805>
 50. Caló E, Khutoryanskiy V V. (2015) Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J* 65:252–267. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>
 51. Majcher MJ, Hoare T (2019) Applications of Hydrogels. In: Jafar Mazumder MA, Sheardown H, Al-Ahmed A (eds) *Functional Biopolymers*. Springer International Publishing, Cham, pp 453–490
 52. Vigata M, Meinert C, Hutmacher DW., Bock N (2020) Hydrogels as Drug Delivery Systems: A Review of Current Characterization and Evaluation Techniques. *Pharmaceutics* 1188
 53. Buenger D, Topuz F, Groll J (2012) Hydrogels in sensing applications. *Prog Polym Sci* 37:1678–1719. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.09.001>
 54. Völlmecke K, Afroz R, Bierbach S, et al (2022) Hydrogel-Based Biosensors. *Gels* 768
 55. Kaliyaraj Selva Kumar A, Zhang Y, Li D, Compton RG (2020) A mini-review: How reliable is the drop casting technique? *Electrochem commun* 121:106867. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106867>
 56. Dhanjai, Sinha A, Kalambate PK, et al (2019) Polymer hydrogel interfaces in electrochemical sensing strategies: A review. *TrAC - Trends Anal Chem* 118:488–501. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.014>
 57. Meyer J, Meyer L-E, Kara S (2021) Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. *Eng Life Sci* 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elsc.202100087>
 58. Tan Z, Bilal M, Raza A, et al (2021) Expanding the biocatalytic scope of enzyme-

- loaded polymeric hydrogels. *Gels* 7:.. <https://doi.org/10.3390/gels7040194>
59. Maroufi LY, Rashidi M, Tabibiazar M, et al (2022) Recent Advances of Macromolecular Hydrogels for Enzyme Immobilization in the Food Products. *Adv Pharm Bull* 12:309–318. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.043>
 60. Wu S, Wu S, Zhang X, et al (2023) Chitosan-Based Hydrogels for Bioelectronic Sensing: Recent Advances and Applications in Biomedicine and Food Safety. *Biosensors* 13:1–15. <https://doi.org/10.3390/bios13010093>
 61. Yang J, Shen M, Luo Y, et al (2021) Advanced applications of chitosan-based hydrogels: From biosensors to intelligent food packaging system. *Trends Food Sci Technol* 110:822–832. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.032>
 62. Fois M, Arrigo P, Bacciu A, et al (2019) The Presence of Polysaccharides, Glycerol, and Polyethyleneimine in Hydrogel Enhances the Performance of the Glucose Biosensor. *Biosensors* 9:95
 63. Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S, et al (2016) Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors (Switzerland)* 16:2–21. <https://doi.org/10.3390/s16060780>
 64. Virgen-Ortíz JJ, Dos Santos JCS, Berenguer-Murcia Á, et al (2017) Polyethylenimine: A very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. *J Mater Chem B* 5:7461–7490. <https://doi.org/10.1039/c7tb01639e>
 65. Lungu CN, Diudea M V., Putz M V., Grudziński IP (2016) Linear and branched PEIs (Polyethylenimines) and their property space. *Int J Mol Sci* 17:1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms17040555>
 66. Yan M, An X, Jiang Z, et al (2022) Effects of cross-linking with EDC/NHS and genipin on characterizations of self-assembled fibrillar gel prepared from tilapia collagen and alginate. *Polym Degrad Stab* 200:109929. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.109929>
 67. Hua J, Li Z, Xia W, et al (2016) Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (gamma-glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels. *Mater Sci Eng C* 61:879–892. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.001>
 68. Jayachandran B, Parvin TN, Alam MM, et al (2022) Insights on Chemical Crosslinking Strategies for Proteins. *Molecules* 27:.. <https://doi.org/10.3390/molecules27238124>
 69. Zafar S, Hanif M, Azeem M, et al (2022) Role of crosslinkers for synthesizing

