

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



“BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS CON APLICACIÓN MEDICA”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA

MICHELLE ARREDONDO ESPINOZA

DIRECTOR

DRA. MARGARITA STOYTCHIEVA ZLATEVA

Tabla de Contenidos

Agradecimientos	5
Resumen	6
Introduccion	10
Capítulo 1 “<i>Biosensor</i>”	21
- Definición de biosensor	23
- Bioreceptor.....	27
- Transductores	35
- Características de funcionamiento del transductor	55
- Selección y utilización de transductores	57
- Clasificación de los biosensores	57
- Estado del arte en Mexico.....	62
- Biosensores comerciales	65
Capítulo 2 “<i>Tripsina</i>”	69
- Proteasas	69
- Activación de la pro-enzima	73
- Especificidad y unión al sustrato	75
- Correlación del centro activo con el pH	78
- Mecanismo catalítico: Hidrólisis	79
- Cinética enzimática: Tripsina	84
- Importancia médica de la tripsina.....	95
Capítulo 3 “<i>Métodos de inmovilización enzimática</i>”	99
- Adsorción.....	104
- Cross-linking.....	105
- Inmovilización electromagnética	108
- Inmovilización por enlace covalente	109
- Inmovilización de microorganismos.....	111

- Inmovilización antígeno-anticuerpo	112
- Atrapamiento en gel	113
- Microencapsulamiento	118
- Atrapamiento en fibras	120
Capítulo 4 “<i>Voltametría de onda cuadrada para la determinación de la actividad de tripsina</i>”	121
- Reactivos, materiales y equipos	123
- Modificación del electrodo por gelatina	123
- Técnica electroquímica	124
- Desarrollo del experimento	124
- Evaluación de la actividad enzimática de tripsina	126
- Respuesta anódica	134
- Respuesta catódica	137
- Electrodo de carbono screen-printed modificado con gelatina para evaluar la actividad enzimática de tripsina	141
Capítulo 5: “<i>Microbalanza de cristal de cuarzo para la determinación de la actividad de tripsina</i>”	144
- Reactivos, materiales y equipos	146
- Síntesis de nanopartículas de plata	146
- Preparación de una solución de gelatina con AgNPs	147
- Medición y modificación de la superficie de QCM	147
- Caracterización de la dispersión de AgNPs	149
- Experimentos para evaluar la degradación de la actividad de tripsina	150
Capítulo 6: “<i>La detección de glicoalcaloides utilizando biosensores desechables basados en enzimas modificadas genéticamente</i>”	154
- Reactivos, materiales y equipos	157
- Preparación del biosensor	159
- Evaluación de la actividad de las colinesterasas	159
- Red Neuronal Artificial	161
- Estudios espectrofotométricos de la actividad de AChE-B131 en presencia de GA	162
- Sensores basados en colinesterasas	163

- Efectos de la mezcla de α -chaconina y α -solanina en sensores basados en colinesterasas	166
- Método de detección en solo un paso "one-step"	166
- Efecto de la matriz del tubérculo	169
Capítulo 7”Caracterizacion de nanopartículas magnéticas en QCM”	171
- Caracterizacion por AFM	176
- Caracterizacion por MFM.....	186
Conclusiones.....	194
Referencias.....	198
Anexos.....	215
Lista de figuras.....	216
Lista de tablas.....	224
Artículo publicado: Squarewave voltammetric determination of trypsin activity
Artículo publicado: Electrochemical Sensing of Trypsin Activity
Artículo publicado: High sensitive trypsin activity evaluation applying a nanostructured QCM-sensor
Artículo publicado: Some Clinical Applications of the Electrochemical Biosensors
Artículo publicado: Detection of glycoalkaloids using disposable biosensors based on genetically modified enzymes

Agradecimientos

Agradezco de la forma más sincera, y afectuosa a mis padres por alentarme cada día, gracias mamá por ser mi mayor ejemplo de responsabilidad, entusiasmo y amor ilimitado, gracias papá por despertar en mí el amor a la profesión. Gracias a toda mi familia y amigos por estar presente en los momentos más trascendentes.

Especialmente a la Dra. Margarita Stoytcheva por su paciencia y cariño, este trabajo no hubiera sido posible sin su gran apoyo. Dr. Roumen, Dr. Benjamín, Dra. Mónica y Dra. Gisela les agradezco las enriquecedoras horas de clase, todos estos brillantes investigadores han dejado una gran huella en mi formación y espero en años futuros igualar su desempeño.

Incluyo especialmente al Dr. Jean-Louis Marty y Dr. Nikola Batina por recibirme en sus laboratorios, por dejarme aprender de ustedes y formar parte de sus equipos de trabajo, su aportación a este proyecto fue imprescindible.

Gracias al Instituto de Ingeniería de UABC, particularmente al personal administrativo, por hacerme participe de su grupo de estudiantes de posgrado, por su apoyo para realizar las estancias de investigación. Gracias por el apoyo económico durante mis estudios de posgrado a CONACyT.

Infinitamente gracias.

Michelle

Resumen

El avance tecnológico ha cobrado un lugar preponderante en la calidad y forma de vida en los últimos años, hemos sido testigos y beneficiarios directos de las múltiples comodidades que trae consigo en diversos aspectos de la vida cotidiana.

La industria de detección médica es uno de los sectores que ha sido ampliamente favorecido al lograr concientizar e involucrar proactivamente a los pacientes con sus enfermedades mediante el control y monitoreo en tiempo real, sin dolor, de manera confiable y en la comodidad de sus hogares de los niveles plasmáticos de particular interés.

Los biosensores son dispositivos de análisis compactos, económicos, portátiles, fiables, selectivos, rápidos y de fácil manejo que han sido la herramienta adecuada para satisfacer las necesidades en tiempo real de detección por parte de la población y la confiabilidad requerida por los médicos para un certero y adecuado seguimiento de diversos padecimientos.

En esta investigación se presenta un nuevo método para la cuantificación de las proteasas (tripsina en particular) usando un biosensor piezoeléctrico gravimétrico. El método se basa en la capacidad de la tripsina de digerir la gelatina inmovilizada sobre la superficie del electrodo de una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). En consecuencia, la frecuencia de oscilación de la QCM aumenta. La pendiente de la curva frecuencia/tiempo es proporcional a la actividad enzimática.

Para el establecimiento de las condiciones óptimas de medición se eligió el método de voltametría de onda cuadrada debido a la alta sensibilidad y selectividad que ofrece la aplicación de diferentes señales de excitación al electrodo, permite realizar la medición tanto en la reacción de oxidación como reducción. Se utiliza como electrodo de trabajo un electrodo rotatorio. Se utiliza como sustrato gelatina, la cual es depositada en el electrodo de trabajo con la finalidad de ser degradada por tripsina, permitiendo la difusión controlada de las moléculas de la solución.

La hidro-capa de gelatina funciona como barrera cinética para el transporte de la especie electroactiva a la superficie del electrodo. De manera progresiva la acción catalítica de la tripsina permite la digestión proteolítica la capa de gelatina provocando el incremento en su permeabilidad resultando en el aumento de la corriente de oxidación.

La intensidad del pico resultante estará en función del volumen, la concentración que se utilice de gelatina y la concentración de sustrato, el pH no es estudiado ya que la variación afecta las propiedades enzimáticas por lo que se trabaja con PBS a pH 7 manteniendo temperatura ambiente.

La determinación de las condiciones óptimas de trabajo es necesaria para su aplicación en QCM permitiendo una rápida evaluación de la actividad enzimática de la tripsina monitoreando en tiempo real de la degradación del sustrato.

Para mejorar la intensidad de corriente se modificó el sustrato cargándolo con nanopartículas de Ag y Fe₃O₄ depositándolas en la QCM, donde abandonan la hidro-capa junto con el producto de la degradación enzimática provocando por lo tanto una mayor disminución de la masa total del cristal en

comparación con el sustrato no cargado de nanopartículas. Teniendo como resultado una respuesta de frecuencia superior.

Este nuevo enfoque tiene como ventaja la implementación de nanopartículas metálicas y magnéticas logrando obtener señales de respuesta con mayor sensibilidad comprándolas con las señales obtenidas de manera análoga sin nanopartículas.

En forma anexa se presentaran dos colaboraciones realizadas en 2012 y 2013 en la Université de Perpignan Via Domitia, Francia y la Universidad Autónoma Metropolitana, México respectivamente. La primera colaboración describiendo la cinética enzimática de la inhibición enzima acetilcolinesterasa AChE por compuestos organofosforados OPs, el enfoque de este estudio es el resultado de un biosensor basado en colinesterasa para clarificar, evaluar, determinar y describir la inhibición AChE por mezclas de glicoalcaloides GAs.

La segunda colaboración caracterizando la superficie por AFM de biosensores electroquímicos para determinación de Tripsina. La caracterización de superficie de biosensores ha sido la respuesta esperada para visualizar y determinar la uniformidad cualitativa y cuantitativa de superficies modificadas. Por lo que su caracterización es una herramienta fundamental para su óptimo funcionamiento.

La importancia que ha cobrado el tema de caracterización de superficie reside principalmente en la necesidad de entender y describir la constitución física y química de superficies sólidas, distribución y cantidad de elementos, características de elementos, entre otras. Por lo que su implementación ha sido la respuesta esperada a problemas de áreas de ciencia y tecnología.

Este trabajo de investigación permite mediciones rápidas y confiables, altas resoluciones y sensibilidad de las determinaciones, así como el bajo costo de la operación y mantenimiento del equipo son, por mencionar, algunas de las ventajas que proporciona este sistema. Los resultados fueron validados por métodos basados en sensores electroquímicos. El desarrollo de este método proporcionará una forma sencilla de detección de los desórdenes pancreáticos.

Introducción

Los biosensores son dispositivos portátiles que ofrecen la ventaja de realizar mediciones en tiempo real, de manera confiable y reproducible sin necesidad de tratamientos previos, complejas técnicas analíticas y lugares especialmente diseñados.

En el año de 1962 se inicia una nueva etapa en los métodos médicos de detección con la descripción del primer biosensor para la detección de glucosa por Leland C. Clark. Por primera vez que era posible la detección de los niveles de glucosa in situ, sin molestias por parte del paciente y de manera confiable. Este hecho marco un precedente especialmente en la maneta en la que se cuantifican los niveles de glucosa en sangre, tomando en cuenta el alarmante y considerable aumento de diabéticos a nivel mundial. A partir de esa fecha diversos equipos científicos multidisciplinarios han realizado investigaciones para desarrollar e implementar este tipo de dispositivos a múltiples disciplinas de interés. Entre ellas destacan diversas áreas ilustradas en la siguiente figura.

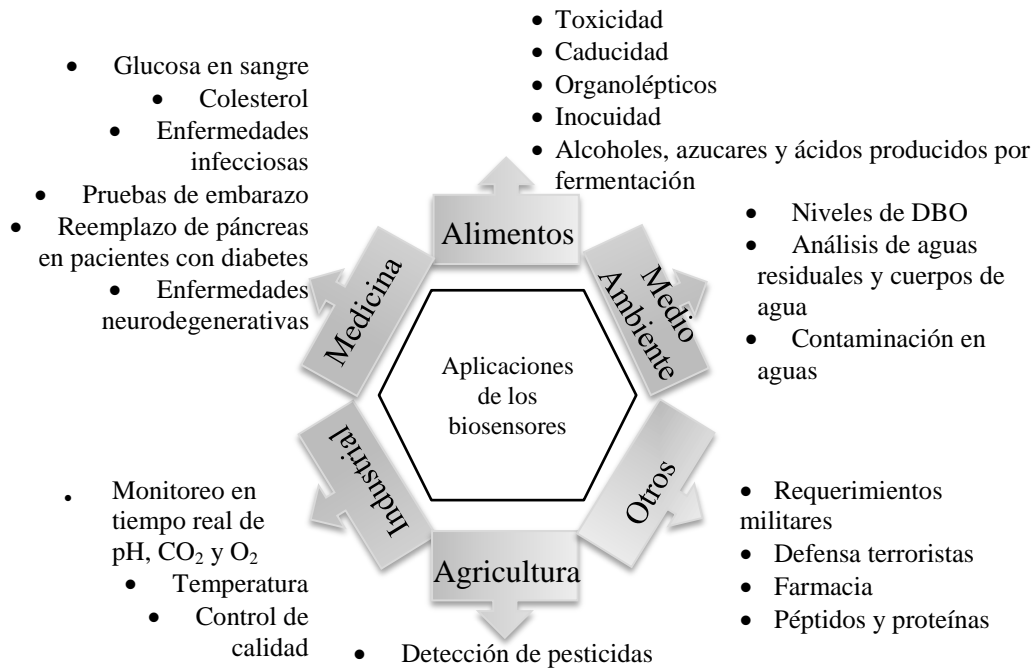


Figura 1: Aplicaciones de los biosensores

Actualmente la utilización más importante se encuentra en el área médica, formando parte de la nueva era de Pruebas en el sitio de atención (POCT). El primer dispositivo comercial es presentado en 1987. Reportando un aumento anual de aproximadamente 5% hasta la fecha.

En 2010 presentaron un aumento comercial de \$7 billones de dólares y se espera en 2015 un crecimiento de \$12 billones de dólares. En más de 20 años de investigación continua, contribuyendo a saciar la necesidad de mejores y eficaces métodos de detección clínica; se han introducido biosensores como técnicas de análisis. Actualmente cercal del 25% de las detecciones médicas los utilizan y se sigue trabajando para llegar al 50%.

La creciente demanda de métodos de detección in situ ha impulsado el desarrollo de este tipo de dispositivos. A nivel

mundial mediante recientes estudios se ha demostrado el aumento en el índice de afectación en enfermedades del tracto gastrointestinal, destacando Pancreatitis aguda como una de las de mayor prevalencia.

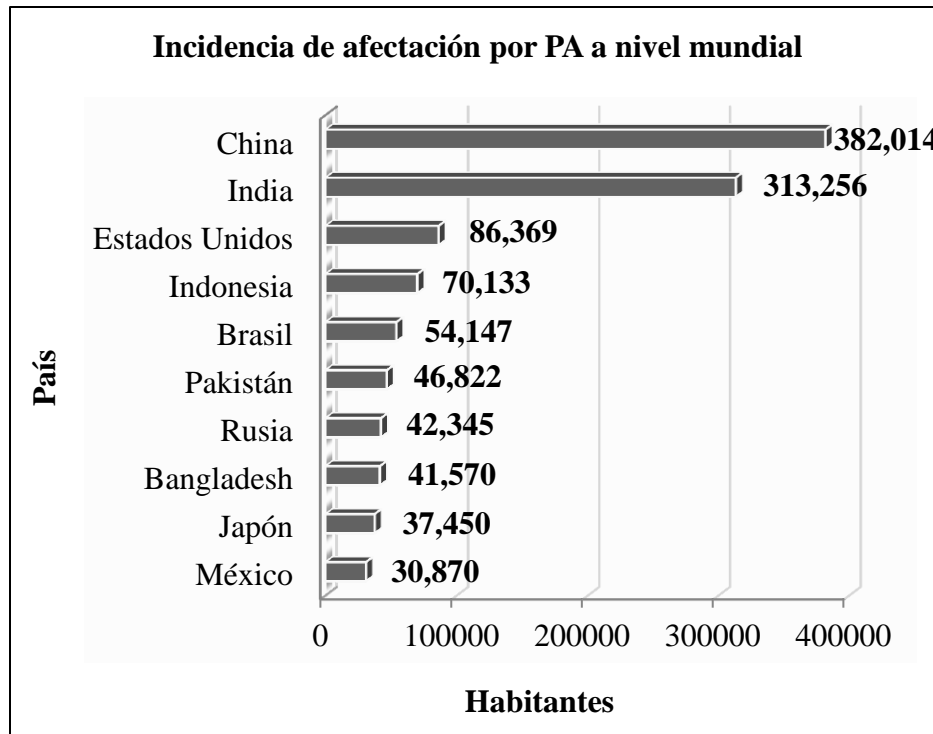


Figura 2: Incidencia de afectación por pancreatitis aguda a nivel mundial.

Actualmente en México se vive un aumento en la detección de enfermedades pancreáticas como: pancreatitis aguda (PA) y cáncer de páncreas, derivadas de la deficiencia de enzimas péptidas, en específico tripsina. En 2009 específicamente en los Estados Unidos de Norteamérica PA fue el diagnóstico más concurrido dentro de los padecimientos gastrointestinales representando un gasto de 2.5 millones de dólares [1]. En la gráfica anterior se puede observar que México ocupa el décimo lugar en afectación de PA a nivel mundial [2].

En estudios a partir de 1988 a 2003 se ha reportado un aumento en la incidencia de PA variando entre 4.9 y 73.4 casos por 100, 000 habitantes en todo el mundo respectivamente [3], [4] y [5].

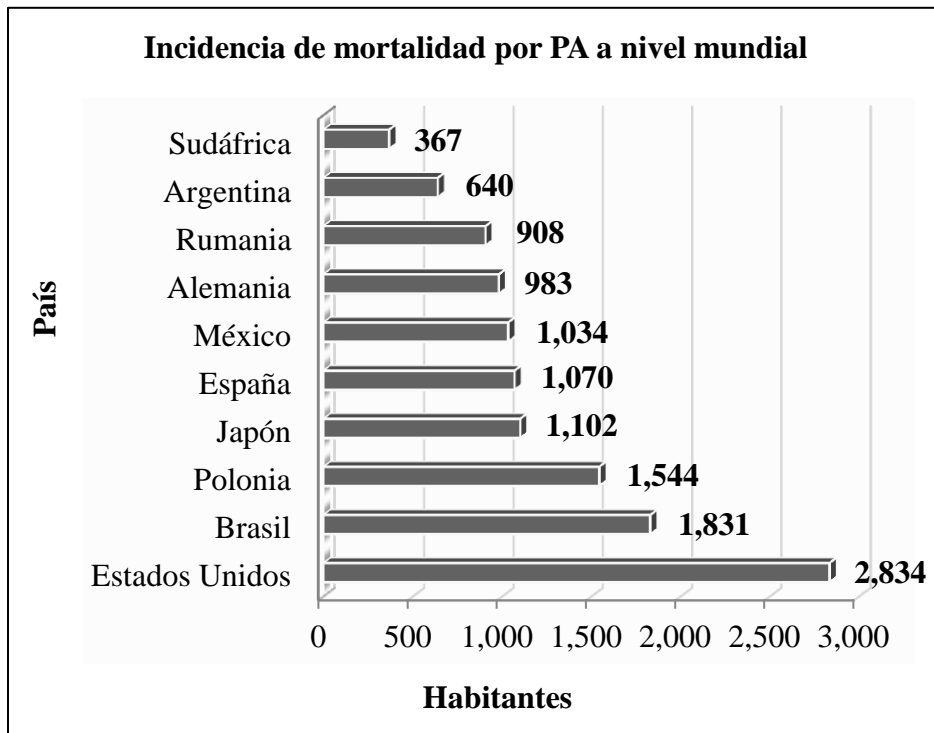


Figura 3: Incidencia de mortalidad por pancreatitis aguda a nivel mundial.

Específicamente en México es una enfermedad que presenta una frecuencia de 2% de los ingresos a hospitales generales aproximadamente y tiene una incidencia de 10 a 46 casos por 100 mil habitantes por año [6]. Por ejemplo, en el hospital Juárez de México localizado en la ciudad de México se presenta como la tercera causa de los ingresos totales al Servicio de Cirugía General y tiene el quinto lugar en ingresos por dolores abdominales en el Servicio de Urgencias de Adultos [7].

Hasta la fecha no se cuentan con estudios estadísticos completos sobre este padecimiento pero tiene una prevalencia del 3% y es conocido que en 2001 fue la decimoséptima causa de mortalidad [8].

La tripsina es producida por el páncreas en forma de tripsinogeno (enzima inactiva) y luego es activada en el duodeno por la enteroquinasa intestinal a tripsina (enzima activa) mediante corte proteolítico. Esta enzima clasificada dentro de la familia de las proteasas se encuentra principalmente en el sistema digestivo.

Por lo tanto, la determinación de la tripsina es una prueba diagnóstica específica y fiable de la función pancreática y de su alteración (pancreatitis, cáncer pancreático, fibrosis quística, etc.).

El test de tripsina parece ser la prueba más sensible para el diagnóstico de la pancreatitis aguda (PA), la cual constituye una importante causa de morbilidad y mortalidad en México y en el mundo: la severidad de la pancreatitis aguda no se correlaciona con el nivel de aumento en suero de la amilasa y de la lipasa; la proteína C reactiva es un predictor útil de PA a las 48 horas del establecimiento de los síntomas, pero no en la fase precoz; los niveles séricos de las citoquinas son indicadores precoces, pero ciertas citoquinas han mostrado baja especificidad como predictores de la severidad de la enfermedad. La pancreatitis aguda es la inflamación aguda del páncreas y puede ser edematosa (leve) o necrotizante (severa).

El cuadro clínico que presenta es inespecífico, se acompaña de dolor en cuadrante superior izquierdo de abdomen, intenso, penetrante, se acompaña de náusea y vómito, fiebre de 38.5°C, diaforesis, distensión abdominal, íleo, equimosis en flanco izquierdo o peri umbilical (pancreatitis necrohemorrágica) posición en gatillo, derrame pleural izquierdo, hipotensión, choque, acidosis metabólica severa, ascitis, Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica, Disfunción orgánica Múltiple, Choque séptico, muerte. Representa un reto diagnóstico en pacientes con dolor abdominal y, en caso de complicaciones eleva la morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios.

Existen las siguientes técnicas analíticas para su detección:

- *Radioinmunoanálisis (RIA):*

Se basa en la formación específica de los complejos Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) lo que le dota de una gran especificidad unido a la sensibilidad de los métodos radiológicos. Es una técnica competitiva donde el antígeno y el trazador luchan para unirse con el mismo anticuerpo, de forma que en ausencia de antígeno todo el complejo que se forma es radioactivo y al aumentar la concentración del antígeno este va desplazando al trazador del complejo formándose una menor proporción del complejo radioactivo. La concentración de tripsina inmunorreactiva se eleva en la pancreatitis aguda, sin la menor superposición con los controles normales.

Valor de referencia:

Neonatos de 0-30 días: hasta 210 ng/ml

Nivel de alerta: mayor de 250 ng/ml

Adultos: 10-57 ng/ml.

- *Tripsina en heces:*

Si el páncreas funciona correctamente, se podrá detectar tripsina en el intestino delgado y en las heces. En los sujetos con fibrosis quística, puede haber obstrucciones mucosas que bloqueen los conductos pancreáticos que conducen al intestino delgado, impidiendo que el tripsinógeno y el quimiotripsinógeno lleguen al intestino. Se requiere una muestra de heces sin contaminación de orina.

Un resultado negativo, aunque no es diagnóstico, indica que puede ser necesario realizar pruebas adicionales relacionadas con la insuficiencia pancreática.

- *Método Anson o método de hemoglobina:*

En este método se toma el principio de la cuantificación de enzimas a partir de hemoglobina desnaturalizada, esta se hidroliza con la tripsina a un pH de 7.5 a temperatura de 25°C por 10 minutos, la hemoglobina no hidrolizada se precipita con ácido tricloroacético (TCA), a la cantidad sobrenadante no precipitada se le añade reactivo fenol Folin-Ciocalteu (FCR) que por colorimetría produce un tono azul con tirosina, triptófano, y en menor grado con cistina, cisteína e histidina (aminoácidos).

El sobrenadante se mide por absorbancia a 750 nm obteniendo una curva de calibración para tripsina.

- *Método de Ludh*

Con esta prueba se determina la capacidad secretora del páncreas a través de una comida de prueba, se coloca una sonda en el duodeno, se le proporciona al paciente 300 ml una bebida con una concentración de 5% de proteínas, 6% de grasas y 15% de hidratos de carbono. En un lapso de 2 horas se empiezan a analizar la cantidad de tripsina dentro de las secreciones del duodeno.

- *Método de análisis de la secreción pancreática con estimulación hormonal (CCK)*

Este método se basa en el principio de masas correspondientes, en el que el volumen de las secreciones (bicarbonato y enzimas) es proporcional a la masa pancreática que funciona correctamente.

La disminución en la concentración de bicarbonato, o en la producción de enzimas, indica la existencia de insuficiencia pancreática exocrina. Se utilizan como hormonas estimulantes

secretina y colecistoquinina (CCK) administradas por vía intravenosa, la primera permite evaluar el volumen de secreción y la producción de bicarbonato, la segunda es responsable de la secreción enzimática (tripsina). Esta combinación proporciona alrededor de un 80 a 90% de especificidad de la enzima.

- *Espectrofotometría*

Método para la determinación de tripsina en el jugo duodenal sugerido por Schwert y Takenaka en 1955 y modificado Lundh en 1957. Utiliza como sustrato específico **BAEE** (αN-benzoil-L-arginina éster etílico CLORHIDRATO) en **PBS** pH 8. Es hidrolizado en presencia de Tripsina causando un aumento en la actividad de 0.001 por minuto a una absorbancia de 235 nm en condiciones normales.

El factor de dilución es tiempo – volumen. Obteniéndose una curva de calibración con resultados en unidades de μmol/volumen.

- *Técnica de Barnett y Kirschke:*

La azocaseína ha sido usada como sustrato. Después de la incubación de la proteasa con azocaseína, el sustrato no degradado es precipitado con TCA y la absorbancia del cromóforo que contiene péptidos en el sobrenadante de TCA a 450 nm brinda una medida de la degradación del sustrato por la proteína. La reacción ocurre en mayor o menor medida en dependencia de los inhibidores presentes en la muestra de suero.

En esta detección se han implementado biosensores, los desarrollados hasta el día de hoy son:

- *Sensor holográfico para la actividad de proteasas:*

Se utiliza gelatina como medio inmovilizante que es digerida por Tripsina formando un holograma grabado sobre la superficie cuando se degrada completamente se torna una emulsión oscura, mediante un reflector Bragg (BDR), detecta el cambio en longitud de onda o de brillantez producto de la absorción entrecruzada. La medida de este potencial es proporcional a la actividad de la Tripsina.

- *Sensor amperometrico para proteasas:*

Formado por un electrodo indicador con una capa externa de glucosa oxidasa y una interna con gelatina, se sumerge en tripsina permitiendo digerir la gelatina y permitir el paso del sustrato al electrodo. Provocando una reacción de oxidación produciendo H_2O_2 la cual produce un diferencia de potencial que será proporcional a la concentración del sustrato. La construcción brinda una gran sensibilidad y marca una diferencia sumamente importante en la detección de esta enzima, toma aproximadamente 10 minutos obtener un resultado.

- *Biosensor óptico con AuNPs para la actividad de proteasas:*

Sistema óptico donde tiene lugar el fenómeno de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) consta de un sustrato de vidrio donde se encuentran depositadas nanopartículas de Au (AuNPs) que interacciona por colorimetría con biomoléculas en especial Tripsina, el cambio de color de rojo a purpura es la evidencia de la

actividad enzimática que es leída por un transductor óptico es detectable a simple vista por lo que es un método sumamente didáctico la respuesta se obtiene aproximadamente en 10 minutos.

Tabla 1: Comparación de métodos analíticos vs biosensores para detección de tripsina

<i>DetECCIÓN</i>	<i>VENTAJAS</i>	<i>DESVENTAJAS</i>
Métodos Analíticos	<ul style="list-style-type: none"> • Son indicadores de disfunción enzimática. • Son realizados por personal capacitado. • Se llevan a cabo en establecimientos libre de interferencias externas. 	<ul style="list-style-type: none"> • No están totalmente estandarizados, necesitan laboratorios específicos. • Tiempo de realización considerable. • Reactivos costosos. • Calibración y mantenimiento e instrumentación específica. • Los resultados no son fundamentales para el diagnóstico de PA.
Biosensores	<ul style="list-style-type: none"> • Determinaciones sensibles. • Disminuyen el tiempo de realización. • Menor costo. • Método no invasivo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Determinaciones indirectas. • Sensibilidad parcial. • Mantenimiento específico de electrodos.

Puesto que estas técnicas consumen tiempo y requieren una instrumentación de laboratorio específica, así como un personal capacitado, es necesaria una herramienta más rápida y más exacta para superar tales desventajas. En las últimas décadas se desarrolló el campo muy prometedor de los biosensores, adaptándolos para la detección exacta de varios compuestos biológicos. Desafortunadamente, los biosensores ópticos [9, 10] y electroquímicos propuestos para la cuantificación de la tripsina son respectivamente no suficientemente sensibles o utilizan un principio de detección sofisticado.

Como vemos aún no se desarrollan un confiable, eficaz y eficiente capaz de realizar una la detección específica de esta afección, en base a estas desventajas y a la amplia facilidad de implementar biosensores hemos fijado nuestro objetivo:

“Elaboración de un biosensor piezoeléctrico altamente sensible para una determinación directa de Tripsina”

CAPÍTULO I

Biosensor

1 El intercambio de información para los seres vivos con su medio ambiente es elemental para su desarrollo y se realiza para satisfacer diferentes necesidades como localizar alimentos, encontrar pareja, para distanciarse de peligros, de forma general dicho intercambio se lleva a cabo por medio de receptores químicos; que es el punto inicial donde surge la propuesta de imitar el funcionamiento de un sistema para detectar determinadas sustancias.

De manera específica en el caso de los seres humanos contamos con la percepción sensorial basada en los sentidos del gusto, el tacto, la vista, el olfato y el oído. Los dos primeros están fundamentos en reacciones químicas pero los últimos tres de forma contraria se basan en principios físicos por lo que la información se transmite a través de un conjunto de reacciones fisicoquímicas.

Haciendo uso del principio de funcionamiento de estos receptores ha sido posible desarrollar un tipo de sensores específicos que se denominan: *biosensores*. Estos receptores en los seres vivos se utilizan para traducir e interpretar eventos en cantidades medibles, son transductores biológicos responsables de transformar un determinado tipo de energía en algún otro tipo de energía.

Por ejemplo; el sentido del tacto consiste en micro-sensores localizados en nuestros dedos si alguien toma algo muy caliente esa energía calórica es capaz de traducir la señal eléctrica que viaja a través de los nervios que viaja al cerebro contrayendo los músculos para dejar de tocar ese objeto.

Se podrían usar para medir diferentes sustancias, como:

- Células
- Tejidos

- Proteínas
- Enzimas

Este tipo de material biológico puede ser usado para construir biosensor.

Un biosensor es un novedoso tipo de sensor mediante la unión de sensores físicos existentes o cualquier transductor el cual es acoplado a un transductor biológico dando lugar al surgimiento de los denominados biosensores.

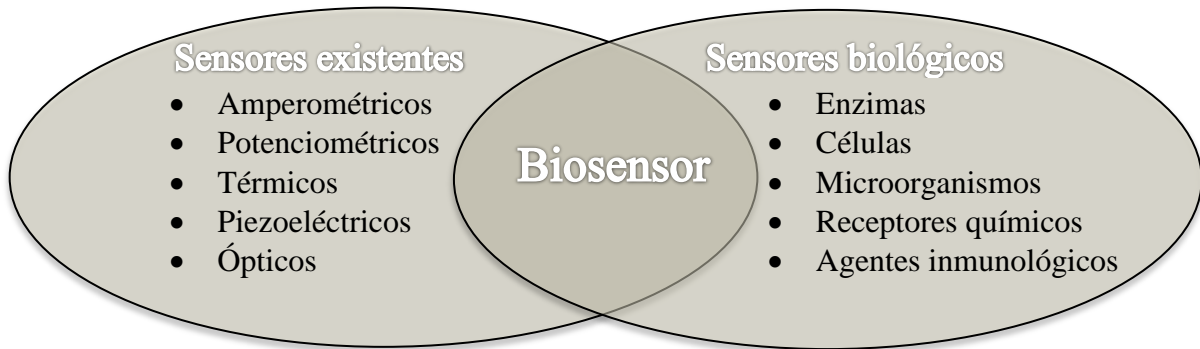


Figura 4: Constitución de un biosensor

1. 1 Definición de biosensor

El creciente interés de la industria médica por mejorar y desarrollar innovadores métodos de detección ha tenido como consecuencia la fructífera incursión de los biosensores, siendo esta su mayor aplicación. Un biosensor, de manera general, es un dispositivo capaz de medir una señal como respuesta a un estímulo biológico y obtener información cuantitativa de dicho sistema. Existen diversas definiciones, entre ellas destacan:

IUPAC:

“Un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos

o células enteras para detectar compuestos químicos por lo general por medio de señales eléctricas, térmicas u ópticas” [11].

Enciclopedia Británica Merriam:

“Un dispositivo de control que transmite información sobre un proceso de la vida; especialmente: un dispositivo que consta de un componente biológico (tal como una enzima o una bacteria) que reacciona con una sustancia objetivo y un componente generador de señal electroquímica que detecta los productos resultantes o subproductos” [12].

Turner, Karube y Wilson:

“Dispositivo analítico compacto la incorporación de un elemento de detección biológico o de origen biológico, ya sea integrado dentro o íntimamente asociado con un transductor físico-química. El objetivo habitual de un dispositivo de este tipo es producir ya sea una discreta o una digital continuo señal electrónica que es proporcional a un único analito o un grupo de analitos relacionados” [13]

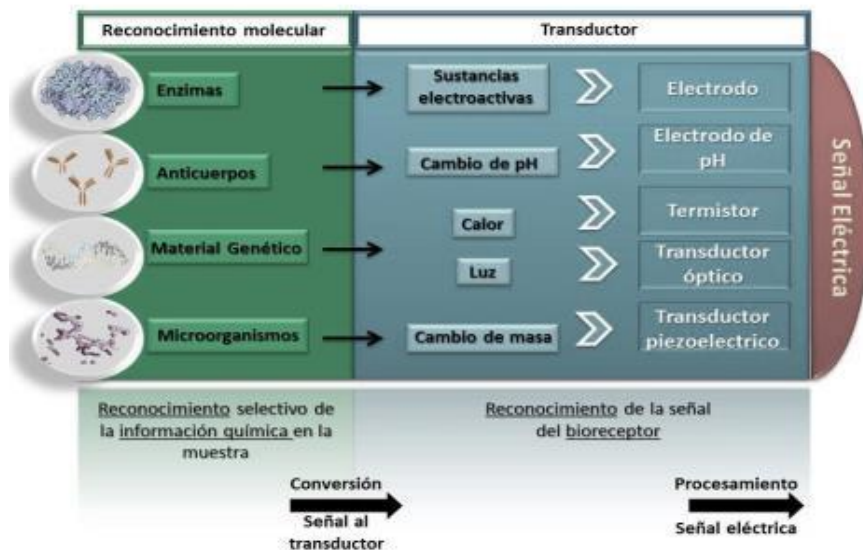
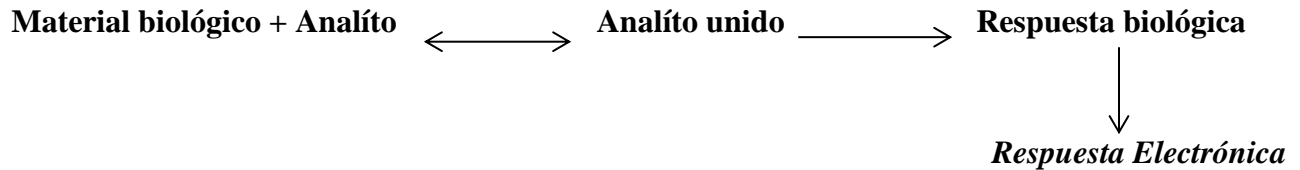


Figura 5: Componentes de un biosensor

En la imagen anterior se observa el bioreceptor que es el material encargado de interpretar selectivamente la información química presente en la muestra, esto es, tiene la característica principal de reconocer al analíto de interés y la interacción da como resultado una señal capaz de ser reconocida por el transductor para convertirla en una señal eléctrica procesable.



$$\text{Respuesta Electrónica} = \frac{[\text{Máxima respuesta electrónica}] * [\text{Concentración del analíto}]}{[\text{Constante de semisaturación}] + [\text{Concentración del analíto}]}$$

Figura 6: Representación de la transducción de la señal.

Los transductores son capaces de transformar la señal enviada por el bioreceptor para convertir y procesar esa información en una señal eléctrica. El proceso clave en este nuevo tipo de sensores es el reconocimiento biológico, en este reside la propiedad fundamental de reconocer selectivamente al analíto. Su posterior recepción e interpretación de señal es realizada por los diferentes tipos de sensores existentes.

Las características esenciales de los biosensores son:

- Repetitividad
- Reproducibilidad
- Selectividad
- Sensibilidad
- Región de respuesta lineal
- Buena respuesta en el tiempo

La repetitividad y reproducibilidad son elementales en cualquier sistema permitiendo asegurar la constancia y confiabilidad en los valores obtenidos. En un biosensor se busca “especificidad” que es la característica primordial para ser capaz de reconocer específicamente solo a un analito de entre varios, pero esto es muy difícil porque existen diversos compuestos interferentes que también pueden brindar una pequeña señal por lo que se habla de utilizar un material de conocimiento molecular selectivo al analito de interés. El bioreceptor debe ser lo suficientemente sensible para detectar la presencia del analito en concentraciones de órdenes muy bajos como micrométricos, picométricos, entre otros.

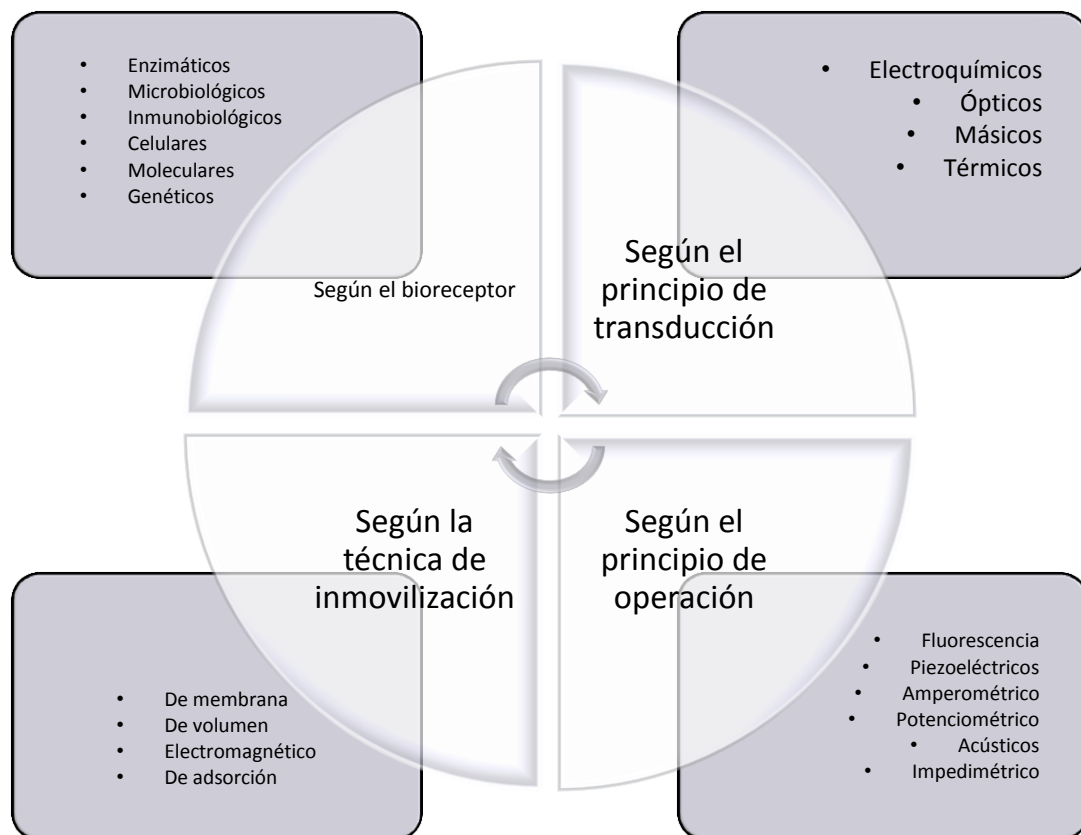


Figura 7: Clasificación de biosensores

1.2 Bioreceptores

El bioreceptor o también conocido como elemento de reconocimiento biológico es un componente clave e indispensable para la constitución de un biosensor. Es una biomolécula que permite el anclaje específico del analíto, este reconocimiento bioreceptor-analíto produce una señal de reconocimiento medible la cual se recibe y convierte en el transductor.

La selección del bioreceptor adecuado es crucial para el óptimo funcionamiento del sistema de detección por lo que las opciones a elegir se multiplican sustancialmente ya que existen numerosos analítos y biomoléculas capaces de detectarlos. Por lo que para cumplir con el criterio de especificidad se han clasificado de manera general de la siguiente manera:

- Enzimas
- Antígeno/Anticuerpo
- Ácidos Nucleicos
- Células/Microorganismos
- Biomiméticos

Enzimas:

Las enzimas son una de las biomoléculas principales debido a su alta actividad catalítica y selectividad hacia sustratos. Específicamente son grandes proteínas que se encargan de acelerar y regular reacciones bioquímicas. Se caracteriza principalmente por reaccionar selectivamente con el analíto(s) incrementando su velocidad sin consumirse. El sitio activo o centro de fijación del sustrato es el lugar específico de cada enzima que posee la forma y

grupos funcionales adecuados para enlazar el sustrato deseado o también llamado molécula reactiva. La velocidad de reacción que proporciona es del orden de 10^6 - 10^{12} veces mayor a la reacción sin catalizadores.

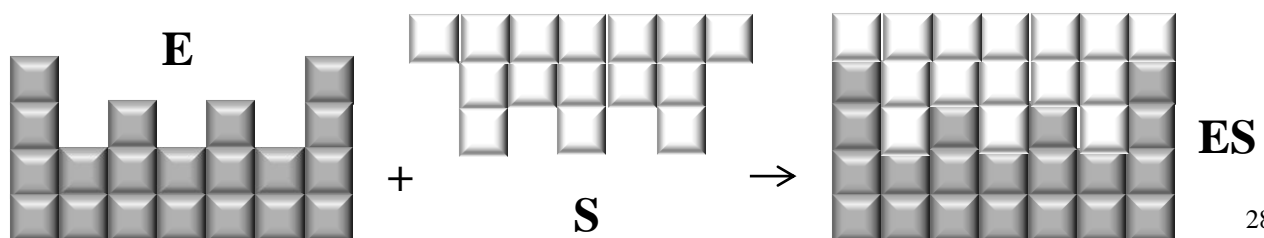
La alta actividad catalítica le permite reestablecer su estado inicial descartando la necesidad de un tratamiento posterior al reaccionar con el sustrato para regenerar el biosensor.

En la siguiente tabla se encuentran los diferentes tipos de enzimas útiles para la implementación en biosensores, en partículas en los de tipo electroquímico.

Tabla 2: Clasificación de las enzimas utilizadas como bioreceptor

<i>Tipo de enzima</i>	<i>Función</i>
Oxidorreductasas	Oxidación/reducción de reacciones
Transferasas	Transferencia de grupos moleculares de una molécula a otra
Hidrolasas	Rupturas hidrolíticas
Liasas	Rupturas de los enlaces C-C, C-O, C-N
Isomerasas	Rearreglos intramoleculares
Ligasas	Unión de dos moléculas

La enzima se une de manera temporal a la molécula que está transformándose (sustrato) durante las diferentes etapas de la reacción, sin embargo al finalizar, la enzima es capaz de reintegrarse a su estado original al mismo tiempo que se libera el producto de la reacción. El mecanismo de catálisis fundamental es el siguiente:



Dónde:

E = Enzima; S=Sustrato; E-S es el complejo enzima-sustrato.

Figura 8: Representación de unión enzima-sustrato

En ocasiones es necesario asociar a las enzimas con pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas denominadas cofactores. La amplia disponibilidad comercial con altos niveles de pureza y su relativa facilidad de distribución a nivel mundial los hace bioreceptores sumamente atractivos para la producción masiva de biosensores [14].

Existen diversas influencias que alteran la actividad catalítica que puede traducirse como limitante para su óptima utilización como bioreceptor. La temperatura optima en la que se tiene la mayor actividad catalítica es alrededor de 37.5°C, debajo este valor se desnaturaliza. Los cambios abruptos de pH propicia la ruptura de las fuerzas intra e intermoleculares disminuyendo su efectividad. Otros tipos de limitantes son la fuerza iónica, inhibidores químicos, cofactores entre otros. La gran mayoría de los biosensores enzimáticos que se han desarrollado utilizan enzimas oxidasas que son excelentes consumidoras de oxígeno disuelto produciendo peróxido de hidrogeno.

Las características generales que debe poseer una enzima para ser utilizada como elemento de reconocimiento en el desarrollo de biosensores también son las ventajas que esta aporta, a continuación se citan algunas de ellas.

Tabla 3: Ventajas y desventajas de utilizar enzimas como bioreceptor

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Elevada sensibilidad	Sensibilidad frente a condiciones ambientales (pH, temperatura o fuerza iónica)
Respuesta rápida	En ocasiones requiere presencia de cofactores
Autoregenerables	Pueden ser inhibidos por sustancias en la muestra
Permiten monitorización continua	Tiempo de vida limitado
No requiere pasos de lavado	
Gran variedad de enzimas disponibles	
Permiten detectar toxicos desconocidos que inhiben enzimas	
Permiten amplificar señales	
Procedimientos de inmovilización bien establecidos	
Mecanismo de acción caracterizado	
Costo moderado	
Manejo sencillo	

El método de inmovilización utilizado y el espesor de la capa enzimática también pueden afectar el rendimiento del biosensor. Entre las técnicas de inmovilización en la superficie del transductor se encuentran:

- Adsorción
- Unión covalente
- Atrapamiento en gel o polímero

Antígeno/Anticuerpo:

Un anticuerpo es una clase de biomolécula de considerable complejidad, está constituida esencialmente por secuencias altamente ordenadas de aminoácidos. La razón fundamental para ser utilizado como bioreceptor es la afinidad, integración e interacción única del antígeno, cómo analíto de interés, con el sitio activo del antígeno [15]. El principio de operación radica en la manera en que interactúan Antígeno y Anticuerpo ya sea de forma directa o indirecta produciendo un cambio de señal detectable por el transductor. Los anticuerpos poseen una estructura tridimensional que es el punto central por el que se une al antígeno de manera altamente específica.

La forma de interacción directa se mantiene inmovilizando el antígeno permitiendo la llegada del anticuerpo para ligarse y formar el complejo Antígeno-Anticuerpo; esta interacción también puede ocurrir de manera inversa en la que el anticuerpo es inmovilizado y el antígeno se ancla formando el complejo inmunológico. La forma de interacción indirecta consiste en la utilización de una especie marcada por separado que es detectada después de la interacción.

Al disminuir las cantidades del reactivo inmovilizado se incrementa la sensibilidad del método [16].

Las técnicas de conjugación para el complejo Antígeno-Anticuerpo utilizadas para ser utilizado como sistema de bioreconocimiento en los biosensores son:

- Inmunofluorescencia indirecta
- Enzimoimmunoanálisis
- Fluoroimmunoanálisis
- Radioimmunoanálisis

La superficie del transductor debe ser funcionalizada previamente con el grupo reactivo correspondiente. Los anticuerpos generalmente son inmovilizados mediante enlaces covalentes con los grupos funcionales amino, carboxilo, aldehído, o tiol. Las limitaciones de los anticuerpos son análogas a las enzimas, la formación del complejo inmunológico se enlace generalmente de manera irreversible; la regeneración requiere de cambios drásticos de pH, alta fuerza iónica, detergentes. Otro de las desventajas es la nula actividad catalítica lo que hace necesario la incorporación de un marcador como isotopos radioactivos, enzimas, partículas luminiscentes, etc [17]. Los transductores más utilizados son ópticos o acústicos.

Ácidos nucleicos

Las macromoléculas proteicas como ADN, RNA y APN han sido altamente utilizadas debido a su alta selectividad y sensibilidad como producto de la fuerte interacción entre los pares de bases (adenina/timina y citosina/guanina) distribuidas a todo lo largo de la doble hélice que conforma la cadena de ADN y las secciones complementarias alineadas de las cadenas de nucleótidos [18].

Se basa en el principio fundamental de la correlación directa del analíto con una de las macromoléculas proteicas que previamente fueron aisladas de su medio ambiente biológico. De manera general se inmoviliza la cadena de ADN en superficies en diversas formas como electrodos, cristales o chips, dependiendo el tipo de transductor, donde se lleva a cabo la hibridación de esta cadena inmovilizada con su base par, siendo esta hibridación la señal detectada por el transductor. Entre los biosensores que se han

desarrollado basados en ácidos nucleicos destacan los inmunosensores, quimiorreceptores, aptámeros, entre otros.

Los aptámeros son análogos a los anticuerpos respecto a sus afinidades de enlace pero son proporcionan mayor resistencia a la desnaturalización y degradación. Además brindan estabilidad considerable y modificable convirtiéndolos en un bioreceptor altamente prometedor para el desarrollo de una nueva generación de biosensores [19]. También pueden encabezar la lista de opciones de selectores quirales, y por lo tanto tener la capacidad de distinguir entre moléculas quirales [20].

Los biosensores electroquímicos basados en ADN son considerados como la alternativa adecuada para el diagnóstico rápido y económico de padecimientos genéticos así como la detección de patógenos y para la compatibilidad con tecnología de micro-fabricación [21]. Los ácidos nucleicos de manera análoga a los anticuerpos presentan una actividad catalítica nula, por lo que también requieren de un marcador para su detección.

Células/Microorganismos

La utilización de estos bioreceptores ya sean células enteras, microorganismos o un componente celular específico se justifica en la medición de su metabolismo al unirse específicamente al analito produciendo una señal eléctrica medible. Una de las ventajas principales de esta clase de bioreceptores es el bajo límite de detección que pueden alcanzar. Las células microbianas a diferencia con las enzimas o anticuerpos son más económicas, más estables y pueden participar en reacciones complejas que implican enzimas y cofactores. Tienen la limitante de tiempo de respuesta y recuperación son más largos, también pueden requerir de una

calibración frecuente; al ser comparadas con las enzimas presentan una selectividad menor [22].

Como contraparte a estas limitantes, los biosensores basados en células o microorganismos pueden ser empleados en biosensayos en tiempo real y en una amplia gama de aplicaciones empezando por biomedicina hasta medio ambiente.

Biomiméticos

Son la única clase de bioreceptores diseñados y creados completamente por el hombre con el claro objetivo de “mimetizar” las funciones de los receptores biológicos de origen natural. En los últimos años se ha presenciado la llegada de nuevos métodos de construcción de receptores biomiméticos como:

- Impresión molecular
- Fabricación de membranas artificiales
- Ingeniería genética y molecular
-

La utilización de estos métodos para elaborar bioreceptores diseñados especialmente para que cumplan con las funciones específicas y selectivas permite obtener como resultado huecos moleculares o sitios activos de unión que son totalmente complementarios de un determinado analíto.

La combinación de dichas técnicas ha permitido la síntesis o modificación en la disposición de una gran variedad de grupos funcionales en su interior haciendo uso de los conocimientos químicos; lo que se ha transformado en una apreciable herramienta para el diseño de bioreceptores con propiedades específicas.

Tabla 4: Ventajas y desventajas del uso de materiales biológicos en biosensores

<i>Tipo de material biológico</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> • Coordina al sustrato • Alta selectividad • Alta sensibilidad • Actividad catalítica • Reacciona rápidamente 	<ul style="list-style-type: none"> • Pueden ser costosas • Pierden actividad al inmovilizarse • Se desnaturalizan en periodos cortos de tiempo.
Tejidos animales o vegetales	<ul style="list-style-type: none"> • Las enzimas se mantienen en su ambiente natural • Se estabiliza la actividad de la enzima • Funcionan donde falla las enzimas puras • Son más económicas que las enzimas puras 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de selectividad • Son mezclas de enzimas las cuales pueden desactivar al sensor.
Microorganismos	<ul style="list-style-type: none"> • Bajos costos en general • Menos propensos a ser inhibidos • Más tolerantes a cambios de pH y temperatura • Mayor tiempo de vida útil que las enzimas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tardan más tiempo en generar respuesta • Presentan tiempo de reutilización más largo • Pérdida de selectividad por la variedad de enzimas presentes.
Ácidos nucleicos	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente selectivos • Se pueden emplear para detección de fallas genéticas, enfermedades, infecciones virales, etc. • Pueden identificar genes similares por técnicas de marcado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tecnología muy costosa • Se requiere del material aislado y certificado • Requiere de personal especializado para su uso

1. 3 Transductores

En el apartado anterior se hizo hincapié en la importancia de la selección adecuada del bioreceptor que, ante todo, debe ser selectivo al analíto de interés; pero para que esta selectividad pueda ser una señal eléctrica medible debe ser traducida. El elemento

responsable de esta interpretación es el transductor, que por otra parte es el componente principal para la clasificación de los biosensores. También el término transductor concierne a materiales que facilitan un tipo de transducción determinada.

Mientras el bioreceptor debe ser altamente selectivo el transductor no requiere satisfacer dicha característica, en algunos casos los bioreceptores y transductores están integralmente acoplados formando un solo componente por lo que el transductor es considerado como un sensor químico. En otros casos se evita el paso de especies interferentes producidas en el proceso de reconocimiento que pueden transportar información analítica innecesaria mediante un separador entre el bioreceptor y el transductor. Su clasificación se describe en la siguiente tabla.

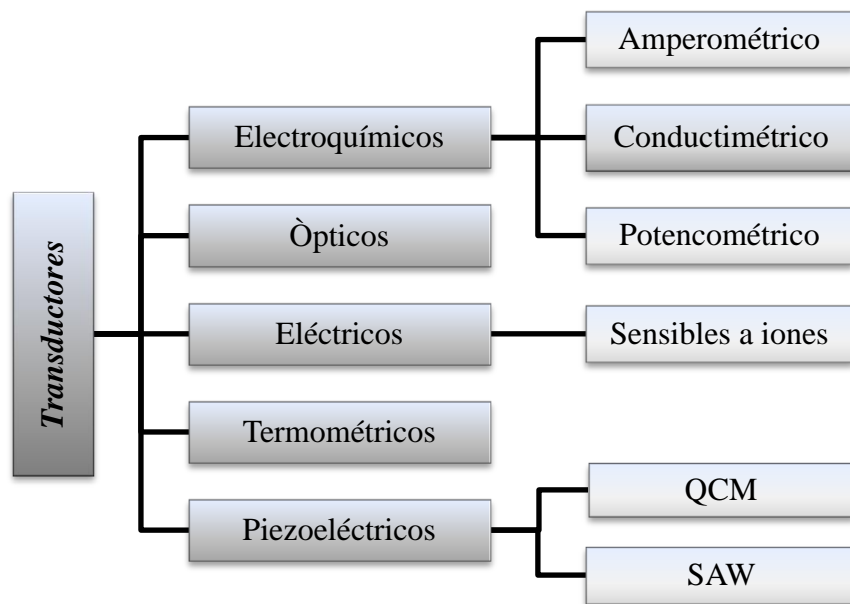


Figura 9: Clasificación de los transductores

Transductores electroquímicos

Este tipo de transductores es el más común de las diversas clases de biosensores, el principio de funcionamiento es basado en las reacciones electroquímicas como producto de la interacción entre las biomoléculas inmovilizadas y el analito de interés produciendo o consumiendo iones y/o electrones que afecta de manera directa la medición de las propiedades eléctricas de la solución, como la corriente eléctrica o el potencial [23] y [24].

Este tipo de transductores se divide en 3 grandes grupos determinados por la técnica electroquímica para interpretar la información de la muestra:

- Conductimétricos
- Potenciométricos
- Amperométricos

Las ventajas que los hacen ser los transductores más utilizados son:

- Se requiere de volúmenes pequeños de muestra inclusive en el orden de nano-litros debido a la naturaleza interfacial del método lo que hace posible la realización de mediciones “*in vivo*”
- Se obtiene como producto de la interacción electroquímica una señal eléctrica permitiendo la transducción directa de la velocidad de reacción a una señal de lectura confiable.
- Se pueden alcanzar límites de detección entre 10^{-9} y 10^{-6} mol L⁻¹ logrando constatar la presencia de números analitos,
- Requiere de material y equipo de bajo costo, sin necesidad de instalaciones específicas ni gran espacio.

Por otro lado, es conocido que las técnicas electroanalíticas poseen baja selectividad en comparación con otras técnicas analíticas aunque esta puede ser disminuida con la unión del bioreceptor. Esta técnica suele ser complementada con la detección por métodos ópticos, como fluorescencia que es la técnica óptica más sensible.

Transductores conductimétricos:

El principio de operación de estos transductores se fundamenta en la determinación de la resistencia o conductividad del analito de interés mediante la variación de la conductividad o alguna propiedad asociada entre dos electrodos sumergidos en solución. Dicha conductividad es medible mediante la aplicación de un potencial de baja amplitud evitando la polarización de la sustancia. El aumento en la conductividad es relacionada con la presencia de elementos iónicos. La conductividad es directamente proporcional a la concentración de iones calculada según la siguiente ecuación:

$$\Lambda = \frac{k}{C}$$

Dónde:

k = conductividad específica con unidades $S\text{ cm}^{-1}$

C = concentración de iones con unidades mol cm^{-3}

De manera general se utiliza corriente continua para medir la resistividad, pero suele modificarse a corriente alterna para mediciones con impedancia [25]. Estas últimas son utilizadas para caracterizar líquidos y/o superficies de electrodos modificadas [26] y [27].

Este transductor se compone de dos electrodos inertes, generalmente metales nobles como Au, Pt, Pd o Ru. No requiere de un electrodo de referencia.

Transductores potenciométricos:

Los transductores potenciométricos se fundamentan en el principio clásico de potenciometría en el que se mide la diferencia de potencial entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. Dicha diferencia de potencial es la señal eléctrica que al ser traducida permite obtener información cuantitativa relacionada a la actividad y/o concentración de la especie generada o producida en la etapa de reconocimiento biológico.

Esta diferencia de potencial es proporcional a la concentración del analíto utilizando la ecuación de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{2.303RT}{nF} \ln(a_i)$$

Dónde:

E = fuerza electromotriz del electrodo.

E^0 = potencial normal del electrodo de referencia a condiciones estándar

a_i = es la actividad del ion de interés.

R = constante de los gases

T = es la temperatura absoluta

n = es el número de carga del ion

F = es la constante de Faraday ($9.64 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)

La actividad del ion se relaciona con la concentración tomando en cuenta el coeficiente de actividad que determina la eficiencia con que el analíto de interés influye en el equilibrio, el termino concentración del ion es más practico por lo que se utiliza con frecuencia. La fuerza iónica es un factor importante que puede modificar la concentración del ion alterando su capacidad reactiva debido a las interacciones electrostáticas que pueden establecer entre ellos.

Esta clase de transductores electroquímicos son los de mayor uso por lo tanto los más estudiados y desarrollados. Su gran implementación se remonta históricamente a inicios del siglo XX cuando se desarrolló el primer electrodo de vidrio.

De manera comercial se ha explotado ampliamente su aplicación en el desarrollo de electrodos selectivos de iones (ISE) también se incluye dentro de esta clase de sensores los sensores químicos a base de Si nombrados ISFETs (transistor de efecto de ion selectivo) para determinar un gran número de iones en solución, lo que continuó en la implementación de óxidos metálicos formando electrodos MOSFETs (transistor de efecto de campo metal-óxido semiconductor), así como también se produjeron modificaciones con membranas selectivas CHEMFET (transistor de efecto de químicamente modificado).

Transductores amperométricos:

La amperometría es una variante de la técnica denominada voltamperometría, el principio básico de funcionamiento consiste obtener información del analito mediante la cuantificación de la corriente eléctrica respecto al tiempo al hacerla fluir entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar en relación a un potencial aplicado y controlado producido entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo; el sistema se hace constar de tres electrodos: electrodo auxiliar o también llamado contraelectrodo se utiliza para completar el circuito entre el mismo y el electrodo de trabajo ya que actúa como un conductor químicamente inerte. El electrodo de referencia proporciona un potencial constante y estable que se establece con el electrodo de trabajo. Por último, el electrodo de trabajo o también

microelectrodo es en él donde ocurre la reacción de interés es de importancia considerar un área de superficie pequeña alrededor de pocos milímetros cuadrados para facilitar la polarización del mismo.

La corriente es medida en tres etapas; la primera es del tipo capacitivo donde se le hace fluir a través de la celda debido a la carga y descarga de la doble capa electroquímica; la segunda es del tipo farádico que es originada por la reacción provocando un cambio en el estado de oxidación-reducción de las especies electroactivas en solución o hasta en el mismo material del electrodo; la tercera es producida por el electrodo al introducirse en un electrolito propiciando efectos de adsorción.

La medida de la velocidad de reacción producida en el electrodo es dada por la corriente farádica, que es directamente proporcional a la concentración de la especie de interés; por lo tanto la corriente aplicada a los sensores amperométricos es producto de una reacción electroquímica neta.

La directa proporcionalidad establecida entre la concentración de la especie electroactiva de interés y la intensidad de corriente eléctrica registrada al momento de llevarse a cabo la oxidación-reducción sobre la superficie del electrodo de trabajo es el fundamento principal de este tipo de transductores. Dicha relación concentración-intensidad obedece al comportamiento descrito en la Ley de Fick,

$$I = nFAD_0 \frac{\delta(C_0(o, t))}{\delta_x}$$

Dónde:

A: es el área del electrodo de trabajo
 D₀: es el coeficiente de difusión
 C₀: es a concentración del analito
 x: representa la distancia de la doble capa.

Al aplicar una agitación constante en la solución se considera constante la distancia de la doble capa por lo tanto la ecuación anterior puede simplificarse para obtener una linealidad entre la intensidad de corriente y la concentración de la especie de interés.

$$I = \frac{nFAD_0}{\delta} C_0$$

La implementación de este tipo de transductores a los biosensores ha sido ampliamente aceptada ya que han demostrado una amplia aplicación en el sector médico. Especialmente para la detección en sangre y suero.

Tabla 5: Clasificación de transductores electroquímicos

<i>Transductor electroquímico</i>	<i>Tipo de medida</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Inconvenientes</i>
Conductimétrico	Variación de conductividad del medio		
Potenciométrico	Diferencia de potencial eléctrico.	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicidad de operación. • Pequeño tamaño 	<ul style="list-style-type: none"> • Menor sensibilidad que amperométricos. • Unión inespecífica a otros iones presentes en la muestra. • Para muestras con gran cantidad de analito. Pueden tener baja selectividad.
Amperométrico	Corriente generada por la reducción u oxidación de especies electroactivas.	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeños y robustos <ul style="list-style-type: none"> • Sensibles • Rápidos • Económicos • Facil para ensayos de campo 	

Transductores ópticos

Los biosensores desarrollados a partir de transductores ópticos son de gran importancia después de los electroquímicos su principal característica es la interacción del analito de interés con una fuente luminosa. El funcionamiento de algunos biosensores es homologado a los espectrómetros tradicionales en los que se evalúa la variación de intensidad de luz por absorción de la muestra. Otro tipo de biosensores ópticos utilizan el índice de refracción luminoso para medir las variaciones de fase en el momento justo de la interacción analito-receptor biológico; como referencia se utiliza como patrón una trayectoria de luz idéntica donde no existe detección química cuya intensidad saliente es sensible a interacciones químicas en el entorno.

En la siguiente figura se representa el principio de funcionamiento básico para esta clase de transductores, se hace pasar un haz de luz por un material conductor en este caso la fibra óptica hasta encontrarse con el bioreceptor el cual consta de moléculas luminiscentes con diferentes espectros de emisión y adsorción. Mencionada emisión y adsorción es recolectada en la misma fibra y traducida para determinar la concentración de la especie de interés.

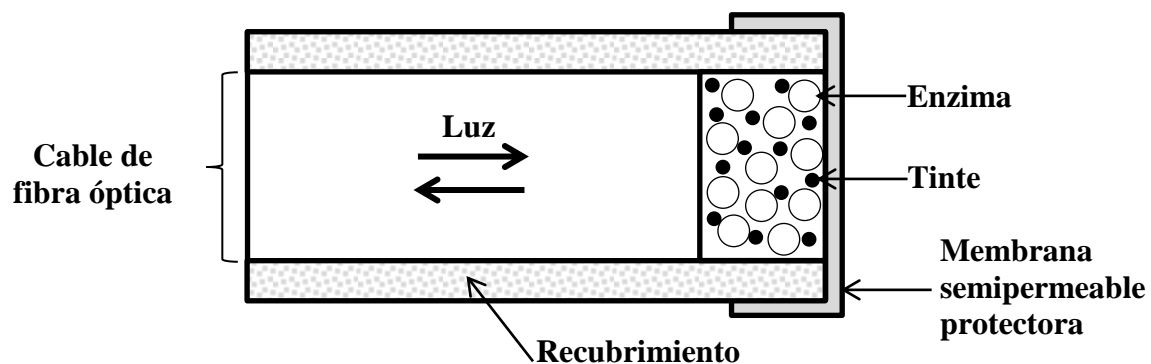


Figura 10: Constitución transductor óptico

La figura anterior muestra adición común de un marcador fluorescente o tinta que se une estrechamente al analito produciendo una fluorescencia detectable y medible, en el que se excita con una longitud de onda inferior a la de emisión.

En las últimas fechas se ha introducido una nueva clase de biosensores ópticos de onda evanescente en los que la fuente luminosa producida por un láser es conducida a través de una superficie o replicada en una capa delgada, generando un campo electromagnético que penetra una distancia determinada de la superficie donde la mayor cantidad de energía luminosa es conducida. En mencionada superficie es donde se localiza el elemento biológico de reconocimiento por lo tanto se hace presente la interacción con el objeto de estudio. Por lo tanto la acción del campo luminoso decrece al interactuar con la composición de la superficie; lo que facilita su reutilización solo cambiando el elemento de reconocimiento biológico y el mismo transductor es completamente aplicable.

Tabla 6: Características de los transductores ópticos

<i>Transductor óptico</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Fibra óptica (Optrodos)	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibilidad • Bajo costo • Análisis in situ remoto • Análisis en tiempo real • Fácil miniaturización 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere marcaje • Señal proporcional a la cantidad de analito • Vida limitada del componente biológica
Resonancia de plasmones superficiales (SPR)	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil de usar • Detección directa • Detección en tiempo real • Elevada sensibilidad • Muestras sin purificar 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibles a temperatura • Ineficaz para diluidos • Inadecuado para miniaturización • Elevado costo
Onda evanescente (EW)	<ul style="list-style-type: none"> • Detección directa, rápida y selectiva del analito. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere marcaje

Transductores eléctricos

Transductores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET):

Es una clase de transistor de efecto de campo que al ponerlo en contacto directo con la disolución genera un potencial eléctrico en la interfase localizada entre el aislante del transductor y la solución que controla la conductancia de corriente del sistema. Se constituye por tres conexiones eléctricas: fuente, compuerta y drenaje que se muestra a continuación:

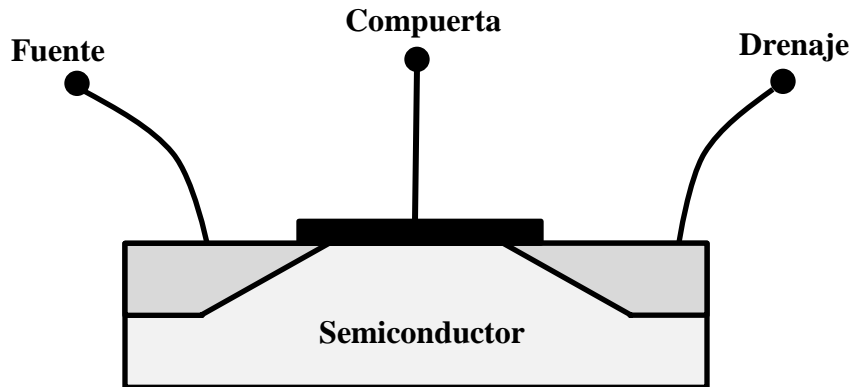


Figura 11: Representación de un transistor de efecto de campo

En la figura anterior se puede ver una zona entre la fuente y el drenaje que normalmente es un aislante basado en el potencial que se aplica en la compuerta que es continuamente conductiva a las cargas provocando una carga proporcional del lado del semiconductor. Por lo tanto si se genera una corriente entre la fuente y el drenaje esta será directamente proporcional a la carga de la compuerta.

Los transductores ISFET son dispositivos que combinan las propiedades sensibles de las membranas de vidrio con las

características de conversión de impedancia de los MOSFETs tiene un electrodo de referencia como compuerta; el material selectivo a los iones de la constitución de los ISFETs es capaz de detectar la variación del potencial en la interfase aislante-solución que termodinámicamente considera la superficie de la capa no-hidratada y de una capa idealmente selectiva a los iones de interés que hace la función de un electrodo.

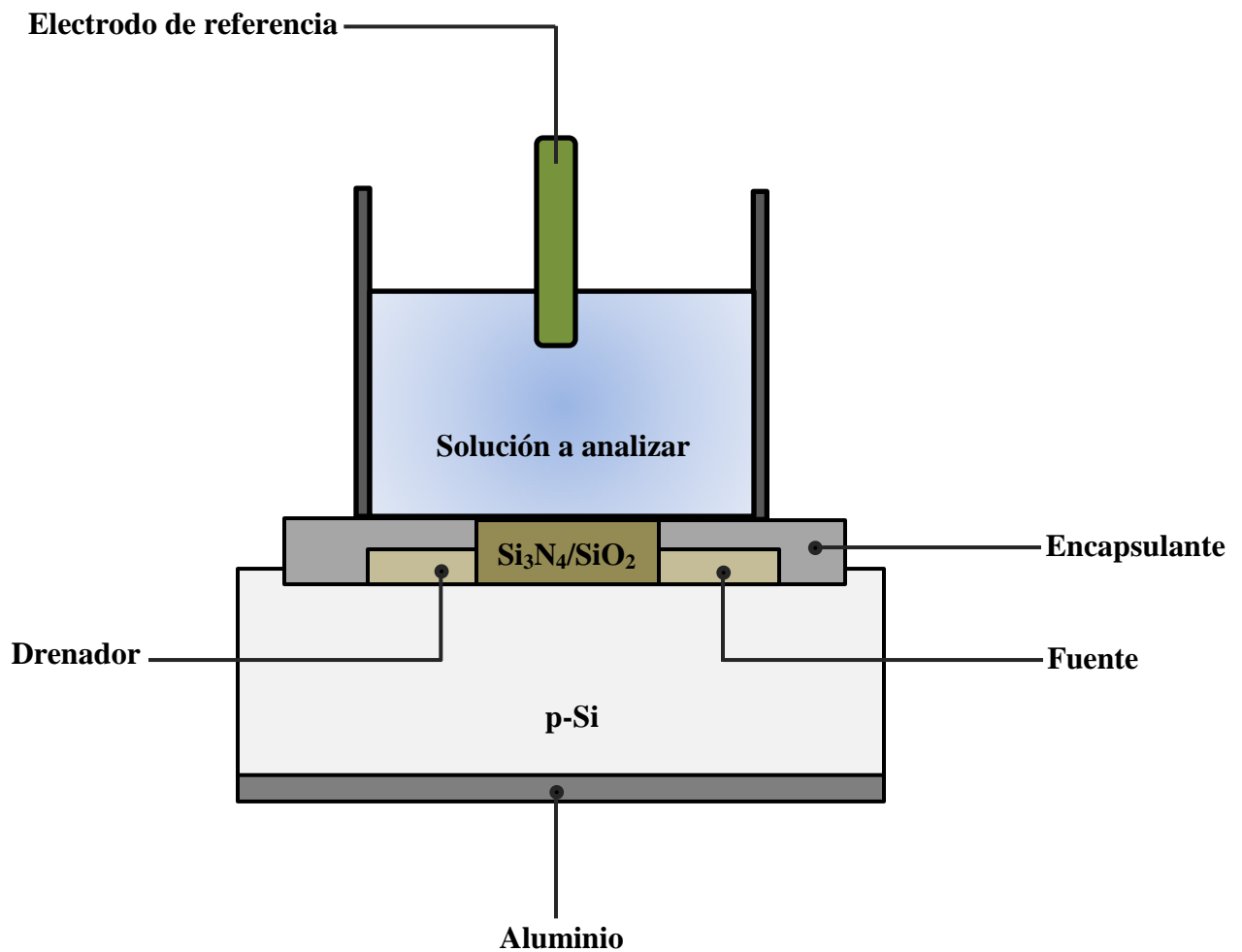


Figura 12: Representación de un transistor ISFET

La sensibilidad al cambio de pH de la capa inorgánica aislante; como SiO_2 , Si_3N_4 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 y $\alpha\text{-WO}_3$, es el componente característico que determina el principio de funcionamiento. Los

aislantes de tipo Si_3N_4 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 y $\alpha\text{-WO}_3$ son caracterizados por una gran estabilidad de respuesta, un largo y efectivo tiempo de vida así como una alta selectividad ya que la influencia de los iones Na^+ y K^+ es muy pequeña. [28]. No obstante, la desventaja principal es la disminuida utilización en la tecnología microelectrónica del Si ya que los procesos de deposición y grabado no se han compatibilizado completamente con los procesos de fabricación estándar actuales.

Existen fenómenos físicos y químicos complejos que explican el funcionamiento del ISFET, fundamentalmente fenómenos superficiales que son explicados por diversas teorías como la Teoría de los Enlaces Locales, la Teoría de la Doble Capa Eléctrica y la Teoría de efecto de campo en la estructura electrolito-óxido semiconductor. La primera teoría establece la existencia de zonas discretas de carga formadas por grupos $-\text{OH}$ considerando su carácter hidrofílico y al entrar en contacto directo con la solución se cargan positivamente con un ion hidrogeno; ó negativamente al perder un protón ó bien permanecer neutros provocando una variación de cargas superficiales repercutiendo en la generación de potenciales eléctricos que obedecen la ecuación de Nernst relacionando la interfase electrolito-aislante con la diferencia de potencial propuesto con la sensibilidad de pH por Yales, Levine y Healy y después aplicado por Siu y Cobbold. [29].

Transductores termométricos

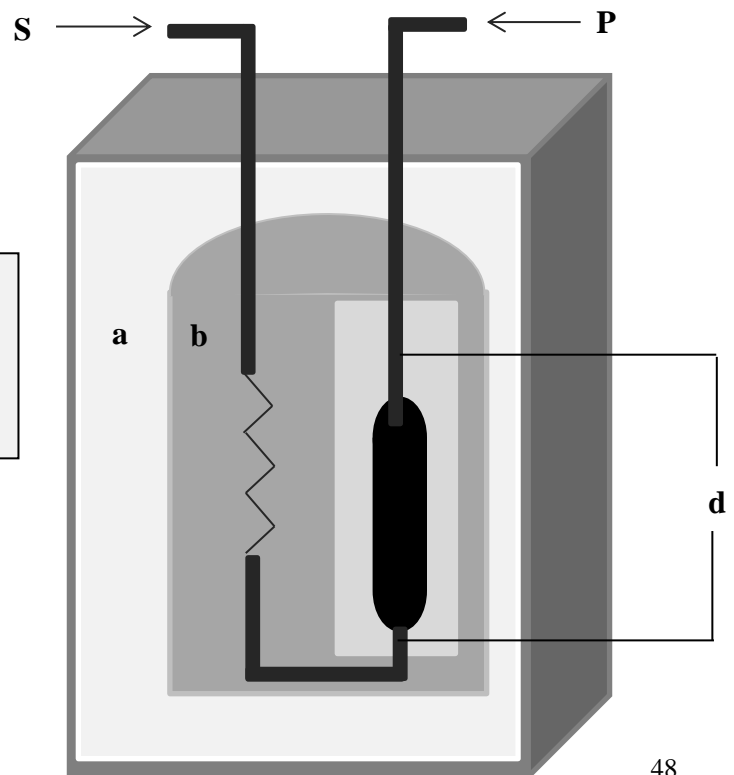
Los transductores termométricos o también conocidos como entalpimétricos se fundamentan en la cuantificación de la concentración del sustrato como consecuencia de la variación de entalpia de reacciones exotérmicas. El cambio de temperatura es el

factor primordial que de forma regular es determinado por termistores, termocuplas o termopilas de entrada y salida. Las termocuplas sencillas no son suficientemente sensibles para detectar variaciones de entalpia de reacciones enzimáticas. Por el otro lado, los termistores y termopilas son capaces de detectar ligeras variaciones.

Los termistores son óxidos metálicos unidos con semiconductores cristalinos que brindan una alta resistividad y una eficaz respuesta debido a su tamaño y capacidad calorífica reducida. Las termopilas se construyen al modificar las uniones termoeléctricas generando señales pasivas ideales para soluciones fluidas.

Se constituye de dos termistores, uno de ellos tiene una temperatura de referencia y el segundo es de trabajo, el bioreceptor inmovilizado se pone en contacto directo sobre el termistor de trabajo. El complejo reaccionante bioreceptor-sustrato puede consumir o liberar calorías que son medidas por los termistores o termocuplas.

Figura 13: Representación de un transductor termométrico: (a) cámara termoaislada, (b) intercambiador de calor, (c) reactor biocatalítico, (d) termistores interconectados.