- biocompatible, biodegradable and mechanically strong hydrogels with desired release profile. *Polym Bull* 79:9199–9219. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03956-8>
70. Yeh Y-Y, Tsai Y-T, Wu C-Y, et al (2022) The Role of Aldehyde-Functionalized Crosslinkers on the Property of Chitosan Hydrogels. *Macromol Biosci* 22:2100477. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mabi.202100477>
 71. Ruhr D, John M, Reiche A (2021) Determination of the effective degree of cross-linking of porous cellulose membranes cross-linked with bifunctional epoxides. *Carbohydr Polym* 251:117043. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117043>
 72. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC (2004) Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 37:790–802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>
 73. House JL, Anderson EM, Ward WK (2007) Immobilization techniques to avoid enzyme loss from oxidase-based biosensors: A one-year study. *J Diabetes Sci Technol* 1:18–27. <https://doi.org/10.1177/193229680700100104>
 74. Pauliukaite R, Ghica ME, Fatibello-Filho O, Brett CMA (2009) Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite-epoxy composite electrode. *Anal Chem* 81:5364–5372. <https://doi.org/10.1021/ac900464z>
 75. Ang LF, Por LY, Yam MF (2015) Development of an amperometric-based glucose biosensor to measure the glucose content of fruit. *PLoS One* 10:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111859>
 76. Ford R, Quinn SJ, O'Neill RD (2016) Characterization of biosensors based on recombinant glutamate oxidase: Comparison of crosslinking agents in terms of enzyme loading and efficiency parameters. *Sensors (Switzerland)* 16:11–13. <https://doi.org/10.3390/s16101565>
 77. Modenez IA, Sastre DE, Moares FC, Marques Netto CGC (2018) Influence of dlutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase b from candida antarctica for transesterification of soy bean oil. *Molecules* 23:. <https://doi.org/10.3390/molecules23092230>
 78. Zhong J, Zhao T, Liu M (2022) Fluorescence microscopic visualization of functionalized hydrogels. *NPG Asia Mater* 14:. <https://doi.org/10.1038/s41427-022-00376-6>

79. Bou S, Klymchenko AS, Collot M (2021) Fluorescent labeling of biocompatible block copolymers: Synthetic strategies and applications in bioimaging. *Mater Adv* 2:3213–3233. <https://doi.org/10.1039/d1ma00110h>
80. Christadore L, Grinstaff MW, Schaus SE (2018) Fluorescent dendritic microhydrogels: Synthesis, analysis and use in single-cell detection. *Molecules* 23:1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules23040936>
81. Xu J, Liu Y, Hsu S (2019) Hydrogels Based on Schiff Base Linkages for Biomedical Applications. *Molecules* 3005
82. Butler MF, Ng YF, Pudney PDA (2003) Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 41:3941–3953. <https://doi.org/10.1002/pola.10960>
83. Matcham S, Novakovic K (2016) Fluorescence imaging in genipin crosslinked chitosan-poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels. *Polymers (Basel)* 8:1–10. <https://doi.org/10.3390/polym8110385>
84. Zhu L, Shao C, Chen H, et al (2021) Hierarchical Hydrogels with Ordered Micro-Nano Structures for Cancer-on-a-Chip Construction. *Research* 2021:.. <https://doi.org/10.34133/2021/9845679>
85. Li X, Chen S, Li J, et al (2016) 3D culture of chondrocytes in gelatin hydrogels with different stiffness. *Polymers (Basel)* 8:.. <https://doi.org/10.3390/polym8080269>
86. Wang W, Chan YH, Kwon SY, et al (2022) Nanoscale fluorescence imaging of biological ultrastructure via molecular anchoring and physical expansion. *Nano Converg* 9:.. <https://doi.org/10.1186/s40580-022-00318-6>
87. Su W, Wang R, Qian C, et al (2020) Research progress review of preparation and applications of fluorescent hydrogels. *J Chem* 2020:.. <https://doi.org/10.1155/2020/8246429>
88. Wei C, Dong X, Zhang Y, et al (2018) Simultaneous fluorescence imaging monitoring of the programmed release of dual drugs from a hydrogel-carbon nanotube delivery system. *Sensors Actuators, B Chem* 273:264–275. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.064>
89. Cardellini J, Balestri A, Montis C, Berti D (2021) Advanced static and dynamic fluorescence microscopy techniques to investigate drug delivery systems. *Pharmaceutics* 13:.. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060861>
90. Sievers J, Sperlich K, Stahnke T, et al (2021) Determination of hydrogel swelling