En la figura anterior se representa un biosensor termométrico, por su cubierta se mantienen aislados de cambio ambientales que puedan interferir en la variación de temperatura interna, el enchaquetado adecuado (a) es indispensable para confinar la reacción química; la corriente del analito se hace pasar a través del intercambiador de calor (b). La reacción tiene lugar en el reactor biocatalítico (c), la diferencia de temperatura entre la entrada del analito (S) y la salida del producto (P) es detectada en los puntos (d) que puede variar entre 1 y 0.0001°C.

Las reacciones capaces de generar la diferencia de calor necesaria para este tipo de transductores son numerosas, en el siguiente cuadro se enlistan algunas.

Tabla 7: Reacciones caloríficas aptas para los transductores calorimétricos

<i>Analíto</i>	<i>Reacción</i>	<i>Biocatalizadores</i>
Antígenos	ELISA	Catalasa/anticuerpo
Ácido ascórbico	Oxidación	Ascorbato-oxidasa
Colesterol	Oxidación	Colesterol-oxidasa
Etanol	Oxidación	Alcohol-oxidasa
Glucosa	Oxidación	Glucosa-oxidasa
Glicerol	Catabolismo	Células de Gluconobacter oxydans
Peróxido de Hidrogeno	Redox	Catalasa
Lactato	Oxidación	Lactato-oxidasa
Penicilina G	Hidrólisis	β -lactamasa
Piruvato	Reducción	Lactato deshidrogenasa de levadura
Ácido Oxálico	Oxidación	Oxalato-oxidasa
Urea	Hidrólisis	Ureasa
Ácido úrico	Oxidación	Uriasa

Esta clase de transductores permite la implementación de varias reacciones en el reactor biocatalítico, permite producir reacciones secuenciales, utilizar células viables para bioconversiones o para controlar la presencia de sustrato, también hace posible el análisis para determinar la presencia de materiales tóxicos.

Transductores piezoeléctricos

Existen en la naturaleza algunos materiales con estructura cristalina asimétrica que al momento de ser sometidos a un esfuerzo mecánico y simultáneamente a una diferencia de potencial eléctrico experimentan una deformación capaz de generar carga eléctrica, a dicha propiedad se le denomina piezoelectricidad.

Los transductores piezoeléctricos se componen de dos superficies metálicas entre las cuales se localiza el material piezoeléctrico (cristalino –cuarzo-, cerámico –titanato de bario-, polímero –PVDF-, composite.) permitiendo aplicar tensión o soportar la generación de cargas. [30]

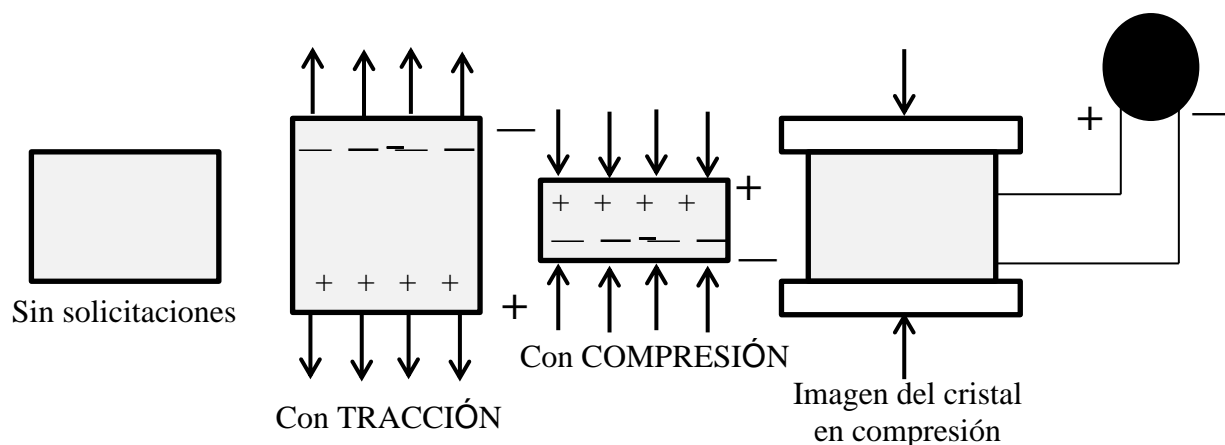


Figura 14: Representación del funcionamiento del cristal piezoeléctrico.

En la figura anterior se representa el funcionamiento básico del transductor piezoeléctrico, a la izquierda se observa un cristal sin solicitaciones es decir sin requerimientos de fuerza o compresión, en el segundo cuadro el cristal se encuentra ligeramente alargado ya que es sometido a una atracción, el tercer cristal está sometido a una compresión provocando una ligera compactación. En el cuarto y último cristal, generalmente cuarzo, se generan fuerzas electromotrices provocando la existencia de tensiones eléctricas y también de manera inversa aplicando tensiones eléctricas sobre uno de los ejes del cristal se producen tensiones mecánicas. La fuerza electromotriz originada por el piezoeléctrico es de pequeña intensidad pero es posible su medición, del orden de:

$$e = 2 \times 10^{12} \frac{C}{m^2}$$

Por cada Newton de fuerza aplicada [31].

La resistencia interna de los materiales aunque es grande no es infinita y considerando que las dos superficies metálicas conforman un condensador resulta en la falta de una respuesta continua limitando la capacidad de medir procesos lentos. Puede existir la necesidad de utilizar amplificadores electrométricos o de carga ya que la impedancia eléctrica de salida puede ser alta [30].

Los biosensores piezoeléctricos se construyen depositando el bioreceptor en la superficie del cristal permitiendo el contacto directo con la muestra de interés originando una variación de masa permitiendo determinar la variación en la frecuencia de oscilación. En la siguiente tabla se muestran diversas ventajas y desventajas que ofrecen este tipo de transductores.

Tabla 8: Ventajas y desventajas de transductores piezoeléctricos

Ventajas	Desventajas
Detección directa (sin marcaje) en tiempo real de la interacción. Análisis on-line Permite varios formatos de inmunoensayo Uso sencillo Bajo costo Alta sensibilidad (1 a 400 pC/m²/N/m²) Alta rigidez mecánica Sensibilidad direccional Pequeño tamaño	Falta de selectividad Tiempos de incubación relativamente largos Problemas con la regeneración de superficie Fragilidad Numerosos pasos de lavado y secado Dificultades para inmovilizar sobre cristales Es necesaria la calibración de cada cristal Interferencias cuando se usa en medio líquido

Principalmente existen dos tipos de transductores piezoeléctricos:

- *Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)* por sus siglas en ingles
- *Ondas acústicas de superficie (SAW)* por sus siglas en ingles

Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM):

Los sensores QCM son construidos con una fina lámina de cristal de cuarzo cortada en un ángulo de 35° situado entre dos electrodos, donde la frecuencia de oscilación del sensor viene dada por el grosor de la lámina de cuarzo y el corte del cristal original para obtener la lámina [32].

Generalmente tiene un diámetro de 0.25 a 1 pulgada, resuenan entre 5 a 30 MHz. La magnitud a medir es la variación de frecuencia que dependerá del espesor del cristal de cuarzo, electrodos de metal y el grosor del material depositado en la superficie del cristal. La alta precisión en las mediciones de

frecuencia permite detectar muy pequeñas cantidades del material depositado, por ejemplo 100 picogramos en 1 cm².

La microbalanza de cristal de cuarzo utiliza su propiedad única de vibrar en una frecuencia característica al aplicar un campo eléctrico, se fundamenta en medir la frecuencia resonante de un cristal de cuarzo cubierto con un electrodo al cual se le adhiere, química o físicamente, una determinada sustancia. La adhesión o incorporación de una especie al electrodo modifica la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo. El cambio de frecuencia (Δf) está relacionado al cambio de masa correspondiente (Δm).

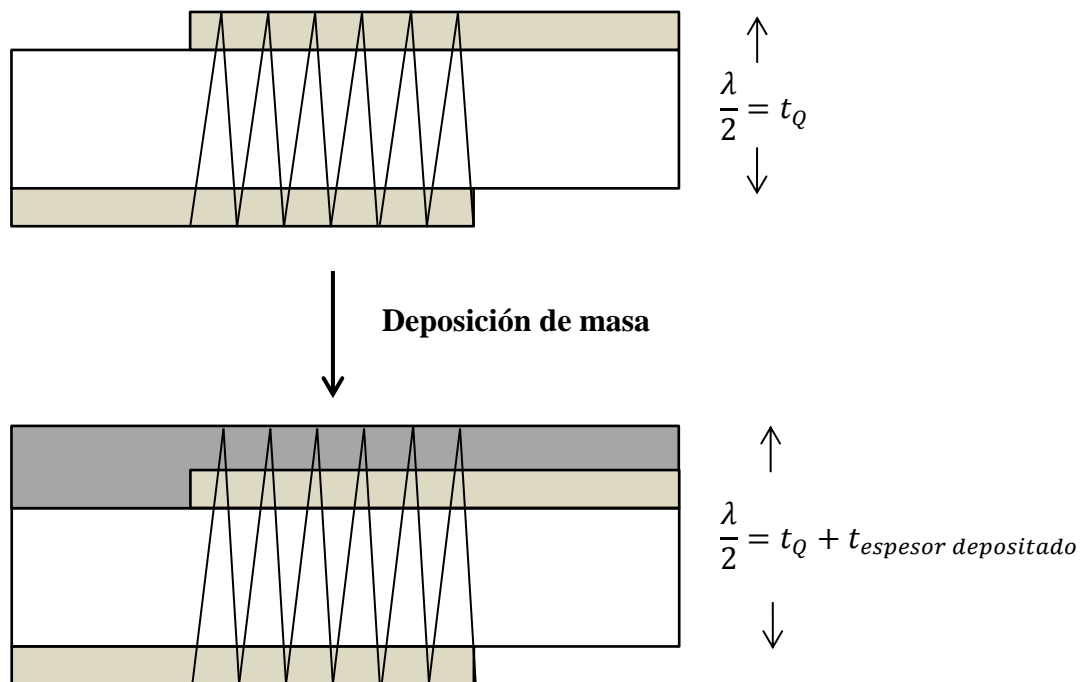


Figura 15: Representación del cambio de frecuencia de QCM

En 1959 G. Sauerbrey relaciona por primera vez el principio de piezoelectricidad descrito por el matrimonio Curie en 1880 y la construcción del primer cristal de cuarzo oscilatoriamente controlado en 1921, proponiendo una estrecha relación entre la

frecuencia de oscilación y la masa, desarrollando una ecuación ahora conocida como la ecuación de Sauerbrey.

Ecuación de Sauerbrey:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{A\sqrt{\rho_a\mu_a}} \Delta m$$

Dónde:

f_0 Es la frecuencia inicial de oscilación

Δf Es el cambio de frecuencia en Hz

Δm Cambio de masa

A Área efectiva del cristal

ρ_a Densidad del cuarzo (2.648 g/cm³)

μ_a Módulo de corte del cuarzo (2.947 x 10¹¹ g/cm*s)

Una de las primeras aplicaciones que tuvo la QCM fue para cuantificar la deposición de metales en los evaporadores de metal de alto vacío permitiendo obtener en tiempo real mediciones rápidas y acertadas de espesores en unidades de Angstrom. Alrededor de 1980 gracias a los avances en esta metodología se realizaron las primeras mediciones dinámicas, cristales de cuarzo recubiertos y al mismo tiempo sumergidos en un líquido. Esta oportunidad de realizar en tiempo real y de manera directa la medición de variación de masa ofreció una nueva visión de esta técnica no disponible en ese momento. Konash y Bastiaans estudiaron el comportamiento del cristal de cuarzo cuando se hace pasar un flujo por una celda del detector de un cromatógrafo de líquidos donde observaron cambios en la frecuencia de resonancia del cristal al pasar diferentes líquidos a través de la celda [33].

Más tarde Nomura y Minemura lograron relacionar experimentalmente los cambio de frecuencia, la densidad del

fluido y la conductividad [34]. Después Bruckenstein y Shay estudiaron los cambios en la frecuencia del cristal a partir del recubrimiento de la superficie por metales y la formación de óxidos corroborando la sensibilidad de la técnica en fluidos y en vacío [35]. Años más adelante Kanazawa en 1985 describió a la técnica de QCM como “in situ” ya que monitoreaba en tiempo real el espesor de la superficie y la velocidad de deposición, por lo que también ha sido utilizada para describir estudios cinéticos de crecimiento de materiales con aplicaciones fotovoltaicas como CdS, CdSe y Zn(Se,O) [36], [37] y [38] .

Los desarrollos más recientes han manifestado una nueva capacidad de medir viscosidad y densidad de los líquidos [39]. Una variante ampliamente utilizada es la microbalanza electroquímica utilizando caras de una lámina de cuarzo para soportar al electrodo de trabajo en la celda electroquímica que está en contacto directo con la solución electrolítica permitiendo estudiar numerosos procesos físico-químicos [40] como electrodeposición, electrocristalización, electrodisolución en corrosión, electrocromismo, entre otros [41], [42] y [43].

1. 4 Características de funcionamiento del transductor

Cada uno de los tipos de transductores existentes mantiene una relación ideal de medida-salida que es descrita mediante una ecuación por una representación numérica o gráfica. Esta idealidad en muchos casos puede ser de forma lineal cuya pendiente es la función de transferencia. Pero resulta complicado fabricar transductores que cumplan con esta condición de idealidad por lo que en la práctica se emplean transductores con una alinealidad menor al 0.25% considerándose este rango de respuesta como lineal.

En caso de que el transductor tenga una respuesta no lineal, se limitara su uso solo a aquellas zonas en las que la respuesta cumpla con la linealidad. Pero si la alinealidad es total se requiere de linealizar la señal, la característica de alinealidad puede ser originada por el elemento sensor o la configuración utilizada para excitar o extraer la señal.

La linealización se realiza de dos formas:

- *Linealización por software:*

La señal producida por el sensor es digitalizada y procesada por un microprocesador o microcontrolador. La FT se define con una magnitud de orden mayor a la precisión necesaria, es requisito definir completamente la función de transferencia (FT) al estar normalizada se representa en forma de tablas disponibles para ser consultadas por el microprocesador y así poder linealizar la señal así se realiza una aproximación a los valores teóricos de la curva.

Es necesaria una amplificación de señal del sensor de por lo menos de 100mV, si es requisito una precisión rigurosa o un determinado número de canales se debe contar con una gran cantidad de circuitos para montaje complejo

- *Linealización por hardware*

Se utiliza esta clase de linealización cuando los sensores presentan una dispersión diferente al contenido de la tabla programada en el microprocesador y es indispensable registrar nuevos parámetros. Se hace uso de una red pasiva para linealizar la respuesta, también

se puede utilizar un procesamiento analógico y una aproximación lineal por segmentos con diversas secciones.

1. 5 Selección y utilización de transductores

Se deben considerar una serie de características para determinar la capacidad de medición del transductor y discernir en su elección:

Rango: el rango debe ser lo suficientemente amplio para abarcar todas las magnitudes esperadas a medir.

Sensibilidad: el transductor debe ser capaz de producir suficientes señales de salida para obtener resultados significativos.

Efectos de carga: es deseable utilizar factores de corrección para compensar las lecturas de pérdida de consumo de energía del efecto físico del transductor.

Respuesta a la frecuencia: se debe tener una velocidad de respuesta máxima al fenómeno.

Formato de salida eléctrica: debe tener un valor compatible con el sistema de medición.

Impedancia de salida: los valores de impedancia de salida deben ser contrastantes con las siguientes etapas eléctricas.

Requerimiento de potencia: se debe confirmar la disponibilidad de fuentes de poder adecuadas

Medio físico: el transductor debe ser resistente a variaciones de cambios ambientales como temperatura, humedad y sustancias químicas corrosivas.

Errores: se deben disminuir y controlar los errores inherentes al procesos o aquellos originados por condiciones medio ambientales.

1. 6 Clasificación de biosensores

Como vimos en la figura 6 existen múltiples categorías para clasificar los biosensores, la interacción del bioreceptor con el analito es una propiedad indispensable de los biosensores, esta puede tener dos naturalezas.

Según el tipo de interacción los biosensores se dividen en dos grandes áreas:

- **Biosensores biocatalíticos**

Los biosensores biocatalíticos son aquellos que hacen uso de catalizadores biológicos, requieren de mediadores en la reacción para aumentar su velocidad. En la mencionada reacción participan varios reactivos o sustratos para generar diferentes productos. Al finalizar la reacción el biocatalizador se regenera posibilitando su reutilización.

Los biocatalizadores suelen ser sistemas que se encuentran en su medio natural como células completas, enzimas, orgánulos celulares, tejidos animal o vegetal, sistemas multienzimáticos aislados [44]. Son útiles para determinar la presencia de los sustratos participantes al detectar la desaparición de un tipo conocido de co-sustrato diferente del que se busca cuantificar; o bien la aparición de algún producto conocido.

También se utilizan biocatalizadores para determinar la presencia de sustancias tóxicas como herbicidas e insecticidas que inhiben de manera selectiva la actividad catalítica de los sistemas enzimáticos. Se puede confirmar la participación del biocatalizador en la reacción cuando no se obtienen los productos deseados en

presencia de los sustratos correspondientes o cuando dicha reacción se realiza en menor extensión.

- Biosensores por bioafinidad

Los biosensores por bioafinidad tienen su fundamento en la interacción analíto-elemento de reconocimiento sin la intervención o transformaciones catalíticas produciendo un complejo analíto-receptor en el equilibrio de reacción.

En la interacción analíto-elemento de reconocimiento no existe el consumo de sustrato y tampoco se generan productos, se hace necesaria la utilización de un marcaje del elemento de reconocimiento que este compitiendo con el analíto por unirse al receptor, con ayuda de una enzima fomentando una reacción biocatalítica complementaria que es detectada por el transductor [45].

Esta clase de biosensores son útiles para detectar material genético de microorganismos, la presencia de patógenos, pesticidas o cualquier sustancia que produzca una respuesta inmune. Los bioreceptores más utilizados son anticuerpos, lectinas, receptores, células completas, ácidos nucleicos, PIMs, aptámeros y PNAs.

Otra forma de detección directa es mediante los cambios de masa en superficie y/o también en los cambios en las propiedades de la luz que son producidos como consecuencia de la interacción analíto-receptor.

Una desventaja de este tipo de biosensores ante los biocatalíticos es la necesidad de lavados posteriores, la eliminación de moléculas marcadas y la implementación de sustratos para desencadenar la reacción ha catalizar por la enzima que funciona como marcaje [44].

El rango de concentraciones del analíto es limitado, ya que se puede alcanzar la saturación del receptor evitando el monitoreo constante de la concentración del analíto. Es indispensable en la interacción biocatalítica el contacto directo del elemento de reconocimiento y el analíto pero puede ser un inconveniente para la utilización de matrices biológicas complejas.

Tabla 9: Criterios para seleccionar un biosensor

<i>Tipo de biosensor (transductor)</i>	<i>Tipo de cambio detectado</i>	<i>Elemento de reconocimiento biológico</i>	<i>Utilización</i>
Calorimétrico (térmico o termométrico)	Temperatura	Enzima	Puede detectar diferencia de temperatura de 0.0001°C
Potenciométrico (selectivo de iones)	Evolución/consumo de un gas	Enzima	Detección de ureasa
Amperométrico	Reacción redox	Enzima	Detección de glucosa
Conductimétrico	Conductividad eléctrica (debido al cambio de concentración del ion)	Enzima	Detección de ureasa
Óptico	Fluorescencia/absorbancia/propiedades ópticas de superficie	Enzima, anticuerpo, DNA/RNA	Luciferasa para la detección de bacterias
Piezoeléctrico	Frecuencia de resonancia de ciertos cristales debido a cambios de masa	Anticuerpos	Detección de cocaína usando anticuerpos
Célula completa	Basado en detectores amperométricos, potenciométricos y termométricos	Células vivas/muertas	Acido nicotínico usando Lactobacillus

Tabla 10: Comparación entre diferentes tipos de biosensores

<i>Característica</i>	<i>Tipo de biosensor</i>					
	<i>Amperométrico</i>	<i>Conductimétrico</i>	<i>Potenciométrico</i>	<i>Piezoeléctrico</i>	<i>Termométrico</i>	<i>Óptico</i>
Costo	Bajo	Muy bajo	Bajo	Bajo	Alto	Bajo
Confiabilidad	Alto	Medio	Medio	Bajo	Alto	Bajo
Sensibilidad	Medio	Medio	Medio	Bajo	Alto	Medio
Complejidad	Alto	Bajo	Medio	Bajo	Alto	Medio
Velocidad de respuesta	Medio	Medio	Medio	Alto	Muy alto	Medio
Uso de corriente	Alto	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto

La región grafica en la figura 16 se obtiene la señal se caracteriza por tener un comportamiento lineal por lo que su pendiente proporciona información relacionado a su concentración. Es deseable que los biosensores tengan una respuesta eficiente y reproducible con el paso del tiempo, esto ha sido un área de oportunidad para el desarrollo de diversas técnicas y materiales para inmovilizar el material biológico en el sensor aumentando su tiempo de vida manteniendo constante su actividad sin alterar su composición.

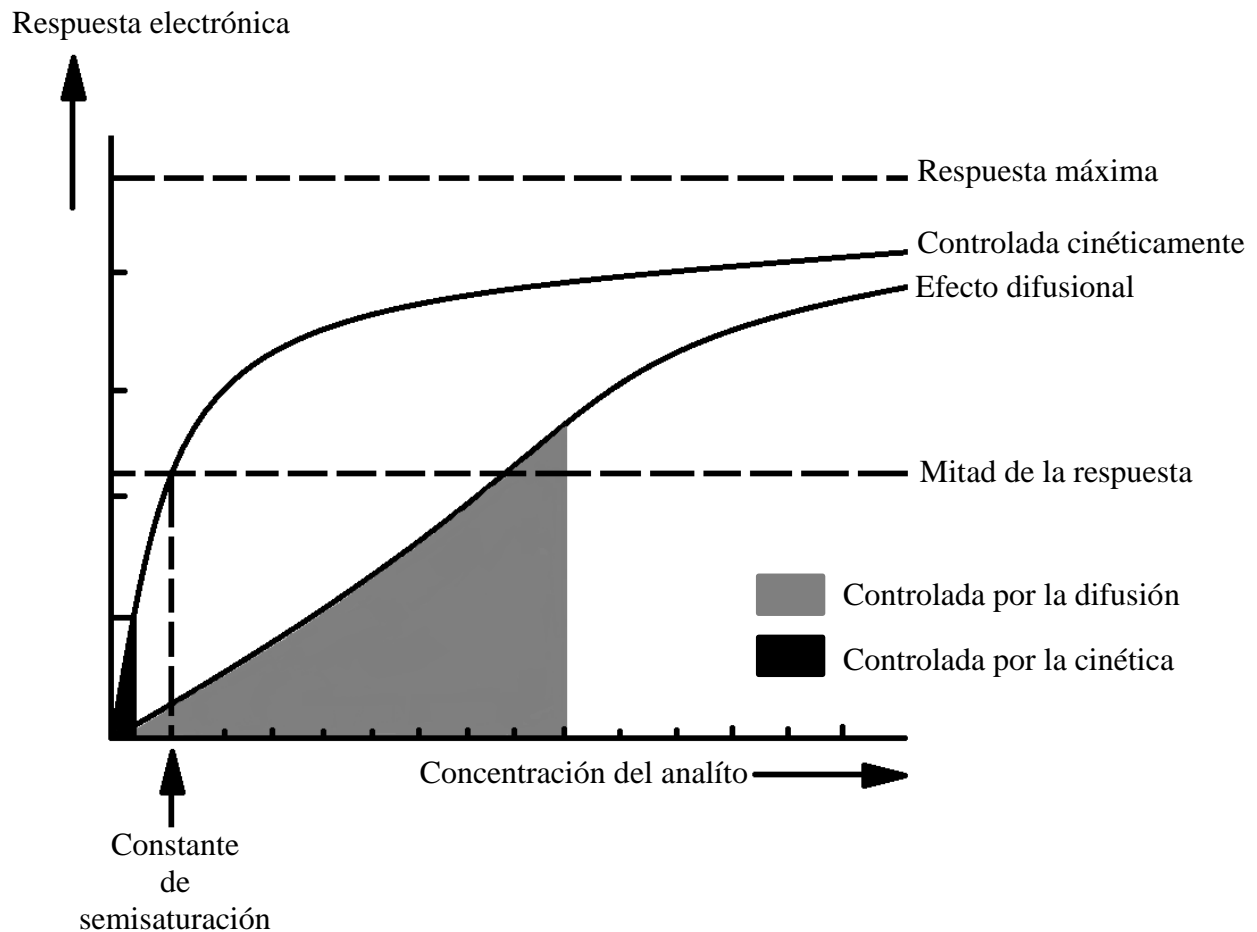


Figura 16: Intervalo de respuesta de un biosensor en condiciones de cinética biocatalítica y control difusional

1. 7 Estado del arte en México.

Como ya se mencionó, al desarrollarse el primer biosensor se abrió el camino para una nueva línea de investigación que rápidamente fue apasionando a los investigadores, Estados Unidos y Europa han sido punta de lanza en este desarrollo desde iniciados los años sesenta.

En México, se inician las primeras investigaciones en los años ochenta y en 1998 se tiene el primer registro de la fabricación

de un electrodo microbiano para la determinación de DBO por el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM [46]

Actualmente se han unido otras unidades de la Universidad Nacional Autónoma de México como el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina donde desarrollan bases bioquímica para biosensores, Instituto de Biotecnología, el Instituto de investigaciones genómicas, la Facultad de química, el Instituto de biotecnología, entre otras.

Otra destacable institución mexicana es la Universidad Autónoma Metropolitana UAM donde también se han desarrollado grupos de investigación de biosensores como el encabezado por la Dra. María Teresa Ramírez Silva, perteneciente al departamento de química unidad Iztapalapa, que en colaboración con la Université de Perpignan Via Domitia fueron galardonados en 2012 con el premio a la investigación por UAM al elaborar un biosensor para determinar compuestos fenólicos en infusiones de té con beneficios antioxidantes para la salud humana. También se destaca el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular dirigido por el Dr. Nikola Batina,

Por otra parte, el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional CINEVESTAV-IPN se han formado líneas de investigación interdisciplinarias como el departamento de bioelectrónica, ingeniería electrónica, física, biotecnología y bioingeniería, entre otros.

Los centros mencionados anteriormente solo comprenden el centro de la república mexicana, pero el auge de los biosensores ha llegado a diversos estados. En San Luis Potosí se encuentra el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por parte de CONACyT; también está la Universidad Autónoma de San Luis Potosí en el Instituto de Física y la Coordinación para la Innovación y la Aplicación de la Ciencia y Tecnología han desarrollado investigación con biosensores construidos con paredes de nanotubos de carbono aumentando su resistencia.

Otras instituciones con investigaciones relevantes son la Universidad del Estado de Hidalgo en el centro de investigaciones químicas, el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. CICESE.

La diversificación que ha tenido esta novedosa línea de investigación ha sido de gran atracción para los científicos nacionales, ya que como se mencionó anteriormente los biosensores tienen grandes áreas de aplicaciones por lo que su utilización no está limitada.

Por último, el Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California en 2006 da inicio el laboratorio de electroquímica aplicada donde se ha establecido la línea de investigación de biosensores electroquímicos dirigido por la Dra. Margarita Stoytcheva y el Dr. Roumen Zlatev donde este trabajo fue realizado.

1. 8 Biosensores comerciales

1975 se tiene el primer gran éxito comercial de los biosensores fue desarrollado por “Yellow Springs Instrument Company”

Figura 17: Medidor de glucosa YSI modelo 23A; 115V, 60Hz, 0.5A



Usado para medir la glucosa en el plasma sanguíneo o suero de sangre para fines de diagnóstico in vitro, la sangre entera se también podía utilizar ajustando la lectura al valor de hematocrito de la sangre. Este dispositivo se utilizó de manera satisfactoria en centros médicos pero seguía como área de oportunidad el permitir a los pacientes realizar dicha detección en la comodidad de sus hogares o de manera remota, ya que la diabetes, lamentablemente, es uno de los padecimientos de mayor prevalencia a nivel mundial. Por lo que los investigadores se dieron a la tarea de miniaturizar el biosensor manteniendo su eficacia. En la siguiente imagen se muestra el gradual progreso en el diseño del medidor de glucosa.



Figura 18: Cuatro generaciones de medidor de glucosa en sangre, 1993-2005 de derecha a izquierda. Los tamaños de muestra varían desde 30 hasta 0,3 μL . Los tiempos de prueba varían de 5 segundos a 2 minutos.

El biosensor para la detección de glucosa fue el primer dispositivo en ser exitosamente comercializado hasta la actualidad han sido numerosas compañías que han iniciado negocios fructíferos como:

- Dexcom
- iBGStar[®]
- LifeScan OneTouch
- Abbott
- Bayer
- Nova
- WaveSense

Pero la implementación de biosensores para detecciones médicas ha sumado adeptos, tal es el caso de las comúnmente llamadas “pruebas de embarazo caseras”, entre otras aplicaciones.

En el ámbito de medio ambiente la compañía PRO-LAB® ha comercializado un kit de prueba para pesticidas en agua utilizando tiras de prueba de grado de laboratorio de precisión y fiabilidad.

Uno de los biosensores comerciales más exitosos de la industria se utiliza en el control de calidad de las aguas residuales como los analizadores de demanda biológica de oxígeno, como la empresa inoLab®.



Figura 19: Dispositivo inoLab® modelo BSB/BOD 740

En la figura anterior se muestra el medidor de oxígeno disuelto para el control de las aguas residuales, el oxígeno disuelto es un parámetro utilizado para medir la calidad de los resultados de tratamiento de agua y en las aguas residuales puede gestionar hasta 540 muestras diluidas.

En la industria de alimentos Gwent Group ha desarrollado biosensores para detección de glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa.

En los últimos años hemos los dispositivos para detectar alcohol en bebidas y aliento que han sido desarrollados por compañías como:

- Ultramind Technologies India Ltd.
- Core Safety Groups
- Sunshine instruments
- SGM Lab solutions
- Nunes instruments, entre otras.

Figura 20: Analizador de alcohol en aliento. Modelo No. PRO Classic 21 detecta la concentración de alcohol en el aliento de una persona que puede variar desde 0,00 hasta 0,40% del alcohol presente en aliento.



Un inesperado sector comercial ha sido el insomnio, la compañía Zeo Inc, ha desarrollado un dispositivo personal que te dice cómo te duermes, y te ayuda a encontrar maneras de mejorar su sueño, mide con precisión la calidad de su sueño y cantidades resultantes de sueño en casa.

Figura 21: Dispositivo Zeo para conocer la calidad del sueño.



CAPÍTULO II

Tripsina

2

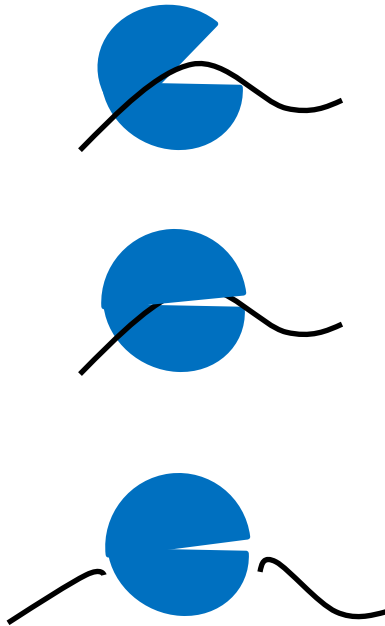


Figura 22: Representación de una proteasa facilitando la liberación de péptidos en la digestión proteolítica

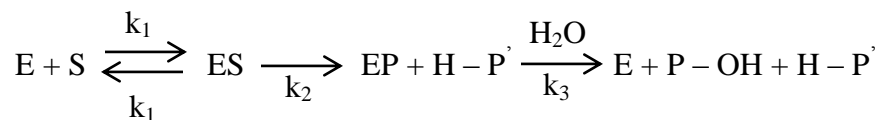
Las proteasas o péptidas (E.C. 3.4) son las enzimas que catalizan el proceso de degradación de las proteínas (la proteólisis). Se agrupan en cinco clases principales en función de su mecanismo de catálisis: serín-, treonin-, cistein-, aspartil- y metalo- proteasas. Se sintetizan en todos los organismos y constituyen 1-5% del contenido del genoma. Las reacciones proteolíticas tienen varias funciones para la célula, entre ellas: digestión de proteínas de los alimentos como fuente de aminoácidos, conversión de proteínas inactivas (pro-enzimas, zimógenos, pre-hormonas) en sus formas funcionales finales, separación de proteínas virales, etc. [47].

Las serín-proteasas o también conocidas como proteasas pancreáticas son enzimas localizadas en el sistema digestivo. Su función principal radica en la hidrólisis de los enlaces peptídicos y regulación de la actividad de sistemas fisiológicos e.g., coagulación sanguínea, esporulación bacteriana, fertilización, etc. El proceso digestivo en los mamíferos se lleva a cabo por la descomposición de las proteínas en cadenas cortas de aminoácidos por las serín proteasas pancreáticas. Por su función relevante en la absorción de nutrientes son las enzimas de mayor atracción para los investigadores, son enzimas extracelulares que se pueden separar y purificar fácilmente en cantidades considerables [48]. Se denominan serín-proteasas debido a la posesión de un residuo Ser altamente reactivo y esencial para su actividad enzimática que es la principal característica del mecanismo catalítico.

Las serín-proteasas son sintetizadas por las células de los acinos pancreáticos en un estado de precursores inactivos o pro-enzimas y secretadas por el conducto pancreático en el interior del duodeno donde son activadas [48],[49] y [50] por el anclaje proteolítico en

el enlace peptídico(amida) más cercano al extremo con terminal-amino de la cadena poli-peptídica [51]. Esta ruptura en el enlace peptídico permite un cambio conformacional [52] y [53] de las pro-enzimas en su forma activa como enzimas. Las enzimas activas son responsables de catalizar el rompimiento de las proteínas en cadenas más cortas hasta obtener aminoácidos individuales.

La cinética de la hidrolisis proteolítica surge por un complejo conjunto de tres reacciones de ruptura de enlaces simultáneas produciendo distintas especies cargadas. En la primera etapa se forma el complejo enzima-sustrato (proteína); en la segunda etapa se produce la liberación de un péptido al momento de la rotura en la terminal-amino. En la tercer y última etapa se separan los restos de péptidos de la enzima mediante un ataque nucleofílico por H₂O. Los pasos anteriormente descritos se representan en la siguiente figura:



E: enzima, S: sustrato, P y P': péptidos resultantes, k_A: constante velocidad de reacción.

Figura 23: Mecanismo catalítico de una proteasa [54]

Las serín proteasas más estudiadas y mejor caracterizadas son tripsina, quimotripsina y elastasa, entre ellas tienen estructuras semejantes pero su principal distinción es su especificidad para hidrolizar de los enlaces peptídicos entre los diferentes aminoácidos presentes en la proteína (sustrato).

Estas enzimas serán proteasas comparten otra similitud respecto a su inhibición ante diisopropilfosforogluoridato (DFP) que reacciona con los grupos hidroxilos en el residuo ser específico del centro activo. [55]

Tabla 11: Selección de proteasas [56]

<i>Enzima</i>	<i>Fuente</i>	<i>Función</i>
Tripsina	Páncreas	Digestión de proteínas
Quimitripsina	Páncreas	Digestión de proteínas
Elastasa	Páncreas	Digestión de proteínas
Trombina	Suero de vertebrados	Coagulación sanguínea
Plasmina	Suero de vertebrados	Disolución de los coágulos sanguíneos
Calicreina	Sangre y tejidos	Control de flujo sanguíneo
Complemento CI	Suero	Lisis celular en la respuesta inmune
Proteasa acrosomal	Acrosoma de espermatozoides	Penetración del ovulo
Proteasa lisosomal	Células animales	Recambio de las proteínas celulares
Tripsina de insectos (enzimas de degradación del capullo)	Larvas de polillas	Disolución de la tripsina de los insectos después de la metamorfosis
Proteasa α-lítica	<i>Bacillus sorangium</i>	Posiblemente digestión
Proteasas A y B	<i>Streptomyces griseus</i>	Posiblemente digestión
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>	Posiblemente digestión

La conformación estructural de estas serán proteasas pancreáticas son prácticamente iguales constan de dos dominios compactos, similarmente plegados y dispuestos simétricamente por medio de dos pliegues en el eje de simetría. [55]

Las tres principales serán proteasas EC 3.4.21 se constituyen por “la triada catalítica” en el sitio activo característicamente formada por tres aminoácidos histidina, aspartato y serina. Aunque, difieren en los residuos del sitio activo localizados en bolsillos hidrofóbicos se muestran en la siguiente imagen:

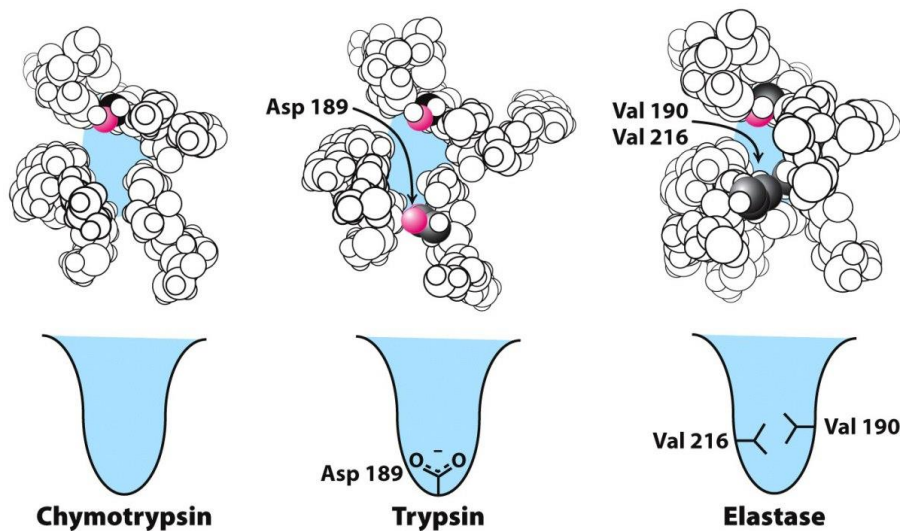


Figure 9.13
 Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

Figura 24: Bolsillos activos S1 de quimiotripsina, tripsina y elastasa.

La tripsina, que es el caso de estudio de este trabajo, es la proteasa con mayor grado de especificidad de las enzimas digestivas con la característica específica de hidrolizar los enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo está contiguo a los aminoácidos básicos lisina o arginina de manera independiente de la longitud de aminoácidos en la cadena.

2.1 Activación de la pro-enzima

Las enzimas de tipo tripsina son las proteasas principales en el sistema digestivo humano [57]. La enteroquinasa o también llamada enteropeptidasa, enzima segregada en pequeñas cantidades por la mucosa intestinal, es la pro-enzima responsable de atacar y anclarse al tripsinogeno que previamente abandonó el páncreas. El tripsinogeno tiene una secuencia inicial de aminoácidos no polares seguidos cada uno de ellos por la secuencia –Asp-Asp-Asp-Asp-Lis- terminando la secuencia con un aminoácido Ile o Val que contienen grupos amonio. La enteropeptidasa está diseñada para

específicamente atacar los inusuales enlaces peptídicos –Asp-Asp-Asp-Asp-Lis-. Por lo tanto, la enteropeptidasa ataca directamente la secuencia Asp₄-Lis cargados negativamente del tripsinogeno liberando aminoácidos con grupos terminales amino cargados positivamente. La acción más sobresaliente de la enteroquinasa es la hidrolización del tripsinogeno mediante corte proteolítico [58] fomentando la atracción electrostática de los grupos serilo, histidilo y aspartilo característicos del centro activo de la tripsina.

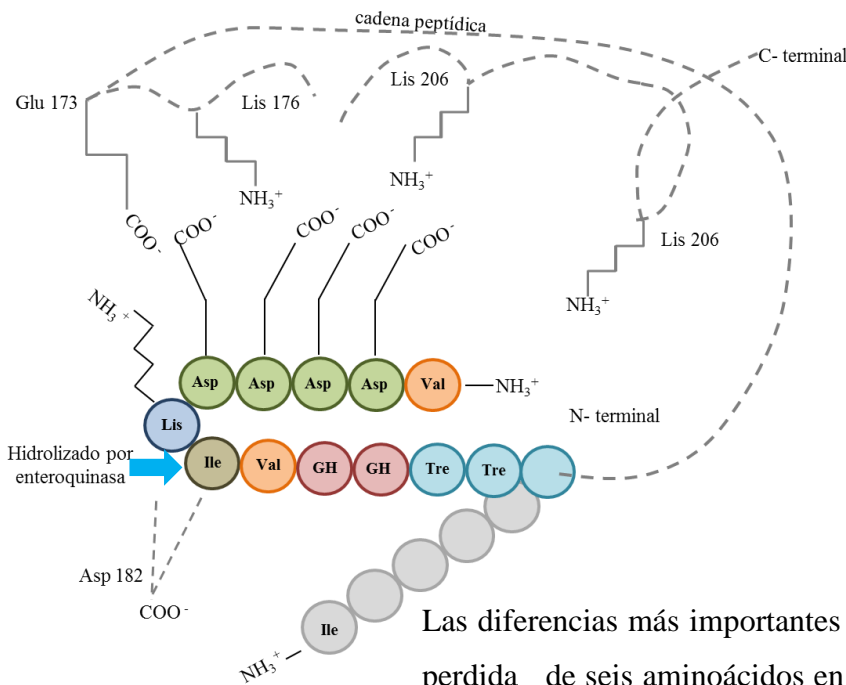
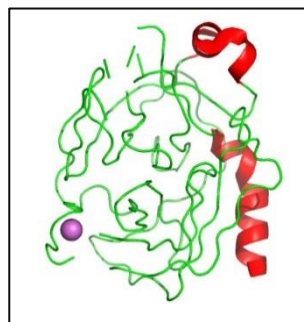
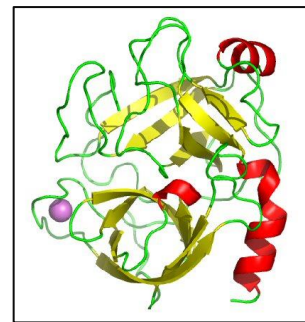


Figura 25: La conversión de tripsina activa lleva consigo la ruptura de un grupo lisilo, con eliminación de 6 aminoácidos a partir del N terminal. Estos seis aminoácidos se mantienen en una posición particular por uniones electrostáticas. Cuando el resto de la cadena se libera por hidrolisis, pasa a una conformación nueva que hace que la enzima sea activa.

Las diferencias más importantes entre tripsinogeno y tripsina es la pérdida de seis aminoácidos en uno de sus extremos terminales y las estructuras se superponen con una distancia media entre los átomos de 0.59 Å [59].



Tripsinogeno (1tgb)



Tripsina (5ptp)

Figura 26: La esfera violeta es un ion Ca²⁺, que ayuda a proporcionar estabilidad térmica.

Con la rotura del enlace y la formación de una nueva terminal amino se produce un cambio conformacional en la estructura perfilando la activa configuración catalítica. En la figura anterior se puede visualizar la comparación del cambio estructural en la transición de tripsinogeno a tripsina. En ambos casos, al saturar la última cadena de la pro-enzima permite la generación de la nueva terminal α -amino cargada positivamente en el residuo 16 para doblarse hacia el interior de la estructura globular formando un par de iones carboxilos en la terminal Asp-194 [60]. Al mismo tiempo, este tiempo se ve conjugado con movimientos en el bolsillo de unión específico, surge un ligero cambio en la interacción Asp-102 – His-57 – Ser-194 del sitio catalítico. La organización de los residuos catalíticos se lleva a cabo en el tripsinogeno, la característica principal a la relativa inactividad de la pro-enzima es que la unión de los sustratos normales se ve obstaculizada. [61] y [62].

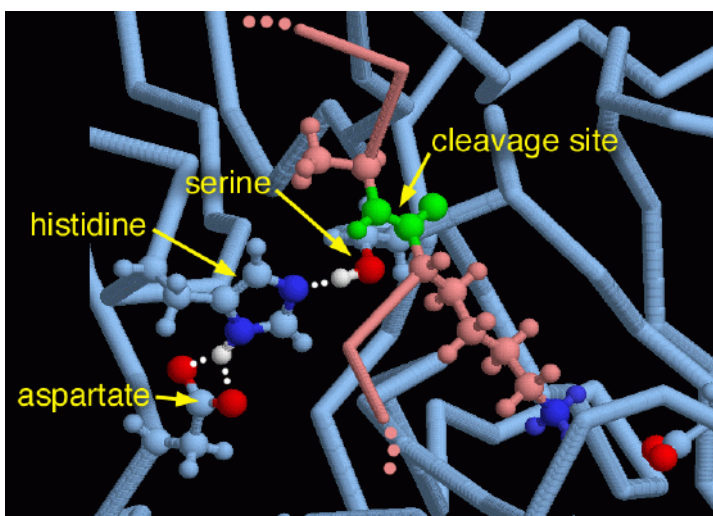
2.2 Especificidad y unión al sustrato.

La tripsina tiene un específico bolsillo de unión de cadena lateral en la superficie de la proteína cercano del sitio catalítico compuesto por los residuos 214-220 y 189-192 definiendo la especificidad primaria hacia cadenas laterales del sustrato inmediatamente antes de la unión peptídica susceptible de anclaje. El residuo 189 es ácido aspártico y está cargado negativamente por un grupo carboxilo ($pK_a=4.6$) que se localiza al fondo del bolsillo. El residuo 216 es glicina y se localiza a la entrada del bolsillo.

La especificidad principal de la tripsina radica en los aminoácidos básicos debido a sus cadenas laterales cargadas positivamente fuertemente unidas en su bolsillo catalítico [63], [64],[65], [66] y

[67]). En un intento para determinar la manera en que cadenas laterales de aminoácidos se unen, se determinó la estructura de la tripsina benzamidina. Benzamidina es un inhibidor competitivo, reversible y específico de la tripsina; tiene una cadena análoga lateral de aminoácido que se ancla en el bolsillo de unión específico [67].

Figura 27: Estructura de la tripsina unida a benzamidina, el centro es un aminoácido que se activa por histidina y aspartato. La histidina y el aspartato ayudan en la eliminación del átomo de hidrógeno de la tripsina (de color blanco), que hace que sea más reactivo cuando se ataca la cadena de proteína. La benzamidina es de color rosa, su lugar de la división en color verde, se mantiene lo suficientemente lejos para evitar el anclaje de otras proteínas en esta ubicación. Nótese también el largo aminoácido lisina que se extiende hasta la parte inferior derecha del sitio de corte, donde interactúa con otro aspartato de la enzima (mostrado en la esquina inferior derecha con oxígenos rojos). A través de esta interacción, tripsina favorece el corte en los lugares junto a los aminoácidos lisina o arginina.



En el caso de la tripsina, existe evidencia de pequeños cambios conformacionales en el complejo enzima-sustrato inducidos por la unión de las cadenas laterales en el bolsillo catalítico ayudando a acelerar la catálisis. En este momento el bolsillo catalítico se encuentra relativamente hidrofóbico y sin carga a un pH neutro; a la entrada se encuentra una larga cadena lateral hidrofóbica que obstaculiza la entrada y solo permite el ingreso de aminoácidos de cadena corta. [68].

También se ven involucradas otras zonas de enzima en la unión con la molécula de sustrato, así como la cadena lateral, de modo que la susceptible unión del sustrato se debe alinear apropiadamente en la superficie. Se puede presentar una especificidad secundaria hacia otras cadenas laterales en las moléculas de sustrato fisiológico que pueden correlacionarse con la

estructura de la enzima [69], aunque el papel de la especificidad secundaria es mucho más importante en las enzimas de alta especificidad biológica que en las enzimas digestivas.

Entre los mejores sustratos de tripsina se encuentran los inhibidores de la tripsina de origen natural. Se han desarrollado en paralelo con las enzimas de manera por lo que se unen muy estrechamente al sitio activo; estos inhibidores son sumamente significativos para el control fisiológico de las serín proteasas [70]. Por ejemplo, si inhibidores de la tripsina no fueron sintetizados junto con las proenzimas pancreáticas, una molécula de tripsina activada prematuramente podría iniciar una reacción en cadena de autocatalítica que puede activar las otras pro-enzimas y destruir cualquier proteína cercana. Los inhibidores están presentes para evitar tales autocatálisis y para controlar los procesos fisiológicos mediante enzimas proteolíticas. La estructura de un inhibidor de tripsina intramolecular aislado de páncreas bovino y otros órganos (PTI) tiene un peso molecular de 6500 determinado por R. Huber et al (1970-1971).

Hay una diferencia muy importante entre los modelos de unión de sustrato predichos y las estructuras de los complejos de inhibidor-tripsina, el inhibidor y la tripsina y se unen covalentemente entre sí a través de un enlace Oxígeno-Carbono entre el hidroxilo Ser-195 y el grupo carbonilo Lys-15 en el complejo tripsina-PTI y entre el hidroxilo de serín y el carbono carboxilo de Arg-63 en el complejo tripsina-STI (inhibidor de tripsina de soya. Estos complejos han mostrado que pueden presentar estructuras tetraédricas que probablemente se asemejan a los intermedios normales en la catálisis de la serín proteasa. Estos y otros estudios cristalográficos y químicas han producido modelos detallados para la asociación de enzima y sustrato antes de la catálisis, estos modelos sugieren

formas en que los grupos químicos sobre la enzima pueden participar en la catálisis.

2.3 Correlación del centro activo con el pH

Para la hidrólisis de péptidos, amidas o ésteres de la tripsina y la quimotripsina son en forma de campana y refleja la máxima actividad enzimática aproximadamente a pH 8. El pK_a de tripsina es 10.1 [71] permite alcanzar el valor máximo en la curva de pH. Fersht y Requena demostraron esta ionización, que controla la conformación de la enzima y la unión del sustrato (K_m) se asocia directamente con la titulación de la terminal α -amino Ile-16. El puente salino interno formado por este grupo amino y la cadena lateral de Asp-194 en la enzima activa se rompe a un valor de pH alto, donde la desprotonación del grupo amino favorece una conformación alternativa para la enzima.

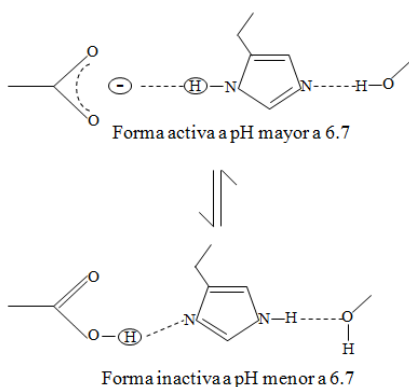


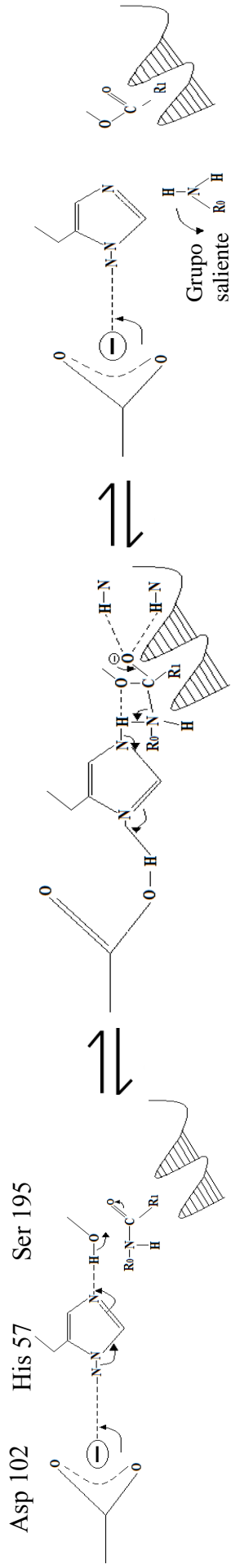
Figura 28: Ionización del sitio activo en rango de pH de 4.0 a 8.0

La mínima actividad enzimática se exhibe alrededor de pK_a de 6.7; la protonación de este grupo afecta negativamente tanto a la acilación y la desacilación [72]. A menudo se ha asumido que este grupo corresponde a His-5. Jencks (1969), sin embargo, ha señalado que este grupo no es obligatoriamente His-57, pero podría ser algún otro grupo en la enzima ya sea controlando la conformación o efectuando un cambio en la velocidad cerca de este pH.

En un pH de 4.0 la terminal imidazol His-57 es esencialmente neutro y el pK_a de Asp-102 es 6.8

2.4 Mecanismo catalítico: Hidrolisis

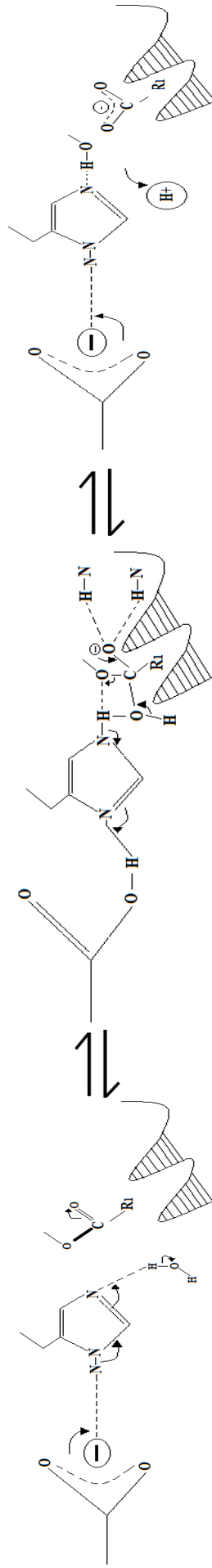
En la sección anterior se mencionaron estudios importantes explicando la transferencia de protones, el ion aspartato del residuo 102 puede actuar como base química apta para recibir un protón de la terminal histidina durante la catálisis [73] es uno de los mecanismos más importantes para describir el proceso de hidrolisis en la tripsina. En conjunto, Asp-102 y His-57 son responsables del transporte de ida y vuelta de los protones entre enzima y sustrato, por lo que el mecanismo se puede describir mejor como un ataque nucleofílico con una catálisis basada en His-57 [72] y [74] y Asp-102. La diferencia principal entre esta reacción y una hidrolisis no enzimática es la unión de la enzima y el transporte efectivo de protón; la mínima interferencia en este transporte inhibe la catálisis. El esquema del mecanismo de ionización mostrado en la figura anterior es compatible con la mayoría de datos experimentales relativos a la hidrólisis de péptidos, ésteres o amidas por la tripsina. En el primer paso (I), el sustrato y la enzima forman un complejo Michaelis seguido de un ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo de Ser-195. A medida que avanza la reacción, los giros hidroxilos alrededor del enlace C_{α} - C_{β} forma un enlace químico covalente con el sustrato de carbono en los pasos I – II [75]. Se transfiere un protón del grupo hidroxilo a la terminal His-57 que eventualmente se entrega al nitrógeno del enlace peptídico en el sustrato. Como resultado de esta transferencia de protones, el protón previamente unido His-57 se transfiere al grupo carboxilo de Asp-102, que actúa como una base en esta reacción [73]. Aunque estas transferencias de protones son rápidas, los efectos del isótopo deuterio muestran que la transferencia de protones está implicada en la determinación de la etapa de catálisis [72] y [76].



Etapa I : Complejo E - S

Etapa II : Intermediario tetraédrico

Etapa III : Acil - Enzima



Etapa IV : Acil - Enzima

Etapa V : Intermediario tetraédrico

Etapa VI : Complejo E - P

Figura 29: Representación del mecanismo de hidrólisis de péptidos por tripsina, se esquematiza el transporte de protón.

Aunque la transferencia de protón entre el conjunto Asp-His-Ser sigue en debate, la carga negativa de Asp-102 será neutralizado mientras la carga negativa se desarrollara en el oxígeno carbonilo del sustrato. El imidazol His-57 permanecerá neutral durante toda la reacción al evitar la separación de cargas provocada por intermediarios desestabilizadores [73] y [77]. El transporte de protones puede ser en etapas, si las necesidades de energía de separación de cargas se compensan con una activación de entropía más favorable en un proceso de dos pasos [78].

El mecanismo catalítico puede reducirse al mínimo si es favorecido evolucionando el proceso entrópico a dos etapas al alinearse la transferencia de protones, esta ventaja ha sido observada en todas las estructuras de las serín proteasas. Así, la enzima puede aumentar la velocidad de reacción la energía ahorrada en la eliminación de separación de carga. Si este no fuera el caso, será innecesario utilizar tanto un Asp y un His para la base general de la catálisis. El Asp podría ser eliminado y His podría actuar como la base.

Después del ataque de la tripsina en el sustrato, se forma un intermediario tetraédrico de corta duración (II). Este intermedio se estabiliza mediante el enlace covalente a la enzima y por una serie de enlaces de hidrógeno. Las siguientes características estructurales del intermedio tetraédrico se basan principalmente en la determinación cristalográfica de diferentes estructuras de inhibidores de la tripsina.

El oxígeno sustrato cargado negativamente en el intermedio tetraédrico se estabiliza por enlaces hidrógeno a partir de los nitrógenos de amida de los residuos 195 y 193. La importancia de las amidas de Ser-195 y Gly-193 se observó por primera por Steitz,

Henderson y Blow (1969) y su rol en la estabilización del estado de transición fue postulado por Henderson (1970) y por Robertus et al. (1972). Otras formas de enlace de hidrógeno entre el grupo carbonilo de Ser-214 y el sustrato [75].

Una explicación para los poderes catalíticos excepcionales de enzimas, es la evolución de las enzimas de manera que puedan unirse de manera óptima a las estructuras en estado de transición en las reacciones que catalizan en lugar de los propios sustratos [79] y [80]. Los enlaces de hidrogeno en la estructura tripsina – sustrato en estado de transición puede ser una forma de estabilización del estado de transición, los enlaces de hidrogeno orientados pueden acelerar la reacción disminuyendo las altas barreras energéticas entre los estados intermediarios. La estabilidad de la estructura tetraédrica en los complejos de inhibidor de tripsina-tripsina es consistente con la hipótesis de la estabilización del estado de transición.

En la etapa II – III, se rompe el inestable enlace carbono-nitrógeno y el primer producto de la hidrólisis, una amina, se libera para difundirse, tomando un protón de la enzima. Al mismo tiempo, la parte unida del sustrato se reorganiza de manera covalente al intermediario acil–enzima (III). El desdoblamiento del intermediario acil–enzima (IV – VI) es el reverso microscópico de los pasos I – III; en este tiempo el agua es el grupo atacante. En la etapa V–VI se forma el segundo producto. Es un ácido que pierde un protón en la solución y se carga negativamente. Por primera vez (si el transporte de protones es concretado) hay dos cargas en el sistema. Estas dos cargas negativas se repelen entre sí y así ayudan a disociar el segundo producto de la enzima [81] regenerando la enzima libre.

La presencia de un grupo carboxilo de alto pK_a y una cadena lateral neutra de His-57 con un bajo pK_a puede sugerir dos razones evolutivas de peso por lo que la disposición Asp-His-Ser debe ser universal para las serín proteasas. En primer lugar, mediante la neutralización de una carga negativa Asp-102, en lugar de generar una carga positiva en His-57 durante la formación del intermedio tetraédrico, no habría ninguna separación de carga desfavorable. Esto contribuye a la reducción del estado de transición de energías internas, y por lo tanto mejorar la velocidad [77]. En segundo lugar, si el cargada Asp-102 es para ser un aceptor de protones a valores de pH fisiológicos, su pK_a debe ser mayor y debe tener acceso al donador de protones. El imidazol His-57 es ideal tanto para aislar Asp-102 del disolvente (a modo de elevar el pK_a del grupo carboxilo encerrado) y para funcionar como un conductor de protones, la transferencia de carga del grupo carboxilo al sustrato. También es importante señalar que tanto la separación inverso de los valores de pK_a de Asp-102 y His-57 y la estructura de tripsina a pH 7 y pH 8, que muestra una interacción simétrica entre la carga de Asp-102 y His-57 son a diferencia de la situación esperada en solución acuosa y reflejan un microambiente único para estos grupos. La reacción de catálisis de la tripsina ocurre en una forma única al suavizar la transición de un estado intermedio a otro. Esto pone de relieve la importancia del ajuste esteroquímico exacto y correcta orientación [82] del sustrato al momento que la reacción tiene lugar, en lugar de simplemente la generación de un sitio especialmente reactivos. Después de todo, un sitio muy reactivo pudiera reaccionar en formas mucho menos específicas. Es mejor tener un sitio catalítico moderadamente eficiente junto con una enzima muy selectiva [69].

2.5 Cinética enzimática: Tripsina

Las enzimas o catalizadores tienen la responsabilidad de disminuir la energía inicial requerida para llevar a cabo una reacción química, como se mencionó anteriormente, se caracteriza por acelerar una reacción sin alterar su integridad por lo que es posible su posterior recuperación. Las funciones termodinámicas de estado; energía libre de Gibbs, entalpía y entropía, no son alteradas por la acción catalizadora de las enzimas demostrando que las reacciones químicas con presencia de catalizador y en ausencia del mismo alcanzan el mismo equilibrio, solo que la primera llega al equilibrio a mayor velocidad. [83].

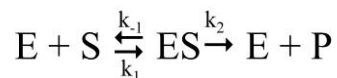
Cuando el sustrato se acerca al centro activo de la enzima inmediatamente se produce un cambio conformacional produciendo el complejo enzima-sustrato en donde se hacen presentes los enlaces covalentes, enlaces electrostáticos, hidrofóbicos, puentes de Hidrogeno, puentes de Van der Waals manteniendo unida esta nueva formación. En este complejo ocurre una reacción catalítica en la que el sustrato es modificado estructuralmente por diferentes mecanismos relacionados con el sitio activo de la enzima. Por último, se desprende el sustrato modificado como producto y el centro catalítico de la enzima regresa a su conformación original para poder interactuar con una nueva molécula de sustrato [84]

Con la descripción anterior podemos enfatizar la importancia del estudio de la manera y pasos secuenciales en los que participan las enzimas para combinarse con sus respectivos sustratos y los productos liberados, la cinética enzimática es el estudio de la

velocidad de cambio del estado inicial de los reactivos y el estado final de los productos [85]

El comportamiento cinético de las enzimas estudia diversos factores que pueden alterar la velocidad de reacción, e.g. concentración de la enzima y el sustrato, la fuerza iónica, el complejo E-S, inhibidores, pH, temperatura, entre otros.

El bioquímico alemán Leonor Michaelis y la fisicoquímica canadiense Maud Menten intentaban describir los mecanismos cinéticos de catálisis de la hidrólisis de la sacarosa por la acción de la invertasa para producir glucosa y fructosa y en 1913 propusieron modelo matemático para relacionar la unión de la enzima al sustrato para formar el complejo E-S que es convertido en un producto y la liberación de la enzima representada en el siguiente modelo matemático:



Dónde:

k_{-1} , k_1 y k_2 = constantes de velocidad

E = enzima

S = sustrato

ES = complejo enzima-sustrato

P = producto

Sustituyendo los valores constantes y asumiendo la disminución de la concentración de la enzima en comparación con la del sustrato, se propone la siguiente ecuación denominada Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max}S}{K_m + S}$$

Dónde:

V_0 = velocidad inicial de la reacción

V_{\max} = velocidad máxima

K_m = constantes de Michaelis-Menten $\left[\frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1}} \right]$; rango de valor 10^{-1}
a 10^{-6} M

S = sustrato

Este modelo matemático se propuso con la finalidad de explicar y caracterizar la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas en las que la enzima con una concentración constante ve el aumento de la velocidad de reacción al mismo tiempo que se experimenta un aumento en la concentración del sustrato hasta alcanzar un valor máximo; esto es, la saturación del sitio activo de la enzima. Por lo tanto, la ahora famosa y fundamental ecuación de Michaelis-Menten ha contribuido en el estudio de la velocidad de reacciones catalizadas.

Los factores que pueden interferir en la velocidad de reacción son:

- Concentración del sustrato: Existe una relación estrecha y directamente proporcional entre la velocidad de reacción y la concentración de la enzima, en otras palabras, si se disminuye la concentración de la enzima la velocidad de la enzima también disminuirá en la misma proporción. En la siguiente figura se describe mencionado comportamiento.

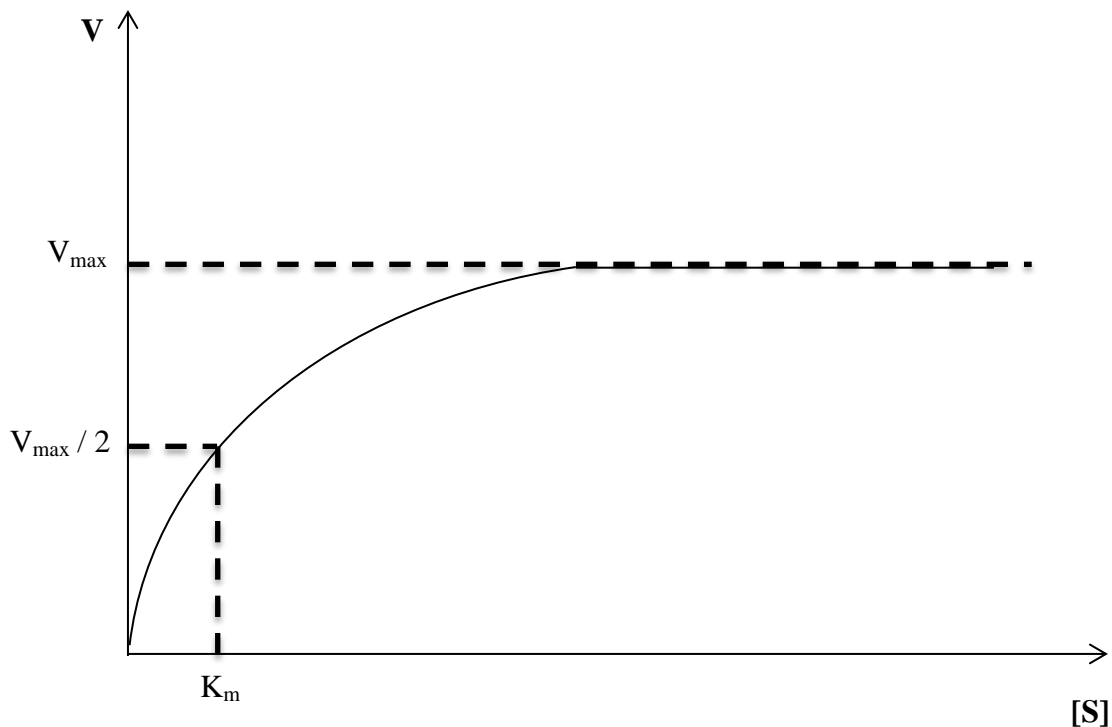


Figura 30: Representación de la velocidad de reacción por Michaelis-Menten.

En la figura anterior se puede observar que la velocidad es directamente proporcional a la concentración del sustrato. La constante de Michaelis-Menten k_m es específica y particular para cada sustrato; k_m es la afinidad que existe entre la enzima y el sustrato, tiene un valor numérico equitativo a la concentración del sustrato, en este punto la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima ($k_m = V_{max}/2$). El parámetro k_m es independiente de la variación de concentración de enzima. La reacción es de primer orden, mientras no sea superada la constante de velocidad, $[S] \ll k_m$, pero para valores superiores de concentración de sustrato se satura el centro activo por lo que se alcanza una V_{max} , la reacción es de orden cero, independientemente de la concentración del sustrato, la V_{max} solo dependerá de la actividad enzimática, $[S] \gg k_m$. Un valor menor de k_m significa una alta afinidad entre enzima – sustrato y la enzima alcanza y supera rápidamente la

media de la velocidad máxima, de manera inversa un valor mayor de k_m significa una baja afinidad y la enzima solo desarrollará la media de la velocidad máxima. La concentración del sustrato también indica el orden de la reacción, si $[S] < k_m$ la velocidad será igual a la concentración del sustrato y la reacción será de primer orden; cuando $[S] > k_m$ la velocidad de reacción es independiente de la concentración del sustrato y el orden de la reacción será cero.

- Fenómenos de difusión: Al existir un método de inmovilización de enzima se modifica la interacción directa que puede existir entre la enzima y el sustrato; para que exista entre la enzima inmovilizada y el sustrato una interacción, el sustrato debe desplazarse hasta la membrana enzimática inmovilizada hasta lograr difundirse en su interior que se conoce como difusión externa, pero también debe existir una difusión interna en donde la enzima se moviliza hasta la membrana, que es una barrera a vencer, para lograr difundirse e interactuar con el sustrato [86].

En sistemas con agitación constante la difusión externa está limitada por la membrana, dentro de la solución el transporte de masa es normalmente rápido por convección y disminuye gradualmente al acercarse a la membrana o barrera cinética.

La difusión externa no tiene una influencia relevante en comparación con la difusión interna en el comportamiento de la enzima inmovilizada. Si la concentración del sustrato es baja sus moléculas son grandes, la membrana inmovilizada tiene poros pequeños y la actividad enzimática es alta por lo que la velocidad de reacción está limitada por la difusión interna.

Si la concentración de sustrato es muy alta en comparación con el valor de k_m la velocidad de reacción se aproxima a la velocidad máxima y en esta condición los fenómenos de difusión no tienen influencia.

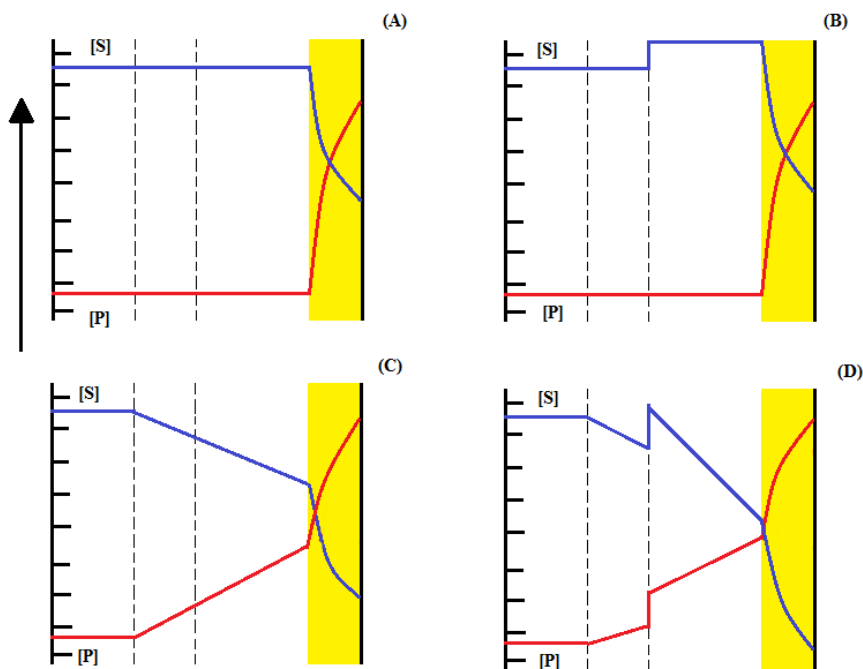
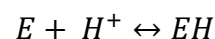


Figura 31: Representación esquemática de los gradientes de concentración en sustratos y producto que se producen alrededor de la porosidad de la membrana enzimática inmovilizada. En (A) el gradiente de concentración se origina únicamente a la velocidad de reacción y la difusión interna de la enzima. En (B) es similar a (A) pero con un aumento en el gradiente de concentración debido a la división del sustrato y el producto en la solución o ambiente de reacción. En (C) se presentan gradientes de concentración adicional debido a la difusión externa en la superficie de la partícula. En (D) el gradiente de concentración es originado por la combinación de los efectos de división y difusión [87].

- Influencia del pH: Las reacciones enzimáticas son sensibles a los cambios de pH debido a la presencia de iones H^+ como sustrato o producto, a la ionización de uno o más sustratos modificando la afinidad de unión entre la enzima y el sustrato, la desnaturalización de la enzima a valores extremos de pH y la existencia de uno o más grupos ionizables en los sitios activos a diferentes valores de pH. La cinética Michaelis-Menten describe los cambios en la actividad enzimática debido a los grupos ionizables en los sitios activos. Cada sitio activo tiene grupos ionizables que se une a los iones H^+ provenientes de la composición del medio definiendo la constante de asociación K_a .



$$K_a = \frac{EH}{[E][H^+]}$$

La unión enzima – iones H^+ produce activación o inhibición. Cuando los iones H^+ actúan como un inhibidor reversible la especie activada es la enzima E. Pero, cuando los iones H^+ actúan como activadores reversibles entonces la forma activa es el complejo EH.

Los grupos que participan en el centro activo de pueden identificar por la influencia de pH en la V_{max} ; generalmente se utiliza una representación gráfica de V_{max} VS pH que tiene una forma similar a una letra “S” con un punto de inflexión en el que V_{max} modifica instantáneamente su forma en función del pH. Este punto de inflexión se presenta cuando el valor de pH del solvente es igual al valor de pK_a del grupo ionizable del sitio activo de la enzima. También se puede graficar $\log V_{max}$ VS pH resultando la representación de dos lineal rectas sencillas que presentan una intersección en el valor de pK_a .

En la siguiente figura se muestra la influencia de la actividad de pH de una enzima con dos grupos ionizables en su sitio activo.

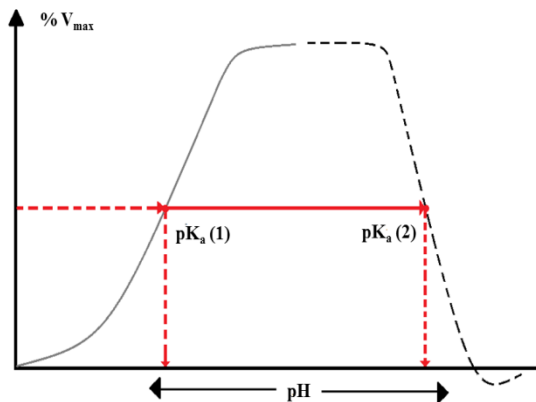


Figura 32: Perfil de pH, los sitios activos se tratan de manera independiente el uno del otro. El punto de inflexión muestra el pH óptimo de actividad [88].

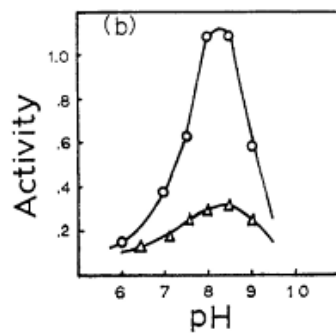
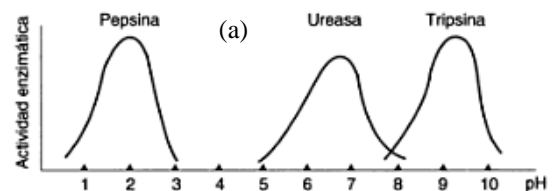


Figura 33:
 (a) actividad enzimática de peptidasas vs pH [89].
 (b) Valor óptimo de pH de la enzima tripsina alrededor de 8.0 a 8.5 [90].

- Inhibición enzimática: Como se mencionó anteriormente un inhibidor es un compuesto o molecular que al unirse a una enzima anula parcial o completamente su actividad catalítica. Se pueden combinar fácilmente con los sustratos, cofactores o enzimas, pero alguno de ellos están limitados a inhibir específicamente a una enzima; en cambio, otros inhibidores pueden afectar a numerosas clases de enzimas. Los inhibidores pueden ser clasificados de acuerdo a su actuación, en la siguiente figura se muestra su clasificación.

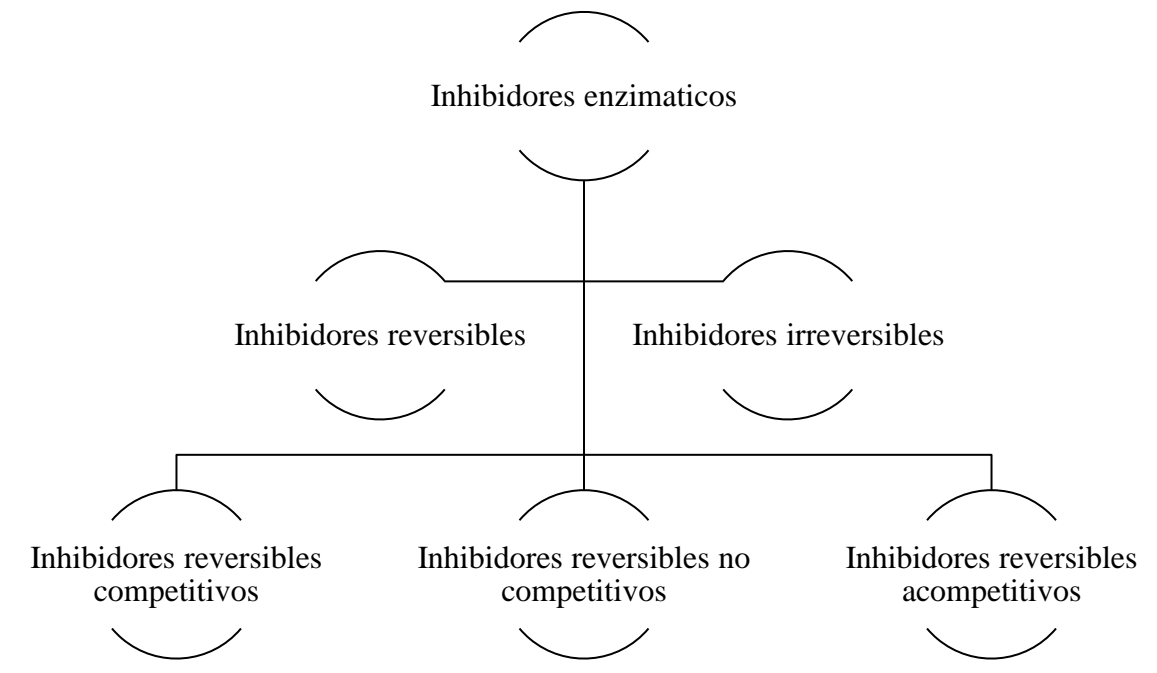
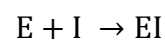


Figura 34: Clasificación de los inhibidores enzimáticos

Los *inhibidores irreversibles* reaccionan con la enzima estableciendo un enlace covalente muy estable formando un complejo no disociable y por ende dejando a la enzima inactiva.



Dónde:

E = enzima

I = inhibidor

EI= complejo no dissociable enzima-inhibidor

Este tipo de inhibidores bloquean la unión al sustrato, el grado de afectación depende del tiempo que se deje actuar al inhibidor, generalmente son tóxicos e.g. penicilina inhibe la síntesis de la pared bacteriana, la aspirina inhibe la síntesis de prostaglandina, los gases nerviosos como diisopropil fluorofosfato (DIFP) inhibe la actividad de los neurotransmisores.

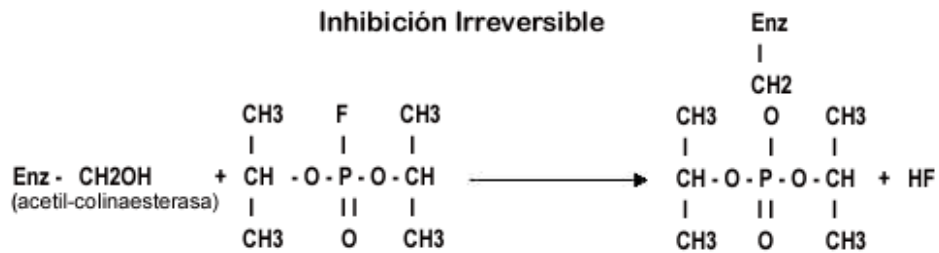
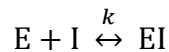


Figura 35: Ejemplo de un inhibidor irreversible, el fluorofosfato de diisopropilo (DFP) que forma un complejo con la enzima acetilcolinaesterasa. Los animales envenenados con este gas quedan paralizados, debido a la imposibilidad de transmitir adecuadamente los impulsos nerviosos

Por otro lado, los *inhibidores reversibles* son aquellos en los que el complejo EI no establece un enlace covalente por lo tanto se puede regenerar la actividad catalítica de la enzima. Este tipo de inhibición no es progresiva.



El grado de inhibición se relaciona con la concentración del inhibidor y la constante de equilibrio de la reacción k_i . Uno de los tipos de inhibiciones reversibles es la competitiva, que como su nombre lo indica se establece una competencia entre el sustrato y el inhibidor por unirse al sitio activo de la enzima.

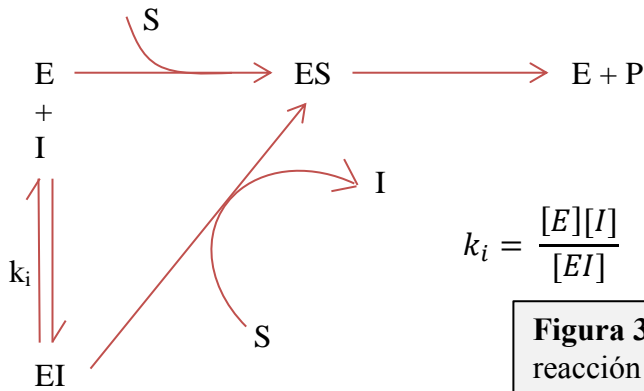


Figura 36: Mecanismo de acción de una reacción de inhibición competitiva.

En la figura anterior se esquematiza el mecanismo de reacción en una inhibición competitiva, en la que el inhibidor tiene una gran afinidad con el sitio activo por lo que compite con el sustrato impidiendo la catálisis enzimática. Generalmente el inhibidor tiene gran similitud al sustrato pero no tiene la capacidad de experimentar una reacción catalítica. El porcentaje de inhibición está relacionado con la combinación de las concentraciones de sustrato e inhibidor, al aumentar la concentración del sustrato es posible desplazar el inhibidor. El inhibidor competitivo reduce la velocidad de reacción pero la velocidad máxima conserva su valor ya que depende del aumento de concentraciones del sustrato.

En la inhibición no competitiva el inhibidor no es rival con el sustrato por el anclaje en el sitio activo de la enzima, el inhibidor encuentra otro lugar en la misma enzima para enlazarse.

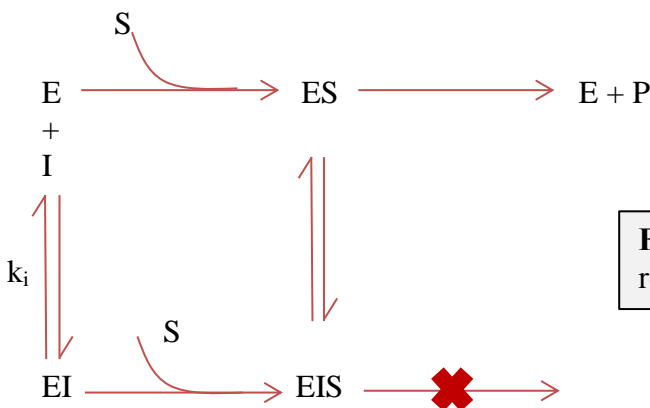
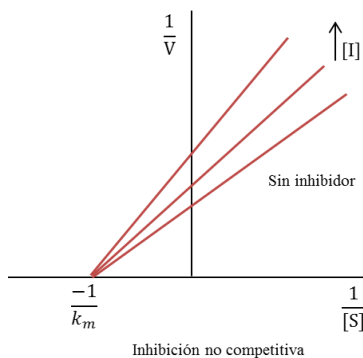
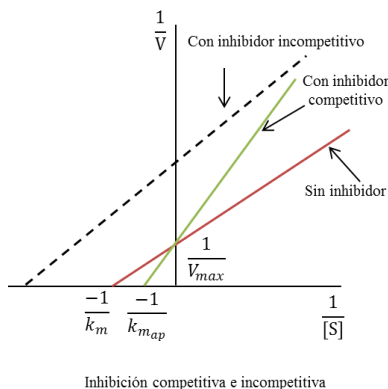


Figura 37: Mecanismo de acción de una reacción de inhibición no-competitiva.

Por lo tanto su fijación a la enzima no bloquea la catálisis del sustrato, aunque, inactiva la enzima independientemente de que el sustrato se una o no se una que se representa en la figura anterior. El aumento en la concentración del sustrato no influencia en el desplazamiento del inhibidor unido a la enzima. El inhibidor no competitivo disminuye la velocidad máxima pero el valor de k_m es el mismo debido a la afinidad del sustrato y la enzima. El inhibidor acompetitivo o incompetitivo, al igual que en la inhibición no competitiva, se una a un grupo funcional diferente del sitio activo de la enzima, pero requiere de la unión previa del sustrato para que este pueda anclarse en la enzima. Los inhibidores incompetitivos preservan la afinidad entre enzima-sustrato por lo que los valores de k_m disminuyen [91].



La representación anterior se conoce como gráficas Lineweaver-Burke, que permite obtener una línea recta de velocidad máxima, ya que al incrementar la concentración de sustrato en el grafico V_{max} VS sustrato se obtiene una hipérbola. Este grafico también se le denomina “dobles reciprocas” ya que se grafica $1/V$ VS $1/[S]$. Con este tipo de grafico es posible calcular k_m y V_{max} y determinar el tipo de inhibición presente. La ecuación que describe la gráfica Lineweaver-Burke se presenta a continuación.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{k_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Esta ecuación describe una recta que se intercepta en el eje x es igual a $-1/k_m$ mientras que en el eje y es igual a $1/V_{max}$.

Figura 38: (a) representación inhibición competitiva (b) inhibición incompetitiva.

- Influencia de la temperatura: al igual que en el pH la temperatura tiene un valor optimo en el que la actividad catalítica es máxima, en la siguiente figura se representa la influencia de temperatura en la actividad enzimática.

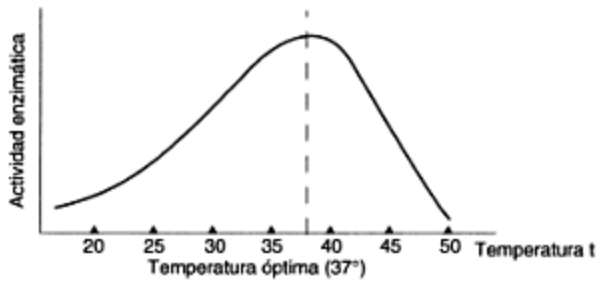


Figura 39: Temperatura óptima para la actividad de tripsina.

Al igual que en los procesos biológicos la temperatura es un factor primordial en la actividad enzimática, al rebasar el valor óptimo se puede observar el descenso gradual de la actividad, hasta desnaturalizar la enzima. Existen enzimas que soportan temperaturas superiores a 100 °C llamadas termoresistentes que a nivel industrial tienen grandes aplicaciones. La velocidad de reacción aumenta a la par de la temperatura hasta que esta última llega a su valor óptimo, mencionado incremento se debe a la ganancia de energía por parte de las moléculas capaces de sobrepasar el estado de transición y formar productos. Pero, cuando la temperatura supera su valor óptimo la velocidad empieza a decrecer al igual que la actividad enzimática debido a la pérdida de estructura tridimensional [92].

2.6 Importancia médica de la tripsina

La función exocrina del páncreas es de importancia vital para el ser humano ya que es responsable de la adsorción de proteínas en el duodeno. Las secreciones exocrinas o bien, el jugo pancreático es fundamental para la digestión de carbohidratos, proteínas y grasas, está constituido por un componente acuoso rico en bicarbonato para neutralizar el flujo duodenal y un componente enzimático compuesto por enzimas endopeptidasas como tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa. Deficiencias en la

secreción de las enzimas pancreáticas deriva en alteraciones como la pancreatitis aguda y crónica, entre otros padecimientos pancreáticos.

El páncreas al estar lleno de enzimas digestivas, la activación prematura o inhibición puede resultar peligroso provocando una intensa inflamación.

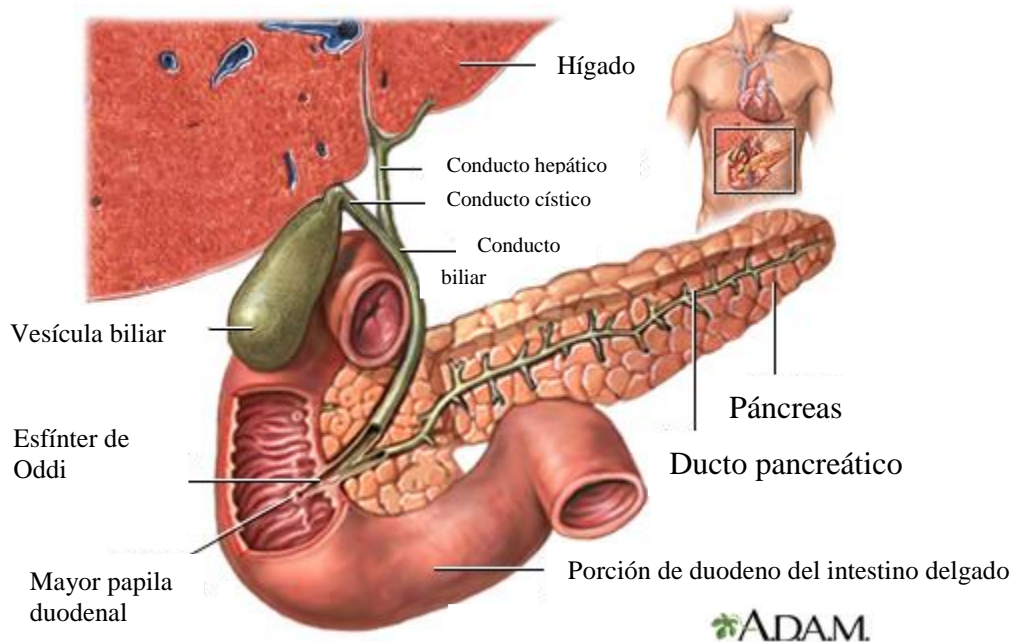


Figura 40: Representación de función pancreática [184].

La pancreatitis es una inflamación en el páncreas puede ser aguda (se desarrolla y persiste por poco tiempo) crónica (se desarrolla por un largo lapso de tiempo) produciendo necrosis. Se manifiesta un dolor agudo y constante en la mitad superior del abdomen acompañado de náuseas y vómitos, este dolor corre hacia la espalda simulando un cinturón en toda la circunferencia abdominal. Se pueden aunar síntomas como persistencia de sed, taquicardia, agitación, confusión e hipotensión en las primeras 48 horas. El proceso clave en la pancreatitis aguda es la entrada de la

tripsina; por lo tanto, la determinación de la tripsina es una prueba diagnóstica específica y fiable de la función pancreática y de su alteración (pancreatitis, cáncer pancreático, fibrosis quística, etc.) [93] y [94].

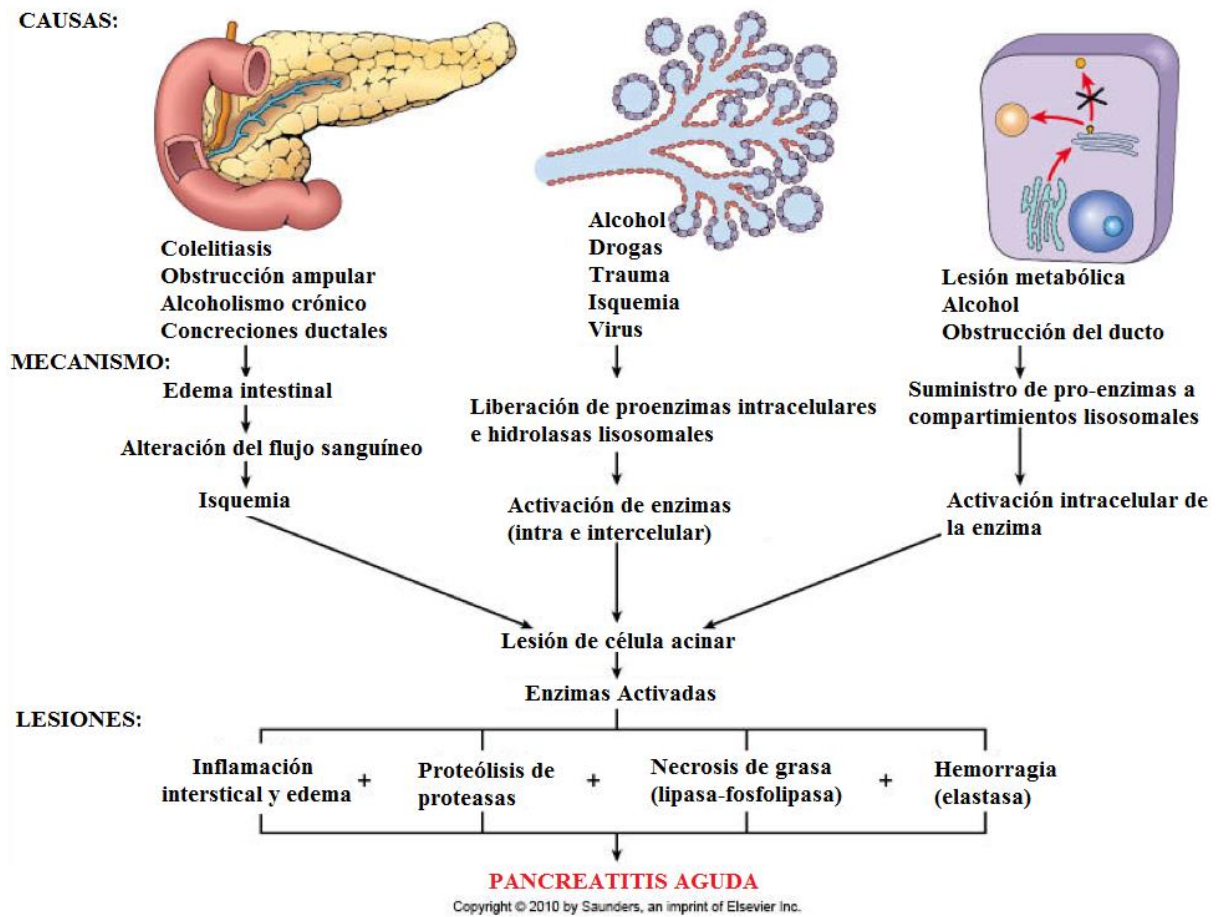


Figura 41: Causas de la prevalencia de pancreatitis aguda.

La pancreatitis crónica se caracteriza por una destrucción irremediable de tejido pancreático y de su función. Los principales factores responsables de la inflamación pancreática son la inhibición de la activación de enzimas digestivas y el consumo excesivo de alcohol. La tripsina y las demás enzimas digestivas destruyen la pro-enzima en la que se activan y además se difunden a la sangre; reclutando y activando células sanguíneas que

aumentan la respuesta inflamatoria local. El papel central de la tripsina en la pancreatitis ha sido comprobado en alteraciones genéticas que promueven su activación e.g. polimorfismos del tripsinogeno o del receptor sensible al calcio, entorpeciendo su eliminación o bloqueando su efecto e.g. inhibidor de la serina proteasa Kazal I [95].

La tripsina activada también digiere las membranas celulares y producen proteólisis, edema, hemorragia intersticial, daño vascular, necrosis de coagulación, necrosis grasa y celular parenquimatosa (4 - 6) [96].

En etapas tempranas los padecimientos pancreáticos agudos y crónicos no es posible una detección y diagnóstico certero ya que las pruebas existentes son insensibles para demostrar la hipofunción [97]. Su diagnóstico representa un reto en pacientes con dolor abdominal y sus complicaciones pueden elevar la morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios [98]. En nuestro país México no se tienen datos estadísticos completos pero se sabe que en el año 2001 fue la 17^{va} causa de mortalidad con una prevalencia del 3% [99] y [100].

CAPÍTULO III

Métodos de inmovilización enzimática

3 El método de inmovilización de la enzima es una etapa crucial en la construcción del biosensor asegurando la vida útil del bioreceptor también permitiendo la interacción constante y reproducible con el analito y el transductor. *Edgard Delvin et Gisèle Pham* definen a la inmovilización como un proceso físico o químico que se utiliza para fijar enzimas, bacterias y cultivos de células u orgánulos de plantas o animales derivados de estas fuentes a un soporte sólido o atraparlos en una matriz sólida [101].

Las características principales del método de inmovilización a seleccionar son:

- Mantener activo al material biológico sin modificar su estructura y especificidad
- Permitir determinaciones repetitivas
- Inmovilizar de más de una enzima si se requiere
- Inmovilizar al co-factor si es necesario
- Asegurar la re-oxidación de los co-factores
- Acelera reacciones químicas
- Reutilización

Al mantener el material biológico inmovilizado en el biosensor se tienen las siguientes ventajas:

- Fácil separación de la mezcla de reacción, proporcionando la capacidad de controlar los tiempos de reacción y minimizar la pérdida de enzima en el producto.
- Reutilización de enzimas para muchos ciclos de reacción, minimizando el costo total de producción de reacciones enzimáticas.
- Capacidad de las enzimas para proporcionar productos puros.

- Posible suministro de un mejor entorno para la actividad enzimática.
- Estabilidad de las enzimas inmovilizadas aumenta
- Propiedades de las enzimas mejoradas.
- Eficiencia de la reacción catalítica es mejor en algunos casos.
- Un mejor control de la reacción.
- Proceso catalítico puede ser operado continuamente.
- Reacción de multienzimas es posible
- Potencial de uso industrial y medicinal

También es importante mencionar las limitaciones que trae consigo la inmovilización:

- Puede afectar la actividad enzimática
- Limita los procesos de difusión
- Aumenta la complejidad del sistema
- Requiere condiciones especiales para preservar su funcionamiento.

Para lograr el funcionamiento óptimo al inmovilizar los agentes biológicos es necesario incluir un agente transportador encargado de los mecanismos difusionales como el transporte de reactivo-sustrato y productos. Este transportador posee características químicas y propiedades mecánicas que aportan estabilidad al sistema. Por lo tanto las características para su correcta selección son las siguientes:

- Grupos funcionales: El rendimiento de la actividad en una reacción inmovilizada depende del tipo de activación, presencia y distribución de los grupos funcionales.
- Porosidad y área superficial: Un área de superficie mayor a 100 m²/g y alta porosidad son deseables para que la enzima y el

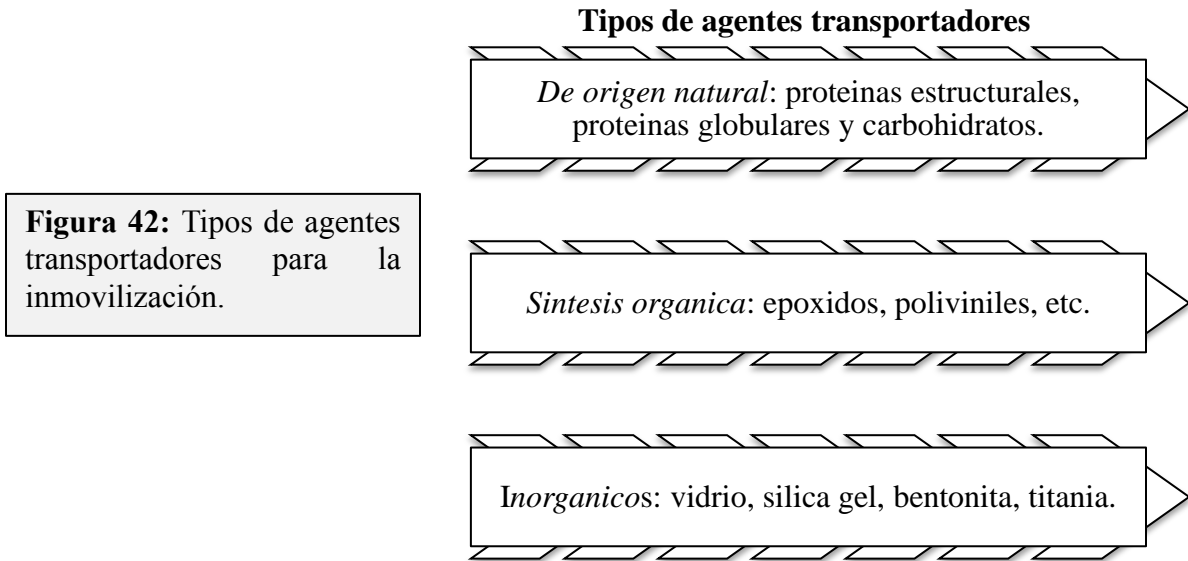
sustrato puede ser penetrado fácilmente. Un tamaño de poro mayor a 300 Å es generalmente suficiente para la mayoría de las enzimas.

- Hidrofilicidad / Hidrofobicidad: Influye en el tipo de fuerza de interacción entre la enzima no covalente y la matriz donde se inmovilizara.
- Insolubilidad: Para prevenir la contaminación y desprendimiento de la enzima.
- Resistencia microbiana: Debido al largo tiempo de vida útil es necesario utilizar materiales resistentes al ataque de microorganismos externos.

Como el agente transportador es necesario para el sistema también debe de cumplir con características especiales para integrarse de manera adecuada:

- Óptima calidad y bajo costo
- Ser inerte
- Brindar soporte físico
- Estable
- Regenerable
- Reducir el producto de inhibición
- Mejorar la especificidad de la enzima

Dependiendo la naturaleza del elemento de reconocimiento se debe seleccionar un tipo de transportador.



Los métodos de inmovilización se pueden clasificar según la naturaleza de la unión, pueden ser físicos o químicos.

Tabla 12: Métodos de inmovilización.

<i>Métodos de inmovilización</i>		
	<i>Enlaces químicos</i>	<i>Atrapamientos físicos</i>
Inmovilización de enzimas	<ul style="list-style-type: none"> • Adsorción • Cross-linking • Electromagnética • Enlace covalente 	Atrapamiento en gel
<i>Inmovilización de microorganismos</i>		<i>Micro-encapsulación</i>
Inmovilización de inmunoagentes	<ul style="list-style-type: none"> • De anticuerpos • De antígenos 	Atrapamiento por fibra

3.1 Adsorción

En este tipo de inmovilización la enzima se une a un agente transportador mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals o Puentes de Hidrogeno. Se puede usar para inmovilizar células enteras y enzimas, es un método antiguo descrito en 196 por Griffin (*absorción de β -D-fructofuranosidasa en $Al(OH)_3$* , Nelson y Griffin 1916) [102]. Pueden utilizarse transportadores orgánicos e inorgánicos conservando la actividad enzimática. Por la naturaleza de las fuerzas de unión involucradas es posible la reversibilidad del sistema modificando las condiciones de operación que alteren las interacciones e.g. pH, fuerzas iónicas, temperatura, polaridad.

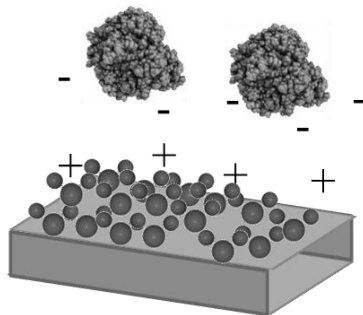


Figura 43: Representación de inmovilización por adsorción.

Los principales factores influyentes son:

- pH: controlando el número y naturaleza de la cargas
- Fuerza iónica: su aumento provoca desorción de la enzima y una unión fuerte de los iones inorgánicos a la enzima.
- Tamaño del poro: se recomienda un diámetro dos veces mayor a la enzima.

Este método es ampliamente usado por su sencilla preparación, es de bajo costo, no requiere reactivos costosos y estable en medios acuosos, es mínima la probabilidad de pérdida de la enzima. Entre los inconvenientes es la dificultad para controlar las variables propiciando la desorción de la proteína enzimática como resultado de cambios en la temperatura, el pH y la fuerza iónica, es una técnica lenta.

La inmovilización de absorción de las enzimas se puede hacer mediante diferentes métodos:

- Proceso estático: la enzima se inmoviliza por simple interacción y atracción con la solución que le permite estar en contacto con el agente transportador sin agitación; técnica eficaz, pero requiere tiempo.
- Proceso Dinámico: también llamado baño con agitación, este proceso implica la inmovilización de la enzima en contacto directo con la solución en agitación constante. .
- Proceso de reactor: el agente transportador se coloca en el reactor que se emplea posteriormente para el procesamiento, a continuación, la solución de enzima se transfiere al reactor y el agente transportador se está cargando en un entorno dinámico agitando la solución portadora y la enzima. Este proceso se emplea para la producción comercial de enzimas inmovilizadas.
- Electrodeposición: el agente transportador se coloca en contacto con uno de los electrodos recubierto por la enzima, se aplica corriente eléctrica para conducir la migración de la enzima hacia el agente transportador. Resultando en la deposición de la enzima en la superficie del soporte.

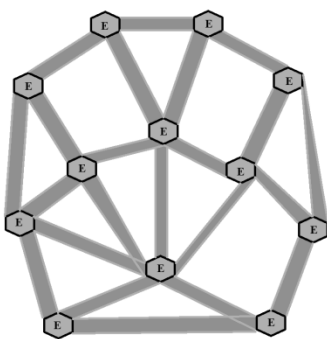


Figura 44: Representación de una inmovilización por cross-linking.

3.2 Cross-linking

También llamada correticulación o unión cruzada es un proceso que utiliza un agente transportador para formar puentes entre diferentes especies biocatalíticas o proteínas como glutaraldehído y hexametileno diisocianato; de igual forma es necesario usar una proteína de carga (albúmina) para unir más dos enzimas y para permitir un aumento en el peso molecular formando compuestos o agregados insolubles evitando su dispersión en el biosensor.

Con el objetivo de formar una capa insoluble en agua formada a partir de uniones intermoleculares. Los grupos funcionales de la

enzima que no participan en la reacción catalítica son las moléculas que deben ser enlazadas por unión cruzada para evitar obstrucciones en el centro activo. Esta técnica es irreversible, resistente a altas temperaturas, valores de pH por lo que es ampliamente usada para estabilizar enzimas [103].

Para formar esta película insoluble es necesario utilizar diferentes técnicas, el método de inmersión que consiste en sumergir el electrodo en una solución que contiene la enzima más albumina más agente transportador por un tiempo determinado, al pasar este tiempo se retira el electrodo de la solución y se gira para eliminar el exceso de la solución y permitir una distribución uniforme, se recubre esta capa para evitar su desprendimiento y se sumerge nuevamente en una solución de glicina para eliminar las enzimas no adheridas.

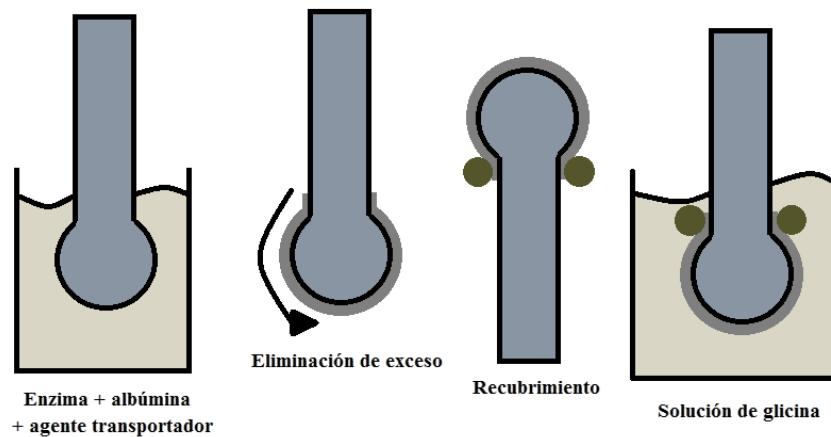


Figura 45: Representación de inmovilización método de inmersión por cross-linking.

Otro es el método de unión directa se utiliza generalmente para enzimas que se preparan en volúmenes pequeños, se colocan 10 μL de solución enzimática directamente sobre la superficie del electrodo se deja secar la microcapa creada y después de agrega el agente para sellar la unión cruzada.

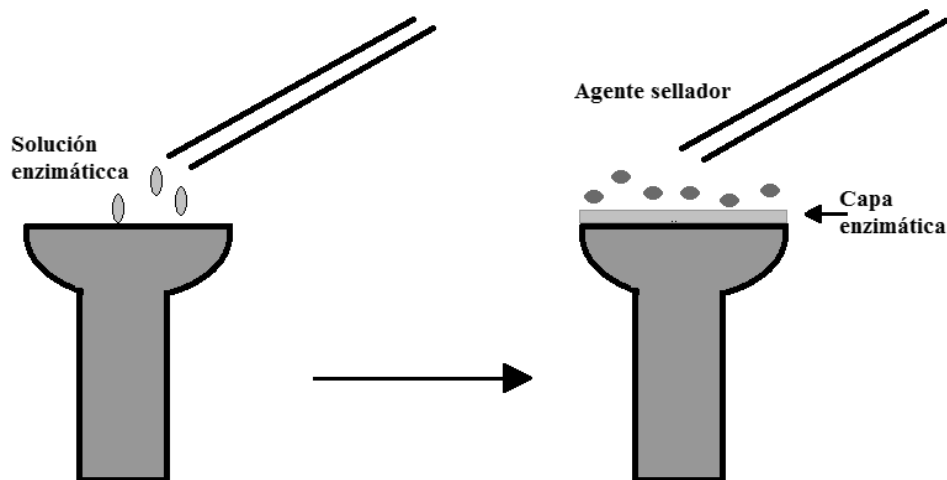


Figura 46: Representación de inmovilización método de unión directa por cross-linking.

Por último, existe un tercer método que es con uso de aerosoles, el aerosol es el agente sellador o agente reticular y la enzima puede ser depositada en la superficie del electrodo por los métodos ya mencionados (unión directa e inmersión), cuando se tiene el electrodo cubierto por la capa enzimática se somete a la acción del aerosol y permite lograr membranas micrométricas de 1 a 2 μm por lo que el tiempo de respuesta es breve aproximadamente 5 a 10 s. El tiempo de respuesta del biosensor es dependiente del grosor de la membrana catalítica inmovilizada.

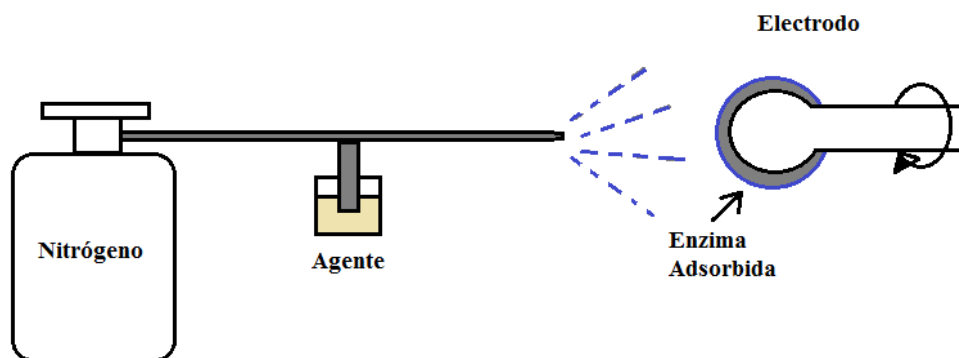


Figura 47: Representación de inmovilización método de aerosol por cross-linking.

Tabla 13: Ventajas y desventajas de la inmovilización por cross-linking

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Se establece una unión muy fuerte y elimina el riesgo de desprendimiento de la enzima	Inactivación parcial o totalmente por la modificación del sitio activo
Mayor estabilidad (pH, concentración de substrato, ionización)	Costoso

3.3 Inmovilización electromagnética

Se utiliza partículas electromagnéticas en las que se pueden adsorber diversos elementos biológicos, por medio de un campo electromagnético de adhiere a un electrodo metálico el bioreceptor, si se desea cambiar el bioreceptor solo se debe suspender el campo electromagnético aplicado, se desprender el antiguo bioreceptor se lava el electrodo para asegurar la eliminación de pequeñas trazas y se reinicia el método.

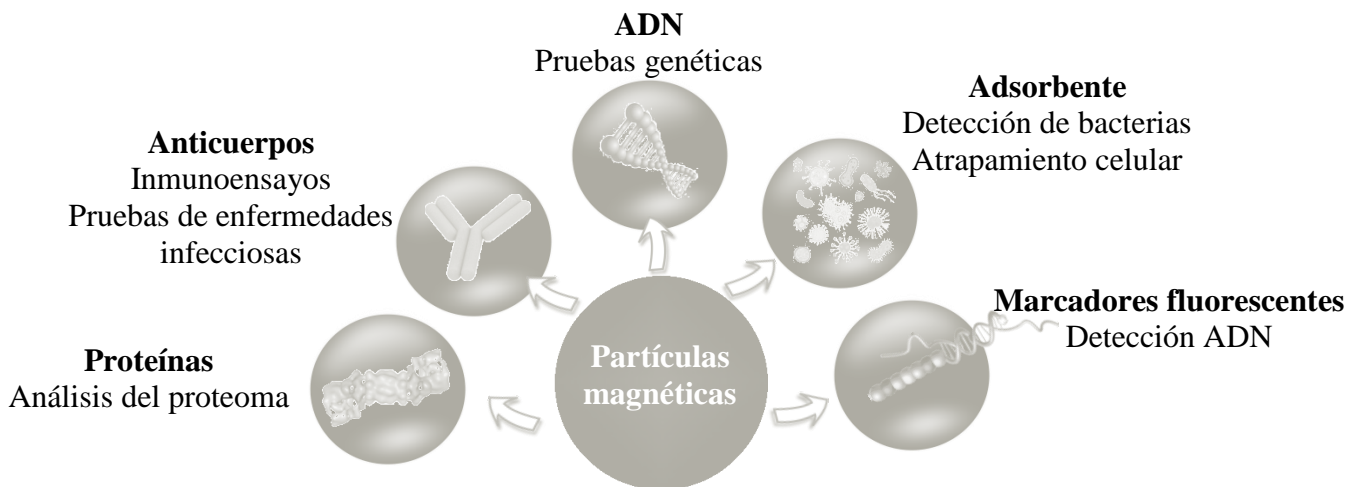


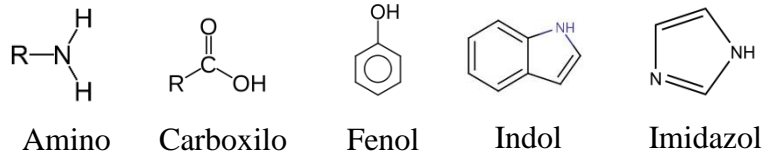
Figura 48: Aplicaciones inmovilizadas por partículas magnéticas

Tabla 14: Ventajas y desventajas de la inmovilización magnética

Ventajas	Desventajas
Reemplazo sencillo	Es difícil lograr la inmovilización La interacción entre enzima-partícula magnética es débil

3.4 Inmovilización por enlace covalente

Es el método más utilizado para la inmovilización de enzimas, se establece un enlace covalente entre la enzima y una matriz de soporte forma un complejo estable. Las enzimas, están compuestas por cadenas de aminoácidos tienen un número de cadenas laterales reactivas que pueden ser utilizados para formar enlaces químicos con el apoyo adecuadamente activo. El grupo funcional presente en la enzima, a través del cual se podría establecer un enlace covalente con el soporte, no debe ser esencial para la catálisis enzimática. Los grupos funcionales de proteínas que podrían ser utilizados en el acoplamiento covalente incluyen:



La unión covalente de una enzima se puede llevar ya sea activando el polímero soporte con un grupo reactivo o empleando reactivo bi-funcional para tender un puente con la enzima o polímero. Existen diversos tipos de soportes, los naturales pueden ser celulosa, dextrano, etc; los sintéticos pueden ser polímeros como poliacrilamida, poliestireno, etc y por último, cerámicos.

Se debe realizar una activación previa del soporte para crear grupos funcionales para la unión de la enzima, esta activación se hace a partir de bromuro de cianógeno, carbodiimida o complejos de diazonio. Cuando el soporte es cerámico o inorgánico se debe hacer un recubrimiento superficial previo con los grupos funcionales necesarios para el enlace covalente de la enzima.

Tabla 15: Ventajas y desventajas de la inmovilización por enlace covalente

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
El enlace covalente es muy fuerte, por lo que, las fugas de la enzima desde el soporte está ausente o muy poco.	Participación del sitio activo en el enlace covalente
Método simple y de amplia aplicabilidad	Impedimentos estéricos
Muy poco margen de elución enzimática	Las enzimas son modificados químicamente y se puede desnaturalizan durante la inmovilización.
Método estable (no se invierte por el pH fuerza iónica, sustrato)	Pequeñas cantidades de enzimas se pueden inmovilizar (alrededor de 0,02 gramos por gramo de matriz)
Amplia gama de opciones seleccionando materiales de soporte y el método de unión.	La baja actividad de la enzima debido a la exposición de las enzimas a ambientes pesados y reactivos tóxicos.

Existes técnica para formar uniones covalentes:

- Di-asociación: la unión entre el grupo funcional de la enzima y del soporte.

- Formación de enlace peptídico: formación de enlaces entre el grupo amino o carboxilo del soporte y amino o carboxilo de la enzima.
- Activación del grupo: el uso de bromuro de cianógeno conteniendo un grupo glicol e.g. celulosa, syphadex, sefarosa, etc.
- Funcionalización de varios reactivos: el uso de un reactivo por ejemplo bifuncional o multifuncional glutaraldehído que forma la unión entre el grupo amino del grupo de apoyo y de aminoácidos de la enzima.

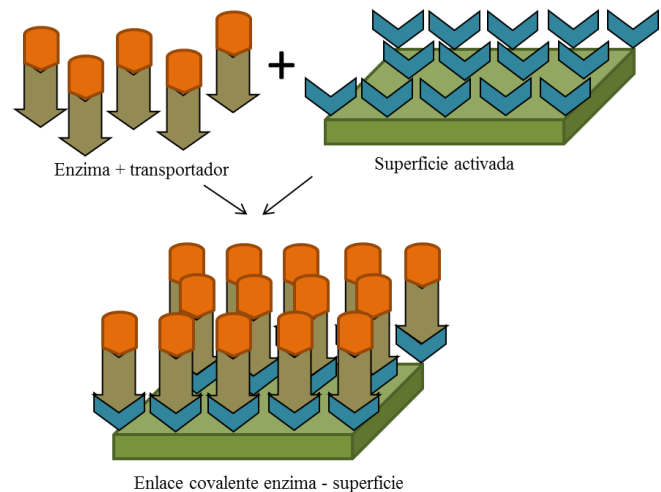
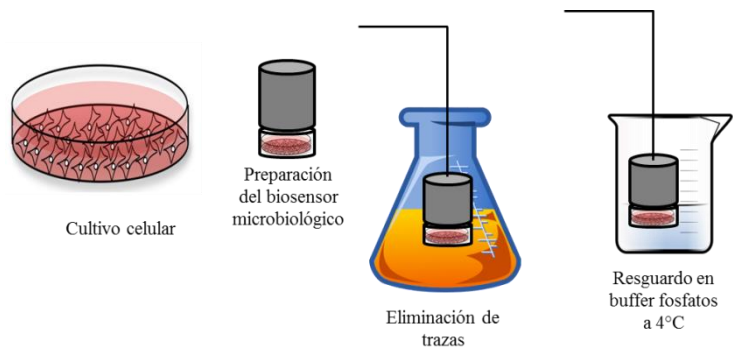


Figura 49: Esquema de inmovilización por enlace covalente.

3.5 Inmovilización de microorganismos

Este tipo de inmovilización utiliza células enteras principalmente u otra clase de microorganismos por medio de gelatina o Agar. Se fabrican fácilmente iniciando por el cultivo celular, de manera independiente se prepara el biosensor o la superficie donde será inmovilizado y se deposita el cultivo creado hasta formar una capa sólida de Agar o gelatina para después sumergir en una solución limpiadora para eliminar trazas o contaminantes y se almacena en una solución amortiguadora de fosfato medio de cultivo hasta su utilización a 4°C. El volumen a depositar dependerá del grosor de la capa que se desea formar.

Figura 50: Construcción de un biosensor microbiológico.

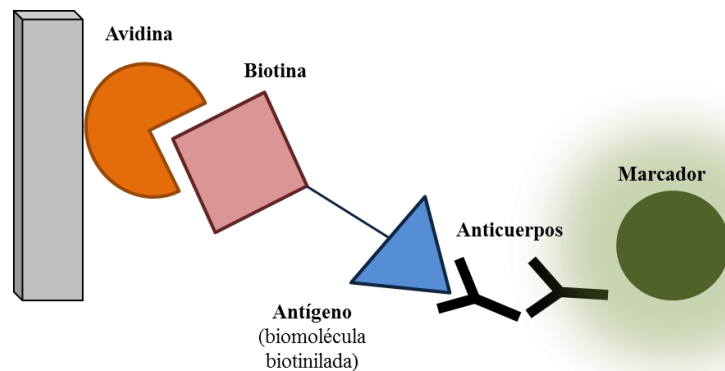


3.6 Inmovilización antígeno – anticuerpo

En este tipo de inmovilización está involucrada la determinación del antígeno correspondiente al analito, se utilizan técnicas análogas a la inmovilización de enzimas como inmovilización directa por medio de enlaces covalentes o por cross linking uniendo grupos carboxilos.

En ocasiones se requiere de inmovilizar el antígeno en lugar del anticuerpo por lo que no se pueden utilizar técnicas como en las proteínas.

Figura 51: Representación de un antígeno inmovilizado.



En la figura anterior se representa el procedimiento de inmovilización del antígeno en la que se ve la formación del complejo Avidina - Biotina que son altamente específicos para determinadas moléculas funcionalizando el sensor y el antígeno se convierte en una biomolécula biotinilada que puede ser detectado

pro un anticuerpo que previamente se encuentra localizado en un marcador para poder detectar la interacción.

3.7 Atrapamiento en gel

Los técnicas de atrapamiento en gel son técnicas físicas de inmovilización en las que se retiene al elemento de reconocimiento en cavidades interiores de la matriz o seno de la inmovilización, esta matriz debe ser sólida y porosa de tal forma que previene la liberación de proteína mientras permite la penetración de substrato. Lo más destacado en esta inmovilización es que la enzima no se enlaza de ninguna forma a la matriz del gel o a la membrana, resguardada por las cavidades de la membrana.

El material de la matriz puede ser prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano.

El procedimiento se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución de la matriz monomérica, seguido se inicia la polimerización aplicando un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico.

La enzima queda atrapada en un gel altamente reticulado como resultado de la polimerización que tiene una estructura similar al alambre de mama por lo que puede contener de manera más eficiente y ordenada las enzimas en los espacio de la retícula. Se pueden inmovilizar cantidades superiores a 1 g de enzima por 1 g de gel. Algunos polímeros sintéticos tales como poliarilamida, alcohol polivinílico y polímero natural (almidón) se han utilizado para inmovilizar enzimas utilizando esta técnica. Para uso microbiano, animal, enzimas vegetales y células se puede utilizar alginato de calcio para realizar este tipo de inmovilización.

Tabla 16: Ventajas y desventajas de atrapamiento en gel

Ventajas	Desventajas
Se reduce al mínimo la pérdida de actividad de la enzima sobre la inmovilización.	La enzima puede filtrarse en el medio circundante
Sin modificación química	Otro problema es la resistencia de transferencia de masa a los sustratos y productos.
Formas relativamente estables	Sustrato no puede difundir profundamente en la matriz de gel.
Fácil manejo y reutilización	Puede ocurrir la difusión de sustrato y el producto
	Se puede reducir accesibilidad sustrato debido a la polimerización por radicales libres de gel

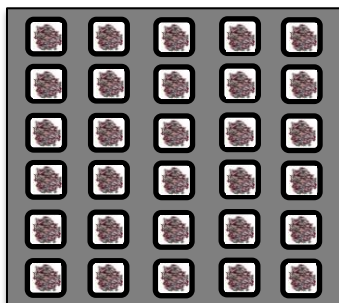


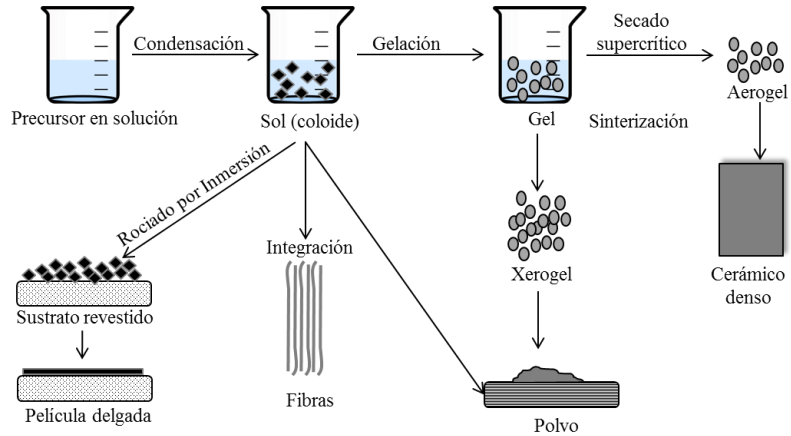
Figura 52: Representación de la encrucijada que se forma en una inmovilización por atrapamiento.

Dentro del atrapamiento en gel se deriva de manera destacada la técnica conocida como sol-gel, es una de las técnicas más sencillas para formar películas delgadas sobre superficies. Se pueden utilizar como recubrimiento óptico, eléctrico, magnético con funciones químicas [104]. Se le denomina sol-gel porque interviene una suspensión coloide y una fase gel que proporciona la estructura sólida y tridimensional. La fase gel puede ser agar, agarosa, gelatina, alginato, quitosan, quitina, carragenina o alcohol polivinílico que deben ser biocompatibles, accesibles, fácil de manejar y se utilizan ampliamente en aplicaciones como capas ópticas protectoras, pasivación, películas de alta o baja constante dieléctrica, membranas inorgánicas, películas ópticas electro-ópticas y no lineales, semiconductores, recubrimientos anti-estáticas, películas superconductoras, el fortalecimiento de las capas y ferroeléctricos [105].

El proceso de preparación por sol-gel inicia con una solución de compuestos metálicos, generalmente empleados como precursores los alcóxidos metálicos y acetilacetatos o las soluciones acuosas de sales inorgánicas. Si se emplea un alcóxido, el proceso puede

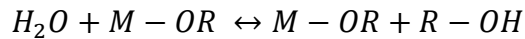
ser descrito en términos de dos clases de reacciones: hidrólisis y condensación, las cuales ocurren mediante sustitución nucleofílica (Brinker, 1990) [106].

Figura 53: Proceso de formación de recubrimientos por sol-gel.



El proceso consiste en dos etapas:

1. Preparación del gel: consiste en la hidrolización del alcóxido metálico en agua usando como solvente alcohol mediante la siguiente reacción:

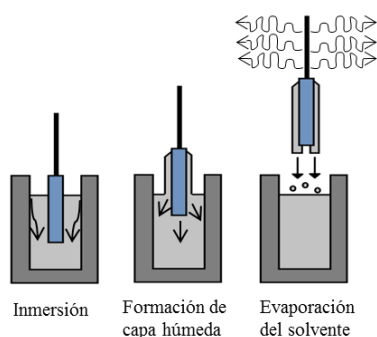


Cuando se termina la reacción toda la solución de alcóxido metálico se ha transformado en gel alcanzándose el punto de gelificación; mediante una sustitución nucleofílica bimolecular. La reacción de hidrólisis es difícil de separarse de la reacción de condensación ya que ocurren de manera simultánea por lo que se forman grupos intermediarios como grupos etoxi (M-OR), grupos hidroxilo (M-OH) y grupos metaloxano (M-O-M). En la reacción de polimerización o condensación, reaccionan los grupos intermediarios formados en la reacción de hidrólisis formando redes poliméricas -M-O-M- determinando la estructura primaria de los geles así como sus propiedades.

2. Post-gelación: involucra todos los fenómenos que se llevan a cabo al secar y a dar tratamiento térmico a los geles, tales como la evaporación del agua y solvente ocluidos en el gel, remoción de los residuos orgánicos, deshidroxilación del gel y los cambios estructurales que sufre.

El líquido encapsulado en el gel puede removerse mediante secado a condiciones normales y/o mediante secado hipercrítico disminuyendo o aumentando la temperatura en una autoclave herméticamente cerrada, los sólidos obtenidos se conocen como:

- a) Xerogeles: elimina el contenido de líquido mediante el secado a presión atmosférica en una estufa a 120 °C.
- b) Aerogeles: elimina el solvente mediante secado hipercrítico.



En el primer caso, se emplea un flujo de nitrógeno aumentándose la presión entre 5 MPa y 10 MPa, a una temperatura por arriba del punto crítico del solvente empleado. En el segundo caso, se emplea CO₂ líquido manteniendo la presión entre 5-6 MPa con una temperatura alrededor de 10-20 °C. En ambos casos, se finaliza a temperatura ambiente (Brinker, 1990)

Figura 54: Inmersión del sustrato en la solución, formando una capa húmeda y gelación de la capa por la evaporación del solvente.

Para formar recubrimientos para inmovilizar elementos biológicos mediante este método se utilizan dos tipos de técnicas:

1. *Recubrimiento por inmersión*: proceso donde el sustrato a recubrir se sumerge en un líquido y luego se retira a una velocidad definida bajo temperatura y condiciones atmosféricas controladas.

En el proceso de recubrimiento por inmersión, las condiciones ambientales controlan la evaporación del solvente y la subsecuente desestabilización de la solución coloide al evaporar el solvente, produciendo una gelación y la formando una película transparente debido al pequeño tamaño de partícula en el coloide.



Figura 55: Proceso de gelación durante el la inmersión obtenido por la evaporación del solvente.

La película resultante debe ser tratada posteriormente por temperatura. El espesor del recubrimiento se define principalmente por la velocidad con la que se remueve el sustrato de la solución, el contenido de sólidos y la viscosidad del líquido. Hay seis fuerzas que actuando sobre el revestimiento durante la remoción:

1. Arrastre del líquido viscoso al elevar el sustrato.
2. Fuerza de la gravedad
3. Fuerza resultante de la tensión superficial en la cavidad formada.
4. Inercia del líquido de la capa límite al llegar a región de deposición.
5. Gradiente de tensión superficial
6. La presión disociada o coasociada (importante para las películas de menos de 1 μm de espesor).

2. *Spin coating o recubrimiento por rotación:* consiste en hacer girar al sustrato alrededor de su eje eje y que debe ser perpendicular a la zona de recubrimiento, ha sido desarrollado para el llamado spin-on-glasses en microelectrónica y sustratos con simetría rotacional. Las etapas de los proceso de recubrimiento por rotación se muestran en la siguiente figura.



Figura 56: Representación del proceso spin coating.

El proceso se lleva a cabo en cuatro etapas: primeramente la deposición de la solución coloide seguida del inicio de la aceleración, suspensión de la rotación y la evaporación del agua o solvente por evaporación en la gelatina. Esta técnica se diferencia del recubrimiento por inmersión en que la disminución del espesor de la película depositada por acción de la rotación, tiende a formar películas más uniformes debido al equilibrio entre la fuerza centrífuga que impulsa el flujo hacia fuera y la fuerza viscosa (fricción) que actúa hacia el interior. Incluso con sustratos no planos se puede obtener un espesor del recubrimiento muy homogéneo.

La calidad del recubrimiento depende en los parámetros como la forma de la partícula, temperatura, solvente, concentración e interacción de partículas del líquido de recubrimiento. El espesor del recubrimiento es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de rotación: $\text{espesor} \sim [1/\text{velocidad}]^{1/2}$. La viscosidad y la densidad del líquido también afectan el espesor del recubrimiento.

3.8 Micro-encapsulamiento

Consiste en la formación de una partícula esférica llamada "microcápsula" en el elemento de reconocimiento está incluido en suspensión dentro de una membrana polimérica semipermeable que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas pueden clasificarse en:

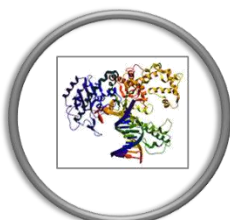
- Permanentes: originadas por polimerización interfacial
- No permanentes: son generadas por surfactantes, también llamadas "micelas reversas"

Las microcápsulas generalmente tienen tamaños entre 1 y 100 μm de diámetro. Este método permite el encapsulamiento simultáneo

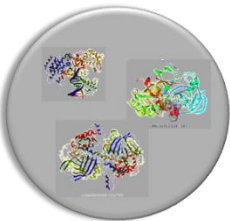
de una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos [107].

Los materiales que se pueden utilizar para formar estas membranas son:

- Carbohidratos: Almidón, dextrano y sacarosa.
- Celulosa: carboximetilcelulosa, metilcelulosa.
- Lípidos: cera de abejas, ácido esteárico, fosfolípidos.
- Proteínas: gelatina, albumina.
- Gomas: alginato de sodio, carragenano.



Mononuclear



Polinuclear



Matriz

Figura 57: Representación de las diferentes morfologías del microencapsulamiento.

Las propiedades más recomendadas que deben tener estos materiales son:

- Estabilización del material dentro del núcleo.
- Inerte frente a ingredientes activos.
- Liberación controlada bajo condiciones específicas.
- Formación de película, flexible y estable.
- Poca viscosidad, económico.
- Soluble en un medio acuoso o disolvente, o de fusión.
- Flexible, frágil, dura, delgada etc.

Morfología de microcápsulas:

La morfología de las microcápsulas depende principalmente del material y el proceso de deposición.

- Mononucleares: contienen la capa alrededor del núcleo.
- Polinucleares: tienen muchos núcleos encerrados dentro de la microcápsulas.
- Matriz encapsulada: en la que el material del núcleo se distribuye homogéneamente en el material de la microcápsulas.

3.9 Atrapamiento en fibras

En este tipo de método el elemento de reconocimiento se encuentra ocluido dentro de las microcavidades de una fibra sintética o también llamados reactores huecos.

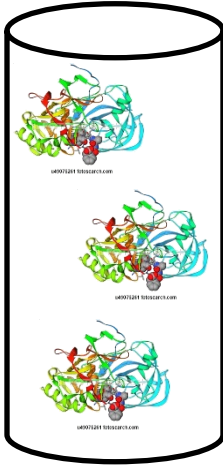


Figura 58: Representación del atrapamiento en fibras.

CAPÍTULO IV

Voltametría de onda cuadrada para la determinación de la actividad de tripsina.

4

Los métodos para la detección de la actividad de tripsina no son específicos, como se mencionó anteriormente existe evidencia que al cuantificar la actividad de la tripsina se puede relacionar con disfunciones pancreáticas como la pancreatitis aguda, se han mencionado los métodos de detección actuales y ninguno de ellos satisface necesidades como especificidad, tiempo de análisis y detección de la enfermedad en etapas tempranas impidiendo el diagnóstico y tratamiento adecuado.

Por lo tanto, en el presente trabajo, se informa de un nuevo método de voltametría de onda cuadrada simple, rápido y sensible para la determinación de la actividad de la tripsina. Se basa en el uso de una gelatina que es deposita en la superficie de un electrodo de carbono vítreo y el registro de la corriente de oxidación de la hidroquinona dependiendo de la actividad tripsina. La formación de la hidro-película establece una barrera cinética para el transporte de las especies electro-activas a la superficie del electrodo. La tripsina catalizada progresivamente la digestión de la hidro-película provocando un aumento en la permeabilidad y produciendo un aumento de la corriente de oxidación de hidroquinona. Para evaluar su funcionamiento y demostrar la eficiencia del método se necesitan establecer las condiciones óptimas de medición; obteniendo datos precisos y reproducibles con los que se realiza la caracterización analítica construyendo una curva de calibración para tripsina.

Para el establecimiento de las condiciones óptimas de medición se eligió el método de voltametría de onda cuadrada debido a la alta sensibilidad y selectividad que ofrece la aplicación de diferentes señales de excitación al electrodo y permite realizar la medición tanto en la reacción de oxidación como reducción. Se utiliza como

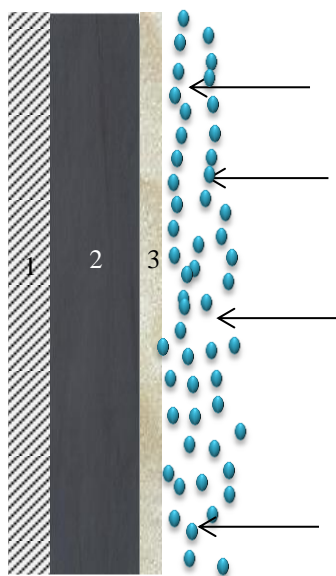


Figura 59: Representación del proceso de digestión.

1. Electrodo Rotatorio
2. Centro de grafito
3. Capa de gelatina

En la figura se muestra como se realiza la modificación de la superficie del electrodo añadiendo una barrera, gelatina, para determinar la actividad de la enzima, tripsina, que degrada la gelatina dependiendo del tiempo de incubación, permitiendo el paso de determinada cantidad de moléculas de la solución (HQ) al grafito y obtener la intensidad del pico que será proporcional a la actividad enzimática.

electrodo de trabajo un electrodo rotatorio. Se utiliza como sustrato gelatina, la cual es depositada en el electrodo de trabajo con la finalidad de ser degradada por tripsina, permitiendo la difusión controlada de las moléculas de la solución.

4.1 Reactivos, materiales y equipos.

Gelatina de piel porcina (tipo A, G2500) y tripsina de páncreas bovino (T9201, $59 \geq 7500$ BAEE unidades / mg sólido). Todos los demás productos químicos utilizados son de grado analítico y sin purificación adicional. Los experimentos se llevaron a cabo en una solución tampón fosfato PBS (0.1 M, pH 7), esta disolución fue preparada con las cantidades adecuadas de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 en agua destilada. El mismo tampón también se utilizó para preparar las soluciones de enzima, sustrato y gelatina. Esta última se disolvió completamente en baño maría a $60^\circ C$.

4.2 Modificación del electrodo por gelatina

El electrodo de trabajo es un electrodo de disco rotario de carbono vítreo (Tacussel CTV 101 T, Diámetro de 3 mm) cubierto por gelatina. Se ha realizado la limpieza la superficie del electrodo de carbono vítreo, puliendo, desengrasando con alcohol, y por último en un baño ultrasónico, su modificación se logró mediante la deposición de una capa de gelatina uniforme y reproducible aplicando el procedimiento spin coating a una velocidad de 1000 rpm durante 30 minutos.

4.3 Técnica electroquímica

Las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C) aplicando la técnica de voltametría de onda cuadrada con valores de incremento de potencial de: 5 mV; amplitud: 50 mV; frecuencia: 30 Hz, utilizando como analizador electroquímico, modelo de CH Instrumentos 440 fabricado por la compañía CH Instruments Inc., EE.UU. Los experimentos se llevaron a cabo en una micro-celda electroquímica con capacidad de 5 ml, modelo K0264 fabricada por la compañía EG & G PARC, EE.UU. y correctamente modificada al contener un electrodo de Pt como electrodo auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia.

Se ha elegido esta técnica por su rapidez y sensibilidad al brindar valores límite de detección en comparación con otras técnicas, también la facilidad para evaluar el comportamiento anódico y catódico de una solución discriminando de manera sencilla la calidad de la actividad enzimática en cada región del voltamperograma.

4.4 Desarrollo del experimento

Se realizaron experimentos preliminares para determinar las condiciones óptimas de la actividad de la tripsina. La metodología involucrada se realizó mediante los siguientes pasos:

- Incubación del electrodo recubierto de gelatina en solución de tripsina por diferentes intervalos de tiempo.
- Enjuague del electrodo entre cada medición con PBS.
- Transferencia del electrodo a la micro-celda electroquímica que contiene la solución de tripsina.

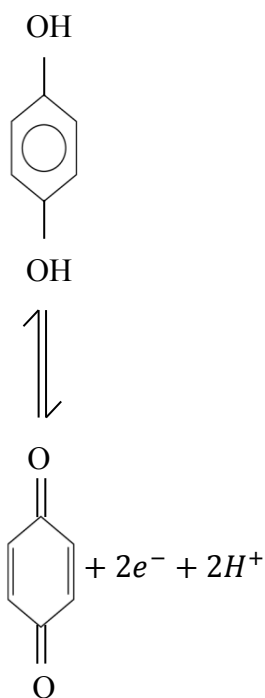


Figura 60: Oxidación de Hidroquinona (HQ) en 1, 2 – Benzoquinona. (BQ)

- Registro de la corriente como respuesta de la oxidación de hidroquinona (HQ) por voltametría de onda cuadrada variando las concentraciones de analito y la corriente como respuesta a la reducción de 1,2 benzoquinona (BQ).
- Siguiendo este procedimiento se investigó en diversas condiciones experimentales el aumento de la corriente dependiendo de la actividad enzimática de la tripsina.

Conociendo los factores que influyen en la intensidad de la respuesta, se propone lo siguiente:

$$I_p = f(V_g, C_g, C_{HQ}, pH, T^\circ)$$

La intensidad del pico resultante estará en función del volumen y concentración que se utilice de gelatina, de la concentración de HQ, el pH no es estudiado ya que la variación afecta las propiedades enzimáticas por lo que se trabaja con PBS a pH 7, la temperatura puede variarse pero es un factor que se estudiara con mayor detenimiento posteriormente.

El número de tratamientos y repeticiones fue de 18 y 2, respectivamente, y el número total de observaciones fue de 36. El nivel de confianza se determinó del 95% ($\alpha = 0,05$). La hipótesis de interés (H_0 : hipótesis nula y H_A : hipótesis alternativa) para los efectos de factores sobre la variable de respuesta se presenta a continuación:

H_0 : Concentración del analito = 0; Concentración de gelatina = 0; Volumen de gelatina = 0

H_A : Concentración del analito \neq 0; Concentración de gelatina \neq 0; Volumen de gelatina \neq 0

El efecto individual y el de sus interacciones se evaluaron aplicando un diseño de experimentos factorial. Los factores A, B y C consideran como supuestos que pueden afectar a la variable de respuesta, el factor A es la concentración del analito a tres niveles (0.5 mM, 1 mM, y 5 mM); el factor B es la concentración de la solución de gelatina a dos niveles (6% y 8%) y por último, el factor C es el volumen de la solución de gelatina deposita sobre la superficie del electrodo a tres niveles (8µL, 10µL, y 15µL).

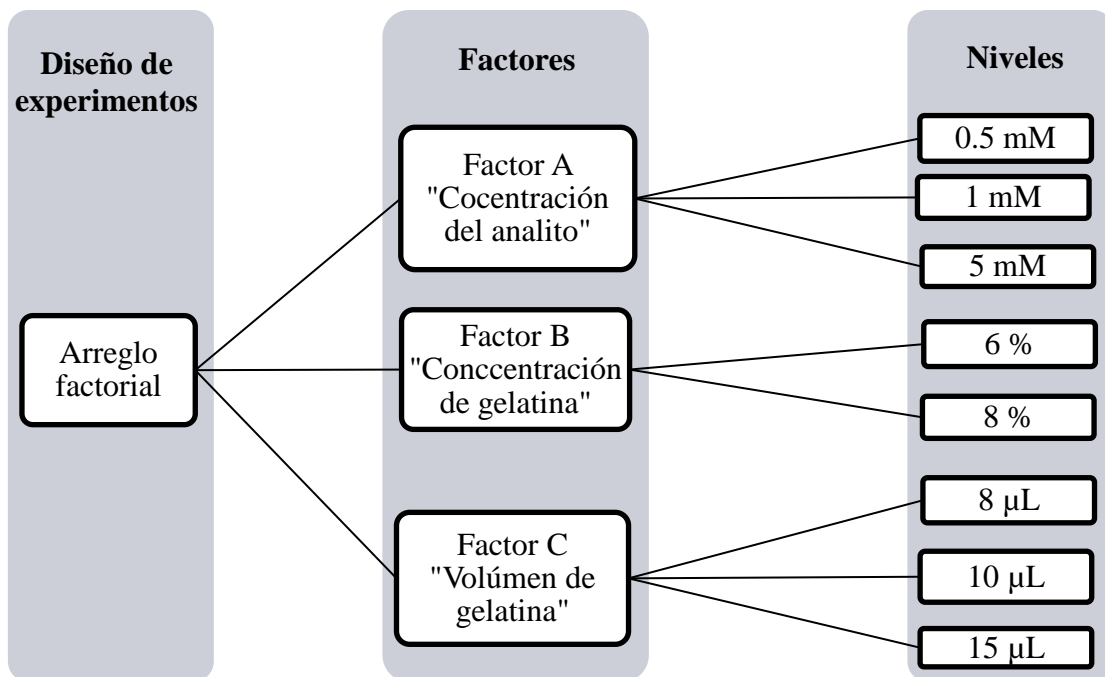


Figura 61: Representación del arreglo factorial a niveles del diseño de experimentos de tripsina

4.4 Evaluación de la actividad enzimática de tripsina

En primera instancia se modifica el primer factor a estudiar, volumen de deposición de gelatina, manteniendo el resto de los factores constantes. Los volúmenes se variaron de 8, 10 y 15 µL. Los factores que se mantuvieron constantes son: gelatina [8%], tripsina [100 µg/ml] e HQ [5mM]. Se obtuvieron los siguientes resultados:

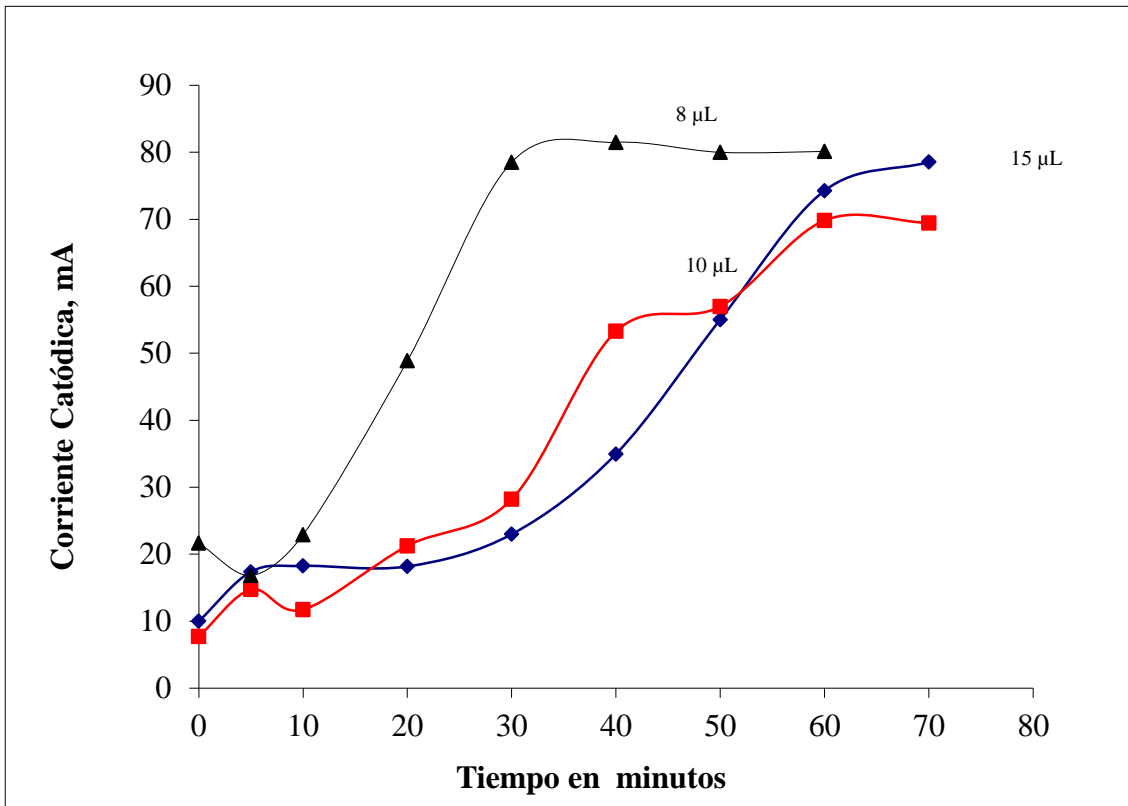


Figura 62: Representación catódica de la variación de volumen de gelatina.

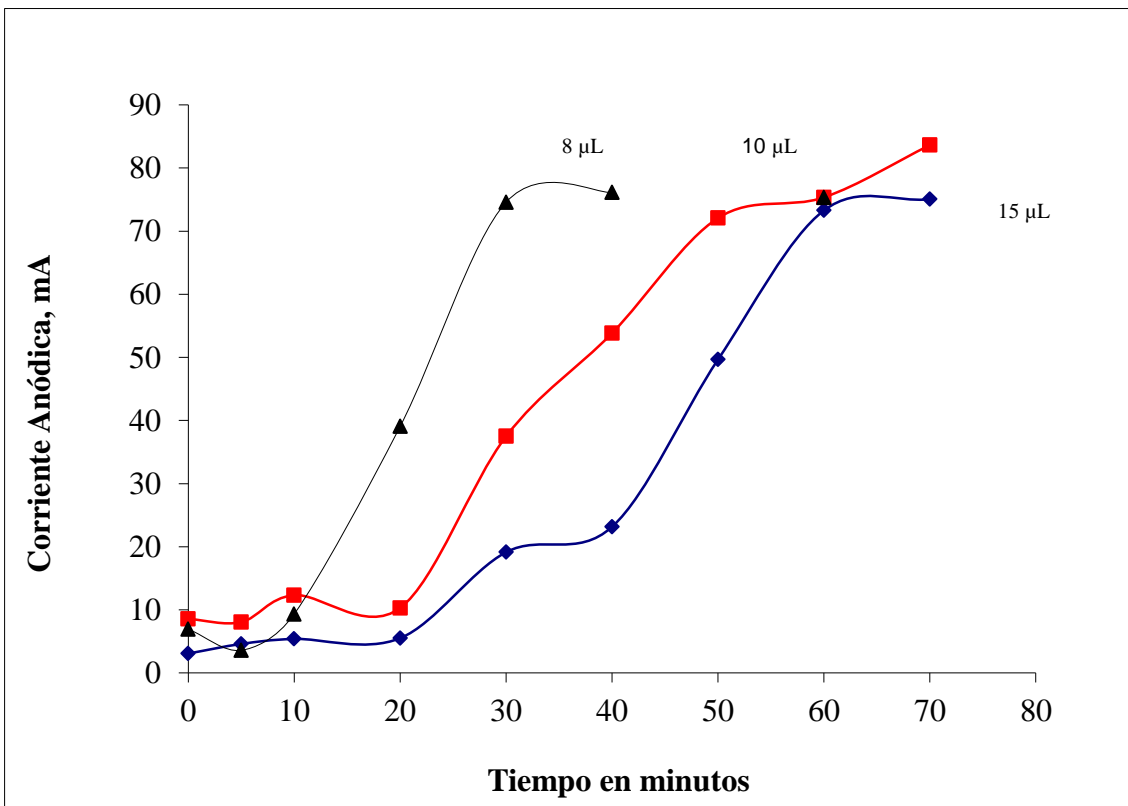


Figura 63: Representación anódica de la variación de volumen de gelatina.

Se puede observar como a menor volumen de gelatina se tiene una intensidad de corriente mayor, lo cual es corroborado en el sentido anódico y catódico.

El volumen menor de 8 μl puede ser elegido como la mejor opción pero por ser una cantidad pequeña es muy difícil asegurar su reproducibilidad, el volumen de 10 μl es una capa sumamente grande por lo que cubre un área mayor de la deseada y es descartada. Por lo tanto la selección se encuentra entre los volúmenes de 8 y 10 μl de las cuales se elige la segunda porque permite una degradación más rápida debido a la menor permeabilidad.

Del mismo modo se varía el segundo factor, concentración de gelatina, manteniendo constantes los restantes.

La selección tanto del volumen y concentración de gelatina es influenciada una por la otra, ya que se requiere de una barrera que sea sencillamente reproducible así como permitir y controlar la difusión.

Los factores que se mantuvieron constantes eran: volumen de gelatina 10 μL , tripsina [100 $\mu\text{g/ml}$] e HQ [5mM]. Los resultados son los siguientes:

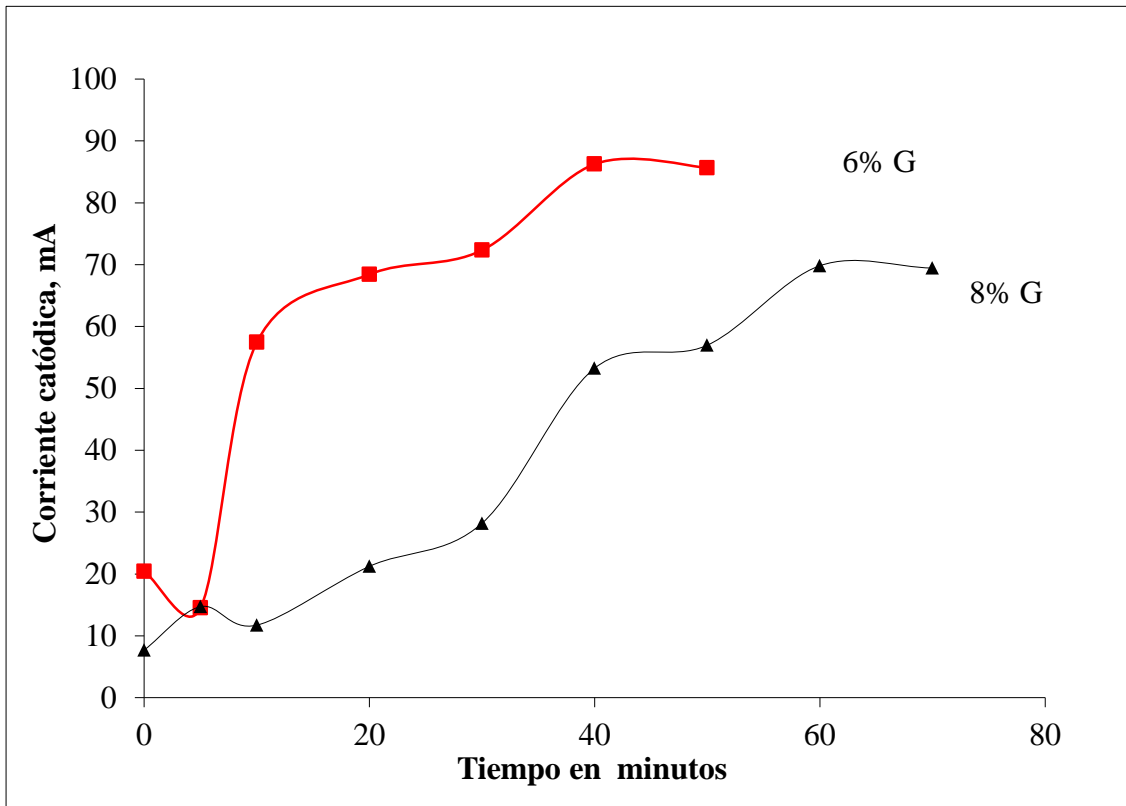


Figura 64: Representación catódica de la variación de concentración de gelatina.