- factors by two established and a novel non-contact continuous method. *J Appl Polym Sci* 138:e50326. <https://doi.org/10.1002/app.50326>
91. Wu F, Pang Y, Liu J (2020) Swelling-strengthening hydrogels by embedding with deformable nanobarriers. *Nat Commun* 11:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18308-9>
 92. Ling Y, Qu F, Zhou Q, et al (2015) Diverse States and Properties of Polymer Nanoparticles and Gel Formed by Polyethyleneimine and Aldehydes and Analytical Applications. *Anal Chem* 87:8679–8686. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01138>
 93. Ding YQ, Cui YZ, Li TD (2015) New views on the reaction of primary amine and aldehyde from DFT study. *J Phys Chem A* 119:4252–4260. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.5b02186>
 94. Zavahir S, Zhu H (2015) Visible light induced green transformation of primary amines to imines using a silicate supported anatase photocatalyst. *Molecules* 20:1941–1954. <https://doi.org/10.3390/molecules20021941>
 95. Drage TC, Arenillas A, Smith KM, Snape CE (2008) Thermal stability of polyethylenimine based carbon dioxide adsorbents and its influence on selection of regeneration strategies. *Microporous Mesoporous Mater* 116:504–512. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.05.009>
 96. Nedel'ko V V, Korsunskii BL, Dubovitskii FI, Gromova GL (1975) The thermal degradation of branched polyethylenimine. *Polym Sci USSR* 17:1697–1703. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0032-3950\(75\)90172-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0032-3950(75)90172-0)
 97. Guiseppi-Elie A, Choi SH, Geckeler KE (2009) Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. *J Mol Catal B Enzym* 58:118–123. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.005>
 98. Rusu AG, Chiriac AP, Nita LE, et al (2022) Synthesis and Comparative Studies of Glucose Oxidase Immobilized on Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Using Different Coupling Agents. *Nanomaterials* 12:. <https://doi.org/10.3390/nano12142445>
 99. Grenda K, Idström A, Evenäs L, et al (2022) An analytical approach to elucidate the architecture of polyethylenimines. *J Appl Polym Sci* 139:1–7. <https://doi.org/10.1002/app.51657>
 100. Li K, Jiang J, Yan F, et al (2014) The influence of polyethylenimine type and molecular weight on the CO₂ capture performance of PEI-nano silica adsorbents.

- Appl Energy 136:750–755. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.09.057>
101. Yoon J, Kim J, Hayward RC (2010) Nucleation, growth, and hysteresis of surface creases on swelled polymer gels. *Soft Matter* 6:5807–5816. <https://doi.org/10.1039/c0sm00372g>
 102. Velankar SS, Lai V, Vaia RA (2012) Swelling-induced delamination causes folding of surface-tethered polymer gels. *ACS Appl Mater Interfaces* 4:24–29. <https://doi.org/10.1021/am201428m>
 103. Dangi YR, Bediako JK, Lin X, et al (2021) Polyethyleneimine impregnated alginate capsule as a high capacity sorbent for the recovery of monovalent and trivalent gold. *Sci Rep* 11:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97228-0>
 104. Dangi YR, Lin X, Choi JW, et al (2022) Polyethyleneimine functionalized alginate composite fiber for fast recovery of gold from acidic aqueous solutions. *Environ Technol Innov* 28:102605. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102605>
 105. Zhou JM, Lucas JP (1999) Hygrothermal effects of epoxy resin. Part I: the nature of water in epoxy. *Polymer (Guildf)* 40:5505–5512
 106. Li L, Yu Y, Wu Q, et al (2009) Effect of chemical structure on the water sorption of amine-cured epoxy resins. *Corros Sci* 51:3000–3006. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2009.08.029>
 107. Budianto E, Muthoharoh SP, Nizardo NM (2015) Effect of Crosslinking Agents , pH and Temperature on Swelling Behavior of Cross - linked Chitosan Hydrogel. *Asian J Appl Sci* 3:581–588
 108. Curtis KA, Miller D, Millard P, et al (2016) Unusual salt and pH induced changes in polyethylenimine solutions. *PLoS One* 11:1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158147>
 109. Benoit DSW, Gray W, Murthy N, et al (2017) pH-Responsive polymers for the intracellular delivery of biomolecular drugs. *Compr Biomater II* 4:472–492. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100691-7.00019-7>
 110. Gallops CE, Yu C, Ziebarth JD, Wang Y (2019) Effect of the Protonation Level and Ionic Strength on the Structure of Linear Polyethyleneimine. *ACS Omega* 4:7255–7264. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00066>
 111. Collins MN, Birkinshaw C (2008) Investigation of the Swelling Behavior of Crosslinked Hyaluronic Acid Films and Hydrogels Produced Using Homogeneous Reactions. *J Appl Polym Sci* 109:923–931. <https://doi.org/10.1002/app>