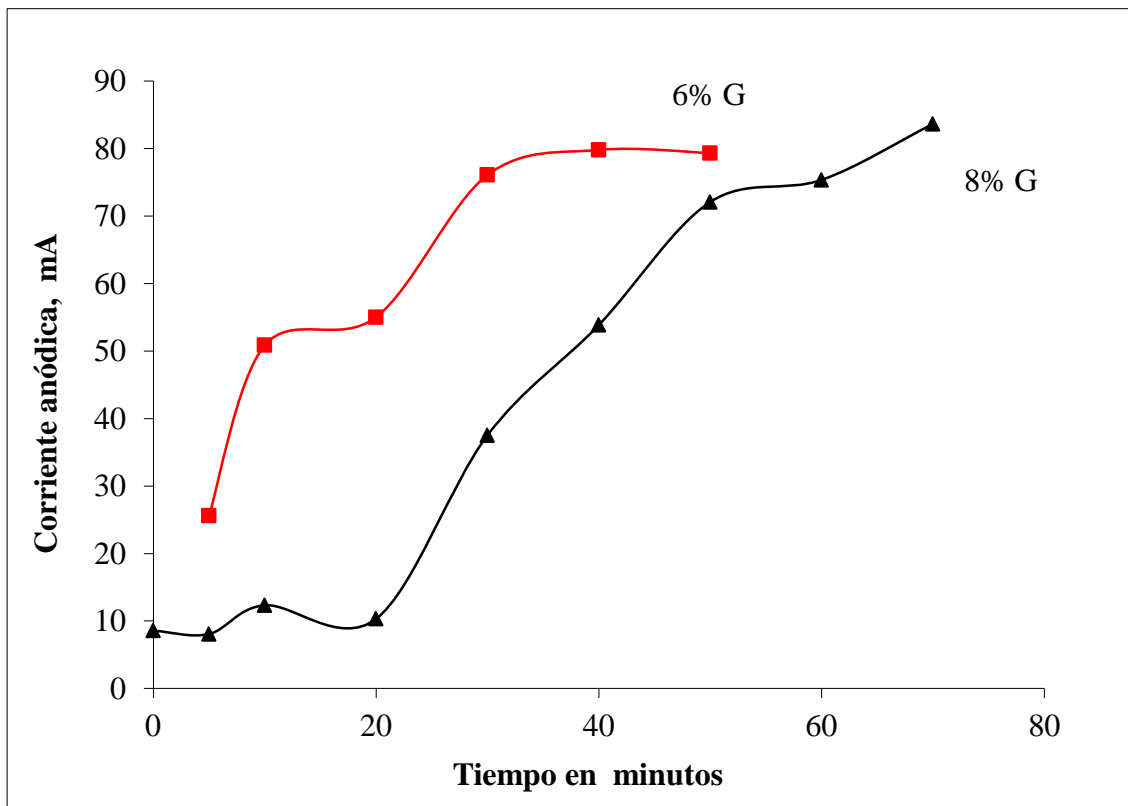


Figura 65: Representación anódica de la variación de concentración de gelatina.

Se realizaron experimentos con concentración gelatina al 4% produciendo una mayor intensidad de corriente en ambos sentidos pero también provoca una ligera uniformidad y el surgimiento de cavidades, por lo que no es un factor óptimo. Las opciones se encuentran entre la concentración de 6% y 8%, siguiendo con el principio de selección se opta por la concentración de menor valor. Este factor al ser aunado al volumen seleccionado de 10 μL permiten una degradación y difusión controlada, la permeabilidad que ofrecen es adecuada para funcionar como barrera y como medio de pasaje de moléculas.

Por último se tiene el factor de concentración de HQ, para realizar dichas pruebas se hacen con base a los factores antes seleccionados y manteniendo constante el volumen de gelatina de 10 μL , tripsina [100 $\mu\text{g}/\text{ml}$] e HQ [5mM]. Los resultados son los siguientes:

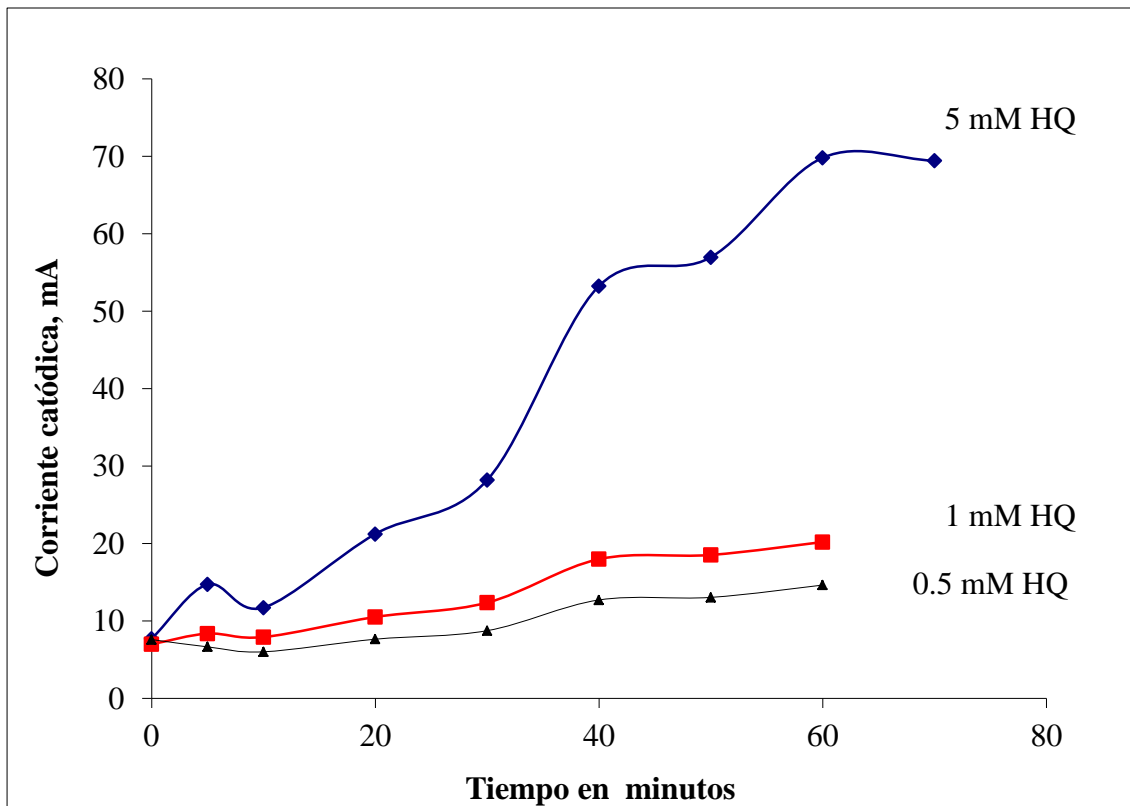


Figura 66: Representación catódica de la variación de concentración de hidroquinona (HQ).

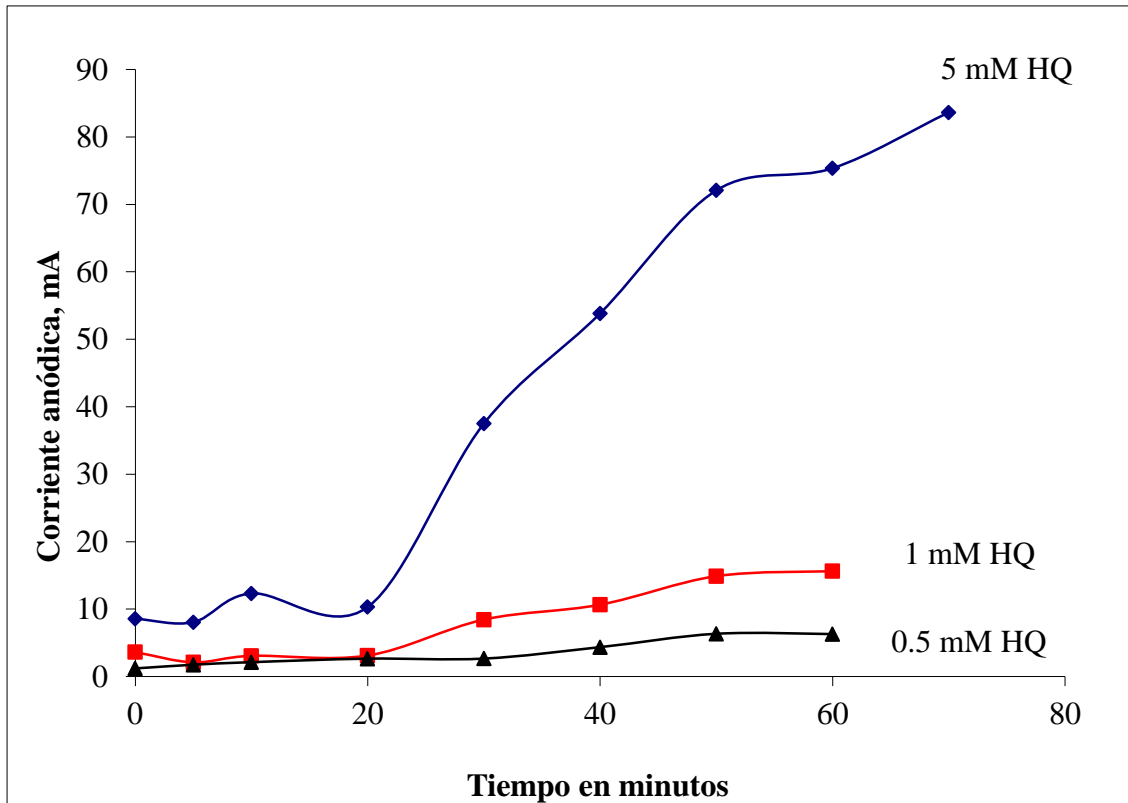


Figura 67: Representación anódica de la variación de concentración de hidroquinona (HQ).

Claramente se puede identificar la concentración 5mM como el valor optimo que permite una mayor intensidad de corriente, la formación de los picos en la concentración de 0.5mM no son fiables.

En este punto se han evaluado los 3 factores de estudio, pero surge la incertidumbre de modificar de manera proporcional el volumen y concentración de gelatina. Buscando la efectividad del análisis se decide realizar nuevos experimentos para disminuir valores de concentración y volumen para realizar un mejor discernimiento y exclusión de parámetros. Los parámetros constantes son volumen de gelatina de 8 μ L, tripsina [100 μ g/ml] y gelatina [6%].

Los resultados son los siguientes:

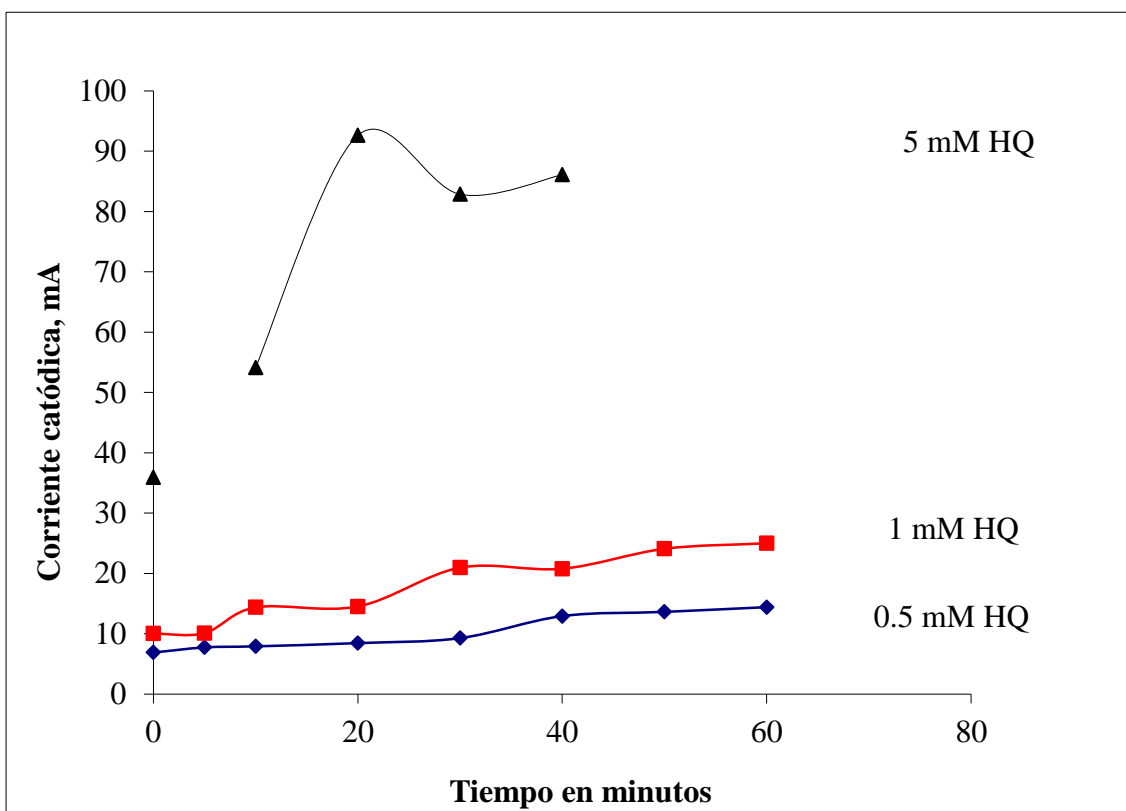


Figura 67: Optimización de corriente catódica de la variación de concentración de (HQ).

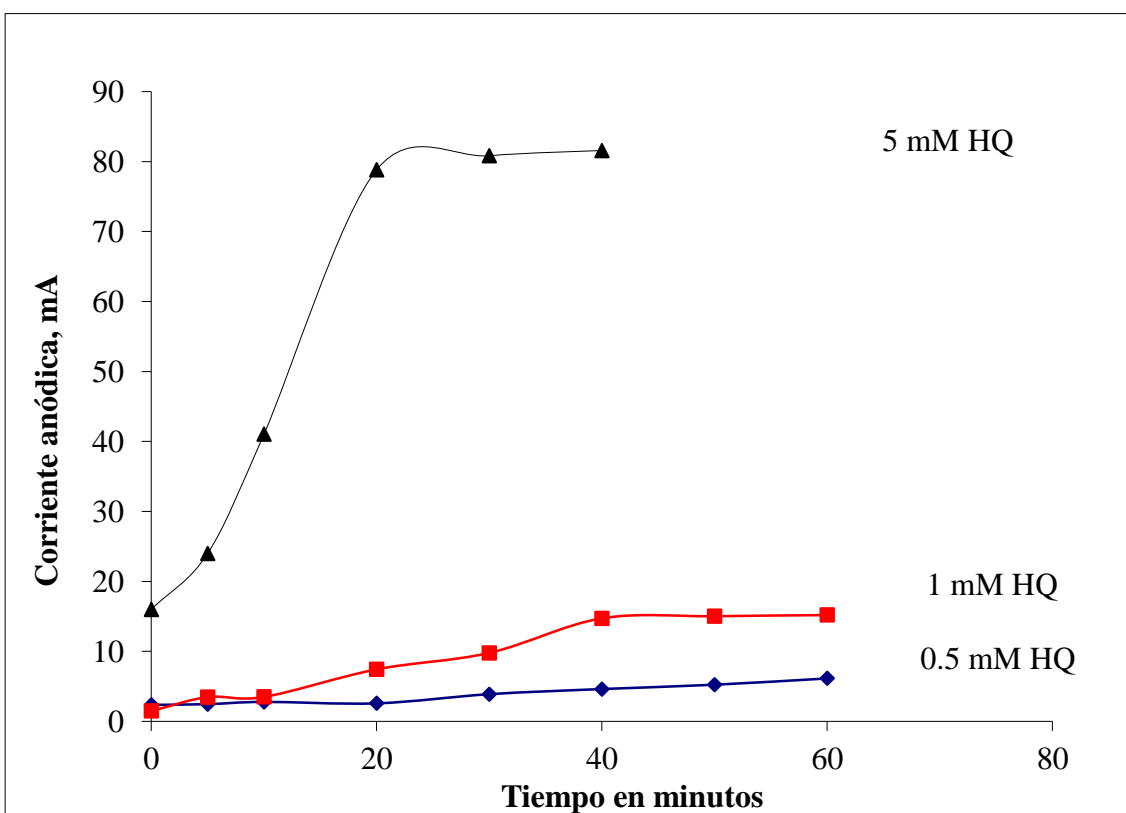


Figura 68: Optimización de corriente anódica de la variación de concentración de (HQ).

Comparando el primer par de graficas con el segundo se obtienen comportamientos similares, por lo que podemos realizar una comparación entre los factores modificados. Los factores que se someten se muestran en la tabla 16.

<i>Volumen</i>	<i>Concentración</i>
10µl	8%
8µl	6%

Tabla 16: Comparación de valor de volumen y concentración de gelatina.

Los resultados se muestran a continuación:

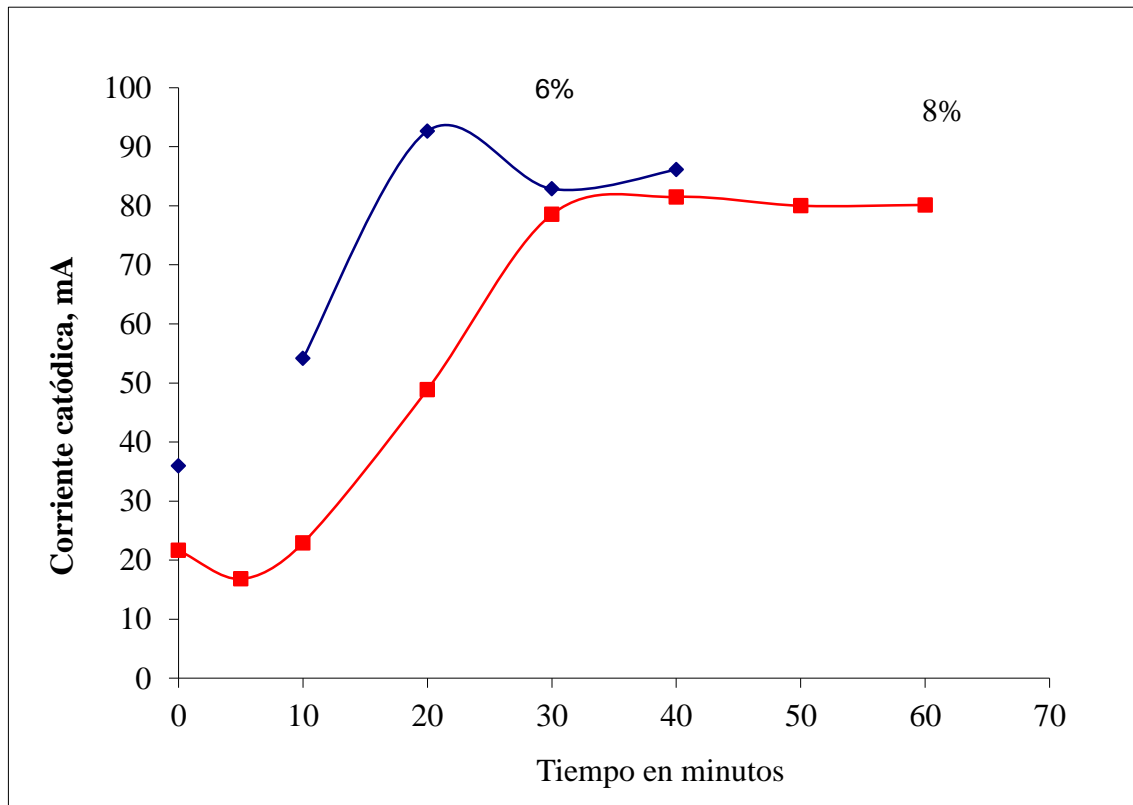


Figura 69: Optimización catódica de la variación de gelatina.

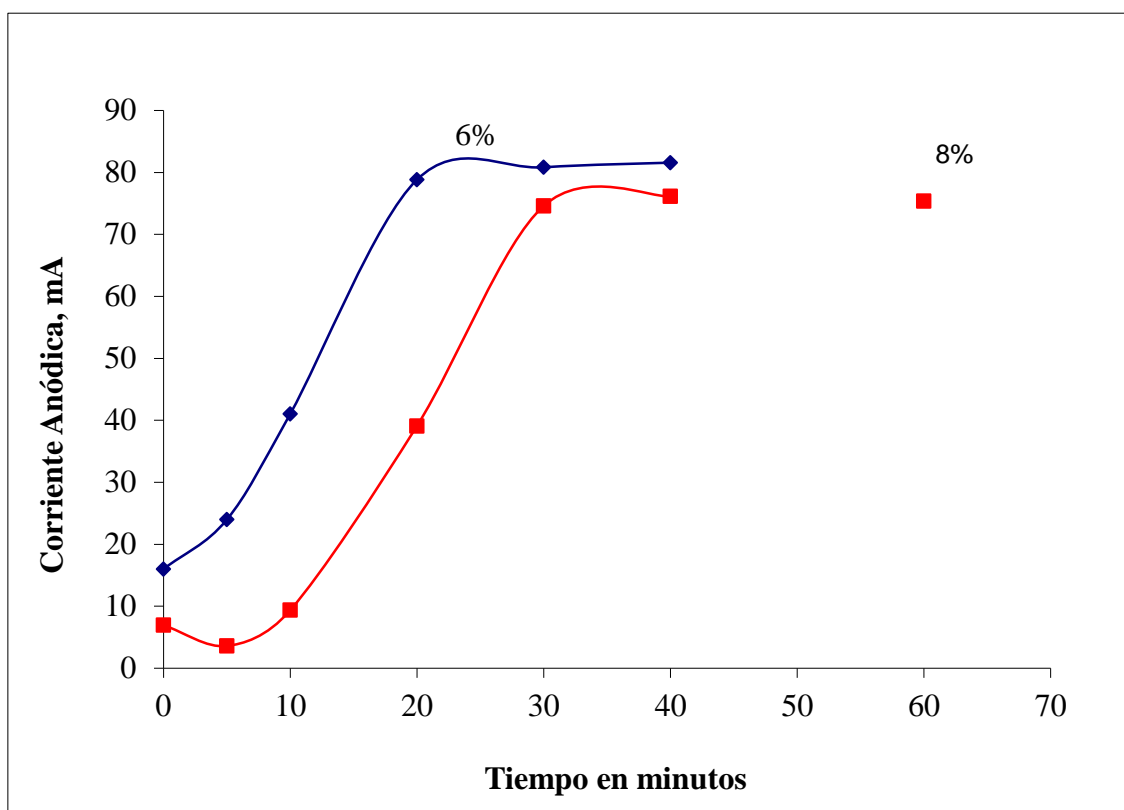


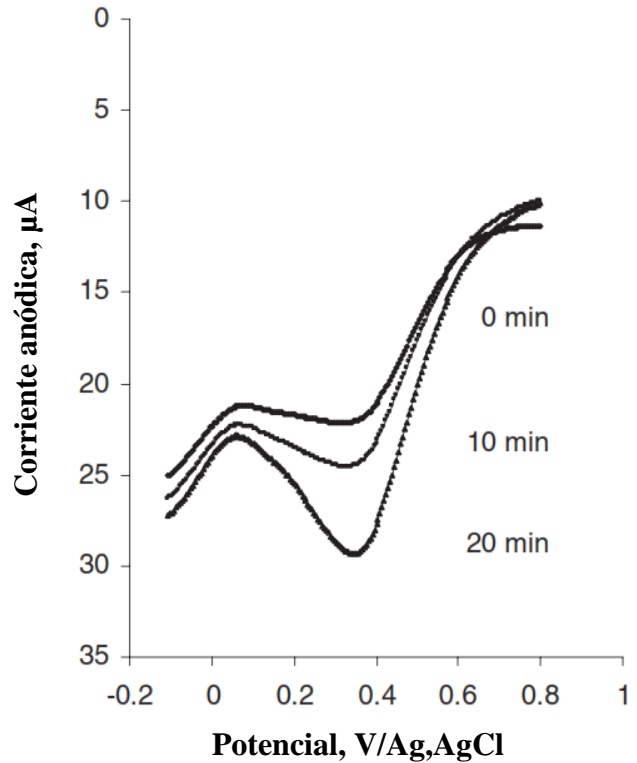
Figura 69: Optimización anódica de la variación de gelatina.

4.4.1 Respuesta anódica

Como se esperaba, la respuesta de corriente aumentó con la concentración de hidroquinona y la permeabilidad de la barrera cinética. La última depende de la concentración de la solución de gelatina, y del espesor de la película de hidrogel, determinada por el volumen de la solución de gelatina depositado.

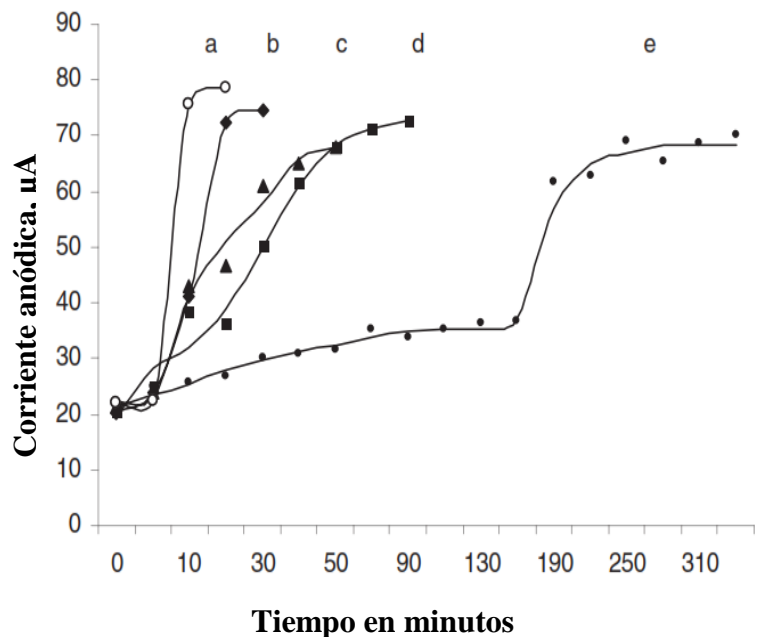
La evolución de la corriente anódica del electrodo recubierto de gelatina a la hidroquinona para diferentes tiempos de incubación (0 min, 10 min, y 20 min) en solución de tripsina de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ se muestra en la siguiente figura.

Figura 70: Evolución de la respuesta de corriente anódica de HQ 1 mM en PBS 0.1M pH7 para diferentes tiempos de incubación en una solución de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y una hidrocapa de gelatina 8%. Técnica voltametría de onda cuadrada, la amplitud del pulso 0.05 V; frecuencia de 30 Hz.



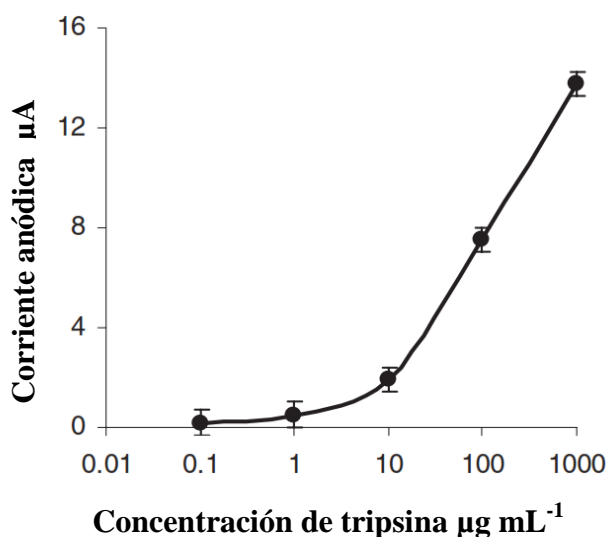
Como se muestra en la figura 70 la respuesta de la película de hidrogel es suprimida antes de la incubación con tripsina. La degradación de la película de gelatina permite el aumento de la corriente del pico anódico. El aumento de la corriente depende de la concentración de la solución de tripsina y el tiempo de incubación.

Figura 71: Corriente del pico de oxidación vs tiempo de incubación y la concentración de solución de tripsina: (a) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) (a) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Como era de esperar en la figura 72 la respuesta de corriente anódica aumentó con el tiempo de incubación. El valor máximo alcanzado corresponde a la degradación completa de la hidrocapa. Se alcanza una degradación a mayor velocidad de digestión de la capa de gelatina al aumentar la concentración de tripsina. La curva de calibración construida para la determinación de la tripsina en el intervalo de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ se muestra a continuación.

Figura 72: Curva de calibración para la determinación de la actividad de tripsina después de un tiempo de incubación de 10 min; $5\mu\text{L}$ de gelatina 8% de gelatina; hidroquinona 1 mM en PBS 0.1 M pH 7.

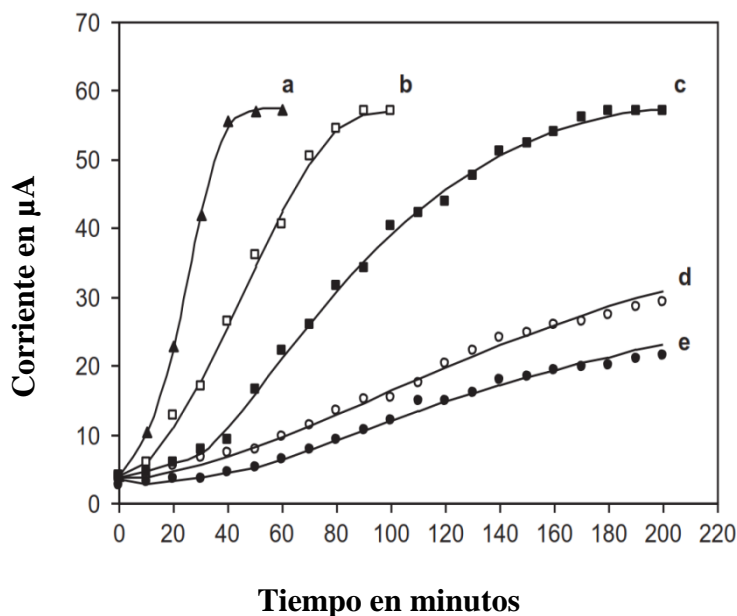


El límite de detección obtenido en condiciones óptimas, evaluada sobre la base de $S/N = 3$ que se alcanzó es de $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$. El valor obtenido por la corriente de oxidación es adecuado para la evaluación de la actividad duodenal de la tripsina en un valor normal de $165\text{-}612 \mu\text{g mL}^{-1}$ [108], y en el rango de pancreatitis crónica $3.2\text{-}76,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ [109]. Aunque el límite de detección es lo suficientemente importante para la corriente de oxidación de HQ, el método es menos sensible en comparación con el registro de la corriente de reducción de 1,2benzoquinona.

4.4.1 Respuesta catódica

El efecto del tiempo de incubación y la concentración de solución de tripsina en el pico de corriente catódica de 1,2-benzoquinona se ilustra en la siguiente figura 73.

Figura 73: Corriente de reducción de pico dependiendo del tiempo de incubación y la concentración de la solución, utilizando el primer sensor 1,2-benzoquinona. Concentraciones de tripsina(a) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y (e) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Con los datos de las diversas concentraciones de tripsina se realiza la curva de calibración tomando en cuenta el tiempo en el que se tiene la actividad máxima, que es a los 10 minutos como se ve en las figuras 71 y 73, a partir del minuto 20 la degradación de la capa de gelatina se ha completado, por lo tanto se cumple otro objetivo que es la reducción del tiempo de análisis.

Los datos obtenidos de los registros de las corrientes catódicas y anódicas son determinantes para la selección de todos los parámetros, se prueba que se puede trabajar con un volumen y concentración menor arrojando resultados con mayor sensibilidad. La selección final de los parámetros es:

Tabla 17: Parámetros de volumen y concentración de gelatina y concentración de HQ óptimos.

Parámetros Óptimos		
<i>Volumen de Gelatina</i>	<i>Concentración de Gelatina</i>	<i>Concentración de HQ</i>
8µl	6%	5mM

Con la identificación de estos factores es posible llegar al siguiente objetivo de caracterizar analíticamente, mediante la construcción de una curva de calibración.

Para esto se han seleccionado una amplia gama de concentraciones:

Tabla 18: Diversas concentraciones de tripsina para la construcción de la curva de calibración bajo condiciones óptimas de operación.

<i>Concentraciones de Tripsina</i>				
1000 µg	100 µg	10 µg	1 µg	0.1 µg

Los factores de tiempo de incubación y concentración de tripsina se mantuvieron constantes: 10 min y 100 µg mL⁻¹ respectivamente, en la siguiente tabla se muestran los resultados del diseño de experimentos de análisis factorial. Se encontró que los valores de *p* de todos los factores considerados son inferiores al valor de $\alpha=0.05$, por lo que afecta a la variable de respuesta y la hipótesis alternativa se debe aceptar como verdadera.

Los valores obtenidos por Minitab® de muestran en la siguiente tabla.

Tabla 19: Los resultados del diseño factorial del análisis de experimentos con Minitab®15.1.30.0 (Minitab Inc.).

<i>Fuente</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor p</i>
Factor A	2	32.6579	16.3290	5679.64	0
Factor B	1	7.7006	7.7006	2678.48	0
Factor C	2	6.1836	3.0918	1075.40	0
Factor A * Factor B	2	3.0276	1.5138	526.54	0
Factor A * Factor C	4	5.2207	1.3052	453.97	0
Factor B * Factor C	2	3.9862	1.9931	693.24	0
Factor A * Factor B * Factor C	4	4.1673	1.0418	362.38	0
Error	18	0.0518	0.0029		
Total	35	62.9957			

De hecho, la respuesta de corriente de reducción de 1,2-benzoquinona aumentó con la concentración y la permeabilidad capa de gelatina. Esta último era dependiente de la concentración de la solución de gelatina y en el espesor de la película de hidrogel, determinada por el volumen de la solución de gelatina depositado. Menor sea la concentración de la solución de gelatina y el volumen de la gota depositada, más alta será la permeabilidad de la capa. Tomando en cuenta estos efectos, otros experimentos se realizaron en las siguientes condiciones experimentales óptimas: concentración de la solución de gelatina 6% y el volumen de 8 μL de la solución de gelatina depositado sobre la superficie del electrodo, lo que permite llegar a una respuesta de corriente máxima para una concentración de analito 5 mM (parámetros óptimos) mostrado en la siguiente figura:

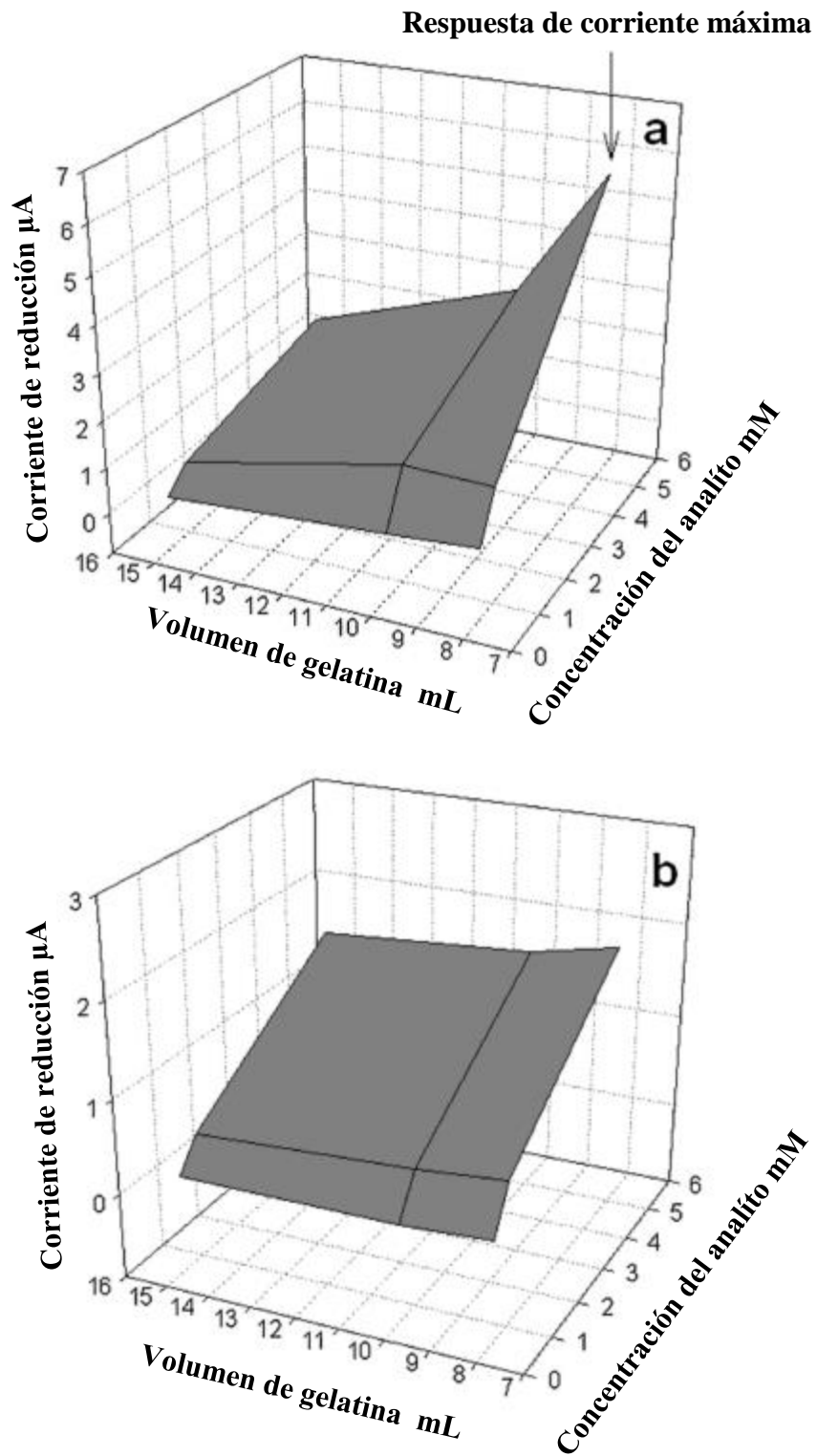
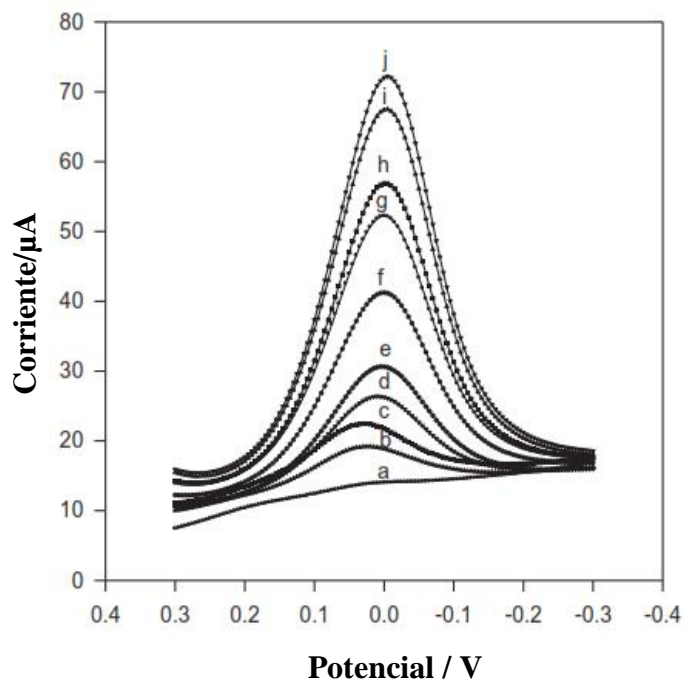


Figura 74: La dependencia de la corriente de respuesta de la concentración de analito y el volumen de solución de gelatina: (a) concentración de la solución de gelatina 6%; (b) concentración de la solución de gelatina 8%.

La respuesta del sensor 1 corresponde a la corriente voltamétrica de reducción de 1,2-benzoquinona se presenta en la siguiente figura bajo las condiciones óptimas mencionadas anteriormente en diferentes tiempos de incubación en $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de solución tripsina se presenta en la siguiente figura 75.

Figura 75: Evolución de la plaza respuesta voltamétrica ola de sensor de 1,2 benzoquinona 5 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7 para tiempos diferentes tiempos de incubación en $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tripsina: (b) 0 min; (c) 10 min; (d) 20 min; (e) 30 min; (f) 40 min; (g) 50 min; (h) 60 min; (i) 70 min; (j) 80 min. (a) blanco tampón fosfato pH7 0.1 M



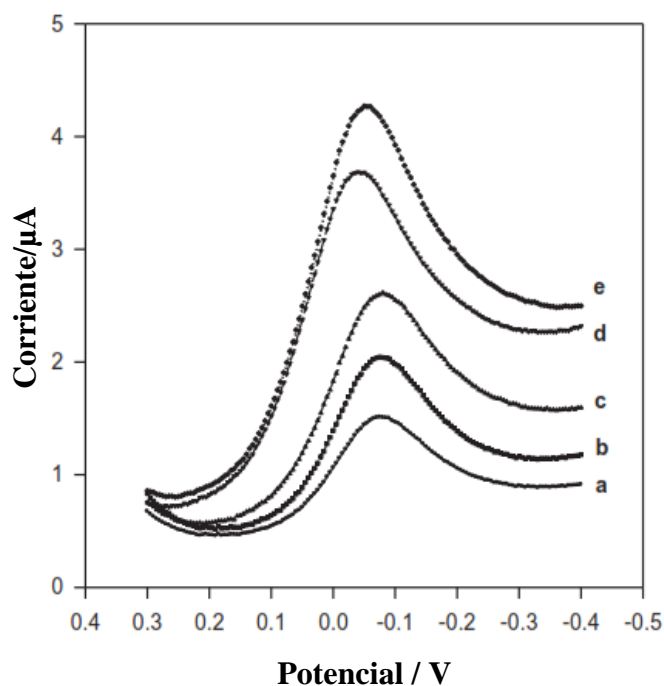
4.6 Electrodo de carbono screen printed modificado con gelatina para evaluar la actividad enzimática de tripsina.

Después de realizar los ensayos preliminares que demuestran la viabilidad del método y permitiendo el establecimiento de condiciones óptimas para la obtención la corriente máxima, la determinación de la actividad de tripsina se logró utilizando un electrodo desechable o también llamado screen printed modificando su superficie con gelatina, que será denominado Sensor 2.

El protocolo para la evolución de la actividad de la tripsina incluye: incubación de gelatina en 30 μL de una solución de tripsina sobre la superficie del electrodo, al finalizar la incubación se continua con un lavado con PBS permitiendo su utilización directa en mediciones de voltametría de onda cuadrada en una celda que contiene una solución 5mM de 1,2-benzoquinona en PBS.

En la figura 76 se presenta la respuesta del sensor 2 a la solución 1,2-benzoquinona después de 10 minutos de incubación en soluciones de tripsina con concentraciones aumenta en el intervalo de $0.1\mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $1000\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 76: Evolución de la respuesta de voltametría de onda cuadrada del sensor 2 a 1,2- benzoquinona 5 mM en tampón PBS pH 0,1 M 7 durante 10 minutos de incubación para concentraciones de tripsina en aumento: (a) $0.1\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $1\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $10\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) $100\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) $1000\mu\text{g mL}^{-1}$.



Los datos del sensor 1 y el sensor 2 fueron utilizados para la construcción de una curva de calibración para la concentración de tripsina (actividad) determinada en el intervalo de $0.1\mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, correspondiente a la actividad enzimática que varía de $0,75\text{ U mL}^{-1}$ hasta 7500 U mL^{-1} , después de un tiempo de incubación de 10 minutos.

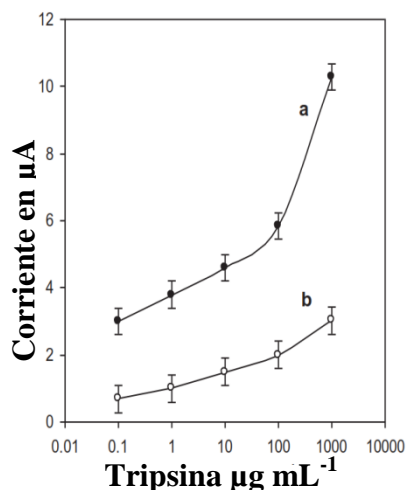


Figura 77: Curva de calibración para la determinación de tripsina después de un tiempo de incubación de 10 min: (a) sensor 1-2, benzoquinona; (b) Sensor 2.

La curva de calibración (corriente vs. logaritmo de la concentración de tripsina) consta de dos partes lineales con diferentes pendientes. La sensibilidad de las determinaciones (la pendiente del gráfico) para el sensor 1 se determinó en $0.79 \mu\text{A mL}\mu\text{g}^{-1}$ en el en el rango de concentración de tripsina de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que en el intervalo de concentración con rango de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ a $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ la pendiente es de $4.44 \mu\text{A mL}\mu\text{g}^{-1}$. La sensibilidad del sensor para bajas concentraciones de la enzima podría mejorarse aumentando el tiempo de incubación. Por lo tanto, se encontró que el límite de detección para la cuantificación de tripsina es de $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, alcanzado un tiempo de incubación de 140 minutos.

La reproducibilidad de las determinaciones es de 2.82% ($n = 3$), evaluada mediante la medición de la corriente de pico de reducción de 1,2-benzoquinona después de la incubación de una serie de electrodos fabricados de forma idéntica en $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de solución de tripsina durante 10 minutos.

Para el Sensor 2, la forma y tendencia de la pendiente es similar a la calibración del primer sensor. La sensibilidad de las determinaciones en el Sensor 2 se encontró que era $0.40 \mu\text{A mL}\mu\text{g}^{-1}$ en el rango de $0.1\mu\text{g mL}^{-1}$ a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, y $1.02 \mu\text{A mL}\mu\text{g}^{-1}$ en el rango de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. El límite de detección se estableció en $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tripsina después de un tiempo de 140 min de incubación. La reproducibilidad de las determinaciones evaluados anteriormente indicado se encontró que era similar, alcanzado al valor del sensor 1 (RSD <3%)

CAPÍTULO V

Microbalanza de cristal de cuarzo para la determinación de la actividad de tripsina.

5 En el capítulo anterior se describió un método por voltametría de onda cuadrada para evaluar la actividad de la tripsina con el que se puede confirmar la eficiencia del método para su implementación como un nuevo método de detección de actividad pancreática.

Pero, el diagnóstico médico, la industria, y la biotecnología requieren de usar métodos para realizar cuantificaciones rápidas, sensibles y fáciles para determinar la actividad de la tripsina. Un enfoque simple, que cumple con todos estos requisitos, es la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), su aplicación permite una rápida evaluación de la actividad de la tripsina por la monitorización en tiempo real de la degradación enzimática del sustrato.

Se ha desarrollado un método de detección electroforética de actividad de la tripsina con nanoporos, basado en la detección de los bloqueos en la corriente iónica debido a la liberación de los hidrolizados de proteínas fue propuesto por Kukwikila y Howorka (2010) [110]. También se lleva a cabo a determinación de la actividad eléctrica de la tripsina utilizando una resistencia recubierta de una delgada capa de silicón aislante (Neff et al., 2007) [111]. Sensores de proteasa basado en resonadores de microesferas ópticas fueron sugeridas por Hanumegowda et al. (2005) [112], mientras que un sensor de tripsina magnetoelástico inalámbrico se fabricó por Wu et al. (2006) [113].

Por lo que en este capítulo se estudia un nuevo enfoque para la determinación de la actividad de la tripsina usando la QCM permitiendo el aumento de sensibilidad, basado en el uso de

nanopartículas de Ag implantadas en la solución de gelatina anteriormente descrita y depositándola sobre la superficie del cristal QCM, como sustrato de tripsina. Durante la degradación enzimática del sustrato por la tripsina, las nanopartículas más pesadas también abandonan la capa sensitiva junto con los productos de la degradación del sustrato, provocando así un mayor cambio de la masa total de la QCM del cambio causado solamente por la degradación del sustrato y por lo tanto un aumento de la respuesta de frecuencia QCM, aumentando la sensibilidad de la determinación.

5.1 Reactivos, materiales y equipos

Gelatina de piel porcina (tipo A, G2500) y tripsina de páncreas bovino (T9201, Z7500 unidades BAEE / mg sólido). Los experimentos se realizaron en una solución tampón de fosfato PBS (0,1 M, pH 8), obtenida disolviendo las cantidades apropiadas de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 en agua destilada. Se utilizó el mismo tampón para preparar las soluciones de enzimas.

La actividad enzimática fue verificada mediante la aplicación de la espectrometría estándar basándose en el protocolo de ensayo fotométrico de Sigma-Aldrich (Bergmeyer et al., 1974) [114]. Los datos obtenidos en diferentes condiciones de almacenamiento fueron consistentes con los definidos por el fabricante.

5.2 Síntesis de nanopartículas de plata

La suspensión acuosa de nanopartículas de plata fue sintetizada aplicando el método electroquímico descrito por Khaydarov et al. (2009). Como cátodo y el ánodo se utilizaron dos barras de plata pulida (5 mm de diámetro y 50 mm de largo)



A



B

Figura 78: Ag Nanopartículas:
(a) solución acuosa;
(b) solución de gelatina

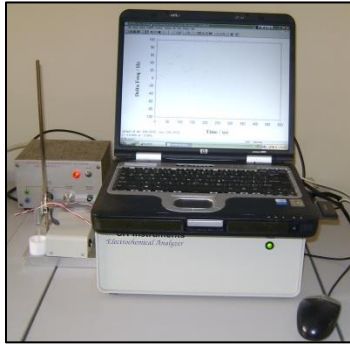
verticalmente colocados frente a frente a una distancia de 10 mm. Los electrodos se sumergieron en 500 ml de agua destilada. La electrólisis se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 25 V, cambiando la polaridad de corriente continua cada 4 minutos, bajo agitación constante para evitar la formación de precipitados, y a una temperatura de 60°C. La dispersión de nanopartículas obtenida se filtró a través de un filtro de papel para descartar los coloides de Ag de mayor tamaño.

5.3 Preparación de una solución de gelatina con Ag NPs

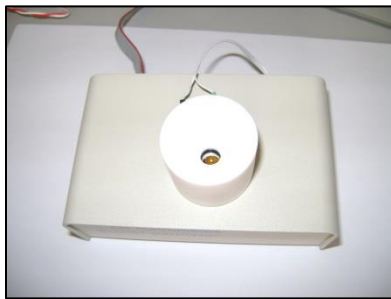
La solución de gelatina 0.8% p/v se preparó disolviendo gelatina de piel porcina en polvo en agua destilada a 60°C a baño maría. La solución formada por gelatina y nanopartículas de plata se obtuvo mediante la adición de la cantidad adecuada de gelatina en polvo a la dispersión de nanopartículas de plata descrita anteriormente hasta alcanzar una concentración de gelatina de 0.8% p/v.

5.4 Medición y modificación de la superficie de QCM

Las mediciones se realizaron utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo electroquímica modelo series CHI400A. El modelo incluye un potencióstato/galvanostato CHI440A, una caja externa con circuito oscilador, y una celda para QCM. La densidad de los recubrimientos de oro en los cristales de cuarzo, con un diámetro de cristal de 13.7 mm y un diámetro de 5.11 mm de recubrimiento de oro, es de 2.648 g cm⁻³. Para un cristal con frecuencia de 8 MHz, el cambio de masa es de 0.14 ng para un cambio de frecuencia de 0.1 Hz.



A



B



C

Figura 79:
Instrumentación para la medición de QCM: (a) equipo CHI440A, (b) vista superficial de celda QCM, (c) celda QCM y potencióstato/galvanostato

Para los objetivos de este trabajo, los cristales de cuarzo fueron modificados esparciendo 2 μL de una solución de triacetato de celulosa en cloroformo en la superficie de la microbalanza, seguida de la deposición, después de la evaporación del cloroformo, de una gota de 4 μL de gelatina 0.8% p/v (sensor 1) y también, la deposición de un volumen similar de una solución de Ag NPs en gelatina 0.8% p/v (sensor 2). Ambos sensores mantuvieron a 4°C por una noche.

La solución triacetato de celulosa se preparó disolviendo 4,5 mg de Gelman GA-1 filtro (5 μm) en 5 mL de cloroformo. Esta solución se forma en la superficie de oro del disco triacetato de celulosa después de la evaporación cloroformo sirve como capa de anclaje entre la superficie de cristal de oro y el hidrogel de gelatina, asegurando una adherencia eficiente.

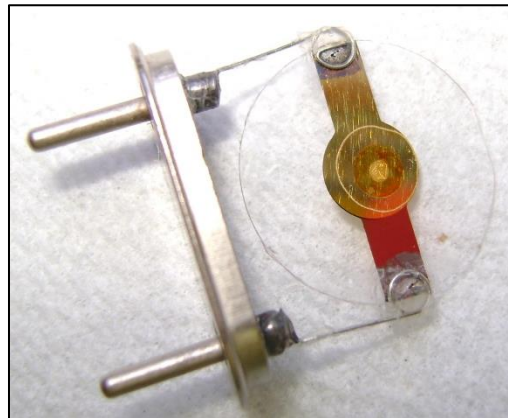
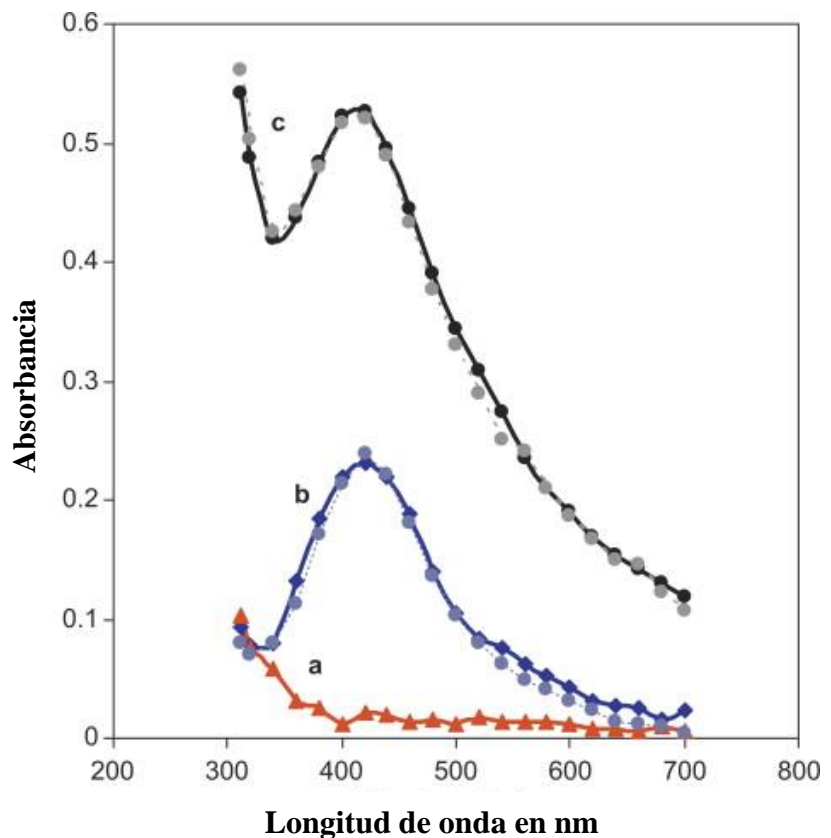


Figura 80: Microbalanza de cristal de cuarzo con la deposición de la solución de Triacetato de celulosa y cloroformo.

5.5 Caracterización de la dispersión de Ag NPs

La dispersión acuosa de las Ag NPs (17 ppm TDS) y la dispersión de Ag NPs en gelatina se caracterizaron por espectrofotometría UV-VIS. La presencia de Ag se puso de manifiesto por la aparición de una máximo de absorción a aproximadamente 420 nm, que se atribuye a la excitación de plasmón de superficie Ag (Evanoff y Chumanov, 2005) [115]. Los espectros de absorción se mantuvieron sin cambios después de almacenar la dispersión de nanopartículas de Ag en agua a temperatura ambiente, y de la solución de nanopartículas de Ag en gelatina a 4°C durante un mes, demostrando así su estabilidad. Los datos obtenidos mediante microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica, y dinámico mediciones de dispersión de luz se podían encontrar en la publicación original de Khaydarov et al. (2009) [116].

Figura 81: Espectros UV-vis de: (a) 0.8% p/v solución de gelatina; (b) Ag nanopartículas en solución acuosa y (c) nanopartículas de Ag en hidrosolución de gelatina, registrados inmediatamente después de la preparación de muestras (líneas continuas) y después de las muestras de almacenamiento para un mes (líneas discontinuas).



5.6 Experimentos para evaluar la degradación de la actividad de tripsina.

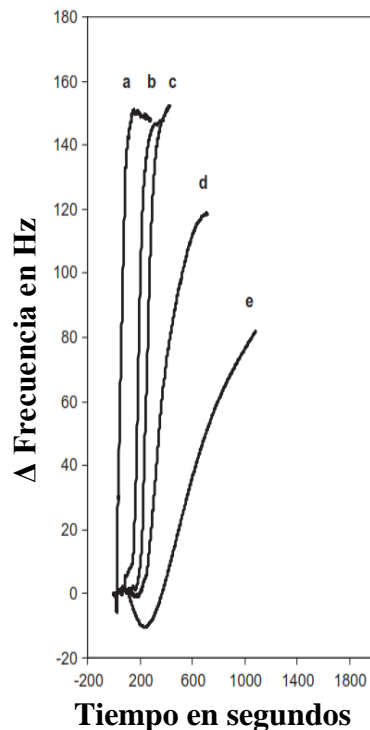


Figura 82: Respuesta del sensor 1 a cambios en la concentración de tripsina: (a) $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, (d) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y (e) $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$. PBS 0.1 M, pH 8, 500 rpm, 26°C .

Los experimentos de degradación para la evaluación de la actividad de tripsina se realizaron de acuerdo con el siguiente protocolo: introducir el cristal de cuarzo modificado en la celda QCM, llenado de la celda con 180 mL de PBS, equilibrar el cristal modificado con la solución PBS durante 10 minutos con agitación constante (500 rpm), añadiendo gota a gota 20 ml de solución de tripsina con una concentración (actividad) definida, y el registro de cambio de frecuencia con el tiempo.

Todos los experimentos se realizaron a 26°C . El cambio de degradación de gelatina se determina por la pendiente de la parte lineal de las curvas registradas: cambio de frecuencia en función del tiempo, variando de la actividad de la enzima. Los experimentos preliminares para demostrar la viabilidad del enfoque propuesto se llevaron a cabo utilizando los cristales modificados con gelatina (sensor 1). La respuesta del sensor a diversas concentraciones de tripsina se muestra en la siguiente figura 82.

La disminución de la frecuencia inicial (aumento de la masa) se atribuye a adsorción de las moléculas de la enzima en la capa de gelatina, iniciando la reacción enzimática y una hinchazón de la película catalítica. La disolución de los productos resulta en un incremento de frecuencia.

Finalmente, se logra la degradación completa de la capa de gelatina, indicada por el cese del cambio en la frecuencia en QCM. Tal modelo de degradación se utiliza para interpretar las

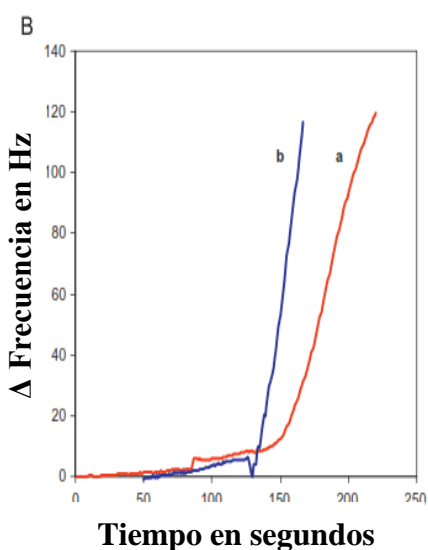
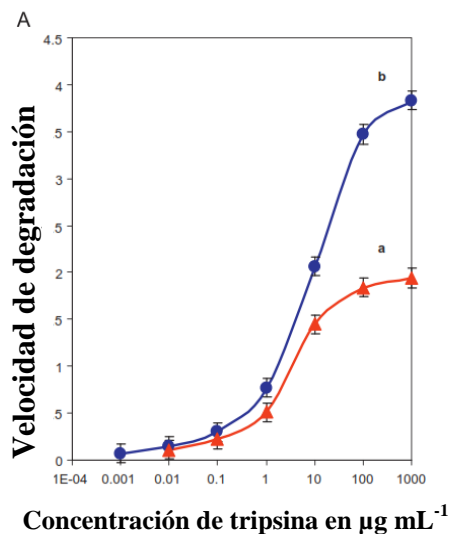


Figura 83: Comparación de respuesta para tripsina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a) Sensor 1;(b) Sensor 2. PBS 0.1M, pH 8, 500 rpm, 26°C .

características expuestas por el hidro-gele de dextrano inmovilizado por cross-linking, así como películas de celulosa y películas de trioleína sometidas a la acción, respectivamente, de la elastasa (Stair et al., 2009) [117], celulasa (Turon et al., 2008) [118], y la lipasa (Snabe y Petersen, 2003) [119], investigada por el uso de las técnicas de la QCM-D y QCM.

El comportamiento descrito es ejemplificado claramente aquí por la respuesta QCM a una baja actividad de tripsina (Figura 82 (e)), donde la degradación de la capa de gelatina disminuye después de una exposición por más de 5 minutos a la acción de la enzima. A valores mayores de actividades enzimáticas, la disminución de frecuencia es insignificante, debido a la rápida degradación de película.

La curva de calibración construida para la evaluación de la actividad tripsina en el rango de 0.075 U mL^{-1} hasta 7500 U mL^{-1} (concentración de la enzima varía de $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), se presenta en la siguiente figura 83. Se encontró que el límite de detección es de 0.0075 U mL^{-1} ($0.0001 \mu\text{g mL}^{-1}$), con base en $S/N = 3$. La reproducibilidad de las determinaciones fue de 0,94% ($n = 4$), este valor fue estimado por la medición de la respuesta de QCM a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tripsina.

Los experimentos posteriores se lograron utilizando los cristales de cuarzo recubiertos con nanopartículas de plata en gelatina (Sensor 2). La curva de calibración se traza con la tasa de degradación de gelatina vs. Concentración de la tripsina ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) se presenta en la figura 83.

Como era de esperar, la señal de QCM fue amplificada debido a la pérdida de nanopartículas junto con la degradación de la capa de gelatina (Fig. 83B). Esta amplificación llevó a un aumento de sensibilidad y permitió llegar a un bajo límite de detección de tripsina en valores de 0.0075 U mL^{-1} ($0.0001 \mu\text{g mL}^{-1}$).

La amplificación de señal es calcula como proporción de las pendientes de la parte lineal de las curvas: cambio de frecuencia en función del tiempo, aplicando respectivamente Sensor 2 y Sensor 1 se muestra en la tabla 20.

Tabla 20: Coeficientes de amplificación de señal para varias concentraciones de tripsina.

<i>Concentración de tripsina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>	<i>Amplificación de señal</i>
0.01	1.39-veces
0.10	1.36- veces
1.00	1.51- veces
10.00	1.42- veces
100.00	1.89- veces
1000.00	1.97- veces

El cambio de frecuencia QCM y la actividad enzimática U con el tiempo $\frac{\Delta f}{\Delta t}$, es correlacionado con la ecuación modificada de Sauerbrey, incluyendo el cambio de masa debido a las nanopartículas liberadas:

$$\Delta f = -k(\Delta m_{NP} + \Delta m_s)$$

Tomando en cuenta que: $\Delta m_{NP} + \Delta m_s = A\Delta n_{NP} + M\Delta n_s$ y $U = \frac{\Delta n_s}{\Delta t}$, se puede obtener:

$$U = -\left(\frac{1}{KM} \frac{\Delta f}{\Delta t} + \frac{A}{M} \frac{\Delta n_{NP}}{\Delta t}\right)$$

Dónde:

f = frecuencia

t = tiempo

m_{NP} = masa de nanopartículas

m_s = masa del sustrato

A = masa atómica de las nanopartículas

M = masa molecular del sustrato

n_{NP} = número de micromoles de nanopartículas

n_s = número de micromoles del sustrato

U = unidades de actividad enzimática

K = constante.

Dependiendo de la frecuencia de resonancia del modo fundamental del cristal f_0 , el area B del disco de oro recubierto sobre el cristal, módulo de corte μ y la densidad del cristal de cuarzo ρ $\left(K = -\frac{2f_0^2}{B\sqrt{\mu\rho}}\right)$. La unidad de la actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la degradación de 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones definidas de los experimentos.

El método desarrollado para la determinación de actividad de la tripsina es uno de los más sensible reportaron hasta ahora. En la siguiente tabla se muestran los límites de detección alcanzados.

Tabla 21: LOD logrado para determinar la de actividad de la tripsina aplicando diversos métodos.

<i>LOD (U mL⁻¹)</i>	<i>Referencia</i>	<i>LOD (U mL⁻¹)</i>	<i>Referencia</i>
0.0001	Hanumegowda et al., 2005 [112]	0.30	Chen et al., 2012 [125]
0.0003	Cai et al., 1997 [120]	0.45	Neff et al., 2007 [111]
0.001	Ionescu et al., 2008 [121]	2.70	Baş and Boyaci, 2010 [126]
0.0094	Ionescu et al., 2006 [122]	5.95	Millington et al., 1995 [127]
0.075	Stoytcheva et al., 2012 [123]	24.00	Wu et al., 2006 [113]
<0.10	Biloivan et al., 2004 [124]		

CAPÍTULO VI

La detección de glicoalcaloides utilizando biosensores desechables basados en enzimas modificadas genéticamente.

6 Las papas contienen sustancias protectoras naturales contra enfermedades e infestaciones de patógeno, conocidos como glicoalcaloides (GAs) [128]. Que han sido considerados como los responsables principales del sabor amargo [129]; α -chaconina y α -solanina son los tipos más predominantes [130], exhaustivos exámenes han demostrado sus efectos tóxicos en humanos y animales [131].

La capacidad del sistema nervioso central para regular la actividad de las colinesterasas (ChE) (acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa)[132] se ve directamente afectado por la acción de los GAs [133]. Se ha descrito en la literatura el mecanismo de toxicidad [134] como una vía de dos pasos; una interrupción temprana de la membrana fosfolípida [135] y en consecuencia permitiendo la inhibición de AChE [136] conduce a trastornos neurológicos y la supresión del sistema nervioso [132].

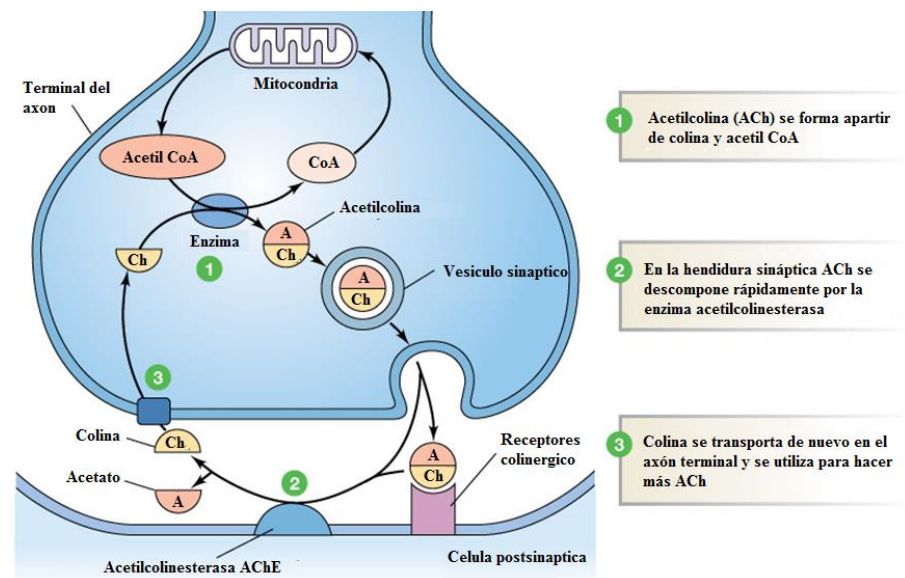


Figura 84: Representación del mecanismo de acción de la acetilconesterasa

Algunos de los síntomas de toxicidad, que normalmente aparecen entre 8 a 12 horas después de la ingesta, implican dolores de cabeza, mareos y trastornos gastrointestinales; casos graves exhiben, temblores constantes, trastornos visuales, alucinaciones, convulsiones, parálisis parcial, coma y la muerte [137-139].

El nivel general de ingesta se ha establecido en 200 mg/Kg tubérculos frescos sin provocar intoxicación [137]. El sabor agrio al consumir una papa conforme avanza el tiempo tiene una sensación ardor y sabor metálico que se caracteriza por concentraciones de GAs de 200-300 mg/Kg [142,143 y 144]. La toxicidad α -chaconina se ha reportado como tres veces mayor que α -solanina [139].

La mezcla sinérgica de α -chaconina y α -solanina se informó por primera vez como un fenómeno real y potencialmente importante [140] y la inhibición sinérgica se confirmó más tarde [141]; el sinergismo entre ellos se basa probablemente en su capacidad de unión de esteroides [140]. Recientemente ha sido clasificada la inhibición GAs como reversible, competitivo y ligeramente antagonista [145]. La mayoría de los biosensores desarrollados basados en la colinesterasa son herramientas que indican la presencia de GAs; y se han caracterizado como de bajo costo rápidos, fiables y eficaces.

Las colinesterasas predominantes son la acetilcolinesterasa (AChE) y Butyrylcholinesterase (BChE). AChE (EC 3.1.1.7) es el principal responsable de conducir la hidrolización del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en la sinapsis colinérgica [133]; se localiza en el cerebro, músculos y membrana de eritrocitos [146]. Por el contrario, BChE (EC 3.1.1.8) se ha considerado como la

"colinesterasa inespecífica"; varios estudios sugieren que está implicada en diversas funciones como hidrolizar las drogas que contienen ésteres y neutraliza los agentes nerviosos inhibidores de la colinesterasa como organofosfatos (OPs) obstaculizando la unión sináptica [147]; es probable que se encuentre en el hígado, intestino, corazón, riñón y pulmón [148]. Ambos GAs son biológica y económicamente importantes [147].

La alteración de las colinesterasas es excepcional por su relación con la enfermedad de Alzheimer y Parkinson. La interacción entre la inhibición de α -chaconina y α -solanina aún ha sido ampliamente estudiada, detallada y comprendida, en otras palabras existe la necesidad de dilucidar el tipo de inhibidores y por otro lado la clasificación de la inhibición de la mezcla. Las técnicas cromatográficas de gases o HPLC han demostrado ser adecuados para la detección de GAs (Kobayashi et al, 1989)[149], pero requieren de tiempos de análisis largos y de una separación previa. Sensores químicos (Yasri et al, 2011) [150] y biosensores (Ben Oujji et al, 2013) [151] se han descrito desde hace muchos años por ser buenos candidatos como herramientas sustitutivas o complementarias a estos métodos sofisticados, ya que pueden proporcionar información cualitativa sobre la composición de los alimentos con un mínimo de preparación.

6.1 Reactivos, materiales y equipos

Ambos glicoalcaloides (GAs) son de brotes de papa y se compraron grado analítico; α -solanina, $\geq 95\%$ (Sigma Aldrich) y α -chaconina $\geq 98\%$ (Carl Roth). Se prepararon en soluciones 1 mM en ácido acético 5 mM y se almacenaron en condiciones de oscuridad a 4 ° C. La enzima genéticamente modificado B-131

(AChE) fue producida por el Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM) (Montpellier, Francia). Butirilcolinesterasa (BChE) a partir de suero de caballo adquirido por Sigma Aldrich.

Antes de la inmovilización, las actividades enzimáticas se midieron espectrofotométricamente usando 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (reactivo de Ellman-DTNB) proporcionado por Sigma. Los sustratos cloruro de acetiltiocolina (ATCh) y cloruro de butiriltiocolina (BTCh) fueron adquiridos en Sigma. Diariamente se preparó una solución madre de ATCh 0,1 M en NaCl [0.9%] y se almacenó a 4 ° C.

La pasta de grafito (Electrodag 423 SS) y la pasta de Ag/AgCl (Electrodag 418SS) se obtuvieron en Acheson (Plymouth, Reino Unido). La pasta de carbono modificado con ftalocianina-cobalto fue adquirida en Gwent Electronic Materials, Ltd. (Gwent, Reino Unido). Las láminas de policloruro de vinilo (PVC) con dimensiones 200 mm × 100 mm × 0.5 mm, fueron suministradas por SKK (Denzlingen, Alemania), utilizadas como soporte para los electrodos serigrafiados. Se usó una pintura gliceroftálica (Astral, Francia) como capa aislante. El polímero fotosensible y unido de manera cruzada (cross-linking) poli (alcohol vinílico) PVA-AWP (Toyo Gosei, Japón) se utilizó para la inmovilización de las enzimas.

Como electrodo de trabajo de utilizo un sistemas de tres electrodos serigrafiados carbono modificado con ftalocianina-cobalto, grafito como electrodo auxiliar y Ag/AgCl como electrodo de referencia, todos fueron fabricados utilizando un sistema screen-printing DEK248 (Weymouth, Reino Unido).

6.2 Preparación del biosensor

La inmovilización de enzimas se realizó mediante atrapamiento físico en un polímero foto sensible (AWP) poli (alcohol vinílico). El polímero AWP se mezcló con una solución enzimática en una relación 70:30% (v/v). La solución fue mezclada en un vórtice y se centrifugo brevemente para eliminar la espuma. Un volumen de 3 μ L se depositó sobre el electrodo de trabajo utilizando una micropipeta. La concentración de la solución inicial AChE se ajustó con el fin de obtener una carga final de enzima de 1 mU/biosensor. Los electrodos fueron expuestos durante 3 horas bajo una lámpara de neón (15W) a 4 ° C para llevar a cabo la fotopolimerización y dejándolos secar durante 48 horas a 4 ° C para su posterior utilización (Istamboulie et al., 2009a) [158].

6.3 Evaluación de la actividad de las colinesterasas

La actividad de ChEs inmovilizadas sobre los electrodos se determinó mediante el control electroquímicamente de la tiocolina formada en la hidrólisis enzimática de ATCh y BTCH. Para las mediciones amperométricas se utilizó un analizador electroquímico (Potenciostato- Galvanostato PG581, Uniscan, Reino Unido), y se elaboró una red neuronal artificial en MATLAB® R2009a 7.8V utilizando la redes neuronales en la paquetería 6.0.2v (MathWorks, EE.UU.).

Este trabajo se concentra en la medición en línea para determinar las afinidades de dos GAs y resolver muestras complejas. Las mediciones amperométricas se llevaron a cabo de la siguiente manera: el biosensor se inserta verticalmente en una celda analítica que contiene tampón PBS bajo agitación magnética constante a

temperatura constante (30 ° C) y a un potencial aplicado de +100 mV vs. Ag/AgCl.

La detección de GAs se realizó por un procedimiento de tres pasos: primero, se registró dos veces la respuesta inicial del electrodo en la inyección de la ATCh (0,5 mM), entonces el electrodo se incubó en una solución que contiene una concentración conocida de GAs durante 2 minutos, y finalmente se registró de nuevo la respuesta residual del electrodo en presencia de GAs y ATCh. El porcentaje de inhibición se correlaciona con la concentración de insecticida.

En segundo lugar se utilizó un método de inhibición para determinar las mezclas de α -solanina y α -chaconina: se registró la respuesta inicial del electrodo al inyectar ATCh (0.5 mM) hasta obtener una señal estable, momento en el que se añaden los GAs. La inhibición es cuantificada mediante la pendiente de la disminución de la señal como se escribe en un reporte previo [156]. Todas las mediciones se repitieron al menos 3 veces y el promedio de inhibición se registró con la desviación estándar.

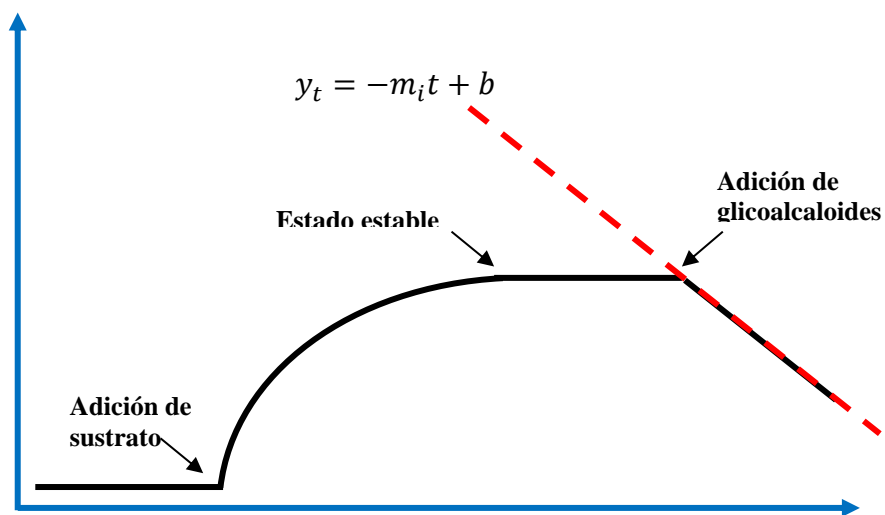


Figura 85: Esquema del protocolo utilizado para la medición one-step de la inhibición de ChE por α -chaconina y α -solanina.

El análisis de los datos de inhibición se llevó a cabo mediante el uso de la función de regresión lineal incluida en Matlab®. Esta función es capaz de encuadrar cualquier ecuación a un conjunto de datos experimentales. En nuestro caso hemos utilizado eq. (3) para modelar la respuesta de inhibición de la biosensor enzimático. Las mezclas de los dos inhibidores se realizaron por diseño factorial [157].

$$y_t = - m_i t + b$$

Dónde:

y_t : es la actividad de la enzima a través del tiempo ($nA s^{-1}$).

m_i : es la pendiente de inhibición por la interacción entre los GAs y la enzima.

b : es el punto de intersección.

6.4 Red Neuronal Artificial

Es importante notar que para las inhibiciones individuales, la pendiente m_i proporciona suficiente información para detectar y discriminar los inhibidores GAs, pero cuando una mezcla compleja se está probando, m_i es el resultado de la interacción de todas las afinidades de los insecticidas que participan en la mezcla, m_i contiene información compleja, que no pueden ser discriminada o modelada por ecuaciones lineales. Una red neuronal artificial se utiliza para modelar la respuesta combinada de los GAs estudiados. La respuesta mixta a α -solanina y α -chaconina se midió construyendo dos biosensores; para llevar a cabo esto, se prepararon un total de 33 soluciones mixtas. De estas 33 mezclas, un conjunto de 25 soluciones fueron elegidas al azar utilizándolas como patrón de formación y 8 mezclas como un conjunto de

prueba. Los rangos de concentración fueron elegidos de acuerdo con el rango de cuantificación de cada inhibidor.

6.5 Estudios espectrofotométricos de la actividad de AChE-B131 en presencia de GAs.

Para clasificar el tipo de inhibición de los GAs en competitivo, no competitivo o incompetitivo es esencial realizar las inhibiciones de manera individual. Se estudió la cinética de la hidrólisis de AChE en presencia de diferentes concentraciones establecidas de α -solanina y α -chaconina. Los ensayos se realizaron por espectrometría bajo condiciones ambientales para determinar la relación entre las concentraciones de sustrato en ausencia y presente de una concentración de los dos GAs.

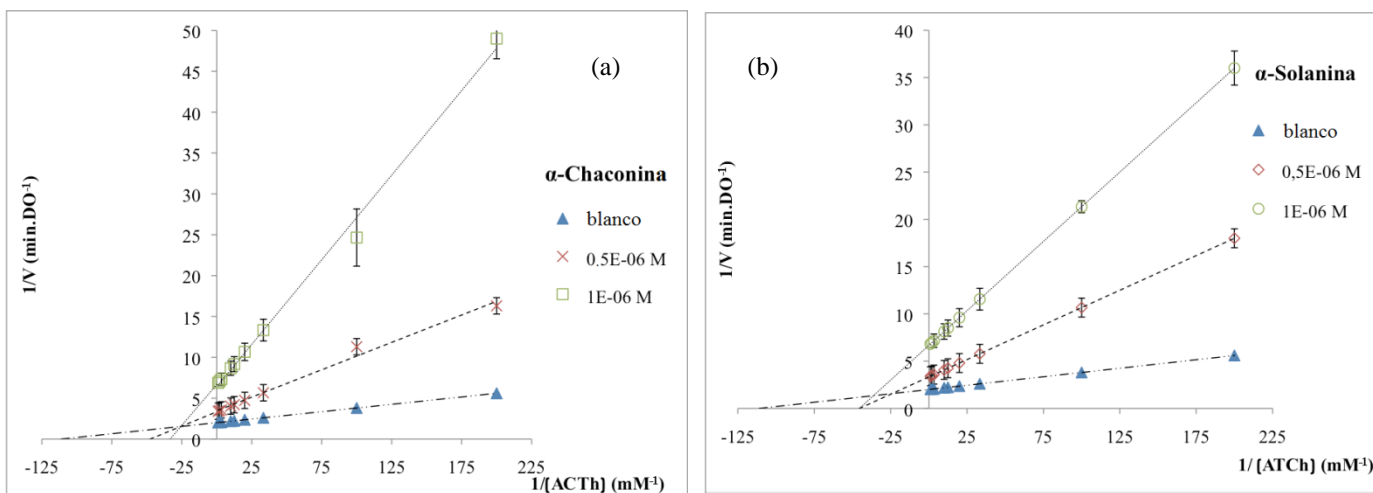


Figura 86: Gráficas Lineweaver-Burk para AChE-B131 inhibida por α -chaconina (a) y α -solanina (b). Procedimiento experimental: 300 μL de DTNB [$2.5 \times 10^{-3}\text{M}$] y 100 μL de ACh (0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 3.5 y 10 mM) fueron añadidos a 500 μL de PBS 0.1M a pH 7, una solución de enzima-Gas conteniendo 0.367 U L⁻¹ de AChE-B131, incubada a 30°C a temperatura controlada fueron registradas en un intervalo de tiempo de 2 minutos; la concentración del inhibidor utilizado fue de 0, 0.5 1 μM .

Como se muestra claramente en el gráfico anterior Lineweaver-Burk se observa una disminución en las velocidades máximas en presencia de 0.5 μM y 1 μM de GAs ($V_{m0} = 0.50 \text{ AU min}^{-1}$, $V_{\text{mapp}(0.5\mu\text{M})} = 0.29 \text{ AU}\cdot\text{min}^{-1}$ y $V_{\text{mapp}(1\mu\text{M})} = 0.16 \text{ AU min}^{-1}$), así como un aparente aumento de las constantes de Michaelis para α -chacónina, ($K_M = 10\mu\text{M}$, $K_{\text{Mapp}(0.5\mu\text{M})} = 19\mu\text{M}$ y $K_{\text{app}(1\mu\text{M})} = 32 \mu\text{M}$) y en presencia de 0.5 μM y 1 μM de α -solanina ($K_m = 10 \mu\text{M}$, $K_{\text{mapp}(0.5\mu\text{M})} = K_{\text{mapp}(1\mu\text{M})} = 2.2 \mu\text{M}$).

Estos resultados son característicos de una inhibición de tipo mixto; además, una inhibición total se observó para las concentraciones de GAs a una concentración de 50 μM .

6.6 Sensores basados en colinesterasas

La literatura que describe en detalle la cinética de inhibición de GAs es limitada. Se realizaron experimentos para el desarrollo de las características cinéticas de inhibición con el fin de establecer la reversibilidad o irreversibilidad de inhibición. Las pruebas se realizaron mediante técnicas amperométricas utilizando un biosensor basado en la colinesterasa descritas anteriormente [156]. La estabilidad de la AChE-B131 inmovilizada se evaluó midiendo sucesivamente la respuesta del mismo electrodo enzimático en 0.5 mM ATCh, a 100 mV vs Ag/AgCl. Los sensores se enjuagaron entre cada una de las pruebas con agua destilada. Los biosensores demostraron ser estables durante al menos 10 mediciones consecutivas y presentaron una buena reproducibilidad, con una variación máxima de señal del 5%. La respuesta recuperada de biosensor inhibido después de ser enjuagado con agua destilada fue del 100%. La respuesta promedio a 0.5 mM ATCh para 5 electrodos preparados en las mismas condiciones experimentales

fue de 215 ± 11 nA. Estos datos de reproducibilidad se refieren al valor medio de diez ensayos para cada electrodo.

Con el fin de estudiar el efecto de los GAs en la enzima inmovilizada, se estudió la inhibición del sensor basado en AChE-B131 usando $20 \mu\text{M}$ de α -chaconina y 5 concentraciones diferentes de ATCh (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM). Los biosensores se lavaron con agua destilada después de cada medición de la inhibición y se reutilizaron por lo menos 5 veces.

Los resultados demuestran de nueva cuenta la reversibilidad del sistema así como la alta reproducibilidad de la inhibición. El valor de inhibición promedio fue de alrededor del 69% ($\sigma = 1,60$) a cualquier concentración de sustrato. Se debe hacer hincapié en que la inhibición no fue inversa incluso utilizando altas concentraciones de sustrato, como generalmente se observa en las inhibiciones competitivas.

Con el fin de obtener una respuesta inicial alta, la mejor concentración de sustrato para subsecuentes experimentos ha demostrado ser 0.5 mM. Basándose en este hecho, el siguiente paso ha sido determinar el porcentaje de inhibición para diferentes concentraciones de inhibidor. Cada experimento se repitió tres veces. Ambos GAs son inhibidores reversibles, pero la inhibición de α -chaconina ha demostrado ser más rápido que α -solanina, Demostrando su toxicidad superior, como se ilustra en la figura 87.

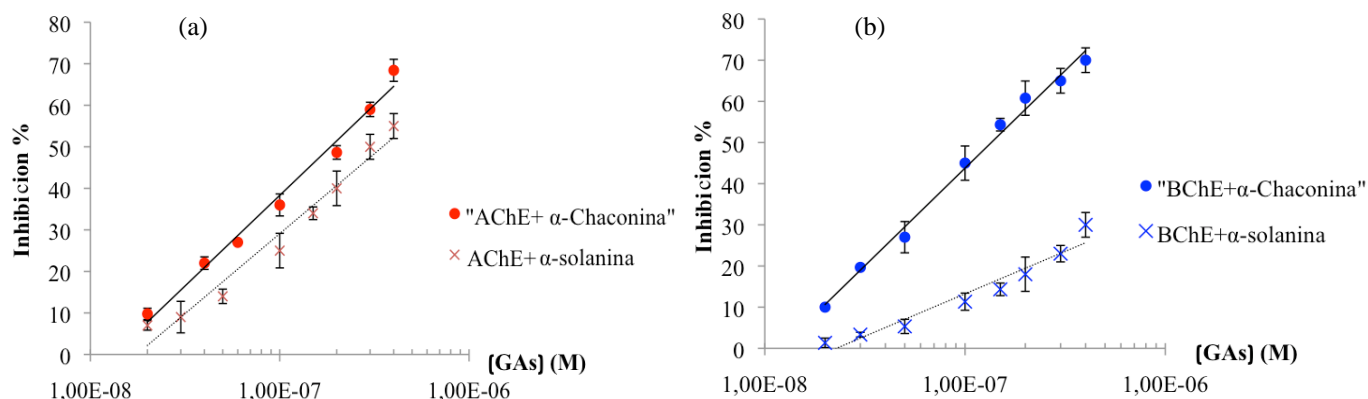


Figura 87: Efecto de la inhibición de α -chaconina [\bullet] y α -solanina [\times] en un sensor basado en AChE-B131 en presencia de ATCh 0.5mM (a) un sensor basado en BChE en presencia de BTCh 0.5mM. Tiempo de incubación de 2 minutos. Ecuaciones de regresión: [a^*] $y = 18.94 \ln(x) + 343.6$; $r^2 = 0.987$, [a_x] $y = 16.72 \ln(x) + 298.52$; $r_2 = 0.97$, [b^*] $y = 20.59 \ln(x) + 375.61$; $r^2 = 0.992$, [b_x] $y = 8.95 \ln(x) + 157.58$; $r^2 = 0.94$.

Para proporcionar una mejor comprensión de la sinergia de la mezcla de glicoalcaloides, es necesario analizar y evaluar las inhibiciones individuales. El límite mínimo de detección (LOD) fue definido según la desviación estándar de la línea base de ruido observada en el ausencia de inhibidor ($\sigma = 3 \text{ nA}$); así, el LOD corresponde a la concentración GA más baja que induce una inhibición equivalente a 3σ . El límite mínimo de cuantificación (LOQ) fue definida como la concentración del inhibidor que induce el 10% de la inhibición. La figura 87 muestra que la inhibición producida por α -chaconina fue similar utilizando sensores basados en AChE-B131 o BChE (LOD = 15 nM, LOQ = 20 nM respectivamente). En contraposición, la inhibición de α -solanina fue mucho más alta usando AChE-B131 (LOD = 23 nM, LOQ = 30 nM) que BChE (LOD = 40 nM, LOQ = 100 nM). Por lo tanto, debido a la diferencia de comportamiento, el uso complementario de AChE-B131 y BChE podría permitir la detección selectiva de los dos GAs investigados en este estudio.

6.7 Efectos de la mezcla de α -chaconina y α -solanina en sensores basados en colinesterasas

Los biosensores que incorporan 1 mU de AChE y BChE se utilizaron en una segunda etapa para la evaluación de las mezclas de GAs. La siguiente tabla 21 muestra la inhibición global inducida por mezclas de α -chaconina y α -solanina. Los resultados se compararon con la inhibición inducida individualmente de cada GA. Se ha observado que en los ensayos de sensores basados en colinesterasas que combinan α -chaconina y α -solanina la inhibición en no es aditiva [155].

Tabla 20: Inhibición de sensores basados en colinesterasas medida en presencia de 0.5 M de sustrato después de 2 min de la incubación de cada uno de GA a diferentes concentraciones, y con sus correspondientes mezclas.

	α -Chaconina (M)	% inhibición	α -Solanina (M)	% inhibición	% inhibición de la mezcla
AChE-B131	9.0E-08	36.3 ± 3.7	9.0E-08	27.3 ± 2.8	40.4 ± 6.5
	1.5E-07	46.0 ± 3.5	1.5E-07	35.8 ± 3.7	48.7 ± 5.7
	3.5E-07	62.0 ± 1.6	3.5E-07	50.0 ± 2.6	65.4 ± 2.9
BChE	9.0E-08	41.6 ± 4.3	9.0E-08	12.3 ± 1.4	40.5 ± 5.2
	1.5E-07	52.1 ± 3.7	1.5E-07	16.8 ± 3.7	53.3 ± 4.6
	3.5E-07	69.5 ± 2.7		24.4 ± 4.2	70.7 ± 3.6

6.8 Método de detección en solo un paso “one-step”

Para superar el problema de problema de inhibición no aditiva en los sensores basados en colinesterasas, se registró la pendiente de la inhibición m_i de la presencia de GAs en tampón PBS. La siguiente tabla 21 se presenta la medición de la pendiente m_i para las mezclas de α -chaconina y α -solanina.

Tabla 21: Pendiente de inhibición de sensores basados en ChE medida utilizando el método de un solo paso en presencia de 0.5 M de sustrato después de la adición de cada GA a diferentes concentraciones, y sus correspondientes mezclas.

α - chacónina (μ M)	α -solanina (μ M)	m_i (A/sec) "AChE-B131"			m_i (A/sec) "BChE"		
		α - chacónina	α - solanina	mezcla	α - chacónina	α - solanina	mezcla
0.05	0.2	2.6 E -06	2.7 E -06	4.7 E -06	1.8 E -06	1.4 E -06	3.3 E -06
0.13	0.3	3.4 E -06	3.4 E -06	6.7 E -06	3.0 E -06	1.7 E -06	4.8 E -06
0.23	0.1	4.1 E -06	1.4 E -06	5.8 E -06	3.8 E -06	7.8 E -07	4.2 E -06
0.2	0.35	4.0 E -06	3.7 E -06	7.0 E -06	3.6 E -06	1.9 E -06	5.0 E -06
0.07	0.4	2.7 E -06	3.9 E -06	6.8 E -06	2.3 E -06	2.0 E -06	4.3 E -06
0.1	0.13	3.1 E -06	1.9 E -06	5.0 E -06	2.7 E -06	1.0 E -06	3.5 E -06
0.25	0.25	4.2 E -06	3.1 E -06	6.8 E -06	3.9 E -06	1.6 E -06	5.3 E -06
0.2	0.2	4.0 E -06	2.7 E -06	7.1 E -06	3.6 E -06	1.4 E -06	5.7 E -06

Incluso si la inhibición global de los sensores basados en colinesterasas no es aditiva, los resultados de la pendiente m_i de inhibición confirma la posibilidad de detectar el efecto de mezclas de GA.

Como se especificó previamente, un conjunto de 33 soluciones mixtas de α -chacónina y α -solanina se preparan para la construcción del modelo de respuesta. El rango de concentración de α -chacónina fue de 10-300 nM y para α -solanina de 75-400 nM. El conjunto de soluciones se subdividió aleatoriamente en subgrupos (es decir. entrenamiento y prueba), necesarios para la correcta formación de la red. Solo una precaución fue tomada, que fue el reservar los valores extremos para el subconjunto de formación, con el fin de evitar el ajuste de extrapolar los puntos salientes del modelo obtenido de la red neuronal artificial (ANN).

La arquitectura de la ANN usada fue estudiada exhaustivamente desde una configuración inicial utilizando una simple capa oculta. En este caso, la pendiente de la inhibición medida para cada solución mixta de GAs era utilizada como información de entrada para la ANN. Así, el número de neuronas en la capa de entrada igualó al número de biosensores utilizados, dos. De forma análoga,

ya que había dos concentraciones incógnitas, la capa de salida se formó por dos neuronas de salida. El número de neuronas en la capa oculta se determinó por ensayo y error buscando el modelado óptimo para la ANN.

Tomando como base experiencia previa, algunos detalles de configuración se fijaron a priori [155], incluyendo la tasa de aprendizaje (α) y el ímpetu (β), que tomó los valores de 0.1 y 0.4, respectivamente. Las funciones de transferencia utilizadas en las capas de entrada y salida también fueron propuestas para tener un comportamiento lineal. Por otra parte, los datos fueron ordenados por rango antes de su utilización para que tuvieran un valor entre -1 y 1, habiendo demostrado que este procesamiento previo facilita el proceso de modelado [158].

Como puede verse en la tabla 22, se obtuvieron muy buenas correlaciones tanto para la formación y los datos de prueba externos en comparación con líneas indistinguibles de los valores teóricos. Por lo tanto, la capacidad de predicción de los dos modelos puede ser considerada como satisfactoria para ambos GAs.

Tabla 22: Resumen de los ajustes obtenidos para los dos GAs con conjunto de pruebas de formación (n=25) y externas (n=8)

ANN		Pendiente m_i	Intercepción (μM)
Formación	α -chaconina $r = 0.985$	0.99 ± 0.04	0.004 ± 0.01
	α -solanina $r = 0.991$	0.99 ± 0.06	0.009 ± 0.03
Prueba	α -chaconina $r = 0.996$	0.98 ± 0.03	0.003 ± 0.13
	α -solanina $r = 0.993$	0.99 ± 0.04	0.002 ± 0.09

La mejor configuración de ANN tenía cuatro neuronas en su capa oculta usando la función de transferencia (r) es el coeficiente de correlación. Intervalos de confianza se calcularon a nivel de confianza del 95%.

Se ha demostrado la inhibición reversible de los glicoalcaloides en AChE B-131 y BChE. El mecanismo de inhibición se basa en la unión no covalente; de todos los gráficos es posible clasificar la inhibición como no aditiva. Sin embargo, el estudio de la inhibición de la pendiente y la modelización basada en la respuesta de las ChE utilizando herramientas quimiométricas permitiendo la detección de su presencia en la mezcla.

6.9 Efecto de la matriz del tubérculo

El método propuesto se comprobó con muestras reales complejas para demostrar su viabilidad. Se analizó una flóculo de patatas directamente mediante la adición de 2 g de polvo del flóculo en la celda de medición (10 ml), y después se le suministran varias concentraciones de α -chaconina y α -solanina. Las muestras sin agregar los GAs no revelaron ningún efecto inhibitor, mientras que las muestras con GAs mostraron algo de inhibición, que podría ser estimado la red ANN desarrollada.

Tabla 23: Resultados obtenidos para la determinación de α -chaconina y α -solanina a partir de muestras de flóculos de papas.

Muestra	Concentraciones de Gas añadidas		Valores encontrados (ANN)	
	α -chaconina	α -solanina	α -chaconina μM ($\mu\text{g/g}^*$)	α -solanina μM ($\mu\text{g/g}^*$)
1	0.8	0.8	0.197 ± 0.012 (0.84)	0.18 ± 0.011 (0.79)
2	0.8	0.1	0.185 ± 0.009 (0.79)	0.025 ± 0.003 (0.11)
3	0.1	0.8	0.026 ± 0.002 (0.11)	0.18 ± 0.014 (0.78)
4	0.5	0.5	0.12 ± 0.011 (0.51)	0.115 ± 0.012 (0.5)
5	0.05	0.1	0.013 ± 0.002 (0.05)	0.025 ± 0.003 (0.11)

* $\text{In } \mu\text{g g}^{-1}$, calculado a partir de la concentración (μM) * V_{celda} (L) * MW_{GA} (g mol^{-1})/masa de flóculo (g).

Como puede verse en la tabla 23, los valores encontrados con la ANN son consistentes con las concentraciones de los GAs añadidos al flóculo. Se han calculado los rendimientos de recuperación promedio, como $(P_1/P_0)100$, donde P_0 es la cantidad adicional de GAs y P_1 es la cantidad encontrada, fueron entre 105 y 97% para las dos toxinas.

Estos resultados sugieren que el método propuesto es eficaz para resolver las mezclas de GAs considerados en las muestras reales usadas. Debido a la amplia variedad de posibles inhibidores de la colinesterasa, estas enzimas son susceptibles de ser inhibidas por varios componentes, incluyendo inhibidores irreversibles tales como los OPs, metales pesados, o neurotoxinas. Incluso si algunas de estas moléculas pueden estar presentes en la piel de la papa, no se encontraron dentro de la matriz, como evidencia de la ausencia del fenómeno de la inhibición irreversible.

CAPÍTULO VII

Caracterización de nanopartículas magnéticas en QCM

7 La implementación de nanotecnología en los biosensores ha revolucionado la forma en que se investigan y desarrollan estos dispositivos. A nivel internacional la nanotecnología se ha ido consolidando como una nueva herramienta para manipular a niveles micro y nanométricos mejorando sus propiedades físico-químicas. En los últimos años las nanopartículas han sido ampliamente aplicadas a causa de sus potenciales aplicaciones y su fundamental importancia científica. [159],[160 y [161]. La caracterización de los fenómenos cinéticos involucrados en el desarrollo de biosensores a escala nanométrica ha permitido su estudio, comprensión y descripción a detalladamente.

Las nanopartículas magnéticas MNPs han sido aceptadas en el sector médico que ha mostrado un especial interés por sus características físicas como el comportamiento magnético y su pequeño tamaño les permite interactuar a nivel celular, sub-celular e incluso molecular. [162]. Por otro lado, su producción con una distribución de tamaño deseado, aceptado ha representado un problema para los investigadores. [163].

Las nanopartículas de magnetita Fe_3O_4 han demostrado ser de gran interés determinado por las posibilidades de diferentes aplicaciones en electrónica (tinta magnética, soporte de grabación) y la medicina (medios de contraste de resonancia magnética o agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer, etc.) [164]. Tienen una fuerte influencia en el comportamiento magnético de estos materiales nanoestructurados magnéticos, por lo tanto la formación de mono-dominios es esperada como resultado del pequeño tamaño crítico del campo magnético [165].

La mayor ventaja de las nanopartículas paramagnéticas se relaciona con su rápida y fácil separación mediante la aplicación de un campo magnético externo. [166].

La encapsulación de magnetita en gelatina (IOPs por sus siglas en inglés) es uno de los biomateriales más importantes para diversas aplicaciones biomédicas mostrando importantes características súper-magnéticas y de bio-compatibilidad [168].

Una cuestión crítica en el uso de la IOPs se refiere a la funcionalidad o modificación de superficie de las nanopartículas para impartir biocompatibilidad, especificidad de ataque y la asimilación de las propiedades biológicas a las nanopartículas. [167].

La modificación de superficie implica el desarrollo de estructuras núcleo-corteza para crear un nuevo tipo de material en el que las propiedades magnéticas únicas de la corteza se combinan con todas las funciones biológicas del núcleo. Cada uno de los materiales de recubrimiento tiene su propia importancia desde el punto de vista biomédico. Polímeros como el polietilenglicol, polivinilpirrolidona y dextrano se utilizan con el fin de mejorar la biocompatibilidad, el tiempo de circulación de la sangre y para estabilizar soluciones coloidales [168].

Las NPs en gelatina se han estudiado ampliamente como un sistema de administración de fármacos y genes para aplicaciones farmacéuticas y médicas [169],[170] y [171]. Propiedades como biodegradabilidad, biocompatibilidad y presencia de grupos multifuncionales promueven el uso de gelatina como un candidato

prometedor para la modificación de la superficie [172]. Idealmente, la gelatina se puede utilizar para encapsular nanopartículas magnéticas y medicamentos farmacéuticos para unirse en su superficie o en su interior y podrían ser guiadas a los órganos [173]. El desarrollo de microesferas y nanopartículas magnéticas, utilizando gelatina como soporte, es una nueva área y sólo unos pocos trabajos de investigación han desarrollado [174]. El proceso de encapsulación se puede realizar mediante la elaboración de una dispersión de magnetita en la solución del polímero (por ejemplo, gelatina), seguido de la adición de un solvente orgánico en el que ambos componentes son insolubles y la posterior unión cruzada [173].

Recientes investigaciones en materiales magnéticos nanoestructurados se han realizado caracterizando los dominios magnéticos en las nanopartículas superficiales con microscopía de fuerza magnética (MFM), detectando el campo magnético en las muestras [175], [176],[177] y [178]. Los estudios a partir de MFM se han centrado esencialmente en recabar información medios magnéticos y materiales magnéticos multi-dominio, así como en la caracterización de punta y su complementado con el análisis de la topográfico por microscopía de fuerza atómica (AFM) [179]. Las imágenes obtenidas por MFM se producen por el escaneo del campo magnetostático de las fuerzas de atracción y repulsión involucradas entre la punta magnética en dirección vertical y en posición horizontal la superficie de una muestra. Para que la muestra se magnetice la punta magnética debe formar un dipolo magnético capaz de magnetizar la superficie de la muestra; los cambios en los campos magnéticos son representados en las imágenes MFM por regiones oscuras y las regiones brillantes representan los campos no-magnéticos. Así, los grandes cambios

negativos (repulsión) son zonas oscuras mientras que grandes cambios positivos (atracción) son zonas brillantes [180] y [181]. Como se mencionó en el capítulo 5 se obtuvo un aumento significando en la amplificación de señal de la QCM al incorporar AgNPS, por lo que se consideró importante incorporar un nuevo material nano estructurado como las Fe_3O_4 NPs obtenidas de manera in situ. La preparación se llevó a cabo siguiendo la descripción hecha por [182] y [183]. De manera resumida, se añadieron $240\mu\text{L}$ de una solución $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol/5mL 0.01N HCl) a 80 mL de una solución acuosa conteniendo 240 mg de gelatina porcina; seguido de $86\mu\text{L}$ de una solución NaNO_3 (6 mmol/5mL H_2O). Promoviendo la reacción por poco más de 10 minutos, se ajustó el valor de pH hasta 9.5 añadiendo gotas de NaOH 1N.

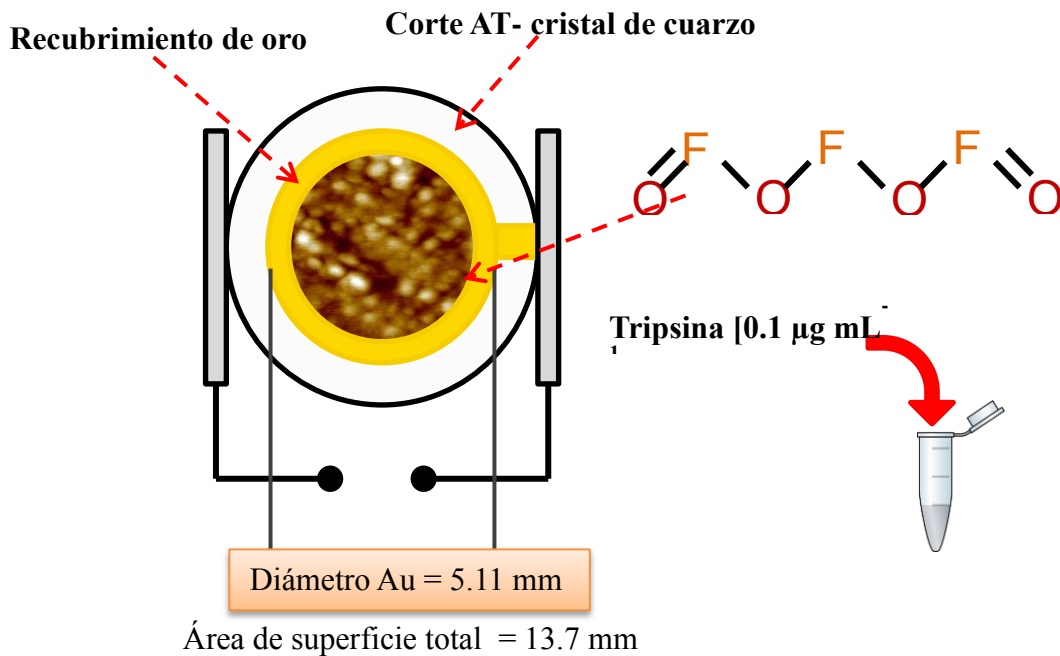


Figura 88: Esquema de la modificación de superficie de la QCM con MNPs

Se siguieron las mismas condiciones de preparación de QCM mencionadas en el capítulo 5, se depositaron 4 μ L de la solución de gelatina con MNPs y se acondiciono previamente la superficie con triacetato de celulosa y cloroformo.

7.1 Caracterización por AFM

Se realizaron experimentos previos para determinar las características morfológicas de la superficie nanomodificada mediante una secuencia de pasos, primeramente se utilizaron muestras de tiras poliméricas modificadas con la solución de MNPs en gelatina después de su modificación, se determinó un área específica dentro de la muestra para subsecuentes mediciones. En segundo lugar se realizó una adición de 1 μ L de tripsina previamente preparada a una concentración de 1 μ g mL⁻¹ en la misma zona para registrar la digestión progresiva de la gelatina nanomodificada. Se expusieron las muestras a un total 3 adiciones de 5, 30 y 60 minutos respectivamente de la solución de tripsina.

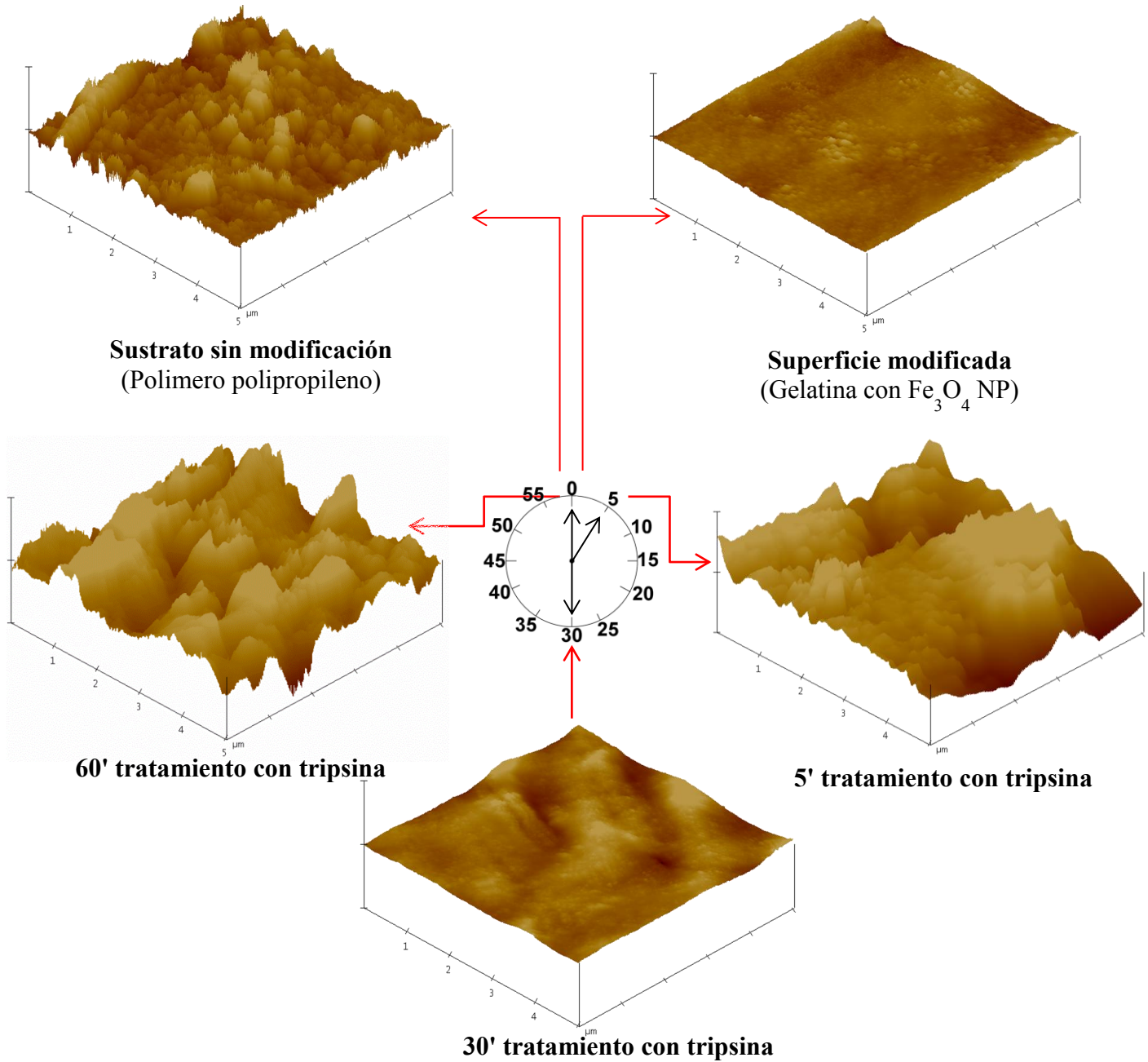


Figura 89: Representación de la modificación de la superficie nanoestructurada por el tratamiento de diferentes tiempos de solución tripsina por efecto de degradación. Imágenes AFM 5 μm .

Para la obtención de las imágenes topográficas se utilizó un microscopio de fuerza atómica modelo NanoScope® III y para el

análisis de las mismas se usó el software NanoScope® Analysis V4.0.

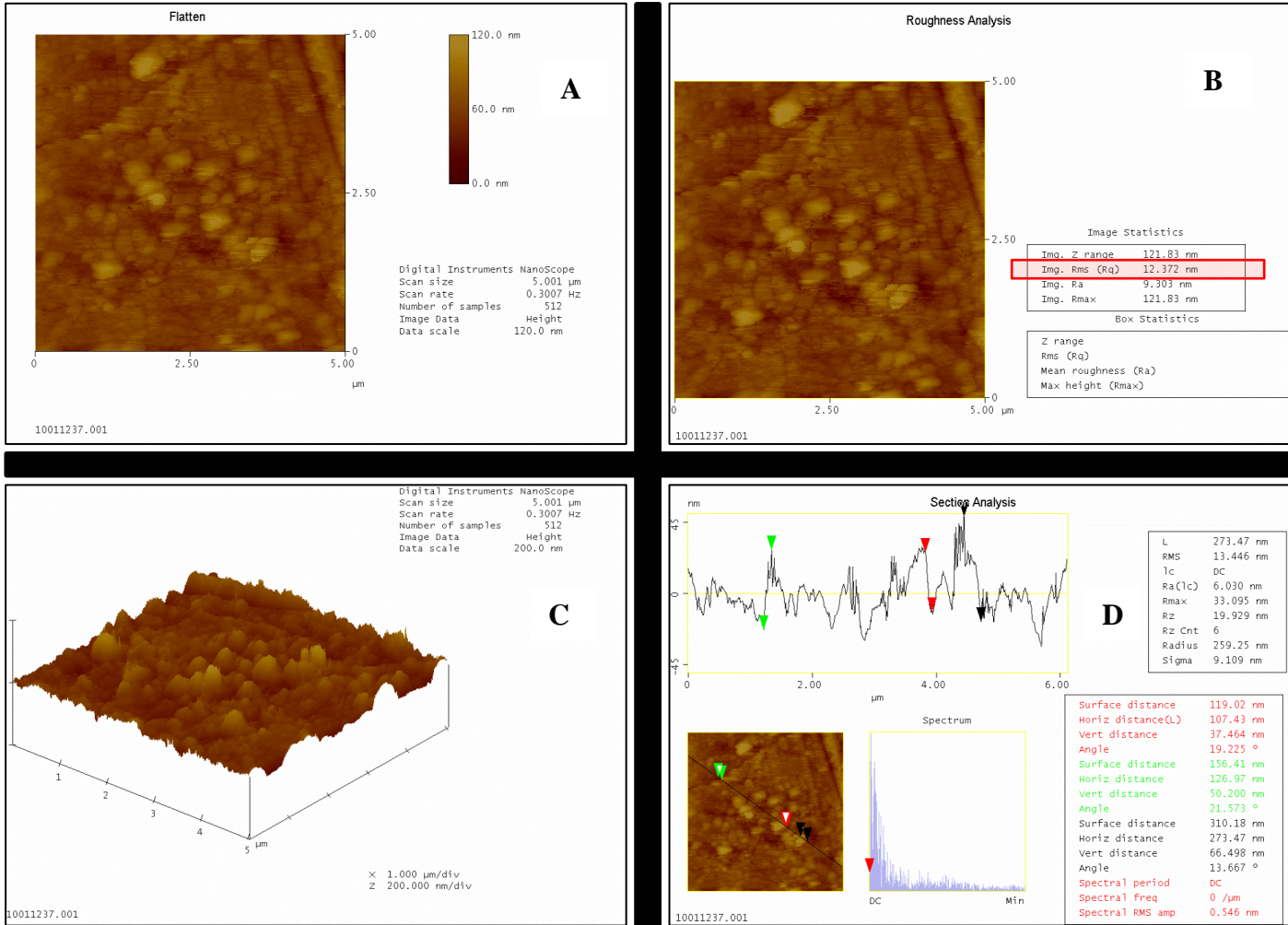


Figura 90: Imágenes AFM de sustrato polimérico. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a 5 μm .

En la figura anterior se puede observar la superficie amorfa del sustrato que es de esperarse debido a la naturaleza del mismo, en el análisis superficial se pueden apreciar las diferencias de alturas y se corrobora en el análisis seccional mostrando diferencias verticales de 50 nm y horizontales de 40 nm.

Las imágenes de superficie modificada sin tratamiento de tripsina y con los diferentes tiempos de tratamiento de tripsina se muestran a continuación:

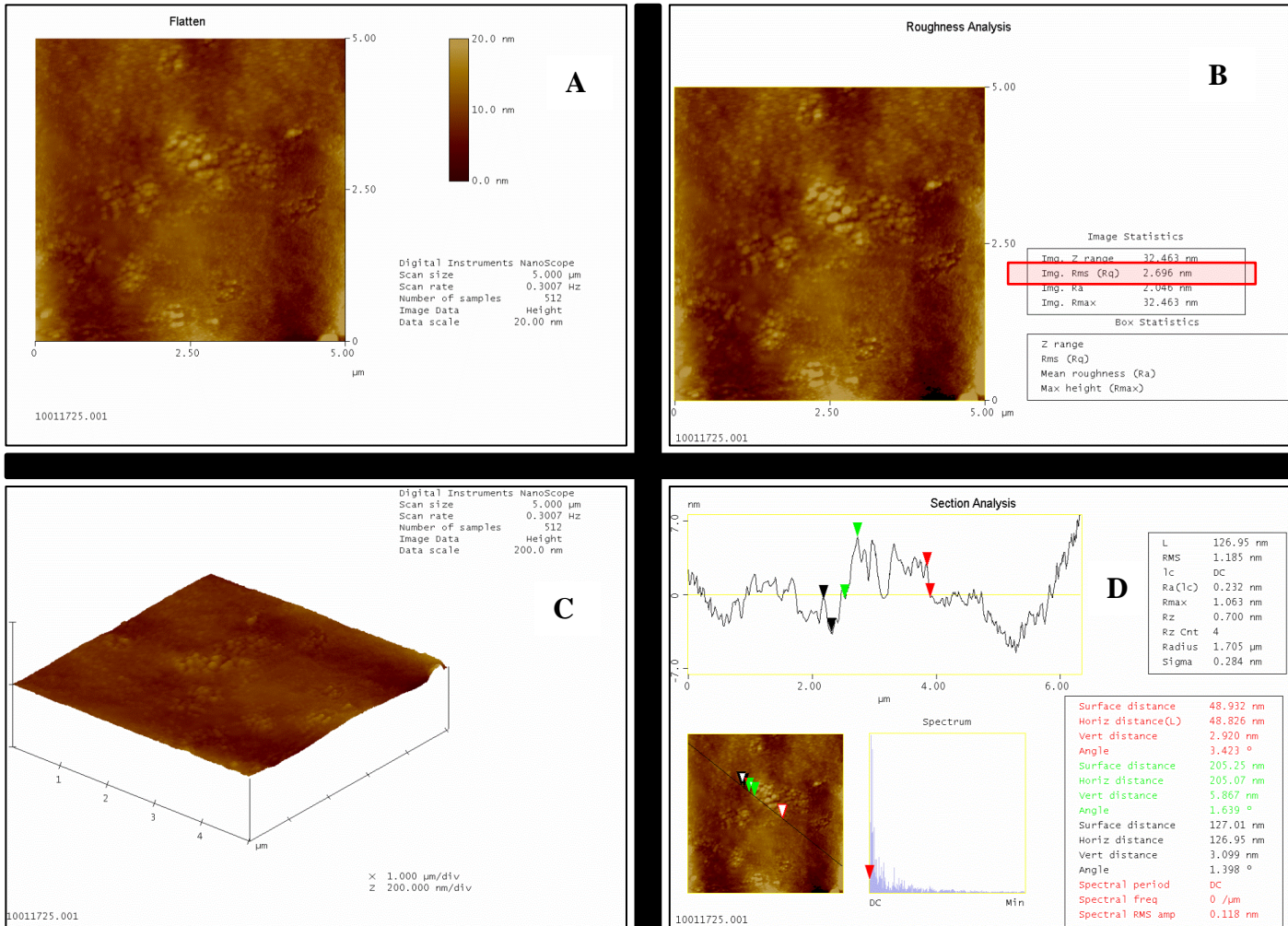


Figura 91: Imágenes AFM de sustrato modificado con MNPs. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a 5 μm

En la figura anterior se puede observar la superficie modificada con MNPs en gelatina formando una película uniforme y con

pequeñas aglomeraciones posiblemente de MNPs, en el análisis superficial se pueden apreciar mínimas diferencias de alturas y se corrobora en el análisis seccional mostrando diferencias verticales de 70 nm y horizontales de 20 nm.

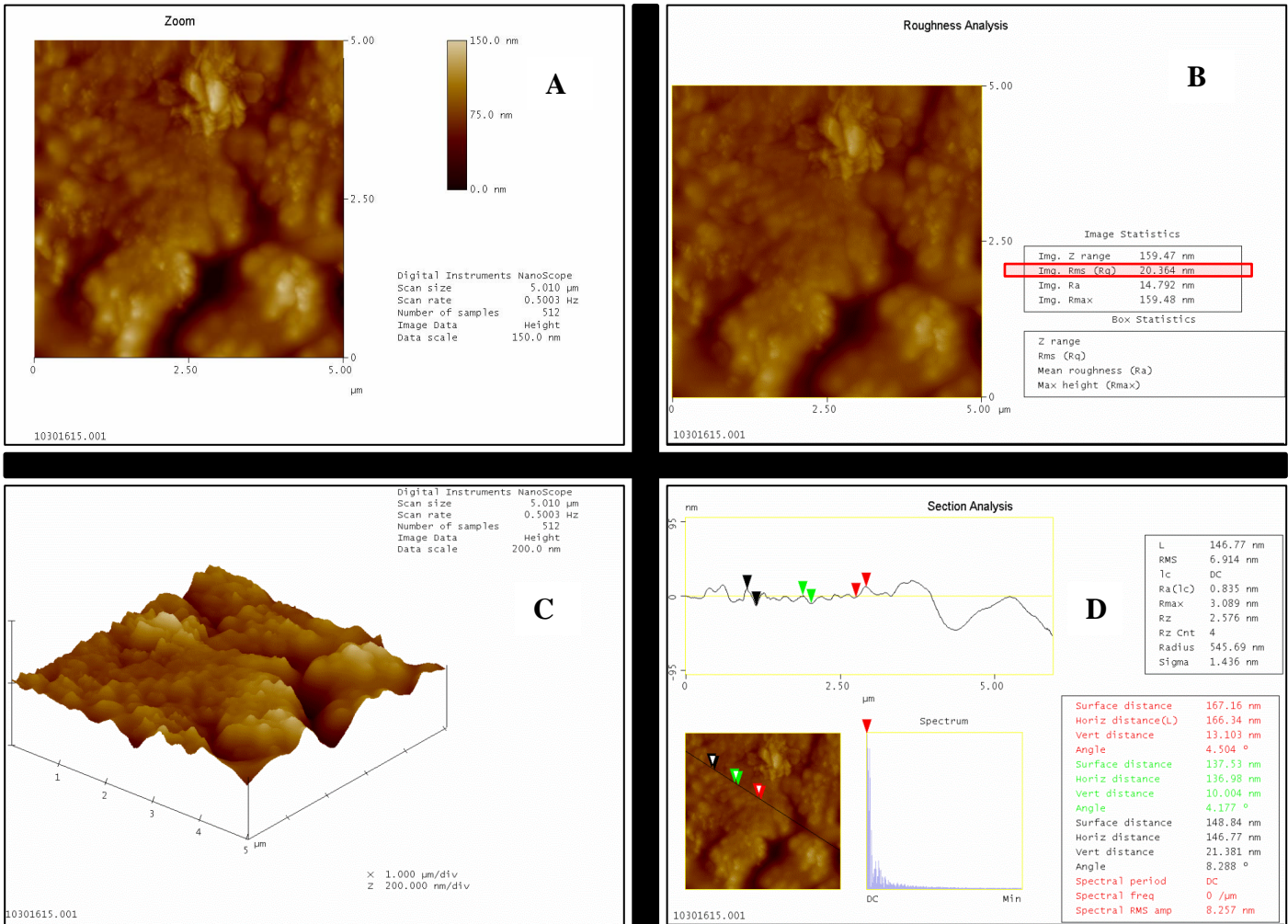


Figura 92: Imágenes AFM de sustrato modificado con MNPs en gelatina tratada por 5 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a $5\mu\text{M}$.

En la figura anterior se puede observar la superficie modificada con MNPs en gelatina atacada por 5 minutos de solución tripsina mostrando una deformación de la película uniforme formada en la imagen del sustrato sin tratamiento y grandes aglomeraciones posiblemente de MNPs, en el análisis superficial se pueden evidenciar importantes diferencias de alturas y se corrobora en el análisis seccional mostrando diferencias verticales y horizontales de más de 100 nm.

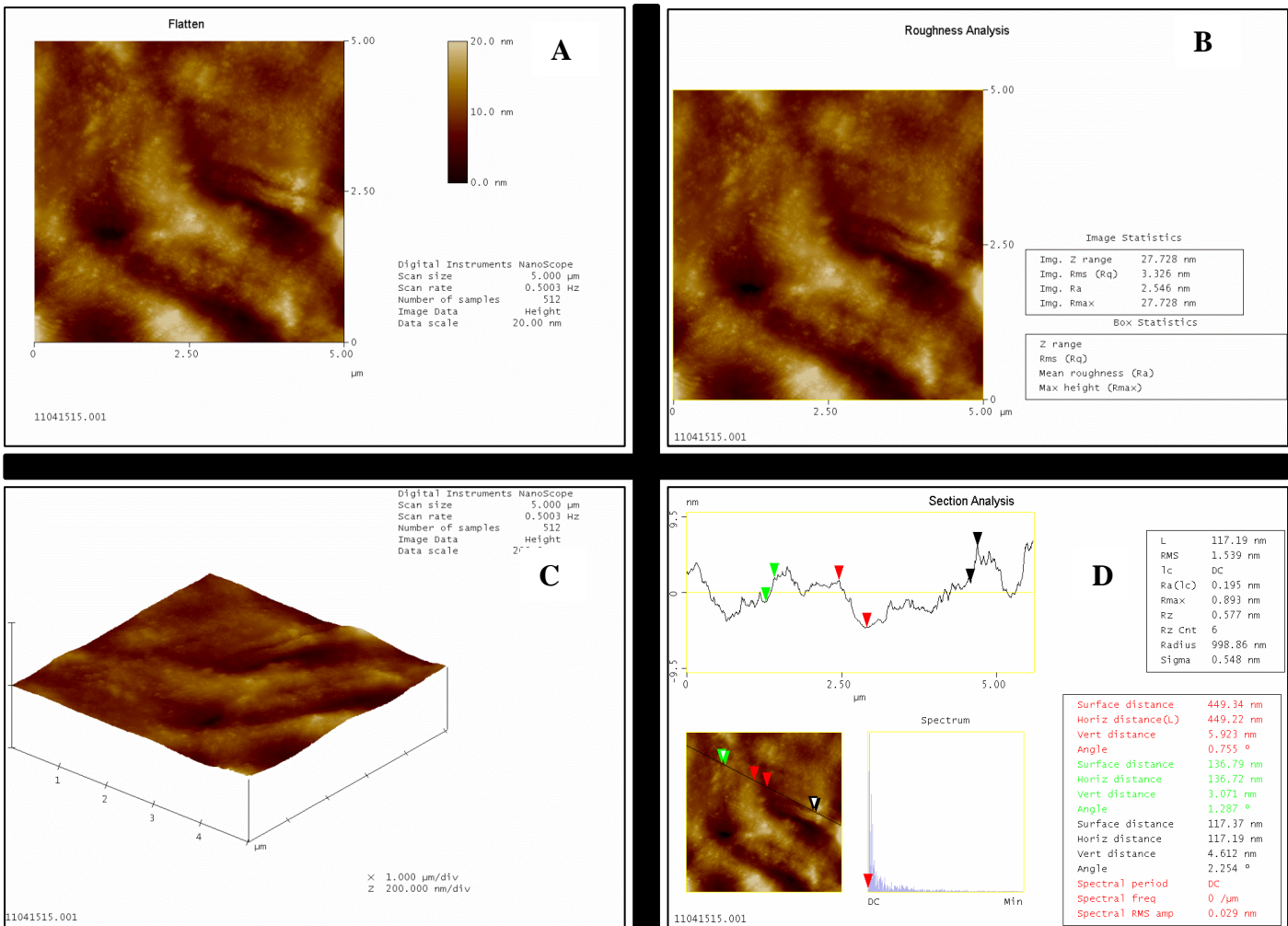


Figura 93: Imágenes AFM de sustrato modificado con MNPs en gelatina tratada por 30 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a $5\mu\text{m}$.

En la figura anterior se puede observar la superficie modificada con MNPs en gelatina atacada por 30 minutos de solución tripsina mostrando una deformación de la película uniforme formada en la imagen del sustrato sin tratamiento y una drástica disminución de las grandes aglomeraciones anteriores, se pueden observar pequeñas zonas brillantes por la presencia de MNPs presentando un diámetro aproximado de 15 a 20 μm ; en el análisis superficial se pueden mostrar despreciables diferencias de alturas y se corrobora en el análisis seccional mostrando diferencias verticales y horizontales por un poco más de 10 nm.

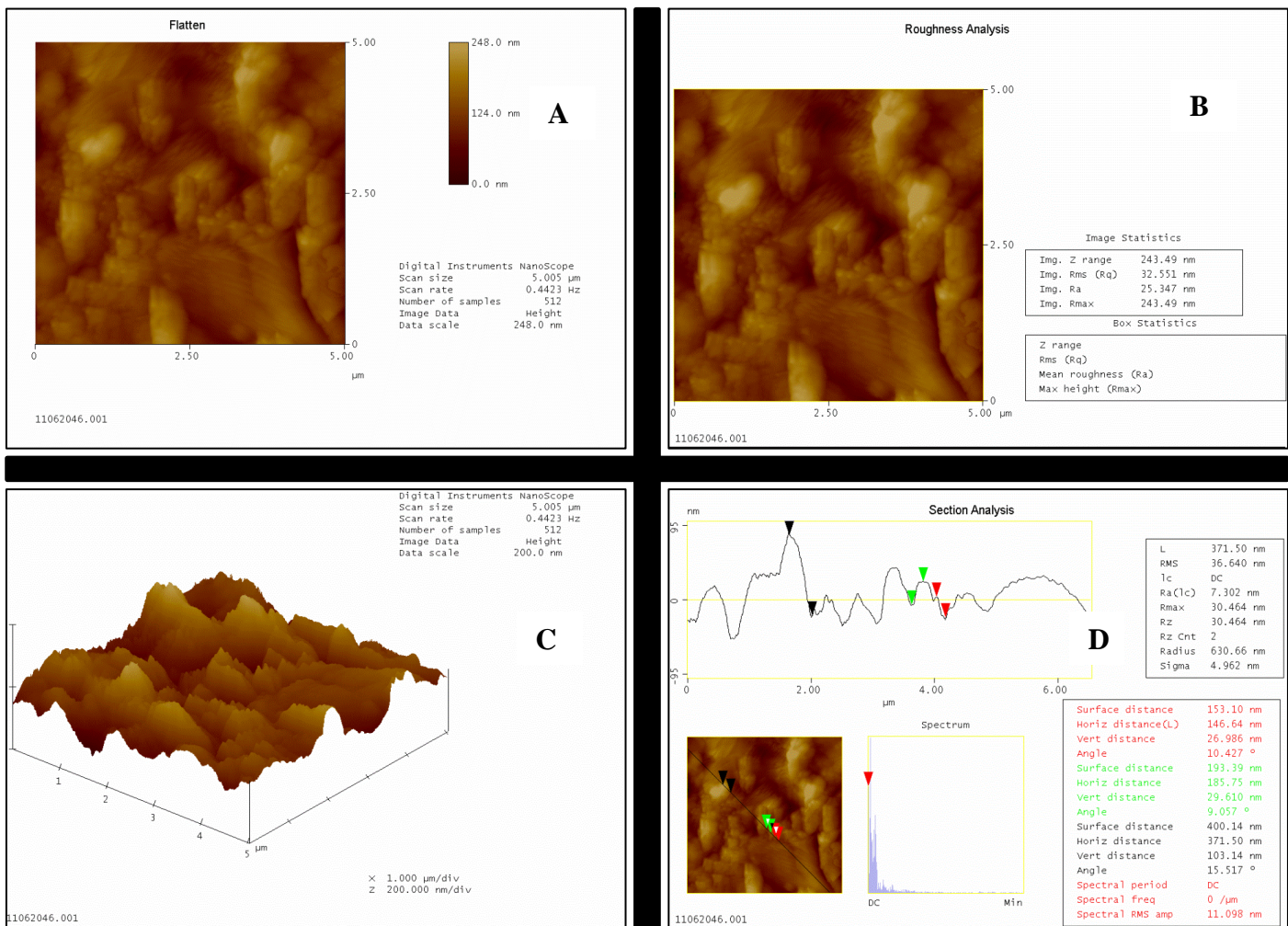


Figura 94: Imágenes AFM de sustrato modificado con MNPs en gelatina tratada por 60 minutos de solución tripsina 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a 5 μm .

En la figura anterior se puede observar la superficie modificada con MNPs en gelatina atacada por 60 minutos de solución tripsina mostrando la completa eliminación de la película uniforme formada en la imagen del sustrato sin tratamiento y el resurgimiento de la morfología del sustrato sin modificación, no se observan zonas brillantes por lo que se descarta la presencia de MNPs; en el análisis superficial se pueden mostrar despreciables diferencias de alturas y se corrobora en el análisis seccional mostrando diferencias similares a los valores del sustrato.

Para lograr un mejor entendimiento de las diferentes etapas de deformaciones se integra al estudio un análisis cuantitativo de las partículas y nanopartículas presentes, se ha elegido usar la imagen plana de cada tratamiento y ajustar los parámetros de cuantificación delimitando las diversas formaciones.

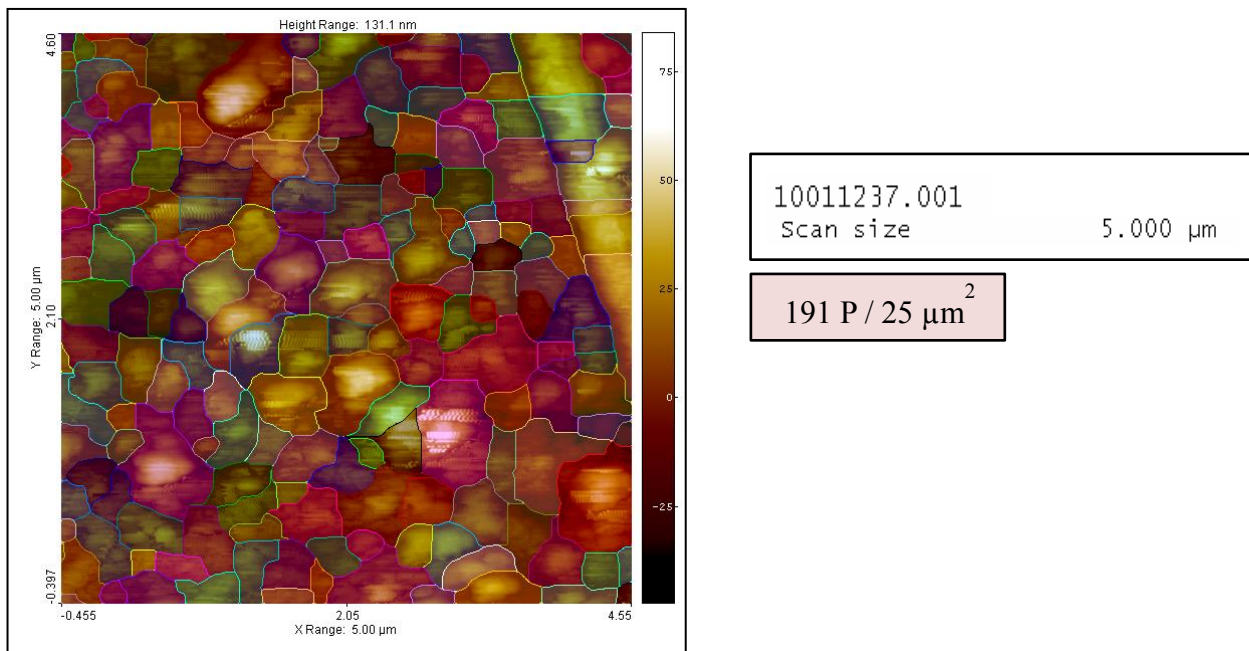
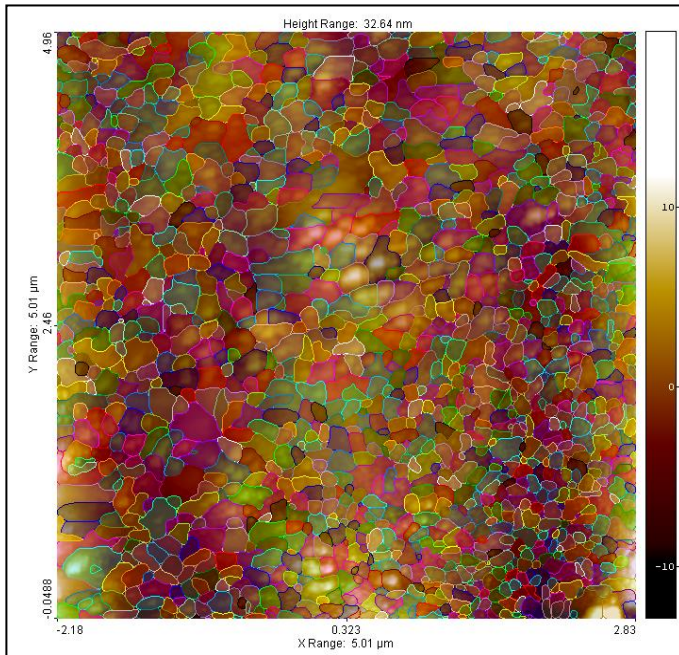


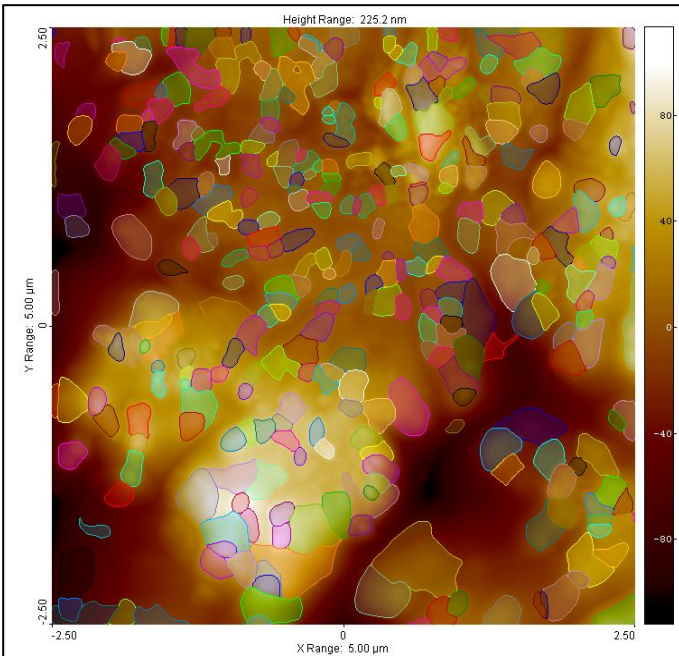
Figura 95: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato polimérico resultando en 191 partículas/25μm². Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.



10011725.001
Scan size 5.000 μm

1410 NP / 25 μm²

Figura 96: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato nanomodificado resultando en 1410 nanopartículas/25μm². Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.



10301615.001
Scan size 5.000 μm

519 NP / 25 μm²

Figura 97: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato nanomodificado aplicando 5 minutos tratamiento con solución de tripsina resultando en 519 nanopartículas/25μm². Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.

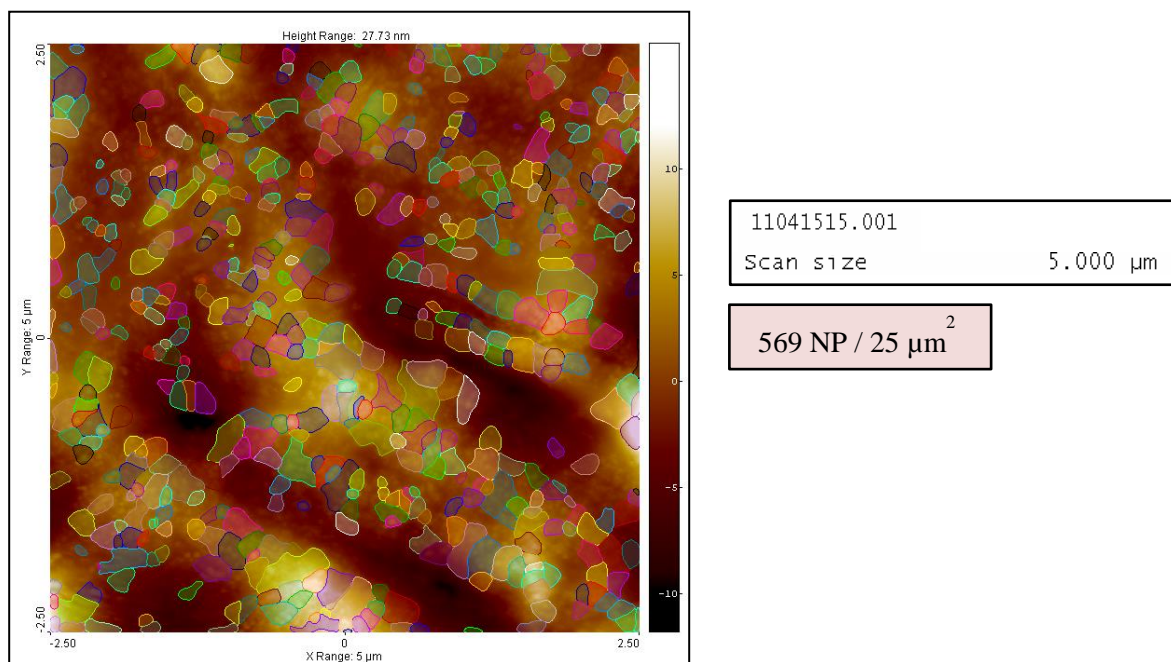


Figura 98: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato nanomodificado aplicando 30 minutos tratamiento con solución de tripsina resultando en 569 nanopartículas/25 μm^2 . Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.

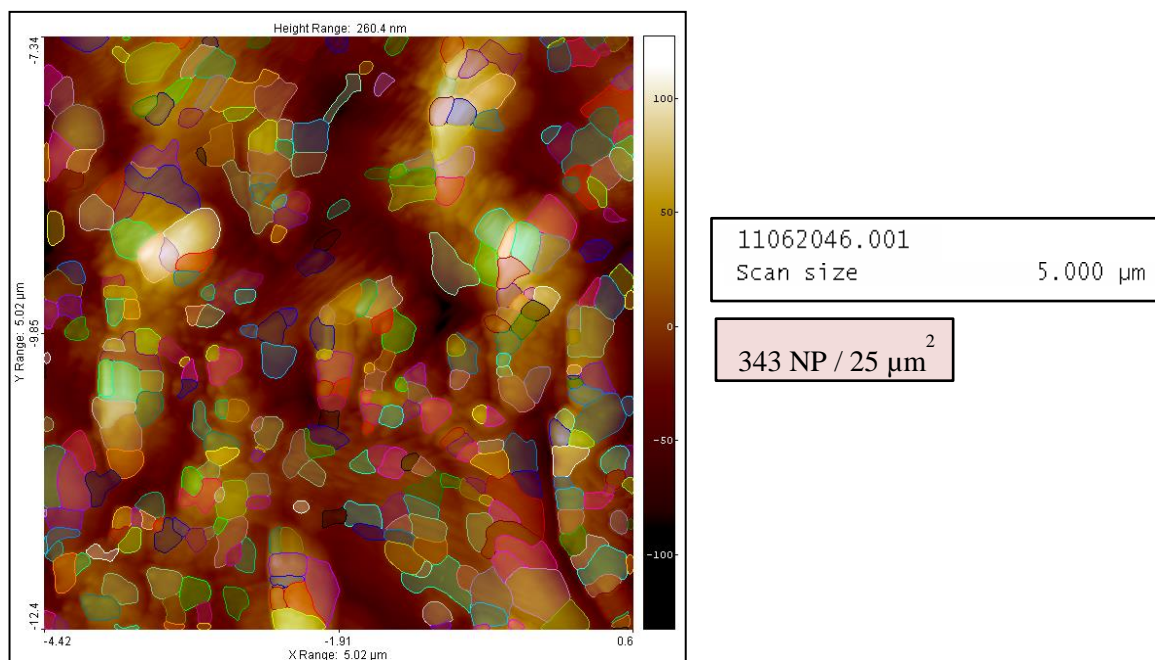


Figura 99: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato nanomodificado aplicando 60 minutos tratamiento con solución de tripsina resultando en 343 nanopartículas/25 μm^2 . Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.

Con los resultados del análisis cuantitativo se puede confirmar la ocurrencia del proceso de degradación proteolítica de la tripsina al disminuir el número de partículas conforme se aumenta el tiempo de tratamiento y se demuestra la efectividad del método, en conjunto con los resultados de los capítulos anteriores se puede estimar que la actividad máxima enzimática se obtiene a los 5 minutos pero al dejarla actuar se continua la degradación de la película de gelatina nanomodificada hasta que se consume completamente. El diámetro de las partículas también disminuye al aumentar el tiempo de tratamiento lo que permite afirmar la aglomeración de nanopartículas al modificar la superficie. En efecto, la microscopia AFM permite observar y describir el proceso de digestión, el análisis cuantitativo de las imágenes permite identificar la disminución de pero en un estudio más detallado haciendo uso de la técnica de microscopia de fuerza magnética MFM se puede caracterizar el comportamiento de las nanopartículas en gelatina.

7.2 Caracterización por MFM

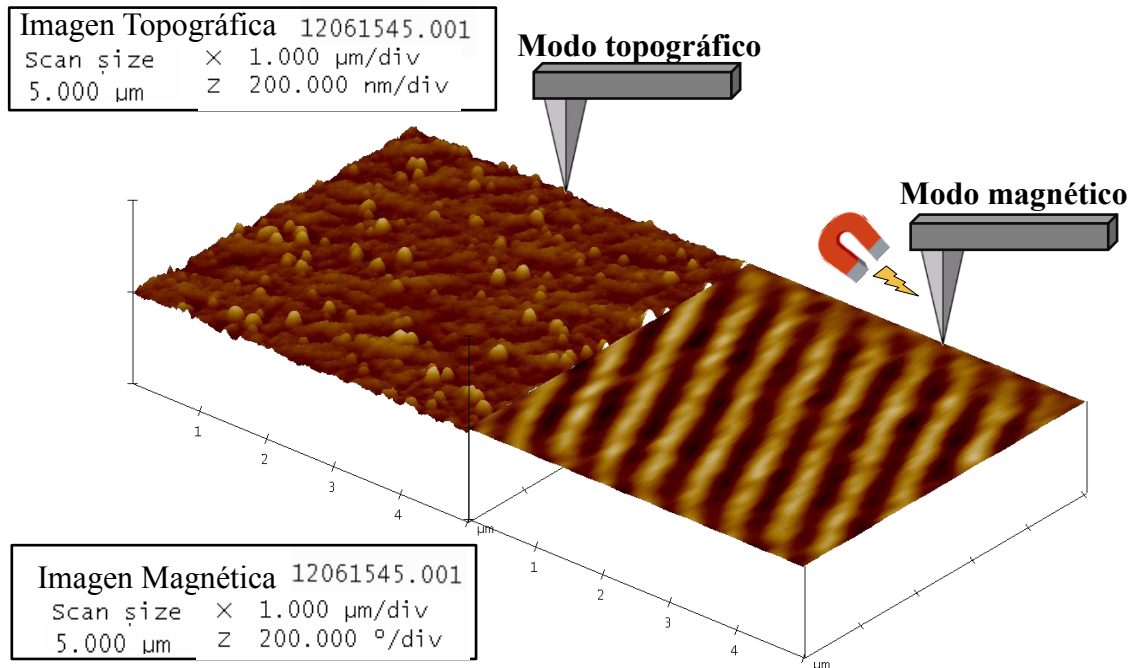


Figura 99: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de cinta magnética para calibrar equipo.

En la imagen anterior podemos ver la diferencia principal de la técnica MFM es la magnetización de la punta que se mantiene constante durante el experimento. Las mismas muestras que se analizaron en AFM fueron analizadas con MFM, se mantuvieron los mismos parámetros de operación. Son pocos los trabajos que ofrecen un análisis magnético, MFM es una técnica complementaria a las microscopias de uso común. Su interpretación aporta información cualitativa del comportamiento magnético en la muestra. Es requisito la existencia de material magnético en la muestra, no es necesario tratamiento previo; se pueden utilizar las mismas puntas que en AFM pero deben ser expuestas a una fuente magnética para asegurar la efectividad del método. En las muestras que se detecta magnetismo se muestran zonas oscuras y zonas brillosas, la última es la evidencia del material magnético..

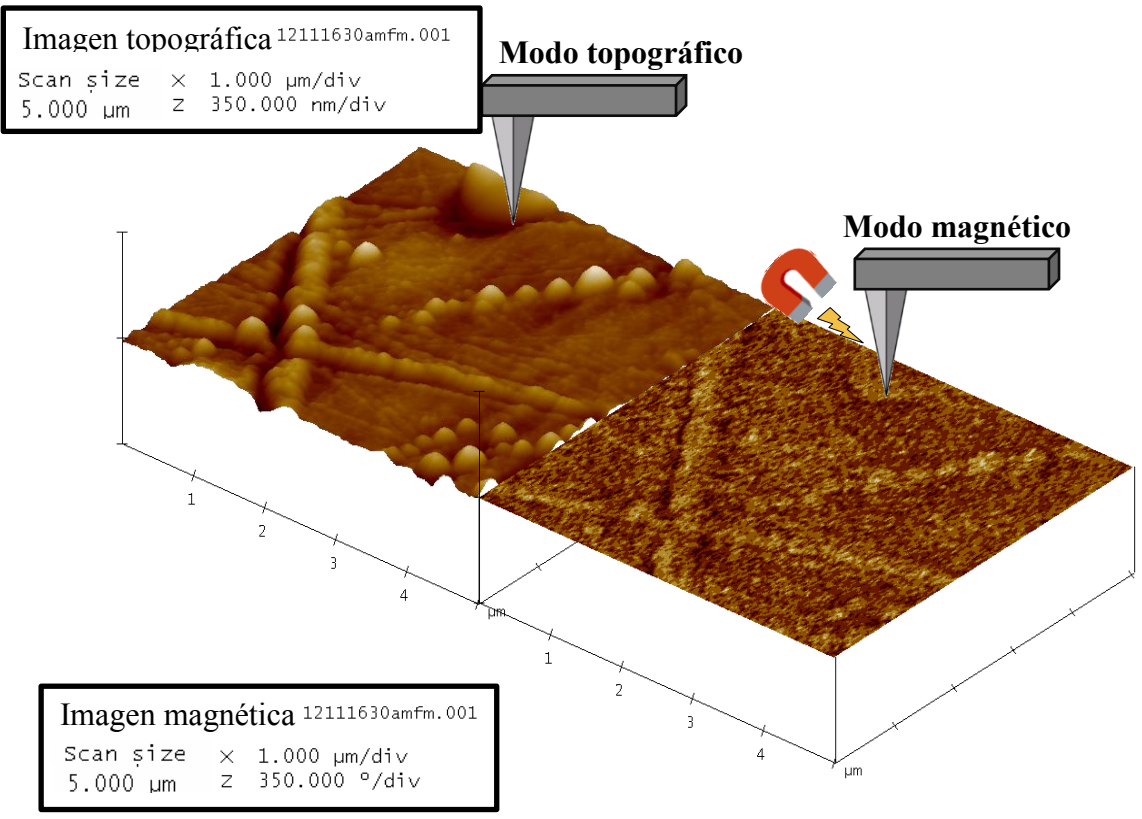


Figura 100: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato polimérico sin modificación.

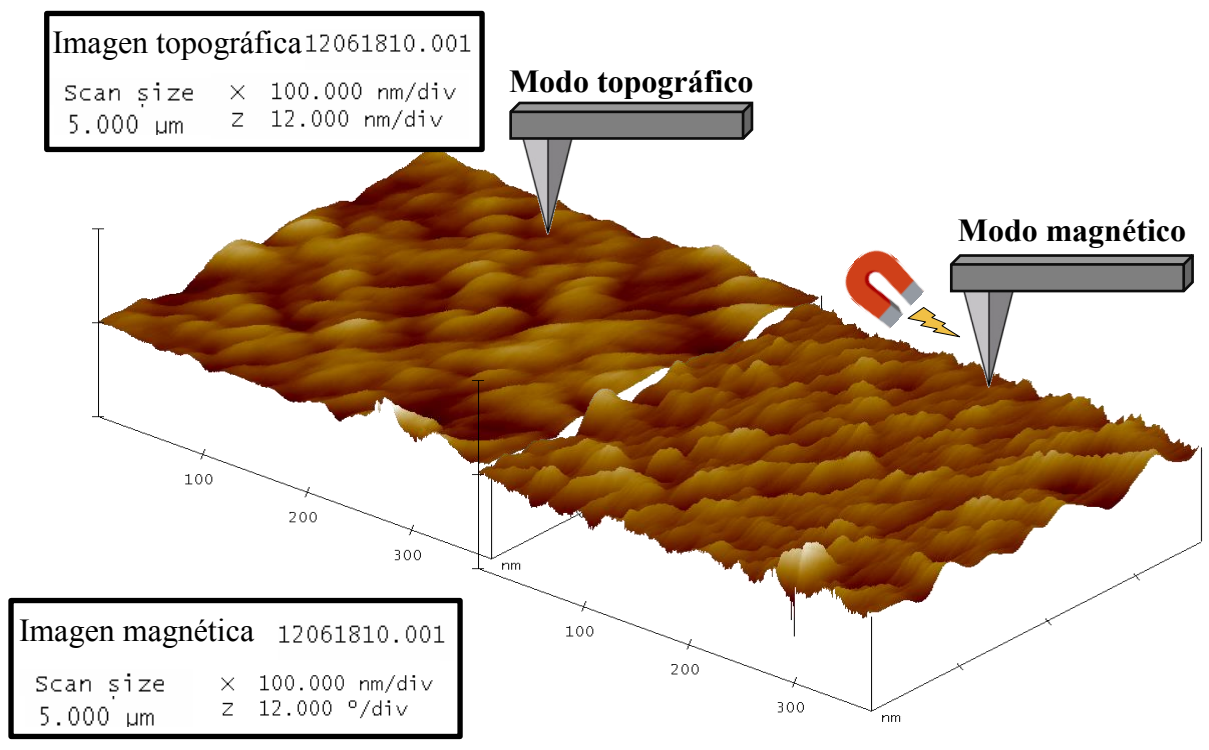


Figura 100: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato modificado con gelatina y Fe₃O₄ NPS.