112. MacAodha D, Ferrer ML, Conghaile PÓ, et al (2012) Crosslinked redox polymer enzyme electrodes containing carbon nanotubes for high and stable glucose oxidation current. *Phys Chem Chem Phys* 14:14667–14672. <https://doi.org/10.1039/c2cp42089a>
113. Vasylieva N, Marinesco S (2013) Enzyme Immobilization on Microelectrode Biosensors. In: Marinesco S, Dale N (eds) *Microelectrode Biosensors*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 95–114
114. Demers N, Agostinelli E, Averill-Bates DA, Fortier G (2001) Immobilization of native and poly(ethylene glycol)-treated ('PEGylated') bovine serum amine oxidase into a biocompatible hydrogel. *Biotechnol Appl Biochem* 33:201. <https://doi.org/10.1042/ba20010009>
115. Pernot P, Mothet JP, Schuvailo O, et al (2008) Characterization of a yeast D-amino acid oxidase microbiosensor for D-serine detection in the central nervous system. *Anal Chem* 80:1589–1597. <https://doi.org/10.1021/ac702230w>
116. Kolin DL, Costantino S, Wiseman PW (2006) Sampling effects, noise, and photobleaching in temporal image correlation spectroscopy. *Biophys J* 90:628–639. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072322>
117. Issa RM, Khedr AM, Rizk H (2008) H NMR, IR and UV/VIS spectroscopic studies of some Schiff bases derived from 2-aminobenzothiazole and 2-amino-3-hydroxypyridine. *J Chinese Chem Soc* 55:875–884. <https://doi.org/10.1002/jccs.200800131>
118. Issa RM, Khedr AM, Rizk HF (2005) UV-vis, IR and ¹H NMR spectroscopic studies of some Schiff bases derivatives of 4-aminoantipyrine. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 62:621–629. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.01.026>
119. Nematidil N, Sadeghi M, Nezami S, Sadeghi H (2019) Synthesis and characterization of Schiff-base based chitosan-g-glutaraldehyde/NaMMTNPs-APTES for removal Pb²⁺ and Hg²⁺ ions. *Carbohydr Polym* 222:114971. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.114971>
120. Hwang KS, Park HY, Kim JH, Lee JY (2018) Fully organic CO₂ absorbent obtained by a Schiff base reaction between branched poly(ethyleneimine) and glutaraldehyde. *Korean J Chem Eng* 35:798–804. <https://doi.org/10.1007/s11814-017-0330-8>
121. Wang X, Ding M, Liu Z, Wang D (2015) Synthesis of a chitosan-based functional

- biopolymer with both catalytic and binding groups for protein and DNA hydrolysis. RSC Adv 5:19541–19551. <https://doi.org/10.1039/c4ra15828h>
122. Islam N, Wang H, Maqbool F, Ferro V (2019) In vitro enzymatic digestibility of glutaraldehyde-crosslinked chitosan nanoparticles in lysozyme solution and their applicability in pulmonary drug delivery. *Molecules* 24:1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24071271>
123. Vernengo J, Fussell GW, Smith NG, Lowman AM (2010) Synthesis and characterization of injectable bioadhesive hydrogels for nucleus pulposus replacement and repair of the damaged intervertebral disc. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 93:309–317. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31547>