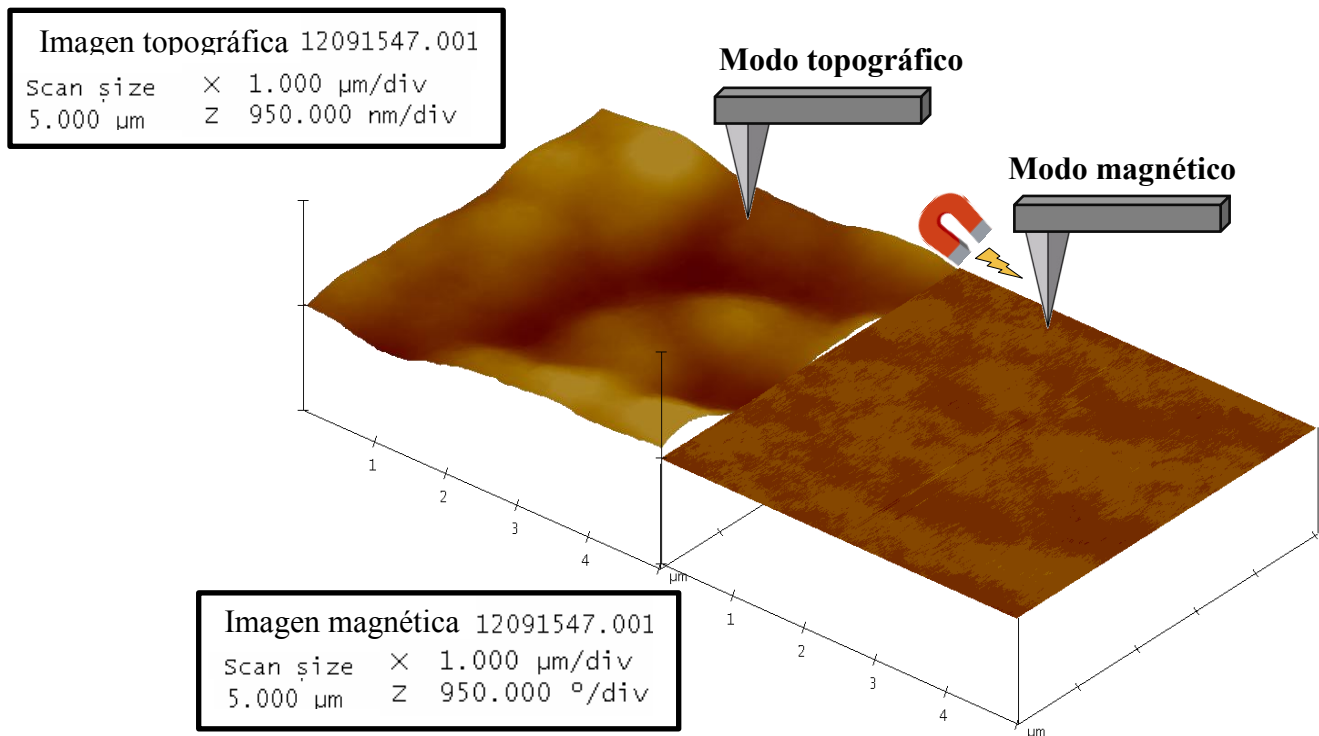


Figura 101: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato modificado con gelatina y Fe_3O_4 NPS tratada por 5 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$.

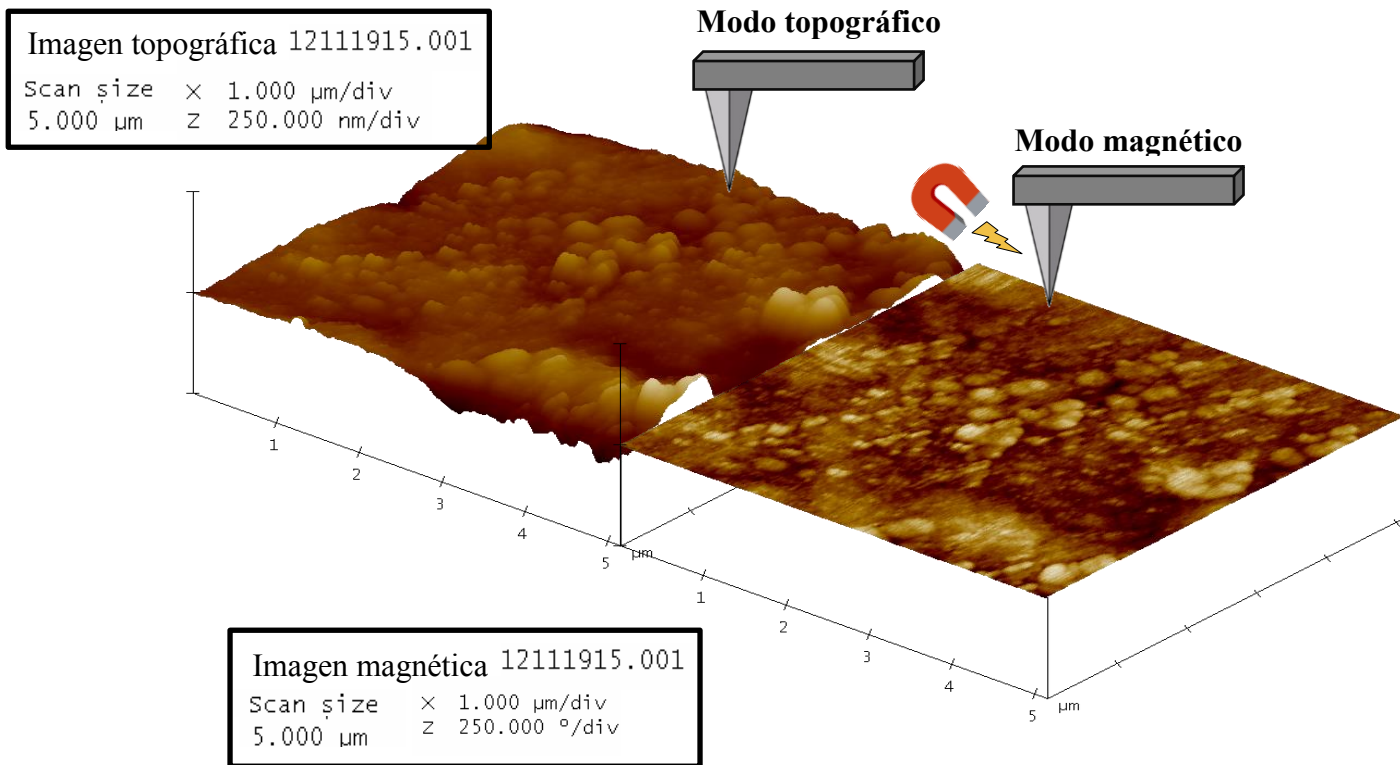


Figura 102: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato modificado con gelatina y Fe_3O_4 NPS tratada por 30 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$.

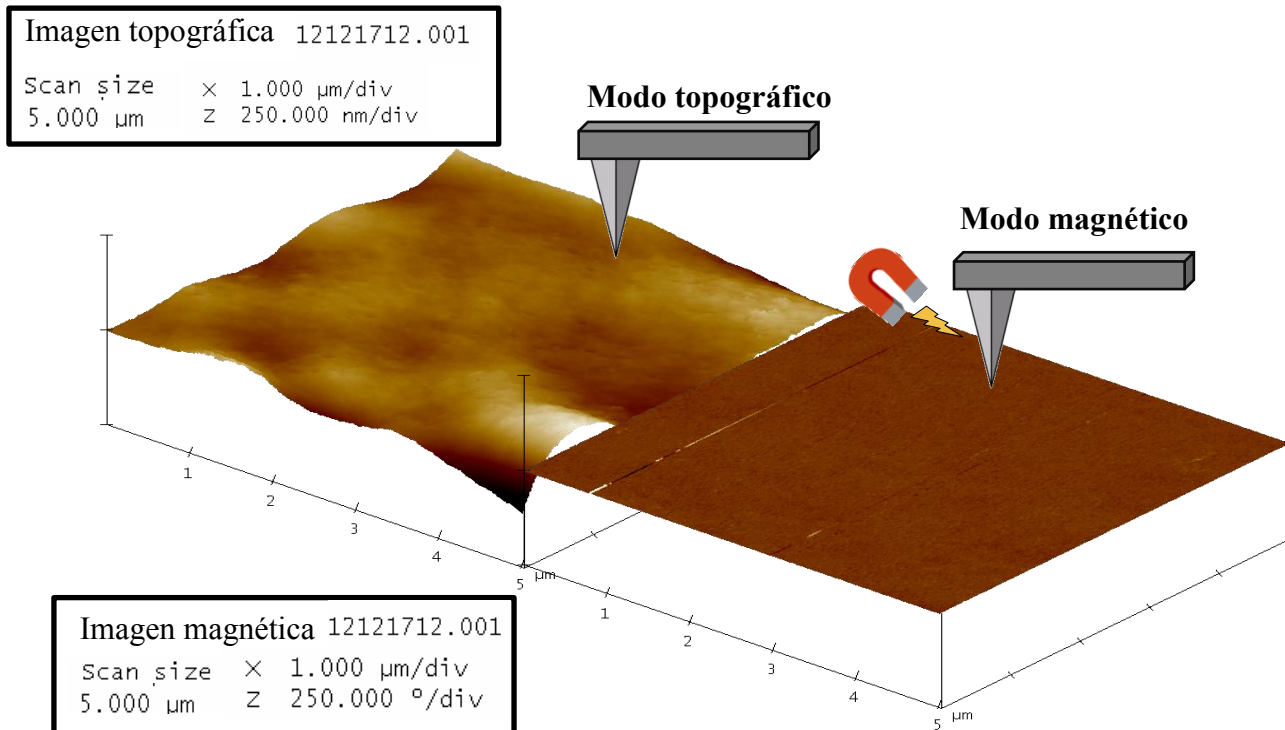


Figura 103: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato modificado con gelatina y Fe_3O_4 NPS tratada por 60 minutos de solución tripsina $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En las imágenes anteriores se puede observar claramente la diferencia de las técnicas, en la imagen magnética del sustrato sin modificación no se observan zonas brillantes pero es caso contrario en la siguiente imagen en la que el sustrato ha sido modificado con MNPs en gelatina se tiene una superficie sobresaturada de zonas brillantes que por topografía se confirman como aglomeraciones. En las imágenes con tratamientos de 5 y 30 minutos persisten las zonas brillantes aunque en la imagen de 30 minutos presentan un decremento. En la última imagen, tratamiento de 60 minutos no existen zonas magnéticas por lo que se asegura la degradación de la gelatina y el abandono de las nanopartículas en la muestra. En conjunto con las imágenes topográficas y magnéticas se puede asegurar la desaparición de las nanopartículas magnéticas por la digestión proteolítica provocada por el largo tiempo de tratamiento con tripsina. Las imágenes magnéticas obtenidas también fueron tratadas para el análisis cuantitativo siguiendo el procedimiento antes mencionado.

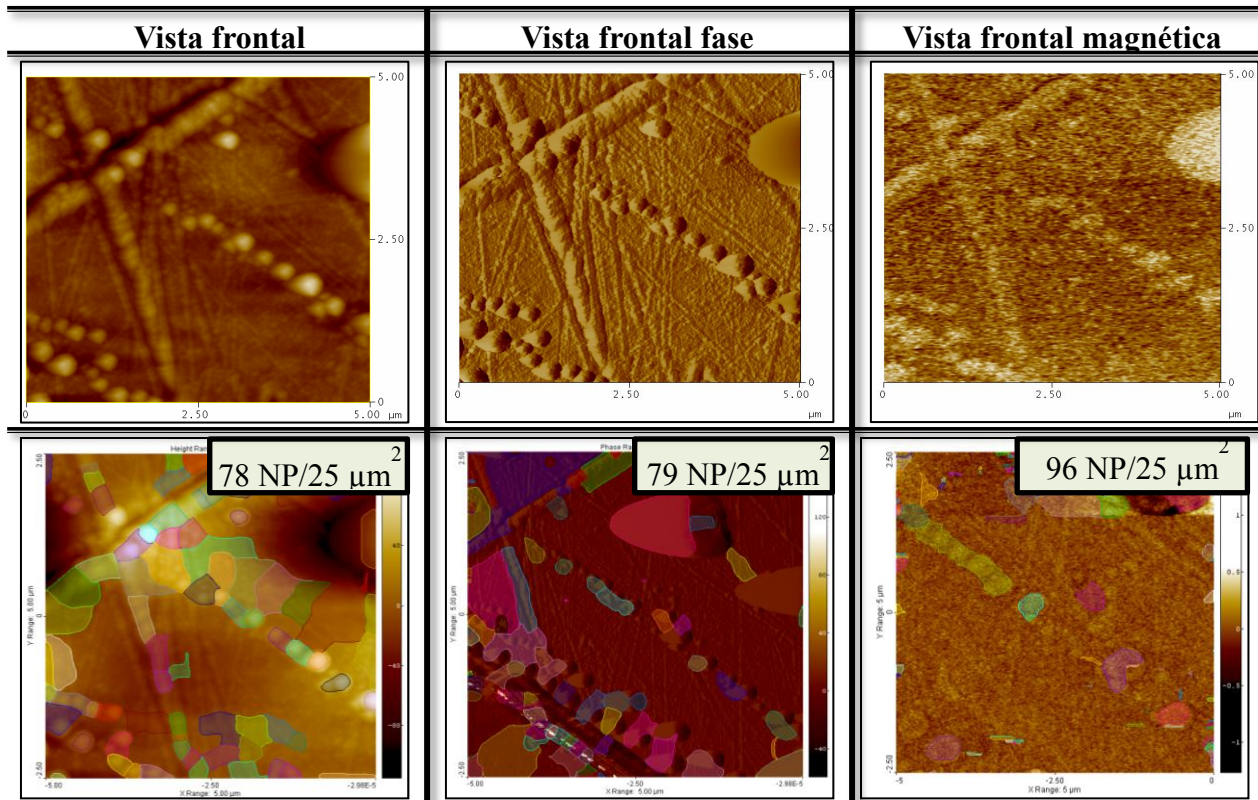


Figura 104: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético del sustrato sin modificación.

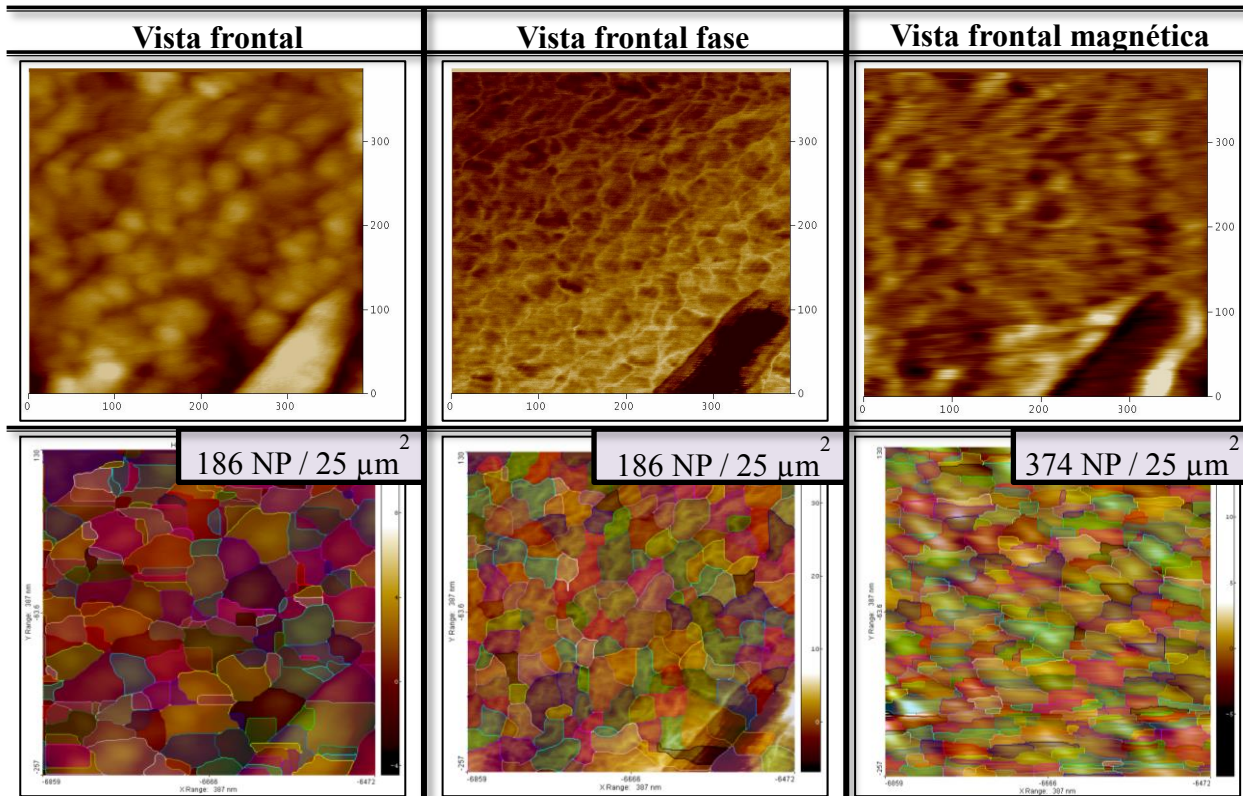


Figura 105: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético de gelatina +MNPs

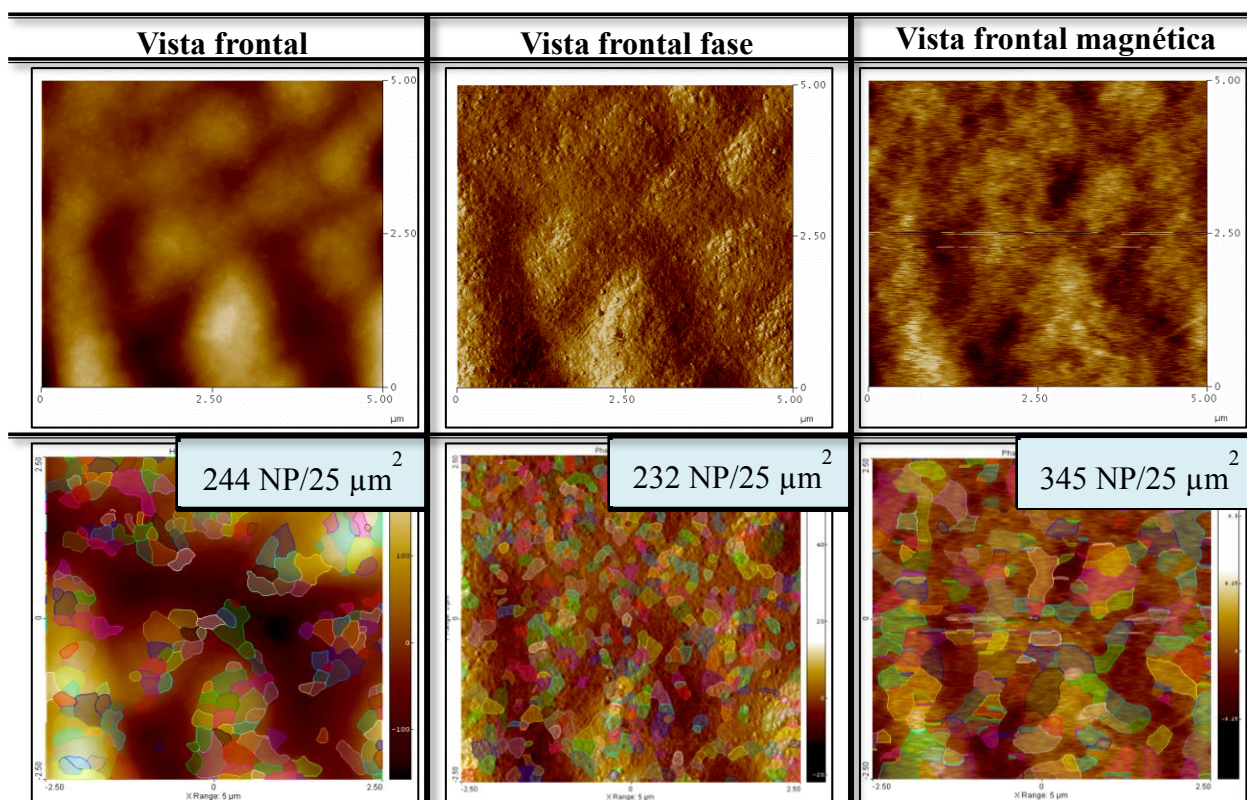


Figura 106: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético de gelatina +MNPs con tratamiento de 5 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$

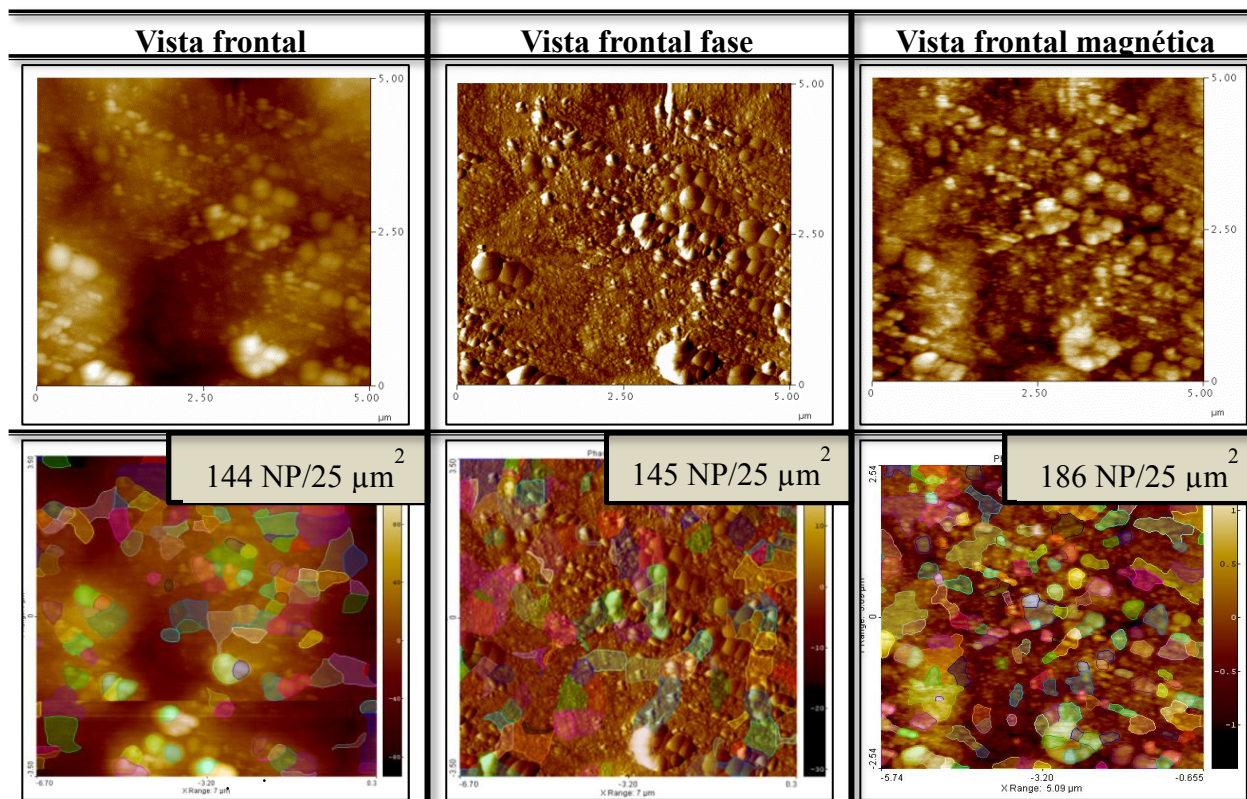


Figura 107: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético de gelatina +MNPs con tratamiento de 30 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$

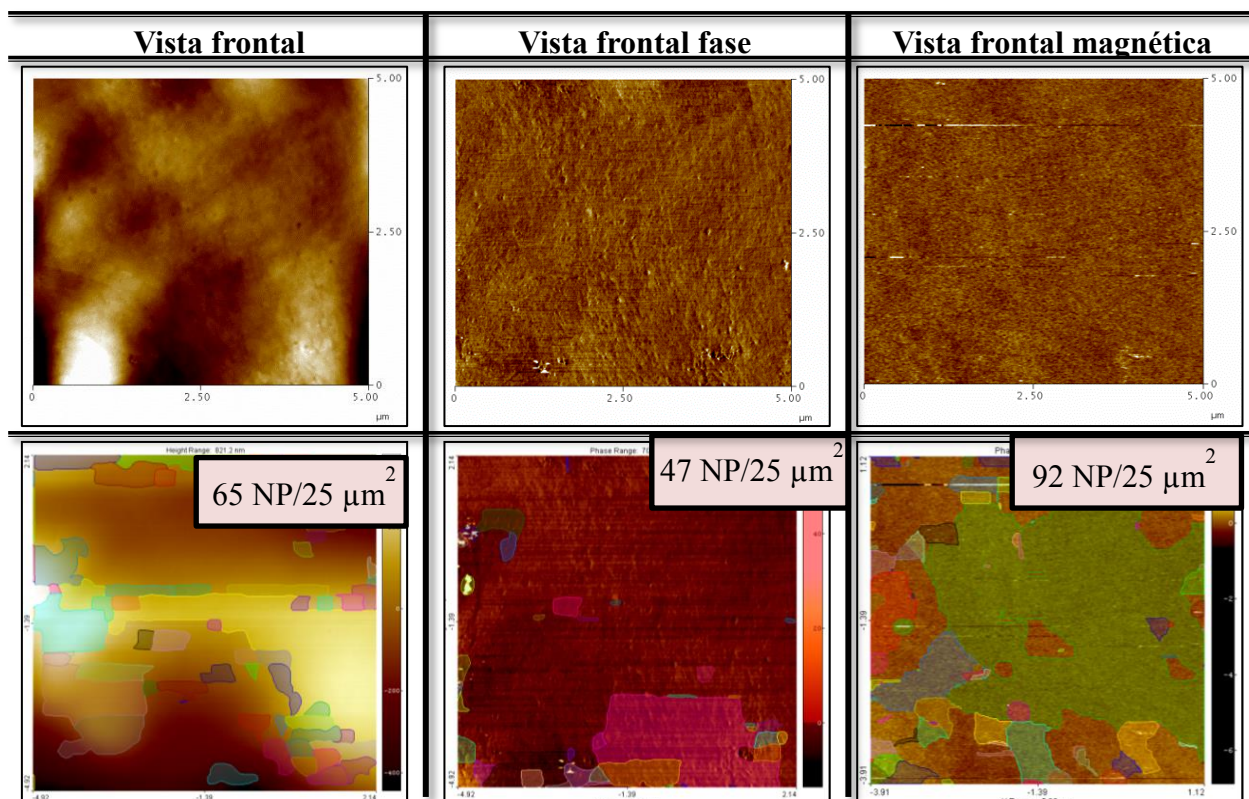


Figura 108: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético de gelatina +MNPs con tratamiento de 60 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$

Las imágenes comparativas anteriores demuestran diferencia en el análisis cuantitativo de la modo topográfico y el modo magnético, se puede deducir que en el modo topográfico se tiene un mayor valor promedio de diámetro debido a un recubrimiento por gelatina de cada partícula y entre ellas existe aglomeración mientras que en el modo magnético solo se determina el número de partículas magnéticas sin tomar en cuenta el recubrimiento por gelatina.

Ambas técnicas microscopias permiten evaluar y describir la degradación enzimática pro tripsina, que en conjunto con los resultados electroquímicos en los que la presencia de nanopartículas aumenta la frecuencia de balanza sensibilizando el método se puede caracterizar superficialmente la actividad electroquímica.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- La investigación de biosensores diseñados para el diagnóstico médico ha demostrado ser una nueva generación de dispositivos analíticos.
- Su desarrollo ha propiciado el mejoramiento de los métodos de análisis tradicionales.
- La aplicación más exitosa hasta el momento son los biosensores electroquímicos para la detección de glucosa.
- Pero, se han logrado grandes avances en la implementación de biosensores para colinesterasas y tripsina.
- En este trabajo se ha desarrollado un método rápido, sensible y efectivo de voltametría de onda cuadrada capaz de detectar la actividad de la tripsina en el rango normal y crítico de la pancreatitis aguda.
- Se ha demostrado la ventaja de utilizar electrodos desechables screen-printed por su bajo costo y reproducibilidad.
- La fabricación de electrodos screen-printed permite trabajar con volúmenes micrométricos y mediciones in situ.
- Se ha logrado la inmovilización enzimática en gelatina sin pérdida de actividad.
- La modificación de la capa de hidro-gel como sustrato se ha modificado exitosamente con nanopartículas de Ag y Fe_3O_4 amplificando la señal de respuesta.

- La detección electroquímica de la actividad de tripsina constituye una técnica económica, sencilla y fácil de usar demostrando el potencial de sustituir métodos de análisis clínicos convencionales.
- El límite mínimo de detección alcanzado es de $7.5 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$
- Se ha desarrollado un nuevo enfoque para determinar la actividad enzimática de tripsina basa en la microbalanza de cristal de cuarzo modificada con nanopartículas de plata.
- La liberación de las nanopartículas mucho más pesadas durante la degradación enzimática del sustrato junto con los productos de degradación amplifica la señal de respuesta del sensor QCM hacia la actividad de tripsina.
- El límite mínimo de detección alcanzado es de $7.5 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$, logrando la aplicación del enfoque en comparación con el “electrodo clásico” que era de $7.5 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$.
- La caracterización microscópica por AFM demuestra la formación de la capa de hidro-gel como barrera cinética de las especies electroactivas.
- La descripción morfológica por AFM ha permitido demostrar la degradación enzimática y la efectividad del método de digestión proteolítica.
- La caracterización por MFM ha logrado comprobar la liberación de nanopartículas magnéticas por la acción de degradación.
- El conteo de nanopartículas presentes en las imágenes macroscópicas ha demostrada la aglomeración de nanopartículas al depositarse en el sustrato de gelatina.
- Dicho conteo también ha demostrado la rápida y eficiente acción de degradación de la tripsina.

- Se han desarrollado y caracterizado diversos biosensores electroquímicos y piezoeléctricos para la determinación de tripsina, cumpliendo con la detección en el rango de alerta médico de pancreatitis aguda por baja actividad enzimática.
- En el capítulo 6, se muestra que es posible cuantificar selectivamente mezclas de GAs: α -chaconina y α -solanina.
- La inhibición de la colinesterasa por los GAs se investigó y se clasificó como reversible y de tipo mixto y se demostró que las mezclas no inducen inhibiciones aditivas.
- Dos biosensores amperométricos se construyeron utilizando BChE de suero de caballo y AChE genéticamente modificada.
- La detección de GAs se realizó usando un método de un solo paso basado en la medición de la pendiente de inhibición. Aunque como resultado la inhibición no es aditiva, este método permite la medición del efecto de los dos GAs en cada biosensor.
- Se utilizó una red neuronal artificial para modelar la respuesta combinada de estos biosensores en concentraciones que van de 10 a 300 nM para α -chaconina y de 75 a 400 nM para α -solanina.
- Finalmente, el sistema desarrollado se aplicó a la determinación de GAs en muestras de papa real. Ambos GAs pueden ser cuantificados de forma directa con un mínimo de error.

REFERENCIAS

- [1] Fagenholz PJ, Fernandez-del Castillo C, Harris NS, Pelletier AJ, Camargo Jr CA. (2007). Direct medical costs of acute pancreatitis hospitalizations in the United States. *Pancreas*, 35, 302-7.
- [2] Right Diagnosis. (2010). Statistics by Country for Acute Pancreatitis. 12/12/14, de Healthgrades Sitio web: http://www.rightdiagnosis.com/a/acute_pancreatitis/stats-country.htm#extrapwarning
- [3] Fagenholz PJ1, Castillo CF, Harris NS, Pelletier AJ, Camargo CA Jr.. (Julio 2007). Increasing United States hospital admissions for acute pancreatitis, 1988-2003. *Ann Epidemiol*, 7, 419-7.
- [4] Yadav D1, Lowenfels AB.. (Noviembre 2006). Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas*, 33(4), 323-30.
- [5] Scott Tenner , MD, MPH, FACP, John Baillie , MB, ChB, FRCP, FACP, John DeWitt, MD, FACP3 and Santhi Swaroop Vege, MD, FACP. (30 de Julio 2013). American College of Gastroenterology Guideline: Management of Acute Pancreatitis . *The American Journal of Gastroenterology*, i: 10.1038/ajg.2013.218 , 1-16.
- [6] Servin TE, Velázquez GJ, Delgadillo TG, Galindo ML, Bevia PF, Rivera BF. Pancreatitis aguda grave, manejo quirúrgico en un hospital de tercer nivel. *Cir Ciruj* 2009; 77: 437-41.
- [7] Roberto Carlos Rebollar-González; Javier García-Álvarez. (Julio - Septiembre 2012). Prevalencia y mortalidad de la pancreatitis aguda grave de origen biliar y alcohólica en el Hospital Juárez de México. *Revista Mexicana de Cirugía del Aparato Digestivo*, 1, 13-17.
- [8] Dr. Jesús Abraham Acosta Leyva. (2010). Pancreatitis Aguda. 10/11/2014, de Urgencias HGZ IMSS 24 Sitio web: <http://es.slideshare.net/dracostaleyva/pancreatitis-aguda-2010>.
- [9] R. B. Millington, A. G. Mayes, J. Blyth, C. R. Lowe. *Anal. Chem.* 1995 67: 4229-4233.
- [10] R. B. Millington, A. G. Mayes, J. Blyth, C. R. Lowe. *Sens. Actuators B* 1996 33: 55-59.
- [11] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK (1997). (b) XML on-line corrected version:

<http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, and B. Kosata; updates compiled by A.D. Jenkins.

- [12] Merriam Webster. (2007). Biosensor. 23 de julio 2014, de Enciclopedia Britannica Company Sitio web: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/biosensor>.
- [13] Turner, A. P. F., Karube, I., and Wilson, G. S. (eds.) (1987) Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, Oxford, p. 770.
- [14] Royal Society of Chemistry. (2004). Chemistry for Biologists. 23 de julio 2014, de Advancing the chemical sciences Sitio web: <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm>.
- [15] Vo-Dinh T, Cullum B.. (Marzo 2000). Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. Fresenius J Anal Chem, 366(6-7), 540-541.
- [16] Tromberg, B.J, M.J. Sepaniak, T. Vo-Dinh, and G.D. Griffin. (1987) Fiberoptic chemical sensors for competitive-binding fluoroimmunoassay. Analytical Chemistry 59(8), 1226-1230.
- [17] M-P.Marco, S. Gee, y B.D. Hammock, Immunochemical techniques for environmental analysis I. Immunosensors (1995). TrAC Trends in Analytical Chemistry Biosensors for environmental monitoring, 14(7), p.341-350.
- [18] Borgmann S, Schulte A, Neugebauer S, Schuhmann W(2011). Advances in Electrochemical Science and Engineering. Edited by Richard C. Alkire, Dieter M. Kolb and Jacek Lipkowski WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-52732885-7.
- [19] Beate Strehlitz, Nadia Nikolaus and Regina Stoltenburg. (21 Julio 2008). Protein Detection with Aptamer Biosensors. Sensors, 8(7), 4296-4307. DOI: [10.3390/s8074296](https://doi.org/10.3390/s8074296).
- [20] Lin PH1, Tong SJ, Louis SR, Chang Y, Chen WY. (14 de Noviembre 2009). Thermodynamic basis of chiral recognition in a DNA aptamer.. Phys Chem Chem Phys., 11(42), 9744-50.
- [21] Lucarelli F., Marrazza G., Turner A.P.F., Mascini M.. (2004). Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. Biosensors and Bioelectronics, 19(6), 515-530.

- [22] White, S.F.; Turner, A.P.F. Mediated Amperometric Biosensors. In Handbook of Biosensors and Electronic Noses. Medicine, Food and the Environment; Kress-Rogers, E., Ed.; CRC Press: New York, 1997; 227 – 244.
- [23] Rastislav Monošík, Miroslav Stred'anský , Ernest Šturdík. (2012). Biosensors — classification, characterization and new trends. Acta Chimica Slovaca, 5(1), 109-120.
- [24] D. R. Thevenot, K. Tóth, R. A. Durst and G. S. Wilson. (1999). Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. Pure and Applied Chemistry, 71(12), 2333-2348.
- [25] C.J. McNeil, D. Athey, M. Ball, W.O. Ho, S. Krause, R.D. Armstrong, J.D. Wright, y K. Rawson. Electrochemical Sensors Bases on Impedance Measurement of enzyme-catalyzed polymer dissolution – Theory and applications. Analytical Chemistry (1995). 67(21): p.3928-3935.
- [26] T. Hoffmann, K. Schoreder, J. Zacheja, y J. Binder, Fluid characterization using sensor elements based on interdigitated electrodes. Sensors and Actuators B-Chemical, (1996). 37(1-2): p. 347-42.
- [27] E. Katzy I. Willner, Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. Electroanalysis (2003), 15(11): p. 913-947.
- [28] J Woodward. (1985). Immobilised cells and enzymes — A practical approach. Biochemical Education , 14(2), 91.
- [29] Guibault, G. G., Kauffmann, J. M., and Patriarche, G. J. (1991) Immobilized Enzyme Electrodes as Biosensors. In: Protein Immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NT, pp. 209–262.
- [30] Introducción a la bioingeniería. (1988). Mundo Electrónico. España: Marcombo S.A.
- [31] Marcelo Antonio Sobrevila, Alejandro Marcelo Sobrevila. (2008). Sensores electrónicos: Aplicables en informática, mediciones y regulación y control automático. Argentina: Librería y Editorial Alsina.
- [32] Ward Research Group. (2000). Quart Crystal Microbalance Research. 18 de agosto 2014, de New York University Sitio web: http://www.nyu.edu/fas/dept/chemistry/wardgroup/MDW_QCM_Web_stuff.pdf.

- [33] Konash, PL , Bastians, GJ . "Piezoelectirc crystals in detectors in liquid chromatography" Anal Chem 52, 1929-1931, 1980.
- [34] Nomura T, Okumura A. Nippon Kagaku Kaishi, 1980, 10:1261
- [35] Bruckenstein y Shay, Abstracts, Pittsburg Conference and Exposition, Atlantic City, NJ, March (1983).
- [36] K. K. Kanazawa, J. G. Gordon II, Analítica Chimica Acta 175(1985) 99.
- [37] R. Ortega-Borges, D. Lincot, J. Electrochem. Soc. 140 (1993)3464.
- [38] H. Cachet, J. Electroanal. Chem, 396 (1995) 175.
- [39] A.M. Chaparro, M.T. Gutie´rrez, J. Herrero. (2001). Quartz-crystal microbalance study of the growth of Zn(Se,O) thin-films in a chemical bath. A sequential electroless-chemical process. Electrochimica Acta , 47, 977-986.
- [40] Maria Hepel, S.Bruckenstein. (1989). Tracking Anion Expulsion During Underpotential Deposition of Lead on Silver Using the Quartz Microbalance. Electrochemical Acta, 34, 1499-1504.
- [41] R. Schumacher, G. Borges, K. K. Kanazawa, Surf. Sci. 163 (1985) L621.
- [42] R. Schumacher, A. Muller, W. Stoeckel, J. Electroanal. Chem 219 (1987) 311.
- [43] G. S. Ostrom, D. A. Buttry, J. Electroanal. Chem, 256 (1988) 441.
- [44] Mello, L.D. y Kubota, L.T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries (2002). Food chemistry, 77, p.237-256.
- [45] Víctor González Rumayor, Esther García Iglesias, Olga Ruiz Galán, Lara Gago Cabezas. (2005). Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. En Informe de Vigilancia Tecnológica (113). Elecé Industria Gráfica: Dirección General de Universidades e Investigación.
- [46] Ma. Elena Zamora, Juan L. García, Irma Méndez, Arturo Aguilar-Águila, Octavio Tanatíuh Ramírez, Enrique Galindo. (1998). Sistema computarizado para la medición rápida y automatizada de la DBO en plantas de lodos activados mediante un biosensor microbiano. Bio Tecnología, 3, 107-117.

- [47] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner. The Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd ed. Academic Press, 2003.
- [48] Kunitz M, Northrop JH.. (Marzo 20 1935). Crystalline chymo-trypsin and chymo-trypsinogen : i. isolation, crystallization, and general properties of a new proteolytic enzyme and its precursor.. J Gen Physiol, 18(4), 433-58.
- [49] Northrop, Kunitz, and Herriott. (1948). Crystalline enzymes. Columbia Univ. Press, New York, 1, 352.
- [50] S. Maroux, J. Baratti and P. Desnuelle. (1971). Purification and Specificity of Porcine Enterokinase. J. Biol. Chem., 246, 5031-5039.
- [51] Earl W. Davie, Hans Neurath. (1955). Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. J. Biol. Chem. , 212, 515-530.
- [52] Neurath H, Dixon GH. (Septiembre 1957). Structure and activation of trypsinogen and chymotrypsinogen.. Fed Proc, 16(3), 791-801.
- [53] Sigler, P.B., Blow, D.M., Matthews, B.W., Henderson, R, Structure of Crystalline Alpha-Chymotrypsin, II.A Preliminary Report Including a Hypothesis for the Activation Mechanism (1968), J.Mol.Biol. 46: 337.
- [54] Adler-Nissen J. Proteases. In: Nagodawithana T, Reed, G, Eds. Enzymes in food processing. San Diego (USA), Academic Press; 1993. p. 159-203.
- [55] Cecilia Picos García. (1998). Proteasas Digestivas de Juveniles de Abulon Azul. CICIMAR: Instituto Politecnico Nacional.
- [56] Stroud, RM. (1974). A family of protein-cutting proteins. Scientific American, 231, 74-88.
- [57] Rawlings ND, Barrett AJ. (1994). Families of serine peptidases. Methods Enzymol, 244, 19-61.
- [58] B. Keil. In The Enzymes, 3rd ed., Vol. III, P. D. Boyer, Academic Press NY: 1971, pp. 250-275.
- [59] Department of Chemistry, University of Maine, Orono, ME 04469. (2014). The Serine Proteases - II. 26 Junio 2014, de University of Maine Sitio web: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase2.html>.
- [60] B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson & D. M. Blow. (13 de Mayo 1967). Three-dimensional Structure of Tosyl- α -chymotrypsin. Nature, 214, 652-656.

- [61] Kassell B, Kay J (1973) Zymogens of proteolytic enzymes. *Science* 180: 1022–1027.
- [62] Gertler, A, Walsh, K.A, Neurath, H.. (1974). Catalysis by chymotrypsinogen. Demonstration of an acyl-zymogen intermediate. *Biochemistry*, 13(6), 1302-1310.
- [63] *Mares-Guia, M. & Shaw, E. (1965) Studies on the active center of. Trypsin: The binding of Amidines and Guanidines as models of the substrate side chain. J. Biol. Chem.* 240, 1579-1585.
- [64] Alfred Rühlmann, Dietmar Kukla, Peter Schwager, Klaus Bartels, Robert Huber. (5 de Julio de 1973). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor: Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *Journal of Molecular Biology*, 77(3), 417–436.
- [65] Janin, J.Sweet, R.M. and Blow, D.M. (1974) in: *Bayer Symp. V, Proteinase Inhibitors*, (Fritz, H. Tschesche, H. Greene, L.J. and Truscheit, E., Eds) Springer-Verlag, Berlin, p513-520.
- [66] R. M. Sweet, H. T. Wright , J. Janin , C. H. Chothia , D. M. Blow. (1974). Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6 Å resolution. *Biochemistry*, 13(20), 4212-4228.
- [67] M. Krieger, L.M. Kay, R.M. Stroud. (12 de Octubre de 1973). Structure and Specific Binding of Trypsin: Comparison of Inhibited Derivates and a Model for Substrate Binding. *Journal of Molecular Biology*, 83, 209-230.
- [68] Shotton DM, Watson HC. (12 de Febrero 1970). The three-dimensional structure of crystalline porcine pancreatic elastase.. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 257(813), 111-8.
- [69] Alan R. Fersht , D. M. Blow , Jacques Fastrez. (1973). Leaving group specificity in the chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of peptides. Stereochemical interpretation. *Biochemistry*, 12(11), 2035-2041.
- [70] Harald Tschesche. (Enero 1974). *Biochemistry of Natura Proteinase Inhibitors. Angewandte Chemie International Edition in English*, 13(1), 10-28.
- [71] Spomer WE, Wootton JF. (14 Abril 1971). The hydrolysis of alpha-N-benzoyl-L-argininamide catalyzed by trypsin and acetyltrypsin. Dependence on pH. . *Biochimica et biophysica acta* , 235(1), 164-171.
- [72] Myron L. Bender , Gerald E. Clement , Ferenc J. Kezdy , Henry D'A. Heck. (1964). The Correlation of the pH (pD) Dependence and the Stepwise Mechanism

of α -Chymotrypsin-Catalyzed Reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 86(18), 3680-3690.

- [73] Michael W. Hunkapiller , Stephen H. Smallcombe , Donald R. Whitaker , John H. Richards. (1973). Carbon nuclear magnetic resonance studies of the histidine residue in α -lytic protease. Implications for the catalytic mechanism of serine proteases. *Biochemistry*, 12(23), 4732–4743.
- [74] Inward PW, Jencks WP. (Mayo 1965). The reactivity of nucleophilic reagents with furoyl-chymotrypsin. *J Biol Chem*, 240, 1986-96.
- [75] T.A. Steitz R. Hendekson, D.M. Blow. (14 Diciembre 1969). Structure of crystalline α -chymotrypsin: III. Crystallographic studies of substrates and inhibitors bound to the active site of α -chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology*, 46(2), 337–340.
- [76] Elizabeth Pollock , John L. Hogg , Richard L. Schowen. (1973). One-proton catalysis in the deacetylation of acetyl-a-chymotrypsin. *J. Am. Chem. Soc*, 95(3), 968–969.
- [77] Michael I. Page and William P. Jencks. (Agosto 1971). Entropic Contributions to Rate Accelerations in Enzymatic and Intramolecular Reactions and the Chelate Effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 68(8), 1678–1683.
- [78] William P. Jencks and Michael I. Page (1972). *Proc. Eighth FEBS Meeting, Amsterdam*, 29-45.
- [79] Linus Pauling. (1946). Molecular Architecture and Biological Reactions. *Chem. Eng. News*, 24(10), 1375–1377.
- [80] Richard Wolfenden. (1972). Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions. *Acc. Chem. Res.*, 5(1), 10–18.
- [81] Johnson CH, Knowles JR. (Octubre 1966). The binding of inhibitors to alpha-chymotrypsin. *Biochem J*, 101(1), 56-62.
- [82] D. E. Koshland, Jr.. (Febrero 1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 44(2), 98–104.
- [83] J. Gareth Morris. (1982). *Fisicoquímica para biólogos: conceptos básicos para las facultades de medicina, farmacia y biología*. España: Reverté.
- [84] I. Posner; *Enzimas y cinética enzimática en Bioquímica*, E. Herrera; Ed. Interamericana, (1986).

- [85] Juan José Hicks Gómez. (2001). Bioquímica. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- [86] Ursula Bilitewski y Anthony P.F. Turner. (200). Biosensors for Environment monitoring. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers.
- [87] Martin Chaplin. (2014). Effects of solute diffusion on the kinetics of immobilised enzymes. 5 de Noviembre 2014, de London South Bank University Sitio web: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/diffusion.html>
- [88] Richard Owusu-Apenten. (2004). Introduction to Food Chemistry. USA: CRC PRESS.
- [89] Eduardo Primo Yúfera. (2007). Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria, Volumen 2. Universidad Politécnica de Valencia: Reverté.
- [90] Tibor Sipos, Joseph R. Merkel. (1970). Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry*, 9(14), 2766–2775.
- [91] José María Teijón. (2006). Fundamentos de bioquímica estructural. Madrid, España: Editorial Tébar.
- [92] Dr. Edgar Vázquez-Contreras. (2003). Efecto de la Temperatura en la actividad enzimática. 4 de Octubre 2014, de Bioquímica y Biología Molecular en línea información actualizada en español para la enseñanza y el aprendizaje de estas disciplinas científicas. Sitio web: <http://bq.unam.mx/~evazquez>
- [93] H. C. Heinrich, E. E. Gabbe, F. IćIagić. *J. Mol. Medicine* 1979 57: 1237-1238.
- [94] J. M. Artigas, M. E. Garcia, M. R. Faure, A. M. Gimeno. *Postgrad. Med. J.* 1981 57: 219-22.
- [95] Sisinio de Castro. (2013). Manual de patología general. España: Elsevir MASSON.
- [96] Luciano Casal, Julio Meana, Carlos M. Karatanasópuloz, Dr. Juan P. Casal, Dr. Juan I. Casal. (Febrero 2002). PANCREATITIS AGUDA: Revisión. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*, 112, 5-20.
- [97] E.Sanz de Villalobos, F. Carballo Alvarez. (2004). Pruebas de Función Pancreática Exocrina. *Revis Gastroenterol*, 4, 167-176.
- [98] Skipworth J, Pereira S. Acute pancreatitis. *Curr Opin Crit Care* 2008;14:172-8.

- [99] Sánchez-Lozada R, Camacho-Hernández MI, Vega-Chavaje RG y col. Pancreatitis aguda: experiencia de cinco años en el Hospital General de México. *Gac Med Mex* 2005;141:1237.
- [100] Ortega L, Herrera J, Obregón L y col. Morbilidad y mortalidad asociadas a un manejo protocolizado de la pancreatitis aguda. *Cir Gen* 2003;25:103-11.
- [101] Edgard Delvin, Gisèle Pham. (1993). *Vocabulaire Du Génie Enzymatique*. Canada: Minister of Supply and Services Canada.
- [102] J. M. Nelson , Edward G. Griffin. (Mayo 1916). Adsorption of invertase. *J. Am. Chem. Soc*, 38(5), 1109–1115.
- [103] S.S. Wongy, L.J.C., Wong; Chemical and Cross-Linking and the stabilization of Proteins and Enzymes. *Enzymes and Microbial Technology* (1992). 14(1), p:866-874.
- [104] Sumio Sakka, Toshinobu Yoko. (1992). Sol-gel-derived coating films and applications. *Chemistry, Spectroscopy and Applications of Sol-Gel Glasses*, 3, 89-118.
- [105] Yuhong Huang, Haixing Zheng, Ian Ball y Zhongkuan Luo. (Diciembre 2001). *Advances in Sol-Gel Technology*. CERAMIC INDUSTRY, 1, 17-20.
- [106] C. Jeffrey Brinker y George W. Scherer. (1990). *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. San Diego, C.A.: Academic Impress.
- [107] Klei, H.E.; Sundstrom, D.W.; Shim, D. (1985) Immobilization of enzymes by microencapsulation en *Immobilized cells and enzymes: a practical approach* J. Woodward, ed. IRL Press, pág. 49-54.
- [108] K. Heinkel, N. Henning, and H. Schoen, Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas : Europäisches Pankreas-Symposium, 24. 5. bis 26. 5. 1963 in Erlangen
- [109] S S Fedail, R F Harvey, P R Salmon, P Brown, and A E Read. (Noviembre 1979). Trypsin and lactoferrin levels in pure pancreatic juice in patients with pancreatic disease. *Gut*, 20(11), 983–986.
- [110] Mikiembo Kukwikila and Stefan Howorka. (2010). Electrically sensing protease activity with nanopores . *Journal of Physics: Condensed Matter*, 22(45), doi:10.1088/0953-8984/22/45/454103.
- [111] Neff PA, Serr A, Wunderlich BK, Bausch AR. (8 de Octubre 2007). Label-free electrical determination of trypsin activity by a silicon-on-insulator based thin film resistor.. *Chemphyschem*, 8(14), 2133-7.

- [112] *megowda, N.M. et al.*, Label-free protease sensors based on optical microsphere resonators. *Sensor Letters*, 2005, 3(4): 315–319.
- [113] Wu, Shihui; Cai, Qingyun; Grimes, Craig A. (Junio 2006). Kinetic Assay of Trypsin with a Wireless Magnetoelastic Sensor. *Sensor Letters*, 4(2), 160-164(5).
- [114] Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., Grassl, M., (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press Inc., New York, 2, 515-516.
- [115] Evanoff DD Jr, Chumanov G. (11 Julio 2005). Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *Chemphyschem*, 6(7), 1221-31.
- [116] Rashid A. Khaydarov, Renat R. Khaydarov, Olga Gapurova, Yuri Estrin, Thomas Scheper. (2009). Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(5), 1193-1200.
- [117] Stair, J. L., Watkinson, M., & Krause, S. (2009). Sensor materials for the detection of proteases. *Biosensors & Bioelectronics*, 24(7), 2113-2118. 10.1016/j.bios.2008.11.002.
- [118] Xavier Turon, Orlando J Rojas, Randall S Deinhammer. (15 Abril 2008). Enzymatic kinetics of cellulose hydrolysis: A QCM-D study. *Langmuir*, 24(8), 3880-3887.
- [119] Torben Snabe, Steffen Bjørn Petersen. (2003). Lag phase and hydrolysis mechanisms of triacylglycerol film lipolysis. *Chemistry and Physics of Lipids* , 125, 69-82.
- [120] Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H.J., Sandal, N.N., Marcker, K.A., Klein-Lankhorst, R.M., Salentijn, E.M.J., Lange, W.,Stiekema, W.J., Wyss, U., Grundler, F.M.W. and Jung, C. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275: 832–834.
- [121] Rodica E. Ionescu , Serge Cosnier , and Robert S. Marks. (2006). Protease Amperometric Sensor. *Anal. Chem.*, 78(18), 6327–633.
- [122] Rodica E. Ionescu, Chrystelle Fillita, Nicole Jaffrezic-Renault, Serge Cosnier. (15 e Noviembre 2008). Urease–gelatin interdigitated microelectrodes for the conductometric determination of protease activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(3), 489–492.
- [123] Margarita Stoytcheva, Roumen Zlatev a, SergeCosnier, MichelleArredondo . (Mayo 2012). Squarewavevoltammetricdeterminationoftrypsinactivity. *Electrochimica Acta*, 76, 43-47.

- [124] Olga A. Biloivan, Sergiy V. Dzyadevych, Olga A. Boubriak, Alexey P. Soldatkin and Anna V. El'skaya. (28 de Septiembre 2004). Development of Enzyme Biosensor Based on ISFETs for Quantitative Analysis of Serine Proteinases. *Electroanalysis*, 24(16), 1883-1889.
- [125] Chen Y, Ding J, Qin W.. (Diciembre 2012). Potentiometric determination of trypsin using a polymeric membrane polycation-sensitive electrode based on current-controlled reagent delivery. *Bioelectrochemistry*, 88, 144-147.
- [126] Deniz Bař and İsmail Hakkı Boyacı. (14 Diciembre 2009). Rapid Method for Quantitative Determination of Proteolytic Activity with Cyclic Voltammetry. *Electroanalysis*, 22(3), 265-267.
- [127] Roger B. Millington, Andrew G. Mayes, Jeff. Blyth, Christopher R. Lowe. (1995). A Holographic Sensor for Proteases. *Analytical Chemistry*, 67(23), 4229-4233.
- [128] M.S. Khan, I. Munir, I. Khan, The potential of unintended effects in potato glycoalkaloids, *Afr. J. Biotechnol.* 12 (2013) 754–766.
- [129] M. Cantwell, A review of important facts about potato glycoalkaloids, *Perishables Handling Newslett.* 87 (1996) 26–27.
- [130] J.G. Roddick, A.L. Rijnenberg, Effect of steroidal glycoalkaloids of the potato on the permeability of liposome membranes, *Physiol. Plant.* 68 (1986) 436–440.
- [131] S.C. Morris, T.H. Lee, The toxicity and teratogenicity of solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*): a review, *Food Technol. Australia* 36 (1984) 118–124.
- [132] P.K. Nema, N. Ramayya, E. Duncan, K. Niranjana, Potato glycoalkaloids: formation and strategies for mitigation, *Sci. Food Agric.* 88 (2008) 1869–1881.
- [133] L.A. Grunenfelder, L.O. Knowles, L.K. Hiller, N.R. Knowles, Glycoalkaloid development during greening of fresh market potatoes (*Solanum tuberosum* L.), *Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5847–5854.
- [134] J.G. Roddick, The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones, *Phytochemistry* 28 (1989) 2631–2634.
- [135] W.H. Orgell, K.A. Vaidya, P.A. Dahm, Inhibition of human plasma cholinesterase in vitro by extracts of solanaceous plants, *Science* 128 (1958) 1136–1137.

- [136] D.B. Smith, J.G. Roddick, J.L. Jones, Potato glycoalkaloids: some unanswered questions, *Trends Food Sci. Technol.* 7 (1996) 126–131.
- [137] S.J. Jadhav, R.P. Sharma, D.K. Salunkhe, Naturally occurring toxic alkaloids in foods, *Crit. Rev. Toxicol.* 9 (1981) 21–104.
- [138] G. Lisinska, W. Leszczynski, *Potato Science and Technology*, Elsevier Applied Science, 1989.
- [139] J.G. Roddick, A.L. Rijnenberg, Synergistic interaction between the potato Glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to lysis of phospholipid/sterol liposomes, *Phytochemistry* 26 (1987) 1325–1328.
- [140] D.B. Smith, J.G. Roddick, J.L. Jones, Synergism between the potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine in inhibition of snail feeding, *Phytochemistry* 57 (2001) 229–234.
- [141] E. Messer, Potatoes (white), in: K.F. Kiple, K.C. Ornelas (Eds.), *Cambridge World History Food*, vol. 1, Cambridge University Press, 2000, pp. 187–200.
- [142] J.A. Woolfe, S.V. Poats, *The Potato in the Human Diet*, Cambridge University Press, 1987.
- [143] T. Johns, S.L. Keen, Taste evaluation of potato glycoalkaloids by the Aymara: a case study in human chemical ecology, *Hum. Ecol.* 14 (1986) 437–452.
- [144] E. Soy, V. Arkhypova, O. Soldatkin, M. Shelyakina, S. Dzyadevych, J. Warzywoda, A. Sacco Jr., B. Akata, Investigation of characteristics of urea and butyrylcholine chloride biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite beta crystals, *Mater. Sci. Eng. C* 32 (2012) 1835–1842.
- [145] D.M. Quinn, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chem. Rev.* 87 (1987) 955–979.
- [146] A. Saxena, A.M. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B.P. Doctor, Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Biochemistry* 36 (1997) 14642–14651.
- [147] L. Raveh, E. Grauer, J. Grunwald, E. Cohen, Y. Ashani, The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145 (1997) 43–53.
- [148] C.A. Prody, D. Zevin-Sonkin, A. Gnatt, O. Goldberg, H. Soreq, Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 3555–3559.

- [149] K. Kobayashi, A.D. Powell, M. Toyoda, Y. Saito, High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous analysis of α -solanine and α -chaconine in potato plants cultured in vitro, *J. Chromatogr. A* 462 (1989) 357–364.
- [150] N.G. Yasri, A.J. Halabi, G. Istamboulie, T. Noguier, Chronoamperometric determination of lead ions using PEDOT: PSS modified carbon electrodes, *Talanta* 85 (2011) 2528–2533.
- [151] N. Ben Oujji, I. Bakas, G. Istamboulie, I. Ait-Ichou, E. Ait-Addi, R. Rouillon, T. Noguier, Solgel immobilization of acetylcholinesterase for the determination of organophosphate pesticides in olive oil with biosensors, *Food Control* 30(2013) 657–661.
- [152] L. Pogac̣nik, M. Franko, Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 1–9.
- [153] O.O. Soldatkin, O.S. Burdak, T.A. Sergeyeva, V.M. Arkhypova, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1, *Sens. Actuators B* 188 (2013) 999–1003.
- [154] S. Sanllorrente-Méndez, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. Application to the determination of arsenic(III), *Sensors* 10 (2010) 2119–2128.
- [155] E.A. Nazarenko, A.P. Soldatkin, C. Martelet, Y.I. Korpan, Potato glycoalkaloids detection based on conductometric sensor coupled to butyryl cholinesterase, *Biopolym. Cell* 20 (2004) 331–336.
- [156] G. Alonso, G. Istamboulie, T. Noguier, J.L. Marty, R. Muñoz, Rapid determination of pesticide mixtures using disposable biosensors based on genetically modified enzymes and artificial neural networks, *Sens. Actuators B Chem.* 164 (2012) 22–28.
- [157] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42(1998) 3–40.
- [158] G. Istamboulie, M. Cortina-Puig, J.L. Marty, T. Noguier, The use of artificial neural networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: chlorpyrifos and chlorfenvinfos, *Talanta* 79 (2009) 507–511.

- [159] Sun, S.H., Murray, C.B., Weller, D., Folks, L. & Moser, A. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. *Science* **287**, 1989-1992 (2000).
- [160] D.J. Sellmyer, Strong magnets by self-assembly, *Nature* **420**, 374-375 (2002)
- [161] Yong Wang, Xiaowei Teng, Jin-Shan Wang, Hong Yang. (2003). Solvent-free atom transfer radical polymerization in the synthesis of Fe₂O₃@ polystyrene core-shell nanoparticles. *Nano letters*, 3(6), 789-793.
- [162] M. Ramos y C. Castillo. (Junio 2011). Aplicaciones biomedicas de las nanoparticulas magneticas. *Ide@s CONCYTEG*, 6(72), 629-646.
- [163] Wenli Pei , H. Kumada , T. Natusme , H. Saito , S. Ishio. (Noviembre 2006). Study on magnetite nanoparticles synthesized by chemical method. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 310, 2375-2377.
- [164] J. Santoyo-Salazar, M.A. Castellanos-Roman, L. Beatriz Gómez. (2007). Structural and magnetic domains characterization of magnetite nanoparticles. *Materials Science and Engineering*, 27, 1317-1320.
- [165] J. Frenkel & J. Doefman. (23 Agosto 1930). Spontaneous and Induced Magnetisation in Ferromagnetic Bodies. *Letters to Nature*, 126, 274-275.
- [166] An-Hui Lu Dr., E. L. Salabas Dr. and Ferdi Schüth Prof. Dr. (5 Febrero 2007). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222–1244.
- [167] Babita Gaihre , Santosh Aryal , Myung Seob Khil, & Hak Yong Kim. (Febrero 2008). Encapsulation of Fe₃O₄ in gelatin nanoparticles: Effect of different parameters on size and stability of the colloidal dispersion 4. *Journal of Microencapsulation*, 25(1), 21-30.
- [168] Gupta AK, Gupta M. (Junio 2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021.
- [169] Leo E, Cameroni R, Forni F. (1999). Dynamic dialysis for the drug release evaluation from doxorubicin-gelatin nanoparticle conjugates. *Int J Pharm* 180:23–30.
- [170] Zillies J, Coester C. 2004. Evaluating gelatin based nanoparticles as a carrier system for double stranded oligonucleotides. *J Pharmaceut Sci* 7:17–21.

- [171] Bajpai AK, Choubey J. 2006. design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate. *J Mater Sci-Mater M* 17:345–358.
- [172] Maria GC, Claudia C, Zhouhai Z. 2002. Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. *J Mater Sci Mater Med* 13:523–526.
- [173] Muniyandy S, Bhaskar K, Maharajan G, Pillai KS. 2004. Ultrasonically controlled release and targeted delivery of diclofenac sodium via gelatin magnetic microspheres. *Int J Pharm* 283:71–82.
- [174] Saravanan M, Bhaskar K, Narayanan VSN, Maharajan G, Pillai SK. 2003. Diclofenac sodium loaded gelatin magnetic microspheres for intra-arterial administration: Formulation, characterization and in vitro release studies. *Boll Chim Farm* 142:347–351.
- [175] M. R. Koblischka, U. Hartmann and T. Sulzbach. (2003). Resolving magnetic nanostructures in the 10nm range using mfm at ambient conditions. *Mat. Sci. Eng.*, 23, 10.1016/j.msec.2003.09.146.
- [176] Witold Szmajaa, Jarosław Grobelnyb, Michał Cichomskib, Ken Makitac. (24 Mayo 2004). Application of MFM for studying Nd–Fe–B magnets. *Vacuum*, 74(2), 297–300.
- [177] S.J. May, A.J. Blattner, D.P. Eam, B.W. Wessels. (Marzo 2006). Direct observation of room temperature magnetism in (In,Mn)As thin films by magnetic force microscopy. *Applied Surface Science*, 252(10), 3509–3513.
- [178] Ailin Xia, Zhaohui Guob, Wei Lib, Baoshan Han. (2006). Magnetic Microstructures of 2:17 Type Sm(Co, Fe, Cu, Zr)_z Magnets Detected by Magnetic Force Microscopy . *Journal of Rare Earths*, 24(2), 214-217.
- [179] M. Raşa, B.W.M. Kuipers, A.P. Philipse. (2002). Atomic Force Microscopy and Magnetic Force Microscopy Study of Model Colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 250(2), 313-315.
- [180] C. Frandsena, S.L.S. Stippb, S.A. McEnroec, M.B. Madsend, J.M. Knudsend. (2004). Magnetic domain structures and stray fields of individual elongated magnetite grains revealed by magnetic force microscopy (MFM). *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 141(2), 121-129.
- [181] H Takahoshi, H Saito, S Ishio. (2004). MFM analysis of magnetization process in CoPt dot-array. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272-276, E1313–E1315.

- [182] MARGEL, Shlomo; GURA, Sigalit. (1999). NUCLEATION AND GROWTH OF MAGNETIC METAL OXIDE NANOPARTICLES AND ITS USE. Ptentscope, WO/1999/062079, PCT/IL1999/000275.
- [183] Shlomo Margel, Tammy Lublin-Tennenbaum, Sigalit Gura, Merav Tsubery, Udi Akiva, Nava Shpaisman, Anna Galperin, Benny Perlstein, Polina Lapido, Yonit Boguslavsky, Jenny Goldshtein, Ofra Ziv. (2007). Synthesis and characterization of nano- and micron-sized iron oxide and iron particles for biomedical applications. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 119-162.
- [184] Dra. María Eugenia Icaza Chávez. (2012). Pancreatitis aguda y Pancreatitis crónica. Junio 2014, de Asociación Mexicana de Gastroenterología Sitio web: <https://www.gastro.org.mx/gastro-para-todos/?p=27>

ANEXOS

Lista de figuras

Figura 1: Aplicaciones de los biosensores

Figura 2: Incidencia de afectación por pancreatitis aguda a nivel mundial.

Figura 3: Incidencia de mortalidad por pancreatitis aguda a nivel mundial.

Figura 4: Constitución de un biosensor

Figura 5: Componentes de un biosensor

Figura 6: Representación de la transducción de la señal.

Figura 7: Clasificación de biosensores

Figura 8: Representación de unión enzima-sustrato

Figura 9: Clasificación de los transductores

Figura 10: Constitución transductor óptico

Figura 11: Representación de un transistor de efecto de campo

Figura 12: Representación de un transistor ISFET

Figura 13: Representación de un transductor termométrico: (a) cámara termoaislada, (b) intercambiador de calor, (c) reactor biocatalítico, (d) termistores interconectados.

Figura 14: Representación del funcionamiento del cristal piezoeléctrico.

Figura 15: Representación del cambio de frecuencia de QCM

Figura 16: Intervalo de respuesta de un biosensor en condiciones de cinética biocatalítica y control difusional

Figura 17: Medidor de glucosa YSI modelo 23A; 115V, 60Hz, 0.5A

Figura 18: Cuatro generaciones de medidor de glucosa en sangre, 1993-2005 de derecha a izquierda. Los tamaños de muestra varían desde 30 hasta 0,3 μL . Los tiempos de prueba varían de 5 segundos a 2 minutos.

Figura 19: Dispositivo inoLab® modelo BSB/BOD 740

Figura 20: Analizador de alcohol en aliento. Modelo No. PRO Classic 21 detecta la concentración de alcohol en el aliento de una persona que puede variar desde 0,00 hasta 0,40% del alcohol presente en aliento.

Figura 21: Dispositivo Zeo para conocer la calidad del sueño.

Figura 22: Representación de una proteasa facilitando la liberación de péptidos en la digestión proteolítica

Figura 23: Mecanismo catalítico de una proteasa [16 DE V42N2A08]

Figura 24: Bolsillos activos S1 de quimiotripsina, tripsina y elastasa.

Figura 25: La conversión de tripsina activa lleva consigo la ruptura de un grupo lisilo, con eliminación de 6 aminoácidos a partir del N terminal. Estos seis aminoácidos se mantienen en una posición particular por uniones electrostáticas. Cuando el resto de la cadena se libera por hidrólisis, pasa a una conformación nueva que hace que la enzima sea activa.

Figura 26: La esfera violeta es un ion Ca^{2+} , que ayuda a proporcionar estabilidad térmica.

Figura 27: Estructura de la tripsina unida a benzamidina, el centro es un aminoácido que se activa por histidina y aspartato. La histidina y el aspartato ayudan en la eliminación del átomo de hidrógeno de la tripsina (de color blanco), que hace que sea más reactivo cuando se ataca la cadena de proteína. La benzamidina es de color rosa, su lugar de la división en color verde, se mantiene lo suficientemente lejos para evitar el anclaje de otras proteínas en esta ubicación. Nótese también el largo aminoácido lisina que se extiende hasta la parte inferior derecha del sitio de corte, donde interactúa con otro aspartato de la enzima (mostrado en la esquina inferior derecha con oxígenos rojos). A través de esta interacción, tripsina favorece el corte en los lugares junto a los aminoácidos lisina o arginina.

Figura 28: Ionización del sitio activo en rango de pH de 4.0 a 8.0

Figura 29: Representación del mecanismo de hidrólisis de péptidos por tripsina, se esquematiza el transporte de protón.

Figura 30: Representación de la velocidad de reacción por Michaelis-Menten.

Figura 31: Representación esquemática de los gradientes de concentración en sustratos y producto que se producen alrededor de la porosidad de la membrana enzimática inmovilizada. En (A) el gradiente de concentración se origina únicamente a la velocidad de reacción y la difusión interna de la enzima. En (B) es similar a (A) pero con un aumento en el gradiente de concentración debido a la división del sustrato y el producto en la solución o ambiente de reacción. En (C) se presentan gradientes de concentración adicional debido a la difusión externa en la superficie de la partícula. En (D) el gradiente de concentración es originado por la combinación de los efectos de división y difusión.

Figura 32: Perfil de pH, los sitios activos se tratan de manera independiente el uno del otro. El punto de inflexión muestra el pH óptimo de actividad. Fuente:

<https://books.google.com.mx/books?id=6hvsj1dbAj8C&pg=PA187&dq=ph+effect+on+enzyme>

+activity&hl=es-

419&sa=X&ei=luXTVP3YFobqoASu0oGQAw&ved=0CCUQ6AEwAQ#v=onepage&q=ph%20effect%20on%20enzyme%20activity&f=false

Figura 33: (a) actividad enzimática de peptidasas vs pH

https://books.google.com.mx/books?id=aU_aBXvAB3MC&pg=PA1020&dq=influencia+temperatura+cinetica+enzimatica&hl=es-

<419&sa=X&ei=WdjVVLsBCY3woASmzIDwDw&ved=0CCQQ6AEwAQ#v=onepage&q=influencia%20temperatura%20cinetica%20enzimatica&f=false>

(b) Valor óptimo de pH de la enzima tripsina alrededor de 8.0 a 8.5, FUENTE: **Sipos, T., and Merkel, J. R. (1970)** An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry*, 9:2766-2775 [doi: [10.1021/bi00816a003](https://doi.org/10.1021/bi00816a003)]

Figura 34: Clasificación de los inhibidores enzimáticos

Figura 35: Ejemplo de un inhibidor irreversible, el fluorofosfato de diisopropilo (DFP) que forma un complejo con la enzima acetilcolinesterasa. Los animales envenenados con este gas quedan paralizados, debido a la imposibilidad de transmitir adecuadamente los impulsos nerviosos.

Figura 36: Mecanismo de acción de una reacción de inhibición competitiva.

Figura 37: Mecanismo de acción de una reacción de inhibición no-competitiva.

Figura 38: (a) representación inhibición competitiva (b) inhibición incompetitiva.

Figura 39: Temperatura óptima para la actividad de tripsina.

Figura 40: Representación de función pancreática. <https://www.gastro.org.mx/gastro-para-todos/?p=27>

Figura 41: Causas de la prevalencia de pancreatitis aguda.

Figura 42: Tipos de agentes transportadores para la inmovilización.

Figura 43: Representación de inmovilización por adsorción.

Figura 44: Representación de una inmovilización por cross-linking.

Figura 45: Representación de inmovilización método de inmersión por cross-linking.

Figura 46: Representación de inmovilización método de unión directa por cross-linking.

Figura 47: Representación de inmovilización método de aerosol por cross-linking.

Figura 48: Aplicaciones inmovilizadas por partículas magnéticas

Figura 49: Esquema de inmovilización por enlace covalente.

Figura 50: Construcción de un biosensor microbiológico.

Figura 51: Representación de un antígeno inmovilizado.

Figura 52: Representación de la enrejada que se forma en una inmovilización por atrapamiento.

Figura 53: Proceso de formación de recubrimientos por sol-gel.

Figura 54: Inmersión del sustrato en la solución, formando una capa húmeda y gelación de la capa por la evaporación del solvente.

Figura 55: Proceso de gelación durante el la inmersión obtenido por la evaporación del solvente.

Figura 56: Representación del proceso spin coating.

Figura 57: Representación de las diferentes morfologías del microencapsulamiento.

Figura 58: Representación del atrapamiento en fibras.

Figura 59: Representación del proceso de digestión.

1. Electrodo Rotatorio
2. Centro de grafito
3. Capa de gelatina

En la figura se muestra como se realiza la modificación de la superficie del electrodo añadiendo una barrera, gelatina, para determinar la actividad de la enzima, tripsina, que degrada la gelatina dependiendo del tiempo de incubación, permitiendo el paso de determinada cantidad de moléculas de la solución (HQ) al grafito y obtener la intensidad del pico que será proporcional a la actividad enzimática.

Figura 60: Oxidación de Hidroquinona (HQ) en 1, 2 – Benzoquinona. (BQ)

Figura 61: Representación del arreglo factorial a niveles del diseño de experimentos de tripsina

Figura 62: Representación catódica de la variación de volumen de gelatina.

Figura 63: Representación anódica de la variación de volumen de gelatina

Figura 64: Representación catódica de la variación de concentración de gelatina.

Figura 65: Representación anódica de la variación de concentración de gelatina.

Figura 66: Representación catódica de la variación de concentración de hidroquinona (HQ).

Figura 67: Optimización de corriente catódica de la variación de concentración de (HQ).

Figura 68: Optimización de corriente anódica de la variación de concentración de (HQ).

Figura 69: Optimización catódica de la variación de gelatina.

Figura 70: Evolución de la respuesta de corriente anódica de HQ 1 mM en PBS 0.1M pH7 para diferentes tiempos de incubación en una solución de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y una hidrocapa de gelatina 8% . Técnica voltametría de onda cuadrada, la amplitud del pulso 0,05 V; frecuencia de 30 Hz.

Figura 71: Corriente del pico de oxidación vs tiempo de incubación y la concentración de solución de tripsina: (a) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) (a) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 72: Curva de calibración para la determinación de la actividad de tripsina después de un tiempo de incubación de 10 min; 5 μL de gelatina 8% de gelatina; hidroquinona 1 mM en PBS 0.1 M pH 7.

Figura 73: Corriente de reducción de pico dependiendo del tiempo de incubación y la concentración de la solución, utilizando el primer sensor 1,2-benzoquinona. Concentraciones de tripsina(a) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y (e) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 74: La dependencia de la corriente de respuesta de la concentración de analíto y el volumen de solución de gelatina: (a) concentración de la solución de gelatina 6%; (b) concentración de la solución de gelatina 8%.

Figura 75: Evolución de la plaza respuesta voltamétrica ola de sensor de 1,2 benzoquinona 5 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7 para tiempos diferentes tiempos de incubación en 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tripsina: (b) 0 min; (c) 10 min; (d) 20 min; (e) 30 min; (f) 40 min; (g) 50 min; (h) 60 min; (i) 70 min; (j) 80 min. (a) blanco tampón fosfato pH7 0.1 M

Figura 76: Evolución de la respuesta de voltametría de onda cuadrada del sensor 2 a 1,2-benzoquinona 5 mM en tampón PBS pH 0,1 M 7 durante 10 minutos de incubación para concentraciones de tripsina en aumento: (a) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 77: Curva de calibración para la determinación de tripsina después de un tiempo de incubación de 10 min: (a) sensor 1-2, benzoquinona; (b) Sensor 2.

Figura 78: Ag Nanopartículas: (a) solución acuosa;
(b) solución de gelatina

Figura 79: Instrumentación para la medición de QCM: (a) equipo CHI440A, (b) vista superficial de celda QCM, (c) celda QCM y potenciostato/galvanostato

Figura 80: Microbalanza de cristal de cuarzo con la deposición de la solución de Triacetato de celulosa y cloroformo.

Figura 81: Espectros UV-vis de: (a) 0.8% p/v solución de gelatina; (b) Ag nanopartículas en solución acuosa y (c) nanopartículas de Ag en hidrosolución de gelatina, registrados inmediatamente después de la preparación de muestras (líneas continuas) y después de las muestras de almacenamiento para un mes (líneas discontinuas).

Figura 82: Respuesta del sensor 1 a cambios en la concentración de tripsina: (a) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (b) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y (e) 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$. PBS 0.1 M, pH 8, 500 rpm, 26 °C.

Figura 83: Comparación de respuesta para tripsina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (a) Sensor 1;(b) Sensor 2. PBS 0.1M, pH 8, 500 rpm, 26°C.

Figura 84: Representación del mecanismo de acción de la acetilconesterasa

Figura 85: Esquema del protocolo utilizado para la medición one-step de la inhibición de ChE por α -chacónina y α -solanina.

Figura 86: Gráficas Lineweaver-Burk para AChE-B131 inhibida por α -chacónina (a) y α -solanina (b). Procedimiento experimental: 300 μL de DTNB [$2.5 \times 10^{-3}\text{M}$] y 100 μL de ATCh (0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 3.5 y 10 mM) fueron añadidos a 500 μL de PBS 0.1M a pH 7, una solución de enzima-Gas conteniendo 0.367 U L⁻¹ de AChE-B131, incubada a 30°C a temperatura controlada fueron registradas en un intervalo de tiempo de 2 minutos; la concentración del inhibidor utilizado fue de 0, 0.5 1 μM .

Figura 87: Efecto de la inhibición de α -chacónina [\bullet] y α -solanina [\times] en un sensor basado en AChE-B131 en presencia de ATCh 0.5mM (a) un sensor basado en BChE en presencia de BTCh 0.5mM. Tiempo de incubación de 2 minutos. Ecuaciones de regresión: [\bullet] $y = 18.94 \ln(x) + 343.6$; $r^2 = 0.987$, [\times] $y = 16.72 \ln(x) + 298.52$; $r^2 = 0.97$, [\bullet] $y = 20.59 \ln(x) + 375.61$; $r^2 = 0.992$, [\times] $y = 8.95 \ln(x) + 157.58$; $r^2 = 0.94$.

Figura 88: Esquema de la modificación de superficie de la QCM con MNPs

Figura 89: Representación de la modificación de la superficie nanoestructurada por el tratamiento de diferentes tiempos de solución tripsina por efecto de degradación. Imágenes AFM 5 μm .

Figura 90: Imágenes AFM de sustrato polimérico. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a 5 μM .

Figura 91: Imágenes AFM de sustrato modificado con MNPs. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a 5 μM

Figura 92: Imágenes AFM de sustrato modificado con MNPs en gelatina tratada por 5 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a 5 μM .

Figura 93: Imágenes AFM de sustrato modificado con MNPs en gelatina tratada por 30 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a 5 μM .

Figura 94: Imágenes AFM de sustrato modificado con MNPs en gelatina tratada por 60 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$. (a) Imagen plana; (b) análisis de rugosidad; (c) imagen superficial; (d) análisis seccional. Todas las imágenes fueron escaladas a 5 μM .

Figura 95: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato polimérico resultando en 191 partículas/ $25\mu\text{m}^2$. Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.

Figura 96: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato nanomodificado resultando en 1410 nanopartículas/ $25\mu\text{m}^2$. Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.

Figura 97: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato nanomodificado aplicando 5 minutos tratamiento con solución de tripsina resultando en 519 nanopartículas/ $25\mu\text{m}^2$. Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.

Figura 98: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato nanomodificado aplicando 30 minutos tratamiento con solución de tripsina resultando en 569 nanopartículas/ $25\mu\text{m}^2$. Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.

Figura 99: Análisis cuantitativo de la imagen AFM del sustrato nanomodificado aplicando 60 minutos tratamiento con solución de tripsina resultando en 519 nanopartículas/ $25\mu\text{m}^2$. Imagen analizada en software SPIP 6.2.4.

Figura 100: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato modificado con gelatina y Fe_3O_4 NPS.

Figura 101: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato modificado con gelatina y Fe_3O_4 NPS tratada por 5 minutos de solución tripsina $1\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 102: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato modificado con gelatina y Fe_3O_4 NPS tratada por 30 minutos de solución tripsina $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 103: Representación de la diferencia entre las técnicas AFM vs MFM. Muestra de sustrato modificado con gelatina y Fe_3O_4 NPS tratada por 60 minutos de solución tripsina $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 104: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético del sustrato sin modificación.

Figura 105: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético de gelatina + MNPs

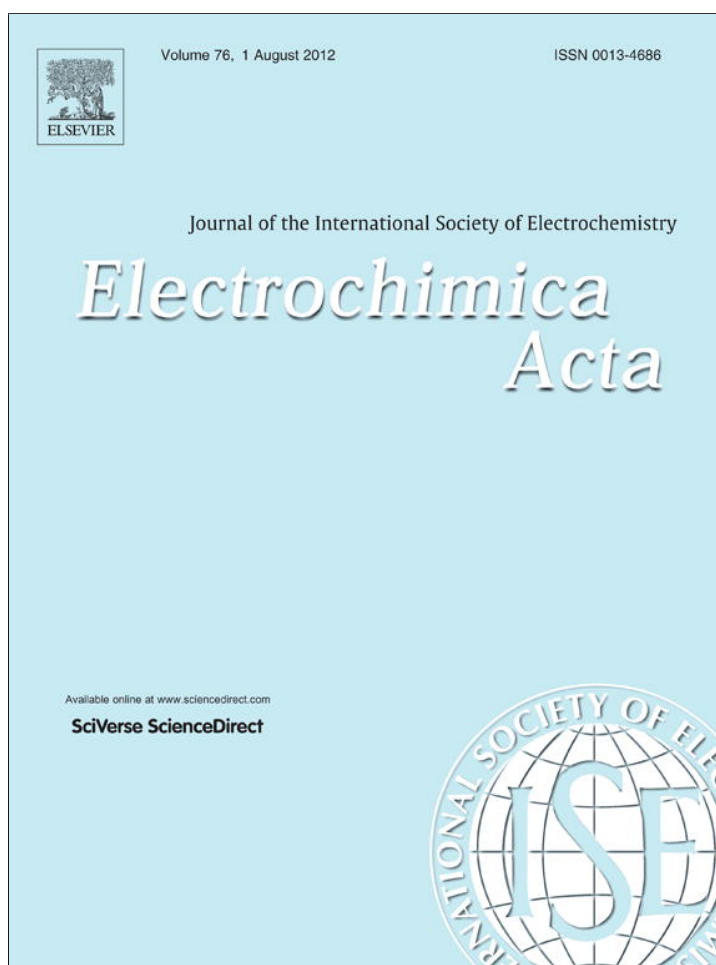
Figura 106: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético de gelatina + MNPs con tratamiento de 5 minutos de solución tripsina $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$

Figura 107: Cuadro comparativo de partículas en modo topográfico, fase-topográfico y magnético de gelatina + MNPs con tratamiento de 30 minutos de solución tripsina $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$

Lista de tablas

- Tabla 1:** Comparación de métodos analíticos vs biosensores para detección de tripsina
- Tabla 2:** Clasificación de las enzimas utilizadas como bioreceptor
- Tabla 3:** Ventajas y desventajas de utilizar enzimas como bioreceptor
- Tabla 4:** Ventajas y desventajas del uso de materiales biológicos en biosensores
- Tabla 5:** Clasificación de transductores electroquímicos
- Tabla 6:** Características de los transductores ópticos
- Tabla 7:** Reacciones caloríficas aptas para los transductores calorimétricos
- Tabla 8:** Ventajas y desventajas de transductores piezoeléctricos
- Tabla 9:** Criterios para seleccionar un biosensor
- Tabla 10:** Comparación entre diferentes tipos de biosensores
- Tabla 11:** Selección de proteasas
- Tabla 12:** Métodos de invalidación.
- Tabla 13:** Ventajas y desventajas de la inmovilización por cross-linking
- Tabla 14:** Ventajas y desventajas de la inmovilización magnética
- Tabla 15:** Ventajas y desventajas de la inmovilización por enlace covalente
- Tabla 16:** Comparación de valor de volumen y concentración de gelatina.
- Tabla 17:** Parámetros de volumen y concentración de gelatina y concentración de HQ óptimos.
- Tabla 18:** Diversas concentraciones de tripsina para la construcción de la curva de calibración bajo condiciones óptimas de operación.
- Tabla 19:** Los resultados del diseño factorial del análisis de experimentos con Minitab®15.1.30.0 (Minitab Inc.).
- Tabla 20:** Inhibición de sensores basados en colinesterasas medida en presencia de 0.5 M de sustrato después de 2 min de la incubación de cada uno de GA a diferentes concentraciones, y con sus correspondientes mezclas.
- Tabla 21:** Pendiente de inhibición de sensores basados en ChE medida utilizando el método de un solo paso en presencia de 0.5 M de sustrato después de la adición de cada GA a diferentes concentraciones, y sus correspondientes mezclas.
- Tabla 22:** Resumen de los ajustes obtenidos para los dos GAs con conjunto de pruebas de formación (n=25) y externas (n=8)
- Tabla 23:** Resultados obtenidos para la determinación de α -chaconina y α -solanina a partir de muestras de flóculos de papas.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Square wave voltammetric determination of trypsin activity

Margarita Stoytcheva^{a,*}, Roumen Zlatev^a, Serge Cosnier^{b,1}, Michelle Arredondo^a

^a Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Blvd. B. Juárez s/n, 21280 Mexicali, Baja California, Mexico

^b Université J. Fourier, Dép. Chimie Moléculaire, UMR CNRS 5250 ICMG-FR BP-53, 38041 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 February 2012

Received in revised form 7 April 2012

Accepted 7 April 2012

Available online 15 May 2012

Keywords:

Trypsin

Gelatin

Square wave voltammetry

Screen printed electrode

ABSTRACT

A simple square wave voltammetric method for trypsin activity determination, based on 1,2-benzoquinone electrochemical reduction on gelatin coated screen printed electrodes requiring small (30 μL) sample volume was developed. The proteolytic digestion of the gelatin film facilitated the transport of the electroactive specie to the electrode surface and resulted in reduction peak current increase. Current response as a function of trypsin concentration within 10 min of incubation time was evaluated in the range of 0.1–1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ trypsin corresponding to enzyme activity in the range from 0.75 U mL^{-1} to 7500 U mL^{-1} , respectively. The limit of detection was determined to be as low as 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.075 U mL^{-1}) trypsin after 140 min incubation time.

The optimal hydrogel permeability defined by the concentration and the volume of the deposited gelatin solution (6% and 8 μL , respectively) was established performing preliminary experiments using a gelatin modified glassy carbon electrode of conventional type and applying factorial design approach.

The method allows a rapid trypsin activity determination in the normal and acute pancreatitis range, taking advantage of the low cost and disposability of the mass produced screen printed electrodes, suitable for point-of-care testing.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Trypsin (EC 3.4.21.4) is an enzyme of the class of the serine proteases, found in the human digestive system [1]. It is produced by the pancreas as trypsinogen (inactive enzyme) and is then activated in the duodenum by the intestinal enterokinase to trypsin (active enzyme) by proteolytic cleavage [2]. Therefore, the determination of trypsin activity could represent a specific and reliable diagnostic test of pancreatic function and its alteration (pancreatitis, pancreatic cancer, cystic fibrosis, etc.) [3,4]. It seems to be the most sensitive test for the diagnosis of acute pancreatitis (AP), considered as a major cause of morbidity and mortality worldwide [5,6].

The laboratory diagnosis of pancreatic disorders is commonly based on the determination of the levels of amylase, lipase, C-reactive protein, or cytokines in serum. Nevertheless, the severity of acute pancreatitis does not correlate well with the level of increase in serum amylase and lipase [7–10]. C-reactive protein is a useful predictor of AP after 48 h of onset of symptoms, but not at the earlier stage [11–14]. The serum levels of cytokines are early indicators, but certain cytokines have shown low specificity as predictors

of the disease severity [15]. Thus, gelatin degradation by trypsin is used as a simple semi-quantitative method for pancreatic disorders detection. However, such a test cannot be easily calibrated. Therefore, spectrophotometric and sensitive radioimmunoassay-based methods [16,17] were suggested for the quantitative trypsin activity determinations. Other methods are based on Bragg reflector devices application for measuring the temperature, pressure [18] and humidity [19] changes, due to the trypsin action on gelatin films. All these techniques are time consuming and require sophisticated laboratory equipment and trained personnel. Hence, faster, precise and simple tools and methods have to be developed, allowing rapid clinical management decisions to be made. Such an alternative offers the (bio)sensing devices. The holographic sensor of Millington et al. [20] is designed to register the change in color (wavelength) or brightness occurred when trypsin cleaves at peptide bonds adjacent to the arginine and lysine residues of gelatin and causes swelling of the hologram. Another technique to obtain a visually observable response is suggested by Chuang et al. [21] exploiting the surface plasmon resonance wavelength shift of colloidal gold nanoparticles (AuNPs) when they aggregate. The AuNPs are modified with gelatin as a proteinase substrate and subsequently modified with 6-mercaptopentan-1-ol. After proteinase digestion, the AuNPs lose shelter, and gradually move closer to each other, to form aggregates. The AuNPs aggregation is monitored by the red shift of surface plasmon absorption and a visible color change of the AuNPs is from red to blue.

* Corresponding author. Tel.: +52 686 566 4150; fax: +52 686 566 4150.

E-mail addresses: margarita@iing.mx, stoytcheva@hotmail.com (M. Stoytcheva).

¹ ISE member.

Other alternative methods for trypsin activity determination, providing numerous advantages such as measurements within turbid and complex media, are the electrochemical ones. Nevertheless, only few electrochemical sensors were created until now for trypsin activity determination. Zaccheo and Crooks [22] report a self-powered sensor for naked-eye detection of serum trypsin. It consists in a galvanic cell containing gelatin and Al barrier layers incorporated between the two half-cells. The degradation of the layers by trypsin and a hydroxide respectively closes the electrical circuit and a light-emitting diode signals the presence of trypsin. Assay time is ~ 3 h, and the limit of detection reached is $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

More rapid and sensitive electrochemical sensors for trypsin activity determination were developed by Ionescu et al. [23,24]. One of them is a disposable conductometric sensor elaborated via the modification of microfabricated integrated gold electrodes by urease/BSA coating covered by a gelatin film. Gelatin film proteolytic digestion results in increase of the conductometric response of the biosensor to urea, as a function of trypsin concentration. The detection limit was reported to be 100 pg mL^{-1} for 70 min of incubation time. The second one, an amperometric biosensor for trypsin activity determination, is based on the registration of the oxidation current of the H_2O_2 produced by glucose oxidase catalyzed glucose oxidation, a process conjugated with the proteolytic digestion of gelatin by trypsin. Glucose oxidase is immobilized into an inner polypyrrole layer, covered by a gelatin film. Low trypsin concentrations down to 42 pM are detected with a response time of ~ 10 min. Although very sensitive, these sensors have a very complicated construction and involve sophisticated multi-step processes. Moreover, trypsin interacted with the respective enzymes after a prolonged incubation, provoking enzyme molecules cleaving, resulting in analytical signal decrease [23,24].

The objective of the present work is to develop a simple and sensitive square wave voltammetric method for trypsin activity determination able to be applied in the medical diagnostics conveniently and immediately to the patient. It is based on the 1,2-benzoquinone electrochemical reduction on gelatin coated disposable and easy to use screen printed carbon electrodes requiring very small (microliters) sample volume. The progressive trypsin catalyzed digestion of the hydrogel film serving as a kinetic barrier for the electroactive specie transport to the electrode surface increases its permeability, resulting in increase of the 1,2-benzoquinone reduction current as a function of the enzyme activity.

2. Experimental

2.1. Reagents

Gelatin from porcine skin (Type A, G2500) and trypsin from bovine pancreas (T9201, ≥ 7500 BAEE units/mg solid) were purchased from Sigma. All the other chemicals were analytical reagent grade and were used without further purification. The experiments were performed in a phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7), obtained by dissolving the appropriate amounts of K_2HPO_4 and KH_2PO_4 in distilled water. The same buffer was used to prepare the enzyme, substrate, and gelatin solutions. Gelatin was fully dissolved at 60°C in a water bath.

2.2. Electrode modification

Sensor 1, employed for the preliminary experiments, was a gelatin coated rotating disc glassy carbon electrode (Tacussel CTV 101T, 3 mm diameter). Gelatin modification was performed applying spin coating procedure, after appropriate treatment of the electrode surface consisting in polishing, degreasing with alcohol,

and ultrasonic cleaning. Uniform and reproducible gelatin layers were obtained by spreading a defined volume of the gelatin solution onto the electrode surface and allowing the electrode rotate at 1000 rpm during 30 min, sufficient for the gelatin solidification at room temperature.

Sensor 2 was a gelatin modified screen printed electrode (Zensor R&D, Taiwan), prepared by spreading $8 \mu\text{L}$ of 6% gelatin solution onto the carbon disk working electrode surface (3 mm diameter). Gelatin was allowed to solidify at room temperature for 30 min. All the electrodes: carbon counter electrode, Ag wire pseudo reference electrode, and modified working electrode were printed on the same support.

2.3. Electrochemical measurements

The electrochemical measurements were carried out at room temperature (25°C) applying square wave voltammetric technique (potential scan increment: 5 mV; amplitude: 50 mV; frequency: 30 Hz), using a CH Instruments model 440 B electrochemical analyzer (CH Instruments Inc., USA). The preliminary experiments involving Sensor 1 were performed in 5 mL electrolysis microcell, model K 0264 (EG&G PARC, USA) properly modified, containing Pt counter electrode and Ag, AgCl reference electrode. The determinations involving the modified screen printed electrode (Sensor 2) were carried out directly, after spreading of a $30 \mu\text{L}$ drop of the analyte on its working area.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary experiments

Preliminary experiments were carried out employing the gelatin coated glassy carbon electrode to determine the optimal conditions for trypsin activity determination, prior screen printed electrodes application. The developed protocol involved the following steps: incubation of the gelatin coated electrode in trypsin solution for different time intervals, rinsing with phosphate buffer, transferring the electrode into the electrolysis cell containing the buffer solution, and recording the square wave voltammetric current response to 1,2-benzoquinone. Following this procedure, current increase dependence on trypsin activity was investigated under various experimental conditions. Their effect and the effect of their interactions were evaluated applying factorial design of experiments. The considered factors supposed to affect the response variable were the 3 level factor (0.5 mM, 1 mM, and 5 mM) analyte concentration (Factor A), the 2 level factor (6% and 8%) gelatin solution concentration (Factor B), and the 3 level factor ($8 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{L}$, and $15 \mu\text{L}$) volume of the gelatin solution deposited on the electrode surface (Factor C). The number of treatments and replicates was 18 and 2 respectively, and the total number of observations was 36. The statistical significance was determined to be 95% ($\alpha = 0.05$). The hypothesis of interest (H_0 : null hypothesis, and H_A : alternative hypothesis) for the factors effects on the response variable are presented below:

H_0 : Analyte concentration = 0; H_0 : Gelatin concentration = 0; H_0 : Gelatin volume = 0.

H_A : Analyte concentration $\neq 0$; H_0 : Gelatin concentration $\neq 0$; H_0 : Gelatin volume $\neq 0$.

The factors incubation time and trypsin concentration were kept constant: 10 min and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectively. Table 1 demonstrates the results of the factorial design of experiments analysis. It was found that the p -values of all of the considered factors are lower than the value of $\alpha = 0.05$, thus they affect the response variable and the alternative hypothesis should be accepted as true.

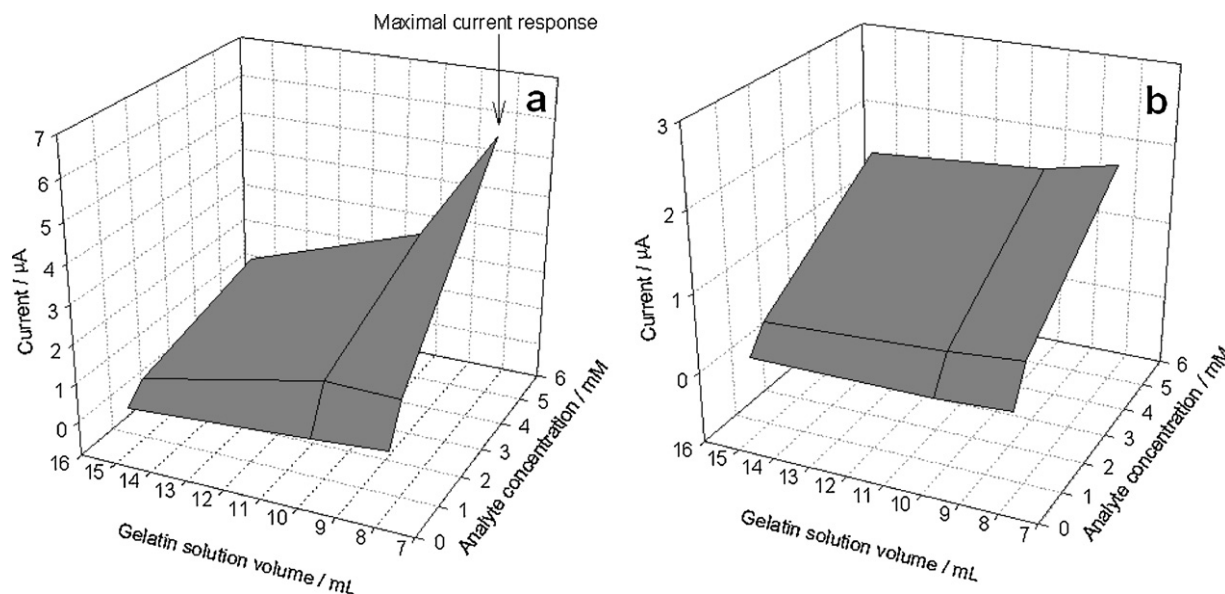


Fig. 1. Current response dependence on analyte concentration and gelatin solution volume: (a) 6% gelatin solution concentration; (b) 8% gelatin solution concentration.

In fact, current response increased with 1,2-benzoquinone concentration and gelatin layer permeability. The latter was dependent on the concentration of the gelatin solution, and on the thickness of the hydrogel film, determined by the volume of the deposited gelatin solution. Lesser the gelatin solution concentration and the volume of the deposited drop, higher the layer permeability. Taking into account these effects, further experiments were performed in the following optimal experimental conditions: gelatin solution concentration 6% and volume of 8 μL of the gelatin solution deposited onto the electrode surface, allowing reaching a maximal current response for an analyte concentration of 5 mM (Fig. 1).

3.2. Evaluation of trypsin activity employing Sensor 1

Sensor 1 voltammetric response to 1,2-benzoquinone in the above mentioned optimal conditions and different incubation times in 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ trypsin solution is presented in Fig. 2. As expected, the kinetic barrier for the transport of the electroactive specie to the electrode surface created by the hydrogel film suppressed almost totally the sensor response before trypsin incubation. Gelatin film digestion resulted in reduction peak current increase up to a maximal value, corresponding to the complete hydrogel degradation.

The effect of the incubation time and trypsin solution concentration on the 1,2-benzoquinone cathodic peak current is illustrated by Fig. 3.

These data were exploited for the construction of a calibration curve for trypsin concentration (activity) determination in the

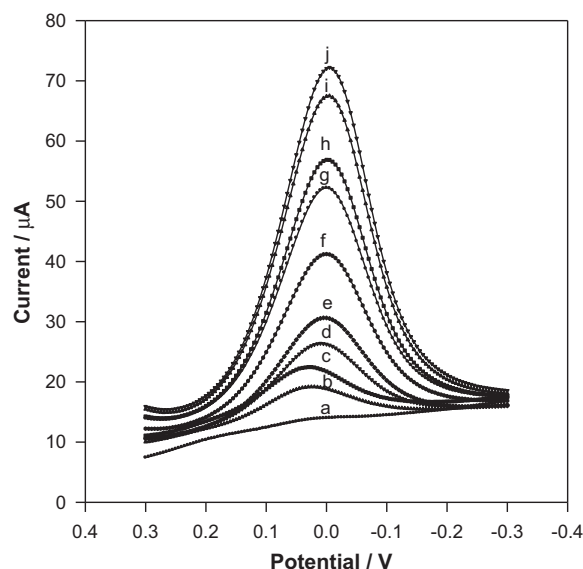


Fig. 2. Evolution of the square wave voltammetric response of Sensor 1 to 1,2-benzoquinone 5 mM in 0.1 M phosphate buffer pH 7 for different incubation times in 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ trypsin solution: (b) 0 min; (c) 10 min; (d) 20 min; (e) 30 min; (f) 40 min; (g) 50 min; (h) 60 min; (i) 70 min; (j) 80 min. (a) blank: 0.1 M phosphate buffer pH 7.

range of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ up to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, corresponding to enzyme activity varying from 0.75 U mL^{-1} up to 7500 U mL^{-1} , after an incubation time of 10 min (see Fig. 5). The calibration plot (current

Table 1 Results of the factorial design of experiments analysis with Minitab® 15.1.30.0 (Minitab Inc.).

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F	p-Value
Factor A	2	32.6579	16.3290	5679.64	0.000
Factor B	1	7.7006	7.7006	2678.48	0.000
Factor C	2	6.1836	3.0918	1075.40	0.000
Factor A* Factor B	2	3.0276	1.5138	526.54	0.000
Factor A* Factor C	4	5.2207	1.3052	453.97	0.000
Factor B* Factor C	2	3.9862	1.9931	693.24	0.000
Factor A* Factor B* Factor C	4	4.1673	1.0418	362.38	0.000
Error	18	0.0518	0.0029		
Total	35	62.9957			

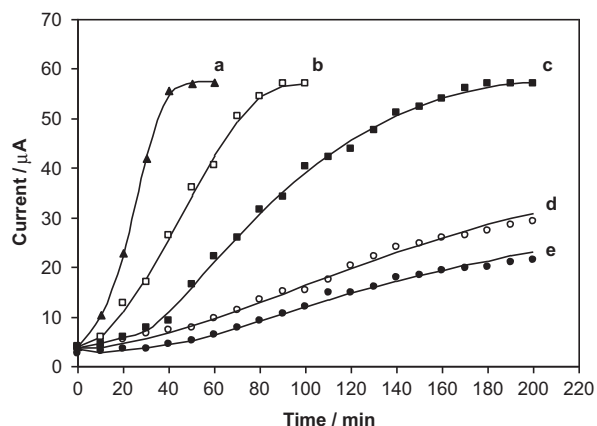


Fig. 3. Reduction peak current dependence on incubation time and trypsin solution concentration, evaluated using Sensor 1. Trypsin solution concentrations: (a) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (b) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (d) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (e) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

response vs. logarithm of trypsin concentration) consisted of two linear parts with different slopes. The sensitivity of the determinations (the calibration plot slope) was found to be $0.79 \mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$ in the trypsin concentration range from $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, while in the concentration range from $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ the slope was $4.44 \mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$. The sensor sensitivity for low enzyme concentrations could be improved increasing the incubation time. Thus, the limit of detection for trypsin quantification was found to be $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, reached for an incubation time of 140 min.

The reproducibility of the determinations was 2.82% ($n=3$), evaluated by measuring the 1,2-benzoquinone reduction peak current after the incubation of series of identically fabricated electrodes in $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ trypsin solution for 10 min.

3.3. Gelatin modified screen printed carbon electrode application for trypsin activity evaluation

After performing the preliminary assays demonstrating the feasibility of the method and allowing establishing the optimal conditions for maximal current response obtaining, trypsin activity determination was achieved applying the gelatin coated screen printed carbon electrode (Sensor 2). The protocol for trypsin activity evaluation included: gelatin incubation in $30 \mu\text{L}$ trypsin containing solution dropped onto the working electrode surface, rinsing with phosphate buffer, and square wave voltammetric measurements performed directly on a drop of $30 \mu\text{L}$ of 5 mM 1,2-benzoquinone in phosphate buffer solution. The square wave response of Sensor 2 to 1,2-benzoquinone after 10 min incubation in trypsin solutions with concentrations increasing in the range of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ up to $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ are presented in Fig. 4.

The corresponding calibration plot in coordinates: 1,2-benzoquinone cathodic current vs. the logarithm of the trypsin concentration is shown in Fig. 5. Its shape was similar to that of the calibration plot obtained applying Sensor 1, i.e. it consisted of two linear parts with different slopes. The sensitivity of the determinations was found to be $0.40 \mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$ in the range from $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, and $1.02 \mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$ in the range from $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The limit of detection was established at $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ trypsin after 140 min incubation time. The reproducibility of the determinations evaluated as indicated in Section 3.2 was found to be similar of that, reached with Sensor 1 (RSD < 3%).

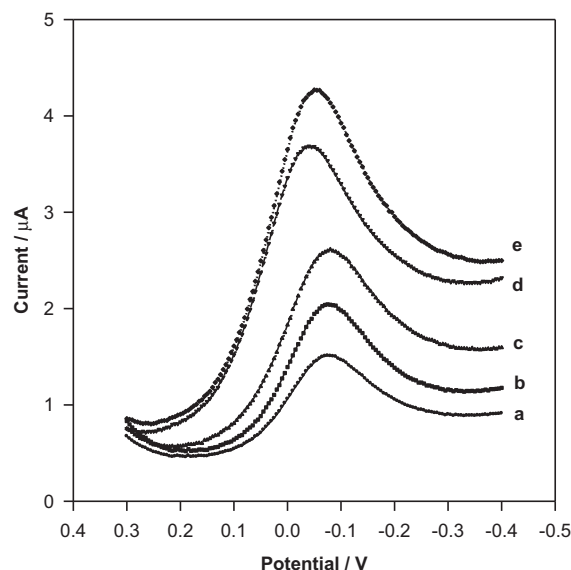


Fig. 4. Evolution of the square wave voltammetric response of Sensor 2 to 1,2-benzoquinone 5 mM in 0.1 M phosphate buffer $\text{pH } 7$ for 10 min incubation time in trypsin solutions with increasing concentrations: (a) $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$; (b) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; (c) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; (d) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; (e) $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

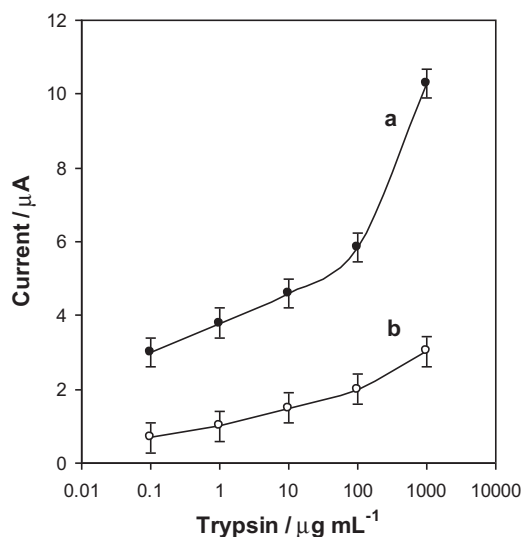


Fig. 5. Calibration curve for trypsin determination after an incubation time of 10 min applying: (a) Sensor 1; (b) Sensor 2.

4. Conclusion

In this work a simple square wave voltammetric method is reported, allowing the rapid trypsin activity determination in the normal and acute pancreatitis range. It takes advantage of the low cost and disposability of the screen printed electrodes, designed to work with microliter volumes of samples, and suitable for mass production and point-of-care testing. Thus, it was demonstrated that electrochemical methods and devices have the potential to improve routine methods in clinical analysis.

Acknowledgement

M. Arredondo gratefully acknowledges the financial support provided by CONACyT, Mexico to carry out this investigation.

References

- [1] N. Rawlings, A. Barrett, *Methods in Enzymology* 244 (1994) 19.
- [2] B. Keil, P. Boyer, *The Enzymes*, vol. III, 3rd ed., Academic Press, NY, 1971, p. 250.
- [3] H. Heinrich, E. Gabbe, F. Ičić, *Journal of Molecular Medicine* 57 (1979) 1237.
- [4] J. Artigas, M. Garcia, M. Faure, A. Gimeno, *Postgraduate Medical Journal* 57 (1981) 219.
- [5] T. Foitzik, E. Klar, H. Buhr, C. Herfarth, *European Journal of Surgery* 16 (1995) 187.
- [6] S. Tenner, G. Sica, M. Hughes, E. Noordhoek, S. Feng, M. Zinner, P. Bankset, *Gastroenterology* 113 (1997) 899.
- [7] R. Pezilli, P. Billi, M. Miglioli, L. Gullo, *Digestive Diseases and Sciences* 38 (1993) 1265.
- [8] P-A. Clavien, J. Robert, P. Meyer, F. Borst, H. Hauser, *Annals of Surgery* 210 (1989) 614.
- [9] S. Kazmierczak, F. Van Lente, E. Hodges, *Clinical Chemistry* 37 (1991) 356.
- [10] P. Lankisch, D. Pflichthofer, D. Lehnick, *Pancreas* 19 (1999) 321.
- [11] J. Neoptolemos, E. Kemppainen, J. Mayer, J. Fitzpatrick, M. Raraty, J. Slavin, H. Beger, A. Hietaranta, P. Puolakkainen, *Lancet* 355 (2000) 1955.
- [12] H. Paajanen, M. Laato, M. Jaakkola, K. Pulkki, J. Niinikoski, I. Nordback, *British Journal of Surgery* 82 (1995) 271.
- [13] P-A. Clavien, S. Burgan, A. Moossa, *British Journal of Surgery* 76 (1989) 1234.
- [14] M-L. Kylänpää-Bäck, A. Takala, E. Kemppainen, P. Puolakkainen, A. Leppäniemi, S-L. Karonen, A. Orpana, R.K. Haapiainen, H. Repo, *Critical Care Medicine* 29 (2001) 63.
- [15] A. De Beaux, A. Goldie, J.A. Ross, D.C. Carter, K.C. Fearon, *British Journal of Surgery* 83 (1996) 349.
- [16] R. Temler, J-P. Felber, *Biochimica et Biophysica Acta* 445 (1976) 720.
- [17] G. Schwert, Y. Takenaka, *Biochimica et Biophysica Acta* 16 (1955) 570.
- [18] A. Kersey, T. Berkoff, W. Morey, *Optics Letters* 18 (1993) 1370.
- [19] R. Spooer, F. Al-Ramadhan, B. Jones, *International Journal of Optoelectronics* 7 (1992) 449.
- [20] R. Millington, A. Mayes, J. Blyth, C. Lowe, *Analytical Chemistry* 67 (1995) 4229.
- [21] Y.-C. Chuang, J.-C. Li, S.-H. Chen, T.-Y. Liu, C.-H. Kuo, W.-T. Huang, C.-S. Lin, *Biomaterials* 31 (2010) 6087.
- [22] B. Zaccaro, R. Crooks, *Analytical Chemistry* 83 (2011) 1185.
- [23] R. Ionescu, C. Fillit, N. Jaffrezic-Renault, S. Cosnier, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 489.
- [24] R. Ionescu, S. Cosnier, S. Marks, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 6327.



the society for solid-state
and electrochemical
science and technology

ECS Electrochemistry Letters

Electrochemical Sensing of Trypsin Activity

M. Arredondo, M. Stoytcheva, R. Zlatev and S. Cosnier

ECS Electrochem. Lett. 2012, Volume 1, Issue 5, Pages B1-B3.
doi: 10.1149/2.008205eel

**Email alerting
service**

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up
in the box at the top right corner of the article or [click here](#)

To subscribe to *ECS Electrochemistry Letters* go to:
<http://eel.ecsdl.org/subscriptions>



Electrochemical Sensing of Trypsin Activity

M. Arredondo,^{a,*} M. Stoytcheva,^{a,z} R. Zlatev,^a and S. Cosnier^{b,**}

^aUniversidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México

^bUniversité J. Fourier, Département de Chimie Moléculaire, Grenoble, France

A rapid and sensitive electrochemical method for trypsin activity determination, using a gelatin coated glassy carbon electrode is reported. The hydrogel film creates a kinetic barrier for the transport of the electroactive hydroquinone to the electrode surface. The progressive trypsin catalyzed film digestion causes increase of its permeability, resulting in increase of the hydroquinone oxidation current. Current response as a function of trypsin concentration within 10 min of incubation time was evaluated in the range of 0.1 to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The limit of detection achieved in optimal conditions was found to be 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

© 2012 The Electrochemical Society. [DOI: 10.1149/2.008205eel] All rights reserved.

Manuscript submitted May 29, 2012; revised manuscript received August 6, 2012. Published September 5, 2012. This was Paper 55 presented at the Seattle, Washington, Meeting of the Society, May 6–10, 2012.

Trypsin (EC 3.4.21.4) is an enzyme of the serine proteases class, playing important role in the human digestive system. Its determination represents a highly specific and reliable test for pancreatitis function diagnostics. Therefore, the clinical significance of the enzyme urged the development of a large variety of sensors for its activity evaluation, such as Bragg reflector devices,^{1,2} holographic,³ liquid crystal,⁴ surface plasmon resonance,^{5,6} electrophoretic,⁷ resistor,⁸ resonator,⁹ and magnetoelastic-based¹⁰ ones. In contrast, the electrochemical sensors for trypsin quantification, despite of the simplicity, sensitivity, and the rapidity of the electrochemical detection, are only few until now. For instance, Zaccheo et al.¹¹ report a self-powered trypsin detector consisting of a galvanic cell containing gelatin/Al barrier layer incorporated between the two half-cells. The degradation of the barrier layers by trypsin and the formed hydroxide respectively closes the electrical circuit activating a light-emitting diode indicating the trypsin presence. Assay time of about 3 h and 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ limit of detection have been reported. Ionescu et al.^{12,13} report two types of sensitive and rapid electrochemical sensors. The first one is based on disposable micro-fabricated conductometric gold electrodes modified by urease/BSA coating covered by a gelatin film. The proteolytic digestion of the gelatin film results in the increase of the conductometric response of the biosensor to urea, as a function of the trypsin concentration. The achieved detection limit is of 100 pg mL^{-1} for 70 min of incubation time. The second is an amperometric one based on the proteolytic digestion of gelatin, conjugated with the glucose oxidase catalyzed glucose oxidation yielding H_2O_2 which current of oxidation is registered. Glucose oxidase is immobilized into an inner polypyrrole layer covered by a gelatin film. Trypsin concentrations down to 42 pM are detected with a response time of ~ 10 min.

An electrochemical method for proteolytic activity determination based on the cyclic voltammetric detection of the electroactive probe ferricyanide on a gelatin film coated ITO electrodes was proposed by Baş and Boyacı.¹⁴ Gelatin film degradation results in an increase in the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ penetration and change of the peak potential in $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ cyclic voltammograms, depending on enzyme activity. The detection limit of the method was determined as 2.7 U mL^{-1} trypsin activity. (~ 0.37 mg mL^{-1} trypsin concentration).

Nevertheless, the described sensors involve multistep processes^{11–13} or are not enough sensitive.¹⁴ Thus, in the present work, a novel simple, rapid, and sensitive square wave voltammetric method for trypsin activity determination is reported. It is based on the use of a gelatin coated glassy carbon electrode and registration of the current of hydroquinone oxidation depending on trypsin activity. The hydrogel film creates a kinetic barrier for the transport of the electroactive species to the electrode surface. The progressive trypsin catalyzed film digestion causes increase of its permeability, resulting in increase of the hydroquinone oxidation current.

Experimental

Reagents.— Gelatin from porcine skin (Type A, G2500) and trypsin from bovine pancreas (T9201, 59 $\geq 7,500$ BAEE units/mg solid) were purchased from Sigma. All the other chemicals were analytical reagent grade and were used without further purification. The experiments were carried out in a phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7), acquired by dissolving suitable amounts of K_2HPO_4 and KH_2PO_4 in distilled water. The same buffer was also used to prepare the enzyme, substrate, and gelatin solutions. Gelatin was fully dissolved at 60°C in a water bath.

Electrode modification.— The working electrode was a gelatin coated rotating disk glassy carbon electrode (Tacussel CTV 101 T, 3 mm diameter). After polishing, degreasing with alcohol, and ultrasonic cleaning of the glassy carbon electrode surface, its modification was achieved by deposition of a uniform and reproducible gelatin layer applying spin coating procedure (1000 rpm, 30 minutes).

Electrochemical measurements.— The electrochemical measurements were carried out at room temperature (25°C) applying square wave voltammetric technique (potential scan increment: 5 mV; amplitude: 50 mV; frequency: 30 Hz), using a CH Instruments model 440 B electrochemical analyzer (CH Instruments Inc., USA). The experiments were performed in 5 mL electrolysis microcell, model K 0264 (EG&G PARC, USA) properly modified, containing Pt counter electrode and Ag/AgCl reference electrode.

Results and Discussion

Preliminary experiments.— Preliminary experiments were carried out to determine the optimal conditions for trypsin activity determination. The methodology involved included the following steps: incubation of the gelatin coated electrode in trypsin solution for different time intervals, rinsing with phosphate buffer, transferring the electrode into the electrolysis cell containing the buffer solution, and recording the square wave voltammetric current response to hydroquinone (HQ), varying the analyte concentration (0.5 mM, 1 mM, and 5 mM), the gelatin solution concentration (4%, 6%, and 8%), and the volume of the gelatin solution deposited onto the electrode surface (5 μL , 8 μL , 10 μL , and 20 μL). Trypsin concentration was kept constant (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The effect of the mentioned factors on the sensor anodic current response to hydroquinone is illustrated by Fig. 1.

As expected, current response increased with hydroquinone concentration and kinetic barrier layer permeability. The last was dependent on the gelatin solution concentration, and on the thickness of the hydrogel film, determined by the volume of the deposited gelatin solution. Lesser the gelatin solution concentration and the volume of the deposited drop, higher the layer permeability. In view of these effects, further experiments were performed in the following optimal experimental conditions: gelatin solution concentration 6%–8%, and volume 5–8 μL of the gelatin solution deposited onto the electrode

*Electrochemical Society Student Member.

**Electrochemical Society Active Member.

^zE-mail: margarita@iing.mx1.uabc.mx

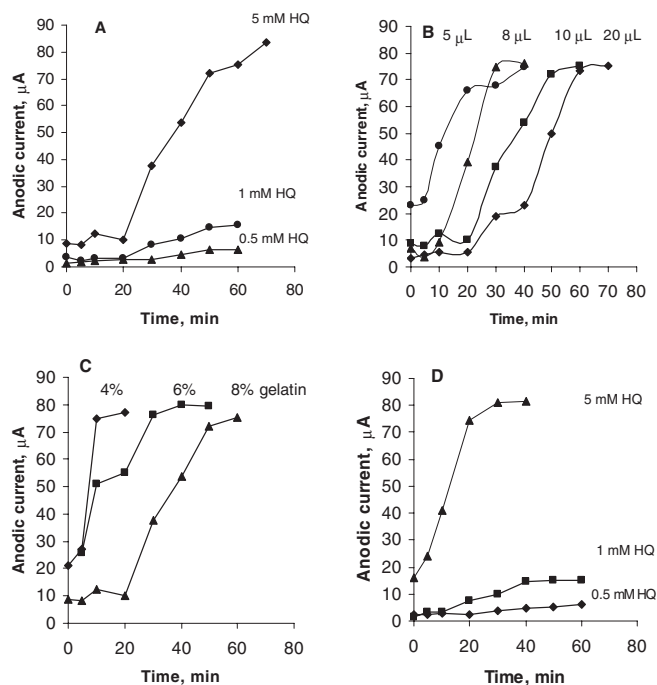


Figure 1. Current response dependence on: (A) HQ concentration (10 μL gelatin 8%); (B) gelatin solution volume (5 mM HQ; gelatin 8%); (C) gelatin solution concentration (5 mM HQ; 10 μL gelatin); (D) HQ concentration (8 μL gelatin 6%). Trypsin 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

surface, allowing reaching a maximal current response for an analyte concentration of 1–5 mM.

Trypsin activity determination.— The evolution of the current response of the gelatin coated electrode to hydroquinone for different incubation times (0 min, 10 min, and 20 min) in 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ trypsin solution is presented in Fig. 2. As shown, the hydrogel film suppressed almost totally the sensor response before trypsin incubation. Gelatin

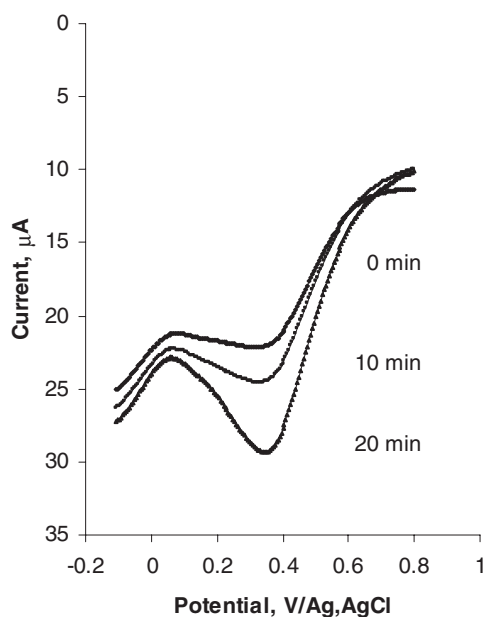


Figure 2. Evolution of the current response of the sensor coated with 5 μL of gelatin 8% to hydroquinone 1 mM in 0.1 M PBS pH 7 for different incubation time in 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ trypsin. SWV: pulse amplitude 0.05 V; frequency 30 Hz.

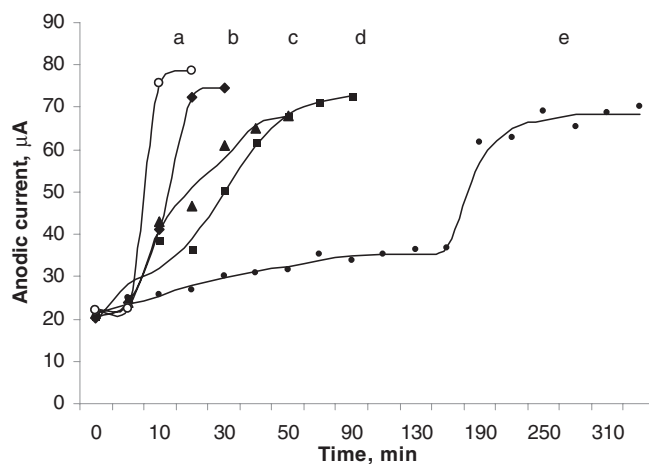


Figure 3. Oxidation peak current dependence on incubation time and trypsin solution concentration: (a) 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (b) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (c) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (d) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (e) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

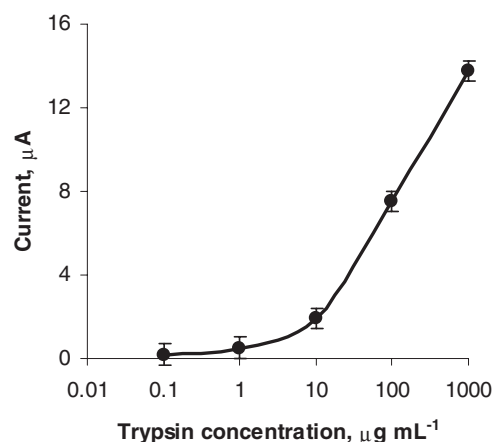


Figure 4. Calibration curve for trypsin determination after an incubation time of 10 min; 5 μL of gelatin 8% coating; Hydroquinone 1 mM in 0.1 M PBS pH 7.

film degradation led to anodic peak current increase. Current increase dependence on trypsin solution concentration and incubation time is demonstrated in Fig. 3. As expected, current response increased with incubation time. The maximum value reached corresponded to the complete hydrogel degradation. Faster gelatin layer digestion was achieved with trypsin solution concentration increase. The constructed calibration curve for trypsin determination in the range 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ is shown in Fig. 4. The limit of detection achieved in optimal conditions, evaluated on the basis of $S/N = 3$, was found to be 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Although the LOD reached is enough important, the method is less sensitive in comparison to the similar, subsequently developed by the authors, based on the SWV registration of the 1,2-benzoquinone reduction current.¹⁵ It is suitable for duodenal trypsin activity evaluation in the normal (165–612 $\mu\text{g mL}^{-1}$),¹⁶ and in the chronic pancreatitis range (3.2–76.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$).¹⁷

Conclusion

In this work is reported a rapid and sensitive electrochemical method for trypsin activity determination, allowing trypsin activity evaluation in the normal and chronic pancreatitis range. Electrochemical sensing of protease activity constitutes an inexpensive and easy to use technique demonstrating the potential to substitute conventional methods in clinical analysis.

Acknowledgments

Financial support provided by CONACyT, Mexico is gratefully acknowledged.

References

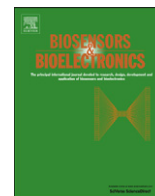
1. A. Kersey, T. Berkoff, and W. Morey, *Opt. Lett.*, **18**, 1370 (1993).
2. R. Spooncer, F. Al-Ramadhan, and B. Jones, *Int. J. Optoelectron.*, **7**, 449 (1992).
3. R. Millington, A. Mayes, J. Blyth, and C. Lowe, *Anal. Chem.*, **67**, 4229 (1995).
4. Q.-Z. Hu and Ch.-H. Jang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **4**, 1791 (2012).
5. M. A. Syed, A. S. Bhatti, C. Li, and H. Bokhari, *Am. J. Biomed. Sci.*, **3**, 253 (2011).
6. Y.-C. Chuang, J.-C. Li, S.-H. Chen, T.-Y. Liu, C.-H. Kuo, W.-T. Huang, and C.-S. Lin, *Biomaterials*, **31**, 6087 (2010).
7. M. Kukwikila and S. Howorka, *J. Phys.: Condens. Matter*, **22**, 454103 (2010).
8. P. A. Neff, A. Serr, B. Wunderlich, and A. Bausch, *Chem. Phys. Chem.*, **8**, 2133 (2007).
9. N. M. Hanumegowda, I. M. White, H. Oveys, and X. Fan, *Sensor Lett.*, **3**, 1 (2005).
10. S. Wu, Q. Cai, and C. A. Grimes, *Sensor Lett.*, **4**, 160 (2006).
11. B. Zacheo and R. Crooks, *Anal. Chem.*, **83**, 1185 (2011).
12. R. Ionescu, C. Fillit, N. Jaffrezic-Renault, and S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 489 (2008).
13. R. Ionescu, S. Cosnier, and S. Marks, *Anal. Chem.*, **78**, 6327 (2006).
14. D. Baş and I. Boyacı, *Electroanalysis*, **22**, 265 (2010).
15. M. Stoytcheva, R. Zlatev, S. Cosnier, and M. Arredondo, *Electrochimica Acta*, **76**, 43 (2012).
16. K. Heinkel, N. Henning, and H. Schoen, *Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas*, Schattauer, Stuttgart (1964).
17. S. S. Fedail, R. F. Harvey, P. R. Salmon, P. Brown, and A. E. Read, *Gut*, **20**, 983 (1979).



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Short communication

High sensitive trypsin activity evaluation applying a nanostructured QCM-sensor

M. Stoytcheva^{a,*}, R. Zlatev^a, S. Cosnier^b, M. Arredondo^a, B. Valdez^a^a Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, 21280 Mexicali, México^b Université J. Fourier, Dép. Chimie Moléculaire, 38041 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2012

Received in revised form

6 August 2012

Accepted 16 August 2012

Keywords:

Quartz crystal microbalance (QCM)

Trypsin

Gelatin

Ag nanoparticles

ABSTRACT

The medical diagnostic, the industry, and the biotechnology require rapid, sensitive, and easy to use methods for trypsin activity determination. A simple approach, which meets all these requirements, based on Quartz Crystal Microbalance (QCM) was developed, analytically characterized and described in the present work. QCM application allows rapid trypsin activity evaluation by real time monitoring of the enzymatic degradation of the substrate. The new approach suggested in this work takes advantage of nanoparticles loaded gelatin employment as a trypsin substrate, deposited on the QCM crystal. The heavy nanoparticles leave the substrate layer together with the products of its enzymatic degradation provoking thus a greater decrease of the total QCM crystal mass compared with the non charged substrate. As a result, a higher sensor frequency response occurs. A 10 fold improvement of the LOD was achieved for trypsin activity evaluation applying the proposed method with Ag nanoparticles loaded gelatin ($7.5 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ vs. $7.5 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$ obtained by the "classic" QCM method). The approach subject of this work can be applied with any substrate degrading enzyme.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trypsin (EC 3.4.21.4) is a protein degrading enzyme of the group of the serine proteases. Its potential is extensively exploited in food and beverage industries to improve the workability of dough, in tenderizing of meat, in production of protein hydrolysates, and during cold stabilization of beer, among other (JECFA, 1971). In biochemistry trypsin is used in the development of cell and tissue culture protocols (Banumathi et al., 2009; Soleimani and Nadri, 2009; Yang et al., 2009), and for protein identification through peptide sequencing techniques (Schuchert-Shi and Hauser, 2009). In medicine, trypsin activity evaluation serves as a specific and reliable diagnostic test of pancreatic function and its alteration: cystic fibrosis, chronic pancreatitis, etc. (Chen et al., 2009; Forsmark, 2010). The industrial, biotechnological, and biochemical importance of trypsin, as well as its clinical significance generated a great interest in developing of methods for quantification of its activity. These include mainly spectrophotometric and sensitive radioimmunoassay-based techniques (Temler and Felber, 1976; Schwert and Takenaka, 1955), Bragg reflector devices for measuring the change of temperature, pressure (Kersey et al., 1993) and humidity (Spooncer et al., 1992), due to the action of trypsin on gelatin films, as well as

numerous recently developed (bio)sensors-based methods. For instance, Millington et al. (1995) suggested a holographic sensor designed to register the change in color (wavelength) or brightness created when trypsin cleaves at peptide bonds adjacent to the arginine and lysine residues of gelatin and causes swelling of the hologram. An optical response was also used by Hu and Jang (2012) to design a liquid crystal (LC)-based sensor for the real-time and label-free monitoring of trypsin activity through changes in the orientation of LCs coupled to the interaction between polyelectrolyte and phospholipid. The utility of a commercial surface plasmon resonance biosensor of Biosensing Instruments Inc. to investigate the proteolytic action of trypsin against a number of proteins was demonstrated in the work of Syed et al. (2011). Chuang et al. (2010) exploited the surface plasmon resonance wavelength shift of gelatin modified colloidal gold nanoparticles when they aggregate after gelatin digestion to quantify trypsin activity. Zaccheo and Crooks (2011) reported a self-powered galvanic cell-based sensor for naked-eye detection of serum trypsin. Although easy to use, it provides a response within ~3 h with a limit of detection $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Series of more sensitive and faster electrochemical sensors for trypsin activity determination were developed by Biloivan et al. (2004), Ionescu et al. (2006, 2008), Fordyce and Shvarev (2008), Adjemian et al. (2010), Baş and Boyaci (2010), Stoytcheva et al. (2012), and Chen et al. (2012), with conductometric, amperometric, voltammetric, and potentiometric detection. Electro-phoretic sensing of trypsin activity with nanopores, based on

* Corresponding author. Tel./fax: +52 686 566 4150.

E-mail address: margarita@iing.mx1.uabc.mx (M. Stoytcheva).

the detection of the blockades in the ionic current due to the release of protein hydrolysates was proposed by Kukwikila and Howorka (2010). Electrical determination of trypsin activity was also performed using a silicon-on-insulator based thin film resistor (Neff et al., 2007). Label-free protease sensors based on optical microsphere resonators were suggested by Hanumegowda et al. (2005), while a wireless magnetoelastic trypsin sensor was fabricated by Wu et al. (2006). This overview of the literature demonstrates that the great potential of the QCM-based sensors for enzyme activity evaluation was not exploited for trypsin activity estimation. To the best of our knowledge, only Krause et al. (2006) and Stair et al. (2009) reported on the use of a QCM-based sensors for proteases activity determination (namely for human neutrophil elastase and pepsin), using QCM. The major part of the studies have focused on cellulase activity quantification applying the QCM-D technique (Ahola et al., 2008; Hu et al., 2009; Jeong et al., 2005; Josefsson et al., 2008; Turon et al., 2008), and on immobilized glucose oxidase activity estimation by coupling QCM and electrochemical techniques (Chen et al., 2009, 2011; Deng et al., 2006).

A new approach for QCM trypsin activity determination allowing sensitivity increase is the subject of this work. It is based on the use of Ag nanoparticles loaded gelatin, deposited on the QCM crystal surface, as trypsin substrate. During the enzymatic substrate degradation by trypsin, the heavier nanoparticles also leave the sensitive layer together with the substrate degradation products, provoking thus a greater change of the QCM crystal total mass than those, caused by the substrate degradation only, and hence a increased QCM frequency response, augmenting thus the sensitivity of the determination.

2. Experimental

2.1. Reagents

Gelatin from porcine skin (Type A, G2500) and trypsin from bovine pancreas (T9201, ≥ 7500 BAEE units/mg solid) were purchased from Sigma. All the other chemicals were analytical reagent grade and were used without further purification. The experiments were performed in a phosphate buffer solution (0.1 M, pH 8), obtained by dissolving the appropriate amounts of K_2HPO_4 and KH_2PO_4 in distilled water. The same buffer was used to prepare the enzyme solutions.

Enzyme activity was verified applying the standard spectrophotometric assay protocol of Sigma-Aldrich (Bergmeyer et al., 1974). Data obtained under different storage conditions were consistent with the defined by the manufacturer.

2.2. Silver nanoparticles synthesis

Silver nanoparticles suspended in aqueous solution were synthesized applying the report by Khaydarov et al. (2009) electrochemical method. As cathode and anode were used two polished silver rods (5 mm diameter and 50 mm long) vertically placed face-to-face at a distance of 10 mm. The electrodes were immersed in distilled water 500 mL. Electrolysis was carried out applying a constant voltage of 25 V, changing the direct current polarity every 4 min, under vigorous stirring to avoid precipitates formation, and at a temperature of 60 °C. The obtained nanoparticles dispersion was filtered through a paper filter to discard the large Ag colloids.

2.3. Gelatin hydrosol and silver nanoparticles loaded gelatin hydrosol preparation

Gelatin hydrosol 0.8% w/v was prepared by dissolving gelatin powder in distilled water at 60 °C in a water bath.

Silver nanoparticles loaded gelatin hydrosol was obtained by adding the suitable quantity of dry gelatin to the above described silver nanoparticles dispersion to reach a gelatin concentration of 0.8% w/v.

2.4. QCM measurements and quartz crystals modification

QCM measurements were accomplished using model CHI400A series electrochemical quartz crystal microbalance. The model includes a potentiostat/galvanostat CHI440A, an external box with oscillator circuitry, and a QCM cell. The density of the gold coated quartz crystals (13.7 mm crystal diameter, and 5.11 mm diameter of the gold disk) was 2.648 g cm^{-3} , and the shear modulus was $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$. For 8 MHz crystal, the mass change is 0.14 ng for 0.1 Hz frequency change.

For the objectives of this work, quartz crystals were modified by spreading onto the gold disk surface of 2 μL cellulose triacetate chloroform solution, followed by the deposition, after chloroform evaporation, of a 4 μL drop of gelatin 0.8% w/v hydrosol (Sensor 1) or of a silver nanoparticles loaded gelatin 0.8% w/v hydrosol (Sensor 2). Then, hydrogel formation was performed at 4 °C for a night.

Cellulose triacetate solution was prepared by dissolving 4.5 mg Gelman GA-1 filter (5 μm) in 5 mL chloroform. The formed onto the gold disk surface cellulose triacetate film after chloroform evaporation served as an anchoring layer between the gold crystal surface and the gelatin hydrogel, ensuring its good adhesion.

2.5. Nanoparticles dispersions characterization

Absorption spectra registration for nanoparticles dispersions characterization was performed using Gilford Stasar III spectrophotometer.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the silver nanoparticles dispersions

The electrochemically obtained Ag nanoparticles water dispersion (17 ppm TDS), as well as the Ag nanoparticles loaded gelatin hydrosol, were characterized by UV-vis spectrophotometry. The presence of Ag was evidenced by the appearance of an absorption maximum at about 420 nm (Fig. 1), attributed to the Ag surface plasmon excitation (Evanoff and Chumanov, 2005). The absorption spectra remained unchanged after storage of the Ag nanoparticles water dispersion at ambient temperature, and of the Ag nanoparticles loaded gelatin solution at 4 °C for a month, thus demonstrating their stability.

Data obtained using transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, atomic force microscopy, and dynamic light scattering measurements could be found in the original publication of Khaydarov et al. (2009).

3.2. Degradation experiments for trypsin activity evaluation

Degradation experiments for trypsin activity evaluation were performed in accordance with the following protocol: fitting of the modified quartz crystal into the QCM cell, filling of the cell with 180 μL PBS, equilibrating of the coated crystal with the

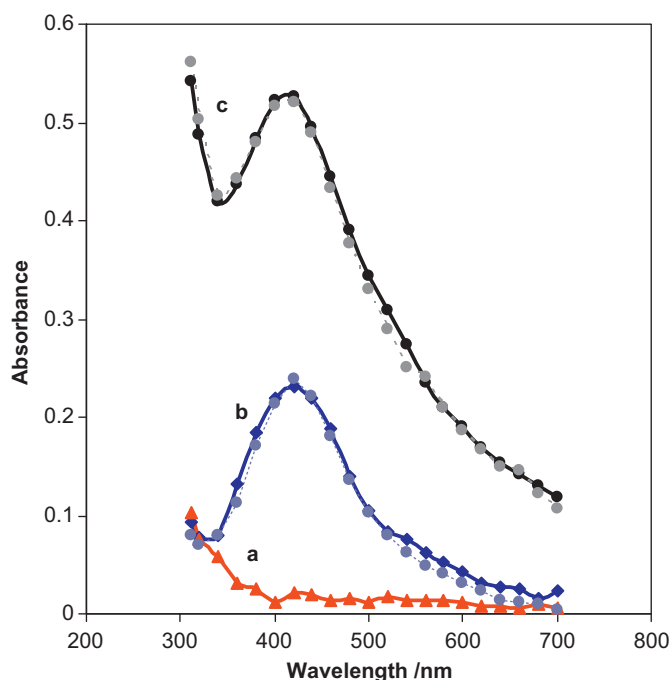


Fig. 1. UV-vis spectra of: (a) 0.8% w/v gelatin solution; (b) Ag nanoparticles water dispersion and (c) Ag nanoparticles loaded gelatin solution, registered immediately after samples preparation (solid lines) and after samples storage for a month (dashed lines).

buffer for 10 min under constant stirring (500 rpm), adding drop wise of 20 μL trypsin solution with defined concentration (activity), and recording of frequency change with time. All the experiments were completed at 26 $^{\circ}\text{C}$. Gelatin degradation rate was determined by the slope of the linear part of the registered curves: frequency change vs. time, varying as a function of enzyme activity.

Preliminary experiments to demonstrate the feasibility of the suggested approach were carried out using the gelatin modified crystals (Sensor 1). The response of the sensor to various trypsin concentrations is shown in Fig. 2.

The initial frequency decrease (mass increase) was attributed to the enzymes molecules adsorption on the gelatin layer, start of the enzyme reaction, and additional film swelling. The dissolution of the products resulted in frequency increase. Finally, complete substrate layer degradation was achieved, indicated by the observed almost no-change in QCM frequency. Such a degradation model was used to interpret the features exhibited by peptide cross-linked dextran hydrogels, as well as by cellulose and trilein films submitted to the action, respectively, of elastase (Stair et al., 2009), cellulase (Turon et al., 2008), and lipase (Snabe and Petersen, 2003), investigated by using the QCM and the QCM-D techniques. The described behavior is exemplified clearly here by the QCM response to low active trypsin (Fig. 2e), where gelatin layer degradation was delayed for more than 5 min after its exposure to the enzyme action. At higher activities, frequency decrease is insignificant, because of the very rapid film degradation.

The constructed calibration curve for trypsin activity evaluation in the range of $75 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$ up to 7500 U mL^{-1} (enzyme concentration varying from $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ up to $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), is presented in Fig. 3A. The detection limit was found to be $75 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$), on the basis of $S/N=3$. The reproducibility of the determinations, estimated by measuring the QCM response to trypsin $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ was 0.94% ($n=4$).

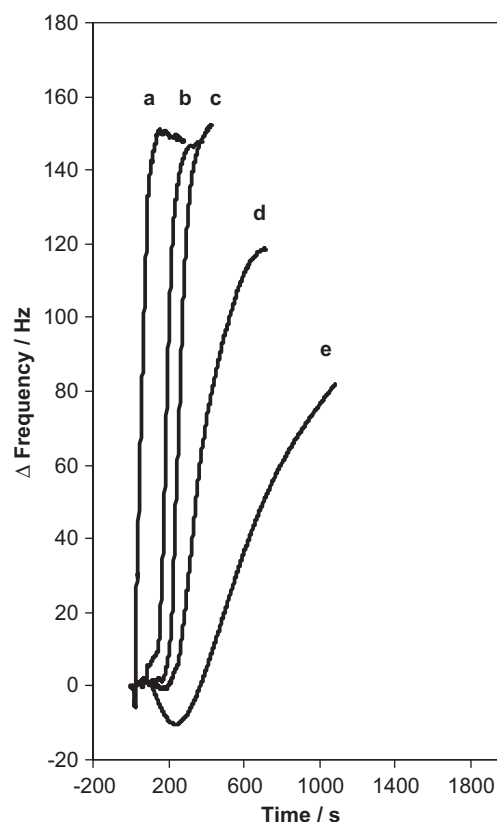


Fig. 2. Sensor 1 response to trypsin: (a) $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$; (b) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; (c) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; (d) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and (e) $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$. PBS 0.1 M, pH 8; 500 rpm; 26 $^{\circ}\text{C}$.

The subsequent experiments were achieved using the quartz crystals coated with silver nanoparticles loaded gelatin (Sensor 2). The calibration curve in coordinates: gelatin degradation rate vs. trypsin solution concentration ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ up to $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) is shown in Fig. 3A.

As expected, QCM signal was amplified due to the loss of nanoparticles all together with gelatin layer degradation (Fig. 3B). This amplification led to sensitivity increase and allowed reaching a limit of detection as low as $7.5 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ ($0.0001 \mu\text{g mL}^{-1}$) trypsin.

Signal amplification calculated as ratio of the slopes of the linear part of the curves: frequency change vs. time, registered applying respectively Sensor 2 and Sensor 1 are listed in Table S1 in Appendix A.

Enzyme activity U and QCM frequency change with time $\frac{\Delta f}{\Delta t}$, recorded applying the approach subject of the present work, could be correlated using the following modified Sauerbrey equation, including the mass change due to the nanoparticles release:

$$\Delta f = -K(\Delta m_{\text{NP}} + \Delta m_{\text{S}}),$$

Taking into consideration, that: $\Delta m_{\text{NP}} + \Delta m_{\text{S}} = A \Delta n_{\text{NP}} + M \Delta n_{\text{S}}$ and $U = \frac{\Delta n_{\text{S}}}{\Delta t}$, one can obtain:

$$U = -\left(\frac{1}{KM} \frac{\Delta f}{\Delta t} + \frac{A}{M} \frac{\Delta n_{\text{NP}}}{\Delta t}\right),$$

with f —frequency, t —time, m_{NP} —mass of the nanoparticles, m_{S} —mass of the enzymatic substrate, A —atomic mass of the nanoparticles, M —molecular mass of the substrate, n_{NP} —number of micromoles of nanoparticles, n_{S} —number of micromoles of substrate, U —enzyme activity unit, and K —a constant, depending on the resonant frequency of the fundamental mode of the crystal

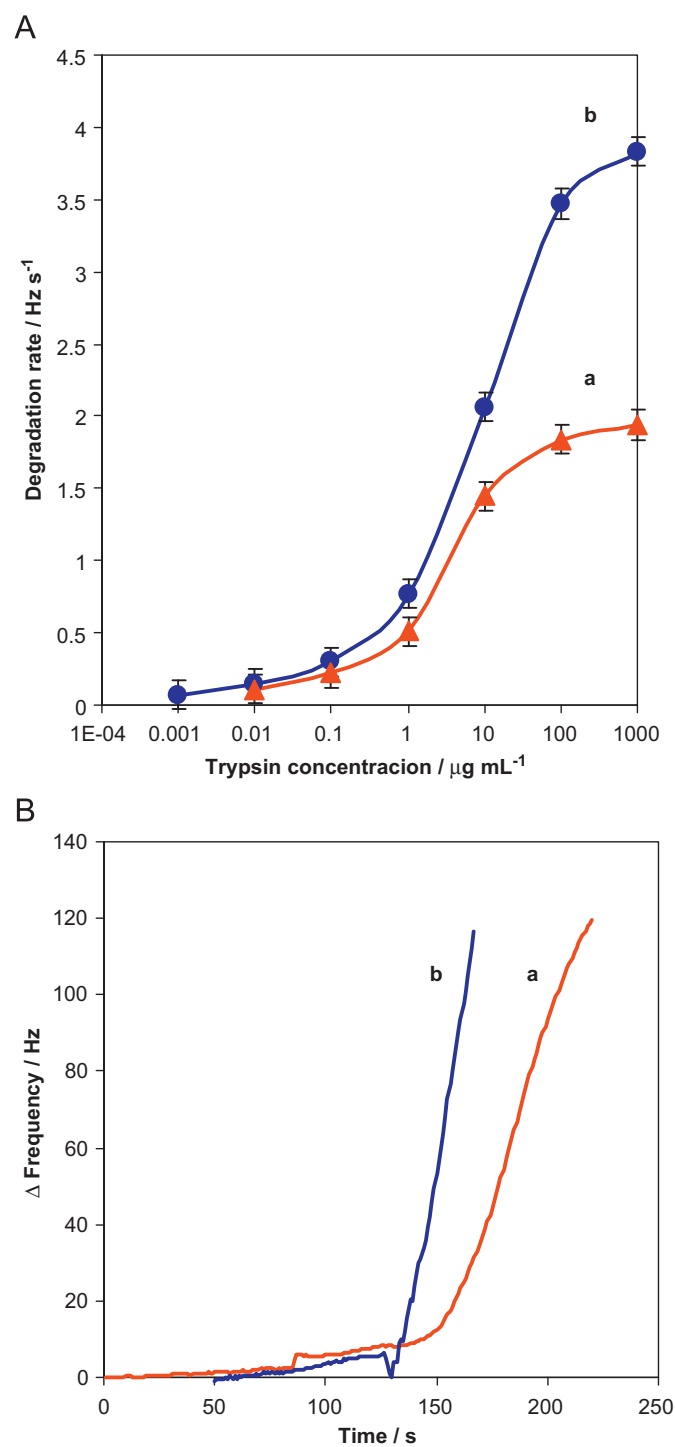


Fig. 3. A. Calibration plots for trypsin activity evaluation applying: (a) Sensor 1; (b) Sensor 2. B. Comparison of the sensors responses to trypsin $100 \mu\text{g mL}^{-1}$: (a) Sensor 1 response and (b) Sensor 2 response. PBS 0.1 M, pH 8; 500 rpm; 26°C .

f_0 , the area B of the gold disk coated onto the crystal, the shear modulus μ of quartz, and the density of the crystal ρ ($K = -\frac{2f_0^2}{B\sqrt{\mu\rho}}$).

The enzyme activity unit was defined as the amount of enzyme which catalyzes the degradation of one micromole of substrate per minute under the defined conditions of the experiments.

As data in Table S2 Appendix A demonstrate, the developed method for trypsin activity determination is one of the most sensitive reported until now.

4. Conclusion

A new approach for QCM trypsin activity determination based on the employment of Ag nanoparticles loaded gelatin as trypsin substrate, deposited on a QCM crystal, was proposed and experimentally tested. The release of the much heavier nanoparticles during the enzymatic substrate degradation by trypsin together with the degradation products amplifies the QCM sensor response toward trypsin activity. A LOD of $7.5 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ was achieved applying the proposed approach compared with $7.5 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$ obtained by the "classic" one.

Acknowledgments

Research Grant 156946/CB-2010-01, provided by SEP-CONACyT, Mexico is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.039>.

References

- Adjemian, J., Anne, A., Cauet, G., Demaille, C., 2010. *Langmuir* 26, 10347–10356.
- Ahola, S., Turon, X., Osterberg, M., Laine, J., Rojas, O.J., 2008. *Langmuir* 24, 11592–11599.
- Banumathi, E., Haribalaganesh, R., Babu, S., Kumar, N., Sangiliyandi, G., 2009. *Microvascular Research* 77, 377–381.
- Baş, D., Boyaci, I.H., 2010. *Electroanalysis* 22, 265–267.
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., Grassl, M., 1974. 2nd ed. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. I. Academic Press Inc., New York. (pp. 515–516).
- Biloivan, O., Dzyadevych, S., Boubriak, O., Soldatkin, A., El'skaya, A., 2004. *Electroanalysis* 16, 1883–1889.
- Chen, Chao, Fu, Yingchun, Xiang, Canhui, Xie, Qingji, Zhang, Qingfang, Su, Yuhua, Lihua, Wang, Shouzhao, Yao, 2009. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2726–2729.
- Chen, Chao, Xie, Qingji, Wang, Lihua, Qin, Cong, Xie, Fangyun, Yao, Shouzhao, Chen, Jinhua, 2011. *Analytical Chemistry* 83, 2660–2666.
- Chen, Y., Ding, J., Qin, W., 2012. *Bioelectrochemistry* <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.04.002>>.
- Chuang, Y.-C., Li, J.-C., Chen, S.-H., Liu, T.-Y., Kuo, C.-H., Huang, W.-T., Lin, C.-S., 2010. *Biomaterials* 31, 6087–6095.
- Deng, Chunyan, Li, Mingrui, Xie, Qingji, Liu, Meiling, Tan, Yueming, Xu, Xiahong, Yao, Shouzhao, 2006. *Analytica Chimica Acta* 557, 85–94.
- Evanoff Jr., D.D., Chumanov, G., 2005. *ChemPhysChem* 6, 1221–1231.
- Fordyce, K., Shvarev, A., 2008. *Analytical Chemistry* 80, 827–833.
- Forsmark, C., 2010. In: Feldman, M., Friedman, L.S., Brandt, L.J. (Eds.), *Sleisinger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*, 9th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, Pa. (Chapter 59).
- Hanumegowda, N.M., White, I.M., Oveys, H., Fan, X., 2005. *Sensor Letters* 3, 1–5.
- Hu, G., Heitmann, J.A., Rojas, O.J., 2009. *Analytical Chemistry* 81, 1872–1880.
- Hu, Q.-Z., Jang, Ch.-H., 2012. *ACS Applied Materials and Interfaces* 4, 1791–1795.
- Ionescu, R., Cosnier, S., Marks, S., 2006. *Analytical Chemistry* 78, 6327–6331.
- Ionescu, R., Fillit, C., Jaffrezic-Renault, N., Cosnier, S., 2008. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 489–492.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 1971. *NMRS 50/TRS 488-JECFA 15/11; FAS 2/NMRS 50B-JECFA 15/11; COMPENDIUM/1561*.
- Jeong, C., Maciel, A.M., Pawlak, J.J., Heitmann, J.A., Argyropoulos, D.S., Rojas, O.J., 2005. *Proceedings of the 13th International Symposium on Wood, Fibre and Pulp Chemistry (ISWFPC)*, vol. 2, Auckland, New Zealand, 16–19 May 2005, pp. 495–502.
- Josefsson, P., Henriksson, G., Wågberg, L., 2008. *Biomacromolecules* 9, 249–254.
- Khaydarov, R.A., Khaydarov, R.R., Gapurova, O., Estrin, Y., Scheper, T., 2009. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 1193–1200.
- Kersey, A., Berkoff, T., Morey, W., 1993. *Optics Letters* 18, 1370–1372.
- Krause, S., McNeil, C.J., Fernández-Sánchez, C., Sabot, A., 2006. *American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA*.
- Kukwikila, M., Howorka, S., 2010. *Journal of Physics: Condensed Matter* 22, 454103–454108.
- Millington, R., Mayes, A., Blyth, J., Lowe, C., 1995. *Analytical Chemistry* 67, 4229–4233.
- Neff, P.A., Serr, A., Wunderlich, B., Bausch, A., 2007. *ChemPhysChem* 8 (14), 2133–2137.
- Schuchert-Shi, A., Hauser, P.C., 2009. *Analytical Biochemistry* 387, 202–207.

- Schwert, G., Takenaka, Y., 1955. *Biochimica et Biophysica Acta* 16, 570–575.
- Snabe, T., Petersen, S.B., 2003. *Chemistry and Physics of Lipids* 125, 69–82.
- Soleimani, M., Nadri, S., 2009. *Nature Protocols* 4, 102–106.
- Spooner, R., Al-Ramadhan, F., Jones, B., 1992. *International Journal of Optoelectronics* 7, 449–452.
- Stair, J.L., Watkinson, M., Krause, S., 2009. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2113–2118.
- Stoytcheva, M., Zlatev, R., Cosnier, S., Arredondo, M., 2012. *Electrochimica Acta* <<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.04.140>>.
- Syed, M.A., Bhatti, A.S., Li, C., Bokhari, H., 2011. *American Journal of Biomedical Sciences* 3, 253–257.
- Temler, R., Felber, J.-P., 1976. *Biochimica et Biophysica Acta* 445, 720–728.
- Turon, X., Rojas, O.J., Deinhammer, R.S., 2008. *Langmuir* 24, 3880–3887.
- Wu, S., Cai, Q., Grimes, C.A., 2006. *Sensor Letters* 4 (5), 160–164.
- Yang, M., Chen, C., Wang, X., Zhu, Y., Gu, Y., 2009. *Journal of Biomedical Materials Research* 91, 354–361.
- Zaccheo, B., Crooks, R., 2011. *Analytical Chemistry* 83, 1185–1188.



Mini-Reviews in Medicinal Chemistry

ISSN: 1389-5575 (Print)

ISSN: 1875-5607 (Online)

Volume 12, 14 Issues, 2012

[SUBSCRIBE TO THIS JOURNAL](#)

[PAY-PER-VIEW ARTICLES](#)

[Online Store](#)

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry
Volume 12, Number 12, October 2012

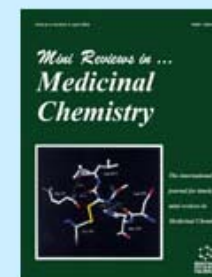
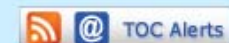
Contents

Some clinical applications of the electrochemical biosensors Pp.1301-1313

Michelle Arredondo, Margarita Stoytcheva, Roumen Zlatev and Velizar Gochev

[\[View Abstract\]](#) [\[Purchase Article\]](#)

Impact Factor: 2.528



Some Clinical Applications of the Electrochemical Biosensors

Michelle Arredondo¹, Margarita Stoytcheva^{1,*}, Roumen Zlatev¹ and Velizar Gochev²

¹Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Blvd. B. Juárez s/n, Col. Insurgentes Este, 21280 Mexicali, Baja California, México; ²“P. Hilendarski” University of Plovdiv, Dep. Biochemistry and Microbiology, 24 Tzar Asen Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria

Abstract: Electrochemical biosensing, due to its sensitivity and specificity, combined with the low-cost and operation convenience of the equipment, is considered as a promising point-of-care approach in clinical analysis. This review presents the basic principles of operation, the current status, and the trends in the development and the clinical implementation of some selected electrochemical biosensors. These include: electrochemical glucose biosensors successfully applied in diabetes management, and electrochemical biosensors for cholinesterases and trypsin activities determination. The latter, although less common, demonstrate the potential of improving the existing clinical methods in the diagnostics and the treatment of neurotoxic, neurological, and pancreatic diseases.

Keywords: Biosensors, clinical analysis, cholinesterases, glucose, trypsin.

INTRODUCTION

The improvement of the analytical techniques for the detection of physiologically important species for the purposes of the medical diagnosis and therapy has always been a major defy to medical science. The progress in clinical analysis, remembering the beginning, 100 years ago, when interferences and errors accompanied the determinations because of the use of lab-produced reagents and a lack of knowledge, is spectacular [1]. A significant shift was experienced during the 1970s due to two major innovations: instruments automation and reagents preparation industrialization. These contributions served as a starting point to answer the growing demand of clinical analysis, in concert with the enhancement of the understanding of the diseases provoking factors. The industrial production of a large quantity of reagents ensured their standardization, as well as the quality improvement. On the other hand, the automation allowed analyzing a considerable amount of samples and drastically decreasing the error factors, although the first automated systems used high volumes of substances and were difficult to operate. Nowadays, vital benefits are obtained from the application of test kits and transportable, portable, and handheld instruments, thus promoting the implementation of Point-of-Care Testing (POCT) systems [2]. POCT, performed conveniently and immediately to the patient, allows a rapid clinical management decisions to be made. The role of point-of-care diagnostics in developing world in particular, the appropriate diagnostic technologies already in distribution, as well as the emerging technologies, and the related technical needs and technical barriers are extensively reviewed by Yager *et al.* [3].

POCT approach created new challenging problems, involving the development of cheaper, smaller, faster, and smarter POCT devices with improved performance characteristics.

The electrochemical biosensors are considered as a new generation of POCT systems able to supply specific, sensitive, accurate and cost-effective *in situ* and *on line* measurements in a real time, without or with a minimum sample preparation. Because of the requests of the clinical analysis, governing the biosensors application market, it is expected that the registered in 2010 growth of the world biosensor industry of US\$ 7 billion will reach US\$12 billion by 2015 [4].

The present work is intended to provide an overview on the basic principles of operation, the current status, and the trends in the development and the clinical application of some electrochemical biosensors of crucial importance for the diagnostics and treatment of diabetes, neurotoxic, neurological and pancreatic disorders, such as the biosensors for glucose quantification and for cholinesterases and trypsin activities determination.

ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

The electrochemical biosensor is an analytical device designed by coupling a biological recognition element and an electrochemical transducer [5]. The transducer converts the analytical signal produced as a result of the biochemical and electrochemical interactions into measurable electrical one. The biorecognition component of the biosensor is typically biocatalytic (enzymes, cells, cell organelles, tissues) or biocomplexing (antibodies, biomimetic materials, cell receptors, nucleic acids), according to the biological specificity-conferring event. It is immobilized or retained in direct spatial contact with the electrochemical transducer. The biorecognition element being often an enzyme, the term “enzyme immobilization” was defined at the First Enzyme

*Address correspondence to this author at the Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. B. Juárez s/n, 21280 Mexicali, Mexico; Tel./Fax: +52 6865664150; E-mail: margarita@iing.mx1.uabc.mx

Engineering Conference held at Hennicker, NH, USA, in 1971. It describes “enzymes physically confined at or located in a certain region or space with retention of their catalytic activity and which can be used repeatedly and continuously” [6]. Immobilization methods are classified as physical and chemical and include [5]: adsorption, entrapment behind a membrane, within a polymeric matrix, or within self-assembled monolayers, covalent bonding, and bulk modification of entire electrode material (carbon paste or graphite epoxy-resin), among other.

The applied electrochemical transduction mode is commonly potentiometric or amperometric one [5]. The potentiometric determinations are based on the measurement of the potential of an electrochemical cell comprising an indicator and a reference electrode. The potential of the reference electrode remains constant, while the potential of the indicator electrode and consequently the cell potential vary as a function of the analyte concentration, according to the Nernst equation. The logarithmic character of the response of the indicator electrode determines the wide linear concentration range of the calibration plot (3-4 decades), but also the unsatisfactory accuracy of the analysis. In terms of accuracy, the amperometric detection suits better the analytical requirements. The amperometry involves the measurement, at a constant potential, of the current response of an indicator electrode, as a function of the concentration of the present electroactive specie. The technique is sensitive and allows in addition controlling the process through the applied electrode potential.

CLINICAL APPLICATIONS OF THE ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

Electrochemical Glucose Biosensors

Glucose is the chief energy supplier for almost all of the bodies' cells and a starting point for a number of important metabolic pathways [7]. Thus, glucose concentration monitoring in biological fluids is of primary importance in clinical diagnostics and a biochemical test for the assessment of the carbohydrate metabolism impairment, namely diabetes, hypoglycemia, and various endocrine disorders. In 2000, according to the World Health Organization (WHO), 2.8% of the population of the world suffered from diabetes, and this number will double by 2030 [8]. Diabetes ranks among the leading 10 causes of death in Mexico affecting 3.7 millions of people [9]. The WHO criteria for the diagnosis of diabetes, based on the establishment of the

glucose levels in whole blood and plasma are presented in Table 1 [10].

Glucose determination in whole blood, serum and plasma is performed currently applying spectrophotometric enzymatic methods, such as the standard glucose oxidase-peroxidase method of Saifer and Gerstenfeld [11], and the reference hexokinase one [12, 13]. The electrochemical glucose biosensors preserve the specificity of the enzymatic analysis, but they take also advantage of the biological component immobilization and of the sensitivity and rapidity of the electrochemical detections. In addition, they are very suitable for continuous and *in-vivo* monitoring of blood glucose, in contrast to the mentioned spectrophotometric techniques.

Three generations of electrochemical biosensors for glucose quantification are developed until now [14]. The principle of their operation is illustrated by the following reaction scheme:

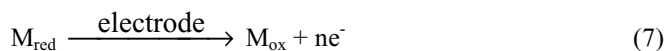
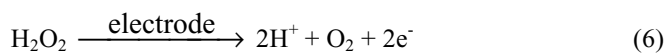


where E_{ox} and E_{red} are the oxidized and the reduced forms of the enzyme glucose oxidase.

E_{red} conversion into E_{ox} is achieved in various ways: by E_{red} oxidation with O_2 (Eq. 3) in the first generation glucose biosensors, by E_{red} oxidation with a redox mediator M (Eq. 4) in the second generation glucose biosensors, and by direct E_{red} oxidation on the electrode surface (Eq.5) in the third generation glucose biosensors:



The analytical signal of the biosensors is respectively the current of H_2O_2 , M_{red} , and E_{red} oxidation (Eqs. 6, 7 and 5).



The first generation electrochemical biosensors suffer from two main drawbacks [15, 16]: the fluctuations of the oxygen concentration influencing the output signal and the presence in the biological fluids of electroactive species such

Table 1. WHO Criteria for the Diagnosis of Diabetes

Diagnosis	Sampling Time	Glucose Concentration (mmol/L)		
		Whole Blood, Venous	Whole Blood, Capillary	Plasma/Serum
Normal	Fasting		< 5.6	< 6.4
Diabetes mellitus	Fasting	> 6.7	> 6-7	> 7.8
	At 2 hours of glucose load	> 10.0	> 11.1	> 11.1
Impaired glucose tolerance	Fasting	< 6.7	< 6.7	< 7.8
	At 2 hours of glucose load	6.7 – 10.0	7.8 - 11.1	7.8 - 11.1

as ascorbic acid, uric acid, and glutathione, interfering with the electrochemical H_2O_2 oxidation. In spite of these problems, the first generation electrochemical biosensors for glucose analysis were commercialized [17, 18].

In second generation electrochemical biosensors for glucose determination the natural glucose oxidase substrate (oxygen) was substituted by an artificial electron acceptor (mediator), allowing the electrochemical measurements to be performed at low electrode potential, thus avoiding the interferences and the O_2 dependence. As mediators were successfully used ferrocene, ferricyanide, quinones, tetrathiafulvalene, tetracyanoquinodimethane, methyl viologen, and so forth [14]. The standard potentials (vs. Ag/AgCl) of some commonly used mediators in glucose oxidase electrochemical sensors of second generation are as low as: -0.370 V for benzyl viologen, -0.188 V for indigo disulfonate, $+0.137$ V for 2,5-dihydroxybenzoquinone, $+0.216$ V for ferrocenemethanol, $+0.217$ V for methylene blue, etc [19]. In 1987 MediSense launched the pen-sized ExactechTM glucose sensors of second generation.

Promising results have also been obtained combining the artificial mediators with glucose dehydrogenase, e.g. the highly specific and stable FAD-dependent glucose dehydrogenase [20-23]. The latter came to substitute the water soluble quinoprotein glucose dehydrogenase, which exhibits low substrate specificity and lack of thermal stability.

The approach applied in the third generation electrochemical biosensors for glucose analysis seems to be the most efficient. As known, glucose oxidase could be directly oxidized at the surface of Hg, Au, Ag, and glassy carbon electrodes in the potential range of -0.30 to -0.70 V/SCE. Nevertheless, the oxidation rate is low and the results are not enough reproducible. Although the issue is questionable [14, 24-33], it could be assumed that the electrode material modification with conducting organic salts favors the heterogeneous electron transfer between the glucose oxidase and the electrode surface. The first used for this purpose was the *N*-methylphenazinium salt of the tetracyanoquinodimethane [24, 33]. Of particular interest is the complex tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane in 1:1 ratio, because of its higher conductivity [29, 30]. The commercialization of this technology is still not available.

The review of the recent research activities on glucose biosensing demonstrates that current efforts are focused on the development of nanomaterials-based electrochemical glucose biosensors with improved selectivity and sensitivity and enhanced direct electrochemistry of glucose oxidase.

The nanotechnological approach in electrochemical biosensors development [34-49] takes advantage of the electrocatalytic properties of the nanostructures, their action as electron transfer mediators or electrical wires, large surface to volume ratio, structural robustness, and biocompatibility. Therefore, it yields the following chief issues: electrode potential lowering, enhancement of the electron transfer rate with no electrode surface fouling, sensitivity increase, stability improvement, and interface functionalization. Nevertheless, only few publications

comment on the development, in the last years, of electrochemical glucose biosensors using single type nanomaterials. Some of them are those incorporating Pt [50], Au [51] or iron [52] nanoparticles, nano-ZnO particles and nanotubes [53-55], mesoporous silica particles [56], or modified with redox mediators graphene oxide [57], carbon fibers [58-60], carbon nanotubes [61-64], and ZnO [57, 65]. The majority of the electrochemical glucose biosensors designed recently incorporates nanocomposites with improved nanomaterials dispersity, and new or enhanced mechanic, catalytic, electric or magnetic properties. These include:

- Natural and synthetic polymer-matrix nanocomposites, such as: chitosan-Prussian blue-multiwall carbon nanotubes-hollow PtCo nanochains films [66], palladium nanoparticles-chitosan-grafted graphene [67], chitosan dispersed Pt nanoparticles supported on carbon nanotubes [68], thulium(III) hexacyanoferrate(II) nanoparticles within a chitosan film [69], Ag nanoprisms-chitosane [70], poly-cyclodextrin-carbon nanotubes [71], and Au nanoparticles modified synthetic polymers [72];
- Sol-gel composites, integrating: carbon nanotubes [73], carbon nanotubes/polyacrylonitrile [74], Pt nanoparticles [75], or Au nanoparticles [76];
- Metal, metal oxides, and carbon nanotubes hybrid materials derived from: Au nanoparticles and carbon nanotubes [77, 78], Au nanocrystals growing on ZnO nanorods [79], Au nanoparticles deposited on TiO_2 nanotubes [80], $\text{Ni}^{2+}/\text{MgFe}$ layered double hydroxide [81], and Pt nanoparticles electrodeposited on iron oxide-carbon nanotubes [82], among other.

Investigating direct glucose oxidase electrochemistry and developing a third generation biosensors is the other challenging problem in glucose biosensing. It has been demonstrated that the carbon-based nanomaterials, such as the carbon nanotubes [83, 84] the boron-doped carbon nanotubes [85], the functionalized TiO_2 [86] coated carbon nanotubes, the graphene [87, 88], and the graphene composites [89] show excellent electron-transfer capabilities. The reported apparent heterogeneous electron transfer rate constants range between 1.08 s^{-1} and 5.9 s^{-1} [83, 89], thus confirming nanomaterials efficiency in promoting the direct electron exchange between the electrode surface and the glucose oxidase molecules. Special attention has to be paid to graphene and its composites. Graphene consists in a one atom thick carbon sheet (sp^2 hybridized), with a surface area nearly twice as large as that of single walled carbon nanotubes [47], good electrical conductivity and electrocatalytic ability, and capability to form charge-transfer complexes. Nanocomposites integrating graphene and metal nanoparticles or nano-sized CdS exhibit enhanced electron transfer properties, due to synergy effects [89].

Latest trends in electrochemical glucose biosensors development have been extensively reviewed by a number of authors [15, 17, 41, 89-94]. The analytical performances of some relevant recently developed electrochemical glucose biosensors are summarized in Table 2.

Table 2. Analytical Performances of Some Relevant Recent Electrochemical Glucose Biosensors

Surface Modification	Detected Specie	Sensitivity	LOD	Reference
Au/PtNPs/oPD	H ₂ O ₂ at 0.3 V/Ag, AgCl	1.2 mA mM ⁻¹ cm ⁻²	3.0 μM	[50]
Nano-ZnO (transferred)	H ₂ O ₂ at 0.8 V/Ag, AgCl	15.46 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	0.05 mM	[53]
Nano-ZnO (grown)	H ₂ O ₂ at 0.8 V/Ag, AgCl	23.43 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	0.01 mM	[53]
CNT/felt/CuHCNFe/Ppy	H ₂ O ₂ at 0.0 V/Ag, AgCl	194 μA mM ⁻¹	10 μM	[61]
SWCNT/PVI-Os	0.3 V/Ag, AgCl	32 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	0.07 μM	[62]
SWCNT/polyBCB	polyBC at -0.25 V/SCE	N	1.0 μM	[63]
CS/PB/MWNT/H-Pt(Co)	PB at -0.1 V/SCE	23.4 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	0.47 μM	[66]
CS-GR/PdNPs	H ₂ O ₂ at 0.7 V/SCE	31.2 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	0.2 μM	[67]
CS/Pt/CNT	GOD at 0.3 V/SCE	41.9 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	0.4 μM	[68]
CS/TmHCF NPs	SWVA	2.35 μA mM ⁻¹	6.0 μM	[69]
AgTNPs/CS	H ₂ O ₂ at 0.6 V/Ag, AgCl	67.67 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	1 μM	[70]
AuNPs/SNS-NH ₂	O ₂ at -0.7 V/Ag, AgCl	1.597 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	2.1 μM	[72]
CS/PB/MWNT	PB at -0.1 V/SCE	15.2 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	7.5 μM	[73]
AuNPs/MWCNT	Ferrocenmethanol at 0.3 V/SCE	19.27 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	2.3 μM	[77]
AuNPs/TiO ₂ NT	GOD at -0.25 V/Ag, AgCl	N	0.31 mM	[80]
CNT/TiO ₂ -NH ₂	GOD at -0.35 V/Ag, AgCl	7.0 μA mM ⁻¹	0.44 μM	[86]
GR	GOD at -0.47 V/SCE	110 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	0.01 mM	[87]
Poly(ViBulm ⁺ Br ⁻)/GR	GOD by CV: -0.1 to -0.7 V/Ag, AgCl	0.77 μA mM ⁻¹	0.267 mM	[88]
GR/CdS	GOD by CV: -0.1 to -0.7 V/Ag, AgCl	1.76 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	0.7 mM	[89]
CS/BCNi	GOD at -0.2 V/SCE	0.25 μA mM ⁻¹	8.33 μM	[94]
PB-Au/Pt-NCs	PB at -0.15 V/SCE	2.77 mA M ⁻¹	1.0 μM	[95]
PtNPs/OMC	H ₂ O ₂ at -0.1 V/Ag, AgCl	0.38 μA mM ⁻¹	0.05 μM	[96]
AuNPs	O ₂ at -0.7 V/Ag, AgCl	9.42 mg L ⁻¹ O ₂ depletion	3.5 μM	[97]
OMC/AuNPs	DPV at -0.1 to -0.7 V/Ag, AgCl	4.34 μA mM ⁻¹	N	[98]
PPMH	GOD at 0.2 V/Ag, AgCl	N	0.05 mM	[99]

AgTNPs: triangular silver nanoprisms; AuNPs: Au nanoparticles; BCB: brilliant cresyl blue; CNT: carbon nanotubes; CS: chitosan; CS/BCNi: chitosan boron doped nickel nanoparticles; CS-GR: chitosane grafted graphene; CV: cyclic voltammetry; DPV: differential pulse voltammetry; GOD: glucose oxidase; MWCNT: multiwalled carbon nanotubes; MWNT: multiwalled nanotubes; OMC: ordered mesoporous carbon; oPD: o-phenylenediamine; PB: Prussian blue; PdNPs: Pd nanoparticles; Poly(ViBulm⁺Br⁻)/GR: poly(1-vinyl-3-butylimidazolium bromide)-graphene; PPMH: poly-phenantroline monohydrate; Ppy: polypyrrol; Pt-NCs: Pt nanoclusters; PVI: Poly(1-vinylimidazole); SWCNT: single walled carbon nanotubes; SWVA: square wave voltammetry; TmHCF: thulium(III) hexacyanoferrate(II).

Electrochemical biosensors for Cholinesterases Activity Determination

The cholinesterases are a family of enzymes, belonging to the class of the hydrolases [100]. The acetylcholinesterase AChE (EC 3.1.1.7) or “true” cholinesterase is present in the red cells and the neural synapses. It is involved in the transmission of the nerve impulses, catalyzing the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine to choline. The reduction in the activity of the cholinergic neurons is known as a feature of Alzheimer's disease [101]. The

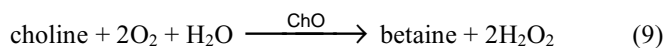
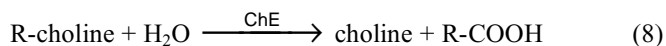
butyrylcholinesterase BuChE (EC 3.1.1.8) or “pseudocholinesterase” is synthesized in the liver and is present in the serum. Pseudocholinesterase activity increase is associated with nephritis syndrome and myocardial infarction, while the decrease is related to lesions in the liver's parenchyma (cirrhosis, carcinomas, and acute forms of infectious and toxic hepatitis) [102]. Both acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are inhibited by neurotoxic substances such as organophosphorus and carbamate pesticides and warfare agents. Acetylcholinesterase inhibition results in impairing of the

transduction of the nerve impulses and induces decreased intraocular pressure, bradycardia, hypotension, hypersecretion, bronchoconstriction, prolonged muscle contraction, and death. Acetylcholinesterase inhibition is also applied for the management of Alzheimer's disease symptoms, by reducing the rate of acetylcholine break down, thus balancing the loss of acetylcholine due to the failure of cholinergic neurons. Thus, the accurate assessment of the cholinesterases activity and cholinesterases inhibition is of vital importance for the diagnostics and the treatment of neurotoxic and neurological disorders, among other.

The evaluation of the cholinesterases activity is performed using various analytical methods: spectrophotometric [103, 104], pH-metric [105, 106], conductometric [107], radiometric [108, 109], fluorimetric [109] and so forth, revised comprehensively in the recent work of Miao *et al.* [108]. The electrochemical approach to cholinesterases activity determination exploiting the unique analytical performances of the electrochemical biosensors was introduced in 1960s.

According to the transduction mode, the electrochemical sensors for cholinesterases activity determination are mainly potentiometric and amperometric. The potentiometric biosensors detect the pH shift resulting from the acid release during the enzyme catalyzed hydrolysis of the choline esters (Eq. 8), using a variety of pH-sensitive transducers, ranging from the traditional pH glass electrodes [111] to the ion-selective field effect transistors [110]. The equipment is simple, commercially available, and affordable. The detection is performed in a single step, under no current flow conditions. A shortcoming of the method, apart of the non-linearity of the biosensor response and the related error of the determination, represents the increased response time. It varies from 2 to 10 min [112] in dependence of the time needed to reach the equilibrium at the biosensor-solution interface.

The call for analytical devices with higher sensitivity, accuracy, and faster response favored the development of amperometric sensors for cholinesterases activity determination. These of first generation take advantage of the following reactions sequence:



or



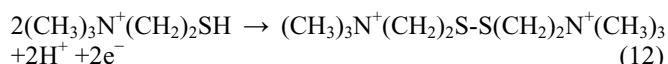
where R is usually an acetyl or butyryl moiety. Acetylcholinesterase demonstrates a high specificity toward acetylcholine, while butyrylcholinesterase is less specific and hydrolyses a number of choline esters, including acetylcholine.

R-choline hydrolysis catalyzed by the cholinesterases (Eq. 8) does not involve electroactive species. Thus, the process was coupled with the choline oxidase catalyzed choline oxidation (Eq. 9). The current of the oxidation of the

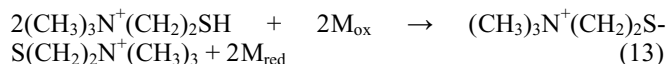
produced H_2O_2 (Eq. 10) or the current of the reduction of the consumed O_2 (Eq. 11), is registered as a sensor response. However, the possible interferences at the potential of H_2O_2 oxidation (+0.60 V vs. SCE), and the fluctuations in the oxygen concentration strained the development of the cholinesterases-based sensors of second generation with improved analytical performances.

The sensors for cholinesterases activity determination of second generation involve the enzymatic hydrolysis of acylthiocholine to thiocholine. The enzyme activity is determined by electrochemically monitoring the thiocholine formed. Two alternative routes are explored as response-generating electrochemical reactions:

- Direct electrochemical oxidation of thiocholine at 0.80 V/Ag, AgCl:



- Mediated thiocholine oxidation at lower electrode potential (0.1-0.45 V/Ag, AgCl), using cobalt phtalocyanine [113, 114], tetracyanoquinodimethane [115] or hexacyanoferrate (III) [116] as electron mediators in a heterogeneous or in a homogeneous phase, to avoid interferences:



The amperometric biosensors of second generation make use of a simple detection principle and of a single enzyme. The biosensor construction is straightforward, the system being monoenzymatic one. The main problems come from the spontaneous hydrolysis of the thiocholine esters, leading to overestimation of the anodic current response, the passivation of the platinum anodes by the sulfur-containing compounds, and the high potential of thiocholine oxidation (+0.80 V vs. SCE) at conventional metal and graphite transducers [117-121] as a cause of possible interferences.

The various types of cholinesterases amperometric sensors in conformity with the reactions involved are summarized by Turdean *et al.* [122]. The principle of their function is illustrated by (Figs. 1 and 2).

The electrochemical biosensors for cholinesterases activity determination were primarily designed for toxicity analysis in environmental monitoring, food and quality control. The method is based on the quantification of the cholinesterases activity inhibition, provoked by organophosphorus and carbamate pesticides and other neurotoxic agents. Comprehensive analysis of the current state of the art is provided by a number of authors [111, 123-131]. Recent trends involve nanomaterials transducer modification and genetic engineering of the biological recognition element, to improve electrochemical biosensors performances. Various nanomaterials used as cholinesterases immobilization matrices in electrochemical biosensors for organophosphorus pesticides determination, along with biosensors performance characteristics such as sensitivity, linear dynamic range, and detection limit are evaluated and

summarized in the review work of Periasamy *et al.* [132]. As demonstrated, the nanomaterials transducer modification confers long storage stability of the biosensors, and enables organophosphorus pesticides detection in the nanomolepicomole range. The alternative route leading to biosensors sensitivity, selectivity and stability increase involves the incorporation in the biosensing platform of biorecognition elements with tailor designed properties. These performances are achieved through appropriate site-directed mutagenesis ensuring increased biorecognition element affinity for the target analyte favoring the accessibility of the active site, enhanced electron transfer, and oriented or more stable immobilization [133, 134]. Genetically modified enzymes are extensively used in inhibition based biosensors for organophosphorus pesticides determination [135-139], allowing attaining LOD as low as 10^{-17} M [140].

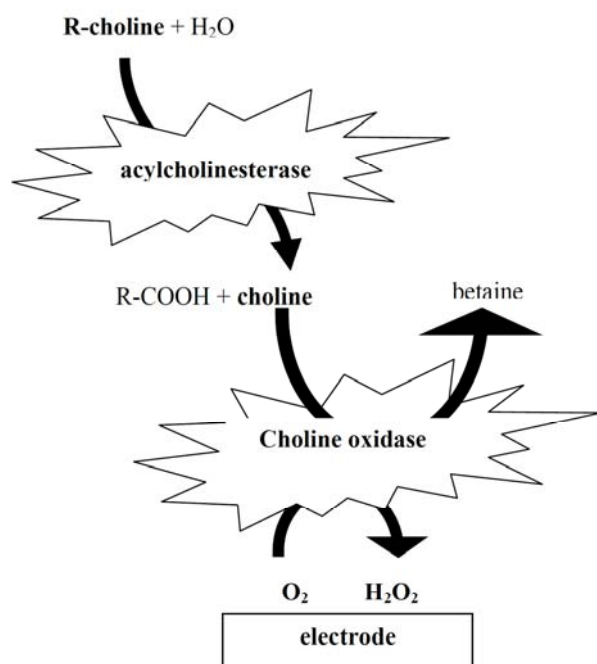


Fig. (1). Amperometric cholinesterase sensor of first generation.

The clinical application of the electrochemical biosensors for cholinesterases activity determination in blood and serum remains still limited. Simple first generation biosensors for cholinesterases activity determination in serum and amniotic fluid involving immobilized choline oxidase associated with the amperometric detection of hydrogen peroxide are reported by Paleschi [141] and Morelis [142] in 1990s.

Sigolaeva *et al.* [143] comment on the development of an electrochemical biosensor of first generation for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities measurement in blood hemolysates of mice, rats, and humans. The transducer used is graphite, modified with H₂O₂-sensitive layer of MnO₂ and choline oxidase incorporated into a self-assembled nanostructured polyelectrolyte layer. The amperometric measurements are performed at a potential of 0.35 V/Ag, AgCl and in diluted solutions, to minimize the interferences from extraneous

substances in blood. The LOD achieved is of 10-20 nmol min⁻¹ ml⁻¹ blood. In addition, this sensor in combination with a tyrosinase-based sensor for phenols determination is applied for the simultaneous quantification of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in test mixtures. Phenols are obtained by cholinesterases catalyzed hydrolysis of phenolic esters.

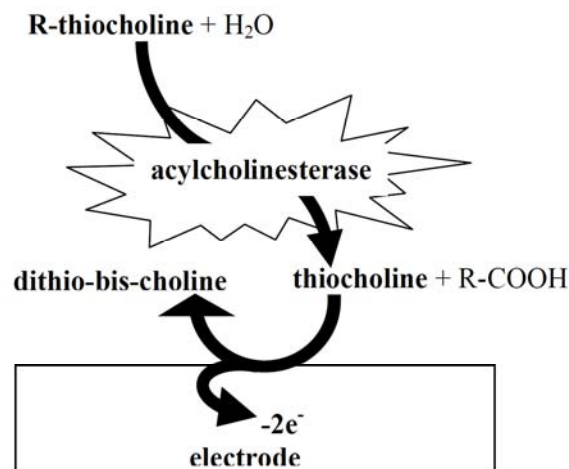


Fig. (2). Amperometric cholinesterase sensor of second generation.

Hsieh *et al.* [144] propose an amperometric flow injection biosensor of first generation for cholinesterase activity determination in human serum. The Pt working electrode is covered with a chitinous membrane, and the enzyme choline oxidase is covalently immobilized onto the membrane surface. It is demonstrated that the dynamic range of the biosensor is sufficient for diagnostic purposes.

An original bacterial electrochemical sensor for cholinesterase activity determination is developed by Stoytcheva *et al.* [145]. It is designed by coupling *Arthrobacter globiformis* and a dissolved oxygen electrode. The natural cells metabolism involves choline oxidation to betaine with oxygen consumption. Hence, current proportional to bacteria respiration is registered as a sensor response. It is correlated to the activity of the cholinesterase, catalyzing the acetylcholine hydrolysis to choline. The measurements are free of interferences: the unique electrochemical reaction taking place is the O₂ reduction, occurring behind the polymer membrane of the oxygen probe, permeable for gases only. The analytical performances of the biosensor are evaluated by cholinesterase activity determination in reconstituted lyophilized serum.

Several works are devoted to the “*in vitro*” study of the kinetics of cholinesterases inhibition and reactivation by using electrochemical biosensors for cholinesterases activity determination both of first, and of second generation [146-154]. Results from such investigations are useful for toxicity effects studies, for the development of appropriate antidotes, and for drug sensitivity evaluation in the treatment of dementia.

Electrochemical Biosensors for Trypsin Activity Determination

Trypsin (EC 3.4.21.4) is an enzyme of the class of the serine proteases, found in the human digestive system [155]. It is produced by the pancreas as trypsinogen (inactive enzyme) and is then activated in the duodenum by the intestinal enterokinase to trypsin (active enzyme) by proteolytic cleavage [156]. Therefore, the determination of trypsin could represent a specific and reliable diagnostic test of pancreatic function and its alteration (pancreatitis, pancreatic cancer, cystic fibrosis, etc) [157, 158]. It seems to be the most sensitive test for the diagnosis of acute pancreatitis (AP). The latter is considered as a major cause of morbidity and mortality worldwide [159, 160], including in Mexico [161].

The laboratory diagnosis of pancreatic disorders is commonly based on the determination of the levels of amylase, lipase, C-reactive protein, or cytokines in serum. Nevertheless, the severity of acute pancreatitis does not correlate well with the level of increase in serum amylase and lipase [162-163]. C-reactive protein is a useful predictor of PA after 48 hours of onset of symptoms, but not at the earlier stage [166-169]. The serum levels of cytokines are early indicators, but certain cytokines have shown low specificity as predictors of the disease severity [170]. Thus, the degradation of gelatin by trypsin is used as a simple semi-quantitative method for pancreatic disorders detection. However, such a test can not be easily calibrated. Therefore, for the quantitative trypsin activity determinations were suggested spectrophotometric and sensitive radioimmunoassay-based methods [171, 172]. Some others make use of Bragg reflector devices for measuring the change of temperature, pressure [173] and humidity [174], due to the action of trypsin on gelatin films. All these techniques are time consuming and require sophisticated laboratory equipment and trained personnel. Hence, faster, precise and simple tools and methods have to be developed. Such an alternative offer the biosensing devices. The holographic sensor of Millington *et al.* [175] is designed to register the change in color (wavelength) or brightness created when trypsin cleaves at peptide bonds adjacent to the arginine and lysine residues of gelatin and causes swelling of the hologram. Another technique to obtain a visually observable response is suggested by Chuang *et al.* [176]. They exploit the surface plasmon resonance wavelength shift of colloidal gold nanoparticles (AuNPs) when they aggregate. The AuNPs are modified with gelatin as a proteinase substrate and subsequently modified with 6-mercaptohexan-1-ol. After proteinase digestion, the AuNPs lose shelter, and gradually move closer to each other, to form aggregates. The AuNPs aggregation is monitored by the red shift of surface plasmon absorption and a visible color change of the AuNPs is from red to blue.

A simple, sensitive, and cost-effective piezoelectric sensor for trypsin activity determination is proposed by Zlatev *et al.* [177]. The change in frequency of an oscillating quartz crystal, due to the proteolytic digestion of the immobilized on its surface gelatin is recorded as a sensor response and is correlated to trypsin activity.

Only few electrochemical biosensors for trypsin activity determination are created until now. For instance, Zaccheo *et al.* [178] report a self-powered sensor for naked-eye detection of serum trypsin. It consists in a galvanic cell containing gelatin and Al barrier layers incorporated between the two half-cells. The degradation of the layers by trypsin and a hydroxide respectively closes the electrical circuit and a light-emitting diode signals the presence of trypsin. Assay time is ~ 3 h, and the limit of detection reached is $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

More sensitive and faster electrochemical sensors for trypsin activity determination are developed by Ionescu *et al.* [179, 180]. The disposable conductometric one is elaborated via the modification of microfabricated integrated gold electrodes by urease /BSA coating covered by a gelatin film. The proteolytic digestion of the gelatin film results in the increase of the conductometric response of the biosensor to urea, as a function of the trypsin concentration. The achieved detection limit is of 100 pg mL^{-1} (1 mU mL^{-1}) for 70 min of incubation time. In the second one, the proteolytic digestion of gelatin, conjugated with the glucose oxidase catalyzed glucose oxidation, and the registration of the current of oxidation of the produced H_2O_2 is used to construct an amperometric biosensor for trypsin determination. Glucose oxidase is immobilized into an inner polypyrrole layer, covered by a gelatin film. Low trypsin concentrations down to 42 pM (9.38 mU mL^{-1}) are detected with a response time of ~ 10 min.

Another electrochemical method for trypsin activity determination, combined with portable sensing system was recently developed by Baş *et al.* [181]. It is based on the registration of the cyclic voltammetric response of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ on gelatin coated ITO electrodes. The gelatin film behaves as a kinetic barrier and decreases the penetration of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, causing an increase of the irreversibility of the system. In contrast, gelatin digestion by trypsin results in an increase in the penetration of the electroactive specie, leading to a change in the reduction peak potential. The time based change in the reduction peak potential during the proteolytic digestion is proportional with the enzyme activity. Trypsin activity is determined in less than three minutes. The detection limit was found to be 2.7 U mL^{-1} .

Newly, a simple square wave voltammetric method allowing the rapid trypsin activity determination in the normal and acute pancreatitis range was proposed by Stoytcheva *et al.* [182]. The analysis is based on the 1,2-benzoquinone electrochemical reduction on gelatin coated disposable screen printed electrodes of low cost, suitable for point-of-care testing. The proteolytic digestion of the gelatin film facilitates the transport of the electroactive specie to the electrode surface (Fig. 3) and results in reduction peak current increase.

Current response as a function of trypsin concentration within 10 min of incubation time is evaluated in the range of 0.1 to $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ trypsin corresponding to enzyme activity in the range from 0.75 U mL^{-1} to 7500 U mL^{-1} , respectively. The limit of detection is determined to be as low as $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0.075 U mL^{-1}) trypsin after 140 min of incubation

time. The optimal hydrogel permeability defined by the concentration and the volume of the deposited gelatin solution (6% and 8 μL , respectively) is established performing preliminary experiments using a gelatin modified glassy carbon electrode of conventional type and applying factorial design approach.

A reagentless way for real-time detection of trypsin activities is reported by Yan Chen *et al.* [183], using a potentiometric biosensor. The method makes use of the trypsin-catalyzed degradation of protamine, which is released from the inner solution of a protamine-conditioned polycation-sensitive electrode. The hydrolysis catalyzed with

trypsin in the sample solution decreases the concentration of free protamine released at the sample-membrane interface. This facilitates the stripping of protamine out of the membrane surface via the ion-exchange process with sodium ions from the sample solution, thus decreasing the membrane potential, by which trypsin is sensed potentiometrically. Under optimum conditions, the proposed protamine-sensitive electrode is useful for continuous and reversible detection of trypsin over the concentration range of 0.5-5 U mL^{-1} with a detection limit of 0.3 U mL^{-1} .

Trypsin activity assaying electrochemical sensors are summarized in Table 3.

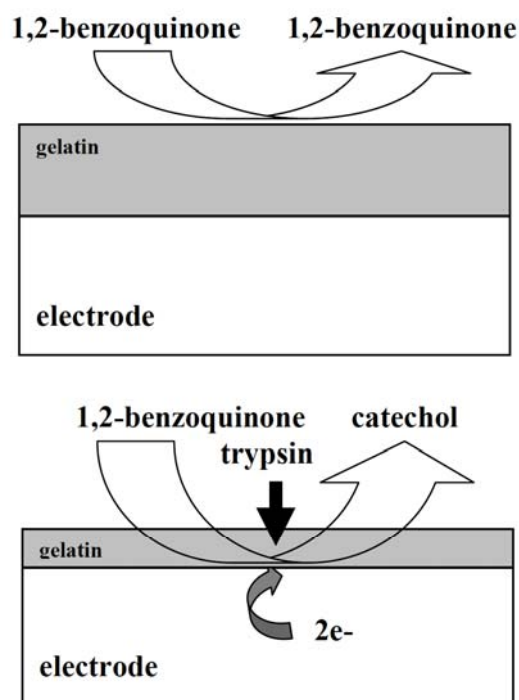


Fig. (3). Electrochemical sensor for trypsin activity determination [182]. The proteolytic gelatin digestion allows the transport of the electroactive specie to the electrode surface.

Table 3. Trypsin Activity Assaying Electrochemical Sensors

Detection Mode	Trypsin Substrat	Involved Reactions	Sensor Response	LOD	Reference
Galvanic cell	Gelatin	Hydroxide etching of an Al membrane $\text{Mg} \xrightarrow{\text{anode}} \text{Mg}^{2+} + 2\text{e}^-$ $\text{Fe}^{3+} + 3\text{e}^- \xrightarrow{\text{cathode}} \text{Fe}$	LED illumination	0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[178]
Conductometry	Gelatin	$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + 3\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{urease}} 2\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^- + \text{OH}^-$	Conductivity change	1×10^{-3} U mL^{-1}	[179]
Amperometry	Gelatin	$\beta\text{-D-glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{glu cos oxidase}} \text{D-gluconic acid} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{anode}} 2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$	Anodic current change	9.38×10^{-3} U mL^{-1}	[180]

(Table 3) contd....

Detection Mode	Trypsin Substrat	Involved Reactions	Sensor Response	LOD	Reference
Cyclic voltammetry	Gelatin	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + e \xrightarrow{\text{cathode}} \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	Reduction peak potential change	27 U mL ⁻¹	[181]
Square wave voltammetry	Gelatin	$1,2\text{-benzoquinone} + 2e^- + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{cathode}} \text{catechol}$	Cathodic current change	75×10^{-3} U mL ⁻¹	[182]
Potentiometry	Protamine	reagentless	Membrane potential change	0.3 U mL ⁻¹	[183]

CONCLUSIONS

Biosensors research targeting medical diagnostics is stimulated almost exclusively by the glucose-sensing market. Novel biosensors with clinical applications, however, could expand the field significantly. In this work are revised, apart of the current achievement and trends in glucose electrochemical biosensors, those of the less common electrochemical biosensors for cholinesterases and trypsin activity evaluation. It was demonstrated that this new generation analytical devices have the potential to improve routine methods in clinical analysis.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

ACKNOWLEDGEMENT

None declared.

REFERENCES

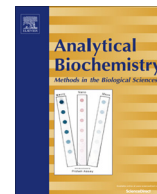
- Ridley, J. *Essential of Clinical Laboratory Science*, Delmar, Cengage Learning: New York, **2010**.
- Kost, G.J. *Principles & Practice of Point-of-Care Testing*, Lippincott Williams & Wilkins: Hagerstown, M.D. **2002**.
- Yager, P.; Domingo, G.J.; Gerdes, J. Point-of-care diagnostics for global health. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2008**, *10*, 107-144.
- Thusu, R. Analyst Briefing: Strategic Research and Development Offer New Perspective for the Biosensors Market, Frost & Sullivan, **2010**.
- Thevenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, **1999**, *71*, 2333-2348.
- Powel, L.W. In *Industrial Enzymology*; 2nd edition, Godfrey, T.; West, S., Eds.; Stockton Press; New York, **1996**; pp. 267-272.
- Newsholme, E.; Leech, A. *Functional Biochemistry in Health and Disease*, Wiley-Blackwell: Oxford, **2010**.
- Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, **2004**, *27*, 1047-53.
- Zarate, A. Diabetes Mellitus in Mexico. *Diabetes Care*, **1991**, *14*, 672-675.
- Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia report of a WHO/IDF consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland **2006**.
- Saifer, A.; Gerstenfeld, S. The photometric microdetermination of blood glucose with glucose oxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **1958**, *51*, 448-460.
- Barthelmai, W.; Czek, R. Enzymatische bestimmung der glucose in blut, liquor und harn. *Klin. Wochenschr.*, **1962**, *40*, 585-589.
- United States Department of Health, Education and Welfare, Food and Administration. *In Vitro Diagnostic Products for Human Use, Proposed Establishment of Glucose*. **1974**, Fed. Regist. 39, No. 126, 24136-24147.
- Turner A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S. *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press: Oxford, **1987**.
- Liu, J.; Wang, J. A novel improved design for the first-generation glucose biosensor. *Food Technol. Biotechnol.*, **2001**, *39*, 55-58.
- Wang, J. Electrochemical glucose biosensors. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 814-825.
- Yoo, E-H.; Lee, S-Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensor*, **2010**, *10*, 4558-4576.
- Newman, J.D.; Turner, A.P.F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, *20*, 2435-2453.
- Harper, A.; Anderson, M.A. Electrochemical glucose sensors-developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction. *Sensors*, **2010**, *10*, 8248-8274.
- Yamaoka, H.; Sode, K. A disposable electrochemical glucose sensor using catalytic subunit of novel thermostable glucose dehydrogenase. *The Open Biotechnology Journal*, **2007**, *1*, 26-30.
- Ferri, S.; Kojima, K.; Sode, K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose densing enzymes. *Journal of Diabetes Science and Technology*, **2011**, *5*, 1068-1076.
- Monošík, R.; Stred'anský, M.; Lušpai, K.; Magdolen, P.; Šturdíka, E. Amperometric glucose biosensor utilizing FAD-dependent glucosedehydrogenase immobilized on nanocomposite electrode. *Enzyme and Microbial Technology*, **2012**, *50*, 227-232.
- Zafar, M.N.; Beden, N.; Leech, D.; Sygmund, C.; Ludwig, R.; Gorton, L. Characterization of different FAD-dependent glucose dehydrogenases for possible use in glucose-based biosensors and biofuel cells. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *402*, 2069-2077.
- Kulys, J.; Samalius, G.; Svirmickas, G. Electron exchange between the enzyme active center and organic metal. *FEBS Lett.*, **1980**, *114*, 7-10.
- Kulys, J. Analytical Systems on the Basis of Immobilized Enzymes, Mokslas: Vilnius, **1981**.
- Čenas, N.K.; Kanapienienė, J.J.; Kulys, J.J. NADH oxidation by quinone electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, *767*, 108-112.
- Čenas, N.K.; Pocius, A.; Kulys, J.J. Electron exchange between flavin- and heme-containing enzymes and electrodes modified by redox polymers. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1983**, *11*, 61-73.
- Čenas, N.; Pocius, A.K.; Kulys, J. Bioelectrocatalytic conversion of substances on polymer-modified electrodes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1984**, *12*, 583-591.
- Albery, W.; Bartlett, P.; Cass, A.; Sim, K. Amperometric enzyme electrodes: Part IV. An enzyme electrode for ethanol. *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, *218*, 127-134.
- Albery, W.; Bartlett, P.; Bycroft, M.; Craston, D.; Driscoll, B. Amperometric enzyme electrodes: Part III. A conducting salt electrode for the oxidation of four different flavoenzymes. *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, *218*, 119-126.
- Albery, W.; Bartlett, P.; Craston, D. Amperometric enzyme electrodes: Part II. Conducting salts as electrode materials for the oxidation of glucose oxidase. *J. Electroanal. Chem.*, **1985**, *194*, 223-235.
- Albery, W.; Bartlett, P. Amperometric enzyme electrodes: Part I. Theory. *J. Electroanal. Chem.*, **1985**, *194*, 211-222.

- [33] Hill, B.; Scolari, C.; Wilson G.S. Enzyme electrocatalysis at organic salt electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **1988**, 252, 125-138.
- [34] Balasubramanian, K.; Burghard, M. Biosensors based on carbon nanotubes. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 385, 452-468.
- [35] Eftekhari, A. Nanostructured materials in electrochemistry, Wiley-VCH: Weinheim, **2008**.
- [36] Gorton, L. Biosensors and modern biospecific analytical techniques. Elsevier: Amsterdam, **2005**.
- [37] Guo, S.; Wang, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 598, 181-192.
- [38] Kerman, K.; Saito, M.; Yamamura, S.; Takamura Y.; Tamiya, E. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. *Trends Anal. Chem.*, **2008**, 27, 585-592.
- [39] Kumar, C. *Nanomaterials for biosensors*. Wiley-VCH: Weinheim, **2007**.
- [40] Luo, X.; Morrin, A.; Killard, A.; Smyth, M. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis*, **2006**, 18, 4, 319-326.
- [41] Merkoçi, A.; Alegret, S. Toward nanoanalytical chemistry. Case of nanomaterial integration into (bio)sensing systems. *Contributions to science*, **2005**, 3, 57-66.
- [42] Merkoçi, A. *Biosensing using nanomaterials*. Wiley: Hoboken, New Jersey, **2009**.
- [43] Pumera, M.; Sánchez, S.; Ichinose, I.; Tang, J. Electrochemical nanobiosensors. *Sensors Actuators B*, **2007**, 123, 1195-1205.
- [44] Zhang, X.; Guo, Q.; Cui, D. Recent Advances in nanotechnology applied to biosensors. *Sensors*, **2009**, 9, 1033-1053.
- [45] Huihui Li; Songqin Liu; Zhihui Dai; Jianchun Bao; Xiaodi Yang. Applications of nanomaterials in electrochemical enzyme biosensors. *Sensors*, **2009**, 9, 8547-8561.
- [46] Cash, K.J.; Clark, H.A. Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, **2010**, 16, 584-593.
- [47] Scida, K.; Stege, P.; Haby, G.; Messina, G.; Garcia, C. Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: Critical review. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 691, 6-17.
- [48] Siangproh, W.; Dunchai, W.; Rattananat, P.; Chailapakul, O. Nanoparticle-based electrochemical detection in conventional and miniaturized systems and their bioanalytical applications: A review. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 690, 10-25.
- [49] Vashist, S.K.; Zheng, D.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J.H.T.; Sheu, F-S. Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications. *Biotechnol. Advances*, **2011**, 29, 169-188.
- [50] Qiang, L.; Vaddiraju, S.; Patel, D.; Papadimitrakopoulos, F. Edge-plane microwire electrodes for highly sensitive H₂O₂ and glucose detection. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26, 3755-3760.
- [51] Wang, J.; Wang, L.; Di, J.; Tu, Y. Disposable biosensor based on immobilization of glucose oxidase at gold nanoparticles electrodeposited on indium tin oxide electrode. *Sensors and Actuators B*, **2008**, 135, 283-288.
- [52] Comba, F.N.; Rubianes, M.D.; Herrasti, P.; Rivas, G.A. Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing iron nanoparticles. *Sensors and Actuators B*, **2010**, 149, 306-309.
- [53] Lei, Y.; Yan, X.; Zhao, J.; Liu, X.; Song, Y.; Luo, N.; Zhang, Y. Improved glucose electrochemical biosensor by appropriate immobilization of nano-ZnO. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, 82, 168-172.
- [54] Fulati, A.; Usman Ali, S.M.; Asif, M.H.; Alvi, N.H.; Willander, M.; Brännmark, C.; Stralfors, P.; Börjesson, S.I.; Elinder, F.; Danielsson, B. An intracellular glucose biosensor based on nanoflake ZnO. *Sensors and Actuators B*, **2010**, 150, 673-680.
- [55] Kong, T.; Chen, Y.; Ye, Y.; Zhang, K.; Wang, Z.; Wang, X. An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the ZnO nanotubes. *Sensors and Actuators B*, **2009**, 138, 344-350.
- [56] Zhou, G.; Fung, K.K.; Wong, L.W.; Chen, Y.; Renneberg, R.; Yang, S. Immobilization of glucose oxidase on rod-like and vesicle-like mesoporous silica for enhancing current responses of glucose biosensors. *Talanta*, **2011**, 84, 659-665.
- [57] Zhang, Y.; Sun, X.; Zhu, L.; Shen, H.; Jia, N. Electrochemical sensing based on graphene oxide/Prussian blue hybrid film modified electrode. *Electrochim. Acta*, **2011**, 56, 1239-1245.
- [58] Salazar, P.; O'Neill, R.D.; Martín, M.; Roche, R.; González-Mora, J.L. Amperometric glucose microbiosensor based on a Prussian Blue modified carbon fiber electrode for physiological applications. *Sensors and Actuators B*, **2011**, 152, 137-143.
- [59] Salazar, P.; Martín, M.; Roche, R.; O'Neill, R.D.; González-Mora, J.L. Prussian Blue-modified microelectrodes for selective transduction in enzyme-based amperometric microbiosensors for *in vivo* neurochemical monitoring. *Electrochimica Acta*, **2010**, 55, 6476-6484.
- [60] Salazar, P.; Martín, M.; Roche, R.; González-Mora, J.L.; O'Neill, R.D. Microbiosensors for glucose based on Prussian Blue modified carbon fiber electrodes for *in vivo* monitoring in the central nervous system. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26, 748-753.
- [61] Gonçalves, V.R.; Matsubara, E.Y.; Rosolen, J.M.; Torresi, S.I.C. Micro/nanostructured carbon composite modified with a hybrid redox mediator and enzymes as a glucose biosensor. *Carbon*, **2011**, 49, 3039-3047.
- [62] Gao, Q.; Guo, Y.; Zhang, W.; Qi, H.; Zhang, C. An amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer GOx-SWCNT conjugate/redox polymer multilayer on a screen-printed carbon electrode. *Sensors and Actuators B*, **2011**, 153, 219-225.
- [63] Chen, M.; Xu, J-Q.; Ding, S-N.; Shan, D.; Xue, H-G.; Cosnier, S.; Holzinger, M. Poly(brilliant cresyl blue) electrogenerated on single-walled carbon nanotubes modified electrode and its application in mediated biosensing system. *Sensors and Actuators B*, **2011**, 152, 14-20.
- [64] Wang, W.; Wang, F.; Yao, Y.; Hu, S.; Shiu, K-K. Amperometric bienzyme glucose biosensor based on carbon nanotube modified electrode with electropolymerized poly(toluidine blue O) film. *Electrochim. Acta*, **2010**, 55, 7055-7060.
- [65] Saha, S.; Arya, S.K.; Singh, S.P.; Sreenivas, K.; Malhotra, B.D.; Gupta, V. PLD grown ZnO-K₃(Fe(CN)₆) composite thin film for biosensing application. *Thin Solid Films*, **2010**, 519, 1184-1186.
- [66] Che, X.; Yuan, R.; Chai, Y.; Li, J.; Song, Z.; Li, W.; Zhong, X. A glucose biosensor based on chitosan-Prussian blue-multiwall carbon nanotubes-hollow PtCo nanochains formed by one-step electrodeposition. *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, **2011**, 84, 454-461.
- [67] Zeng, Q.; Cheng, J-S.; Liu, X-F.; Bai, H-T.; Jiang, J-H. Palladium nanoparticle/chitosan-grafted graphene nanocomposites for construction of a glucose biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26, 3456-3463.
- [68] Li, W.; Yuan, R.; Chai, Y.; Zhong, H.; Wang, Y. Study of the biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and sugar-lectin biospecific interactions for the determination of glucose. *Electrochim. Acta*, **2011**, 56, 4203-4208.
- [69] Meng, Z.; Zheng, J.; Sheng, Q.; Zheng, X. In situ synthesis of thulium(III) hexacyanoferrate(II) nanoparticles and its application for glucose detection. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 689, 47-51.
- [70] Shi, W.; Ma, Z. Amperometric glucose biosensor based on a triangular silver nanoprisms/chitosan composite film as immobilization matrix. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26, 1098-1103.
- [71] Yang, H.; Zhu, Y.; Chen, D.; Li, C.; Chen, S.; Ge, Z. Electrochemical biosensing platforms using poly-cyclodextrin and carbon nanotube composite. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26, 295-298.
- [72] Tunçagil, S.; Ozdemir, C.; Demirkol, D.O.; Timur, S.; Toppare, L. Gold nanoparticle modified conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-yl) benzenamine for potential use as a biosensing material. *Food Chemistry*, **2011**, 127, 1317-1322.
- [73] Fu, G.; Yue, X.; Dai, Z. Glucose biosensor based on covalent immobilization of enzyme in sol-gel composite film combined with Prussian blue/carbon nanotubes hybrid. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26, 3973-3976.
- [74] Nenkova, R.; Ivanova, D.; Vladimirova, J.; Godjevargova, T. New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanocomposite film. *Sensors and Actuators B*, **2010**, 148, 59-65.
- [75] Jena, B.K.; Raj, C.R. Enzyme integrated silicate-Pt nanoparticle architecture: A versatile biosensing platform. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26, 2960-2966.
- [76] Gu, M.; Wang, J.; Tu, Y.; Di, J. Fabrication of reagentless glucose biosensors: A comparison of mono-enzyme GOD and bienzyme GOD-HRP systems. *Sensors and Actuators B*, **2010**, 148, 486-491.
- [77] Si, P.; Kannan, P.; Guo, L.; Son, H.; Kim, D-H. Highly stable and sensitive glucose biosensor based on covalently assembled high density Au nanostructures. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26, 3845-3851.

- [78] Kwon, K.W.; Yang, S.B.; Kong, B.-S.; Kim, J.; Jung, H.-T. High-performance biosensors based on enzyme precipitate coating in gold nanoparticle-conjugated single-walled carbon nanotube network films. *Carbon* **2010**, *48*, 4504-4509.
- [79] Wei, Y.; Li, Y.; Liu, X.; Xian, Y.; Shi, G.; Jin, L. ZnO nanorods/Au hybrid nanocomposites for glucose biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, *26*, 275-278.
- [80] Zhang, Z.; Xie, Y.; Liu, Z.; Rong, F.; Wang, Y.; Fu, D. Covalently immobilized biosensor based on gold nanoparticles modified TiO₂ nanotube arrays. *J. Electroanal. Chem.*, **2011**, *650*, 241-247.
- [81] Xu, Y.; Liu, X.; Ding, Y.; Luo, L.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Xu, Y. Preparation and electrochemical investigation of a nano-structured material Ni²⁺/MgFe layered double hydroxide as a glucose biosensor. *Applied Clay Science*, **2011**, *52*, 322-327.
- [82] Li, J.; Yuan, R.; Chai, Y.; Che, X. Fabrication of a novel glucose biosensor based on Pt nanoparticles-decorated iron oxide-multiwall carbon nanotubes magnetic composite. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2010**, *66*, 8-14.
- [83] Periasamy, A.P.; Chang, Y.-J.; Chen, S.-M. Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry* **2011**, *80*, 114-120.
- [84] Deng, C.; Chen, J.; Nieb, Z.; Si, S. A sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the multiwall carbon nanotube-modified electrode. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, *26*, 213-219.
- [85] Deng, S.Y.; Jian, G.Q.; Lei, J.P.; Hu, Z.; Ju, H.X. A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *25*, 373-377.
- [86] Tasviri, M.; Rafiee-Pour, H.-A.; Ghourchian, H.; Gholami, M.R. Amine functionalized TiO₂ coated on carbon nanotube as a nanomaterial for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose biosensing. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2011**, *68*, 206-210.
- [87] Wu, P.; Shao, Q.; Hu, Y.; Jin, J.; Yin, Y.; Zhang, H.; Cai, C. Direct electrochemistry of glucose oxidase assembled on graphene and application to glucose detection. *Electrochim. Acta*, **2010**, *55*, 8606-8614.
- [88] Zhang, Q.; Wu, S.; Zhang, L.; Lu, J.; Verproot, F.; Liu, Y.; Xing, Z.; Li, J.; Xi-Ming Song, X.-M.; Fabrication of polymeric ionic liquid/graphene nanocomposite for glucose oxidase immobilization and direct electrochemistry. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2632-2637.
- [89] Wang, K.; Liu, Q.; Guan, Q.-M.; Wu, J.; Li, H.-N.; Yan, J.-J. Enhanced direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose via synergy effect of graphene and CdS nanocrystals. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, *26*, 2252-2257.
- [90] Zhang, X.; Ju, H.; Wang, J. *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. Elsevier: Amsterdam, **2008**.
- [91] Gonsalves, K.E.; Laurencin, C.L.; Halberstadt, C.R.; Nair, L.S. *Biomedical Nanostructures*. Wiley, **2008**.
- [92] Wang, Y.; Xu, H.; Zhang, J.; Li, G. Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, **2008**, *8*, 2043-2081.
- [93] Justino, C.; Rocha-Santos, T.-A.; Duarte, A.C. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *Trends in Analytical Chemistry*, **2010**, *29*, 1172-1183.
- [94] Yang, L.; Xiong, H.; Zhang, X.; Wang, S.; Zhang, X. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon-coated nickel modified electrode. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, *26*, 3801-3805.
- [95] Wang, C.; Chen, S.; Xiang, Y.; Li, W.; Zhong, X.; Che, X.; Li, J. Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on Prussian blue-gold nanocomposite films. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2011**, *69*, 1-7.
- [96] Jiang, X.; Wu, Y.; Mao, X.; Cui, X.; Zhu, L. Amperometric glucose biosensor based on integration of glucose oxidase with platinum nanoparticles/ordered mesoporous carbon nanocomposite. *Sensors and Actuators B*, **2011**, *153*, 158-163.
- [97] Zheng, B.; Xie, S.; Qian, L.; Yuan, H.; Xiao, D.; Choi, M. Gold nanoparticles-coated eggshell membrane with immobilized glucose oxidase for fabrication of glucose biosensor. *Sensors and Actuators B*, **2011**, *152*, 49-55.
- [98] Wang, L.; Bai, J.; Bo, X.; Zhang, X.; Guo, L. A novel glucose sensor based on ordered mesoporous carbon-Au nanoparticles nanocomposites. *Talanta*, **2011**, *83*, 1386-1391.
- [99] Oztekin, Y.; Ramanaviciene, A.; Yazicigil, Z.; Solak, A.; Ramanavicius, A. Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on polyphenanthroline-modified glassy carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, *26*, 2541-2546.
- [100] Schomburg, D.; Schomburg, I.; Chang, A. *Springer handbook of enzymes*, Vol. 9, Springer: Berlin, **2003**.
- [101] Geula, C.; Mesulam, M.M. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **1995**, *9*, 23-28.
- [102] Podilchak, M.D. *Clinical Enzymology*. Zdorov'ya: Kiev, **1967**.
- [103] Hestrin, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxyl amine, and its analytical application. *J. Biol. Chem.*, **1949**, *180*, 249-261.
- [104] Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Feathersfow, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.
- [105] Michel, H.O. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.*, **1949**, *34*, 1564-1569.
- [106] Nenner, M. Gleichzeitige bestimmung der aktivität von acetylcholinesterase (EC 3.1 A.7.) in vollblut, plasma und erythrocyten mit dem automatischen titrator. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **1970**, *8*, 537-540.
- [107] Hanss, M.; Rey, A. Application de la conductimétrie à l'étude des réactions enzymatiques, butyrylcholinestérase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1971**, *227*, 618-629.
- [108] Gaballah, S. A direct radioisotopic microassay for cholinesterase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1968**, *129*, 376-380.
- [109] Guibault, G. *Enzymic Methods of Analysis*. Pergamon: Oxford, **1970**.
- [110] Miao, Y.; He, N.; Zhu, J.-J. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 5216-5234.
- [111] Tran-Minh, C. Immobilized enzyme probes for determining inhibitors. *Ion-Selective Electrode Rev.*, **1985**, *7*, 41-75.
- [112] Nikol'skaya, E.B.; Evtyugin, G.A. Cholinesterases application in analytical chemistry. *Zh. Anal. Khim.*, **1992**, *47*, 8, 1358-1378.
- [113] Alonso, G.; Istamboulie, G.; Ramirez-García, A.; Noguer, T.; Marty, J.-L.; Muñoz, R. Artificial neural network implementation in single low-cost chip for the detection of insecticides by modeling of screen-printed enzymatic sensors response. *Computers and Electronics in Agriculture*, **2010**, *74*, 223-229.
- [114] Law, K.; Higson, S. Sonochemically fabricated acetylcholinesterase micro-electrode arrays within a flow injection analyser for the determination of organophosphate pesticides. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, *20*, 1914-1924.
- [115] Hildebrandt, A.; Bragos, R.; Lacorte, S.; Marty, J.-L. Performance of a portable biosensor for the analysis of organophosphorus and carbamate insecticides in water and food. *Sensors and Actuators B*, **2008**, *133*, 195-201.
- [116] Ovallé, M.; Stoytcheva, M.; Zlatev, R.; Valdez, B. Electrochemical study of rat brain acetylcholinesterase inhibition by chlorofos: Kinetic aspects and analytical applications. *Electrochim. Acta*, **2009**, *55*, 516-520.
- [117] Martorell, D.; Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on a polishable, 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane-modified, graphite-epoxy biocomposite. *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *337*, 3, 305-313.
- [118] Marty, J.-L.; Mionetto, N.; Rouillon, R. Entrapped enzymes in photocrosslinkable gel for enzyme electrodes. *Anal. Lett.*, **1992**, *25*, 8, 1389-1398.
- [119] Marty, J.-L.; Mionetto, N.; Noguer, T.; Ortega, F.; Roux, C. Enzyme sensors for the detection of pesticides. *Biosens. Bioelectron.*, **1993**, *8*, 273-280.
- [120] Marty, J.-L.; Mionetto, N.; Lacorte, S.; Barceló, D. Validation of an enzymatic biosensor with various liquid chromatographic techniques for determining organophosphorus pesticides and carbaryl in freeze-dried waters. *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *311*, 265-271.
- [121] Sužnjević, D.Ž.; Veselinović, D.S.; Vukelić, N.S.; Pavlović, D.Ž.; Nikolić, A.V. Investigation of the system butyrylthiocholineiodide-butyrocholinesterase by cyclic voltammetry and chronopotentiometry using inert working electrodes. *J. Serb. Chem. Soc.*, **1985**, *50*, 83-88.

- [122] Turdean, G.; Popescu, I.C.; Oniciu, L. Biocapteurs ampérométriques à cholinestéras pour la détermination des pesticides organophosphorés. *Can. J. Chem.*, **2002**, *80*, 315-331.
- [123] Andreescu, S.; Marty, J.-L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomol. Eng.*, **2006**, *23*, 1-15.
- [124] Anzai, J. Use of biosensors for detecting organophosphorus agents. *Yakugaku Zasshi*, **2006**, *126*, 1301-1308.
- [125] Jaffrezic-Renault, N. New trends in biosensors for organophosphorus pesticides. *Sensors*, **2001**, *1*, 60-64.
- [126] Noguer, T.; Leca, B.; Jeanty, G.; Marty, J.-L. Biosensors based on enzyme inhibition: Detection of organophosphorus and carbamate insecticides and dithiocarbamate fungicides. *Field Anal. Chem. Technol.*, **1999**, *3*, 171-178.
- [127] Prieto-Simón, B.; Campàs, M.; Andreescu, S.; Marty, J.-L. Trends in flow-based biosensing systems for pesticide assessment. *Sensors*, **2006**, *6*, 1161-1186.
- [128] Rodríguez-Mozaz, S.; Marco, M.-P.; Lopez de Alda M. J.; Barceló, D. Biosensors for environmental applications: future development trends. *Pure Appl. Chem.*, **2004**, *76*, 723-752.
- [129] Solé, S.; Merkoçi, A.; Alegret, S. Determination of toxic substances based on enzyme inhibition. Part I. Electrochemical biosensors for the determination of pesticides using batch procedures. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2003**, *33*, 89-126.
- [130] Solé, S.; Merkoçi, A.; Alegret, S. Determination of toxic substances based on enzyme inhibition. Part I. Electrochemical biosensors for the determination of pesticides using flow procedures. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2003**, *33*, 127-143.
- [131] Turdean, G.; Popescu, I.C.; Oniciu, L. Biocapteurs ampérométriques à cholinestéras pour la détermination des pesticides organophosphorés. *Can. J. Chem.*, **2002**, *80*, 315-331.
- [132] Periasamy, A.P.; Umasankar Y.; Chen S.-M. Nanomaterials-acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical biosensors: a review. *Sensors*, **2009**, *9*, 4034-4055.
- [133] Campàs, M.; Prieto-Simón, B.; Marty J.-L. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **2009**, 3-9.
- [134] Lambrianou, A.; Demin, S.; Hall, E. In *Biosensing for the 21st century*; Scheper, T., Series Ed., Renneberg, R.; Lisdat, F., Volume Eds., Springer: Berlin/Heidelberg, **2008**; vol. 109, pp. 65-96.
- [135] Bachmann, T.; Schmid, R. A disposable multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *401*, 95-103.
- [136] Bucur, B.; Dondoi, M.; Danet, A.; Marty, J.-L. Insecticide identification using a flow injection analysis system with biosensors based on various cholinesterases. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *539*, 195-201.
- [137] Marques, P.; Nunes, G.S.; Rodrigues dos Santos, T.C.; Andreescu, S.; Marty, J.-L. Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster*: Application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, *20*, 825-832.
- [138] Nunes, G. S.; Montesinos, T.; Marques, P.; Fournier, D.; Marty, J.-L. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide: Evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster*. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *434*, 1-8.
- [139] Valdés-Ramírez, G.; Fournier, D.; Ramírez-Silva, M.T.; Marty, J.-L. Sensitive amperometric biosensor for dichlorvos quantification: Application to detection of residues on apple skin. *Talanta*, **2008**, *74*, 741-746.
- [140] Sotiropoulou, S.; Fournier, D.; Chaniotakis, N. Genetically engineered acetylcholinesterase-based biosensor for attomolar detection of dichlorvos. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, *20*, 2347-2352.
- [141] Palleschi, G.; Lavagnini, M.; Moscone, D.; Pilloton, R.; D'Ottavio, D.; Evangelisti, M. Determination of serum cholinesterase activity and dibucaine numbers by an amperometric choline sensor. *Biosens. Bioelectron.*, **1990**, *5*, 27-35.
- [142] Morelis, R.; Coulet, P.; Simplot, A.; Boisson, C.; Guibaud, G. Rapid and sensitive discriminating determination of acetylcholinesterase activity in amniotic fluid with a choline sensor. *Clin. Chim. Acta*, **1991**, *203*, 295-303.
- [143] Sigolaeva, L.; Makhaeva, G.; Rudakova, E.; Boltneva, N.; Porus, M.; Dubacheva, G.; Eremenko, A.; Kurochkin, I.; Richardson, R. Biosensor analysis of blood esterases for organophosphorus compounds exposure assessment: approaches to simultaneous determination of several esterases. *Chemico-Biological Interactions*, **2010**, *187*, 312-317.
- [144] Hsieh, B.-C.; Hsiao, H.-Y.; Cheng, T.-J.; Chen, R. Assays for serum cholinesterase activity by capillary electrophoresis and an amperometric flow injection choline biosensor. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, *623*, 157-162.
- [145] Stoytcheva, M.; Zlatev, R.; Valdez, B.; Magnin, J.-P.; Velkova, Z. Electrochemical sensor based on *Arthrobacter globiformis* for cholinesterase activity determination. *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, *22*, 1-9.
- [146] Stoytcheva, M.; Zlatev, R. Bioelectrocatalytic studies on the effects of some pharmaceuticals on the acetylcholinesterase activity. *Electroanalysis*, **1996**, *8*, 676-679.
- [147] Stoytcheva, M.; Sharkova, V.; Magnin, J.-P. Electrochemical approach in studying the inactivation of immobilized acetylcholinesterase by arsenate(III). *Electroanalysis*, **1998**, *10*, 994-998.
- [148] Stoytcheva, M.; Sharkova, V. kinetics of the inhibition of the immobilized acetylcholinesterase with Hg(II). *Electroanalysis*, **2002**, *14*, 1007-1010.
- [149] Stoytcheva, M. Electrochemical evaluation of the kinetic parameters of a heterogeneous enzyme reaction in presence of metal ions. *Electroanalysis*, **2002**, *14*, 923-927.
- [150] Ovalle, M.; Stoytcheva, M.; Zlatev, R.; Valdez, B.; Velkova, Z. Electrochemical study on the type of immobilized acetylcholinesterase inhibition by sodium fluoride. *Electrochim. Acta*, **2008**, *53*, 6344-6350.
- [151] Ovalle, M.; Stoytcheva, M.; Zlatev, R.; Valdez, B. Electrochemical study of rat brain acetylcholinesterase inhibition by chloroform: Kinetic aspects and analytical applications. *Electrochim. Acta*, **2009**, *55*, 516-520.
- [152] Stoytcheva, M.; Zlatev, R.; Velkova, Z.; Valdez, B.; Ovalle, M. Electrochemical study on the kinetic behavior of the immobilized acetylcholinesterase. *ECS Transactions*, **2009**, *20*, 175-184.
- [153] Du, D.; Chen, S.; Cai, J.; Song, D. Comparison of drug sensitivity using acetylcholinesterase biosensor based on nanoparticles-chitosan sol-gel composite. *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, *611*, 60-66.
- [154] Lenigk, R.; Lam, E.; Lai, A.; Wang, H.; Han, Y.; Carlier, P.; Renneberg, R. Enzyme biosensor for studying therapeutics of Alzheimer's disease. *Biosens. Bioelectron.*, **2000**, *15*, 541-547.
- [155] Rawlings, N.; Barrett, A. Families of serine peptidases. *Meth. Enzymol.*, **1994**, *244*, 19-61.
- [156] Keil, B. In *The Enzymes*; 3rd ed., Boyer, P., Ed.; Academic Press: New York, **1971**; Vol. III, pp. 250-275.
- [157] Heinrich, H.; Gabbe, E.; Ičlagic, F. Enteropancreatic circulation of trypsin in man. *J. Mol. Medicine*, **1979**, *57*, 1237-1238.
- [158] Artigas, J.; Garcia, M.; Faure, M.; Gimeno, A. Serum trypsin levels in acute pancreatic and non-pancreatic abdominal conditions. *Postgrad. Med. J.*, **1981**, *57*, 219-22.
- [159] Foitzik, T.; Klar, E.; Buhr, H.; Herfarth, C. Improved survival in acute necrotizing pancreatitis despite limiting the indications for surgical debridement. *Eur. J. Surg.*, **1995**, *16*, 187-92.
- [160] Tenner, S.; Sica, G.; Hughes, M.; Noordhoek, E.; Feng, S.; Zinner, M.; Bankset, P. Relationship of necrosis to organ failure in severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*, **1997**, *113*, 899-903.
- [161] Sánchez-Lozada, R.; Camacho-Hernández, M.; Vega-Chavaje, R.; Garza Flores, J.; Campos-Castillo, C.; Gutiérrez-Vega, R. Pancreatitis aguda: Experiencia de cinco años en el Hospital General de México. *Gac. Méd. Méx.*, **2005**, *141*, 123-127.
- [162] Pezilli, R.; Billi, P.; Miglioli, M.; Gullo, L. Serum amylase and lipase concentrations and lipase/amylase ratio in assessment of etiology and severity of acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.*, **1993**, *38*, 1265-1269.
- [163] Clavien, P.-A.; Robert, J.; Meyer, P.; Borst, F.; Hauser, H. Acute pancreatitis and normoamylasemia. Not an uncommon combination. *Ann. Surg.*, **1989**, *210*, 614-620.
- [164] Kazmierczak, S.; Van Lente, F.; Hodges, E. Diagnostic and prognostic utility of phospholipase A activity in patients with acute pancreatitis: Comparison with amylase and lipase. *Clin. Chem.*, **1991**, *37*, 356-360.

- [165] Lankisch, P.; Pflichthofer, D.; Lehnick, D. Acute pancreatitis: which patient is most at risk? *Pancreas*, **1999**, *19*, 321-324.
- [166] Neoptolemos, J.; Kemppainen, E.; Mayer, J.; Fitzpatrick, J.; Raraty, M.; Slavin, J.; Beger, H.; Hietaranta, A.; Puolakkainen, P. Early prediction of severity in acute pancreatitis by urinary trypsinogen activation peptide: a multicentre study. *Lancet*, **2000**, *355*, 1955-60.
- [167] Paajanen, H.; Laato, M.; Jaakkola, M.; Pulkki, K.; Niinikoski, J.; Nordback, I. Serum tumor necrosis factor compared with C-reactive protein in the early assessment of severity in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.*, **1995**, *82*, 271-273.
- [168] Clavien, P.-A.; Burgan, S.; Moossa, A. Serum enzymes and other laboratory tests in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.*, **1989**, *76*, 1234-1243.
- [169] Kylänpää-Bäck, M.-L.; Takala, A.; Kemppainen, E.; Puolakkainen, P.; Leppäniemi, A.; Karonen, S.-L.; Orpana, A.; Haapiainen, R. K.; Repo, H. Procalcitonin, soluble interleukin-2 receptor, and soluble E-selectin in predicting the severity of acute pancreatitis. *Crit. Care Med.*, **2001**, *29*, 63-69.
- [170] De Beaux, A.; Goldie, A.; Ross, J.A.; Carter, D.C.; Fearon, K.C. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **1996**, *83*, 349-53.
- [171] Temler, R.; Felber, J.-P. Radioimmunoassay of human plasma trypsin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *445*, 720-728.
- [172] Schwert, G.; Takenaka, Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1955**, *16*, 570-575.
- [173] Kersey, A.; Berkoff, T.; Morey, W. Multiplexed fiber Bragg grating strain-sensor system with a fiber Fabry-Perot wavelength filter. *Opt. Lett.*, **1993**, *18*, 1370-1372.
- [174] Spooncer, R.; Al-Ramadhan, F.; Jones, B. A humidity sensor using a wavelength-dependent holographic filter with fibre-optic links. *Int. J. Optoelectron.*, **1992**, *7*, 449-452.
- [175] Millington, R.; Mayes, A.; Blyth, J.; Lowe, C. A holographic sensor for proteases. *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 4229-4233.
- [176] Chuang, Y.-C.; Li, J.-C.; Chen, S.-H.; Liu, T.-Y.; Kuo, C.-H.; Huang, W.-T.; Lin, C.-S. An optical biosensing platform for proteinase activity using gold nanoparticles. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 6087-6095.
- [177] Zlatev, R.; Stoytcheva, M.; Valdes, B. BG Patent pending, Appl. No: 110 666/31.05.2010; MEX Patent pending, Appl. No: MX/E/2010/068700
- [178] Zaccheo, B.; Crooks, R. Self-Powered Sensor for Naked-Eye Detection of Serum Trypsin. *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 1185-1188.
- [179] Ionescu, R.; Fillit, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Cosnier, S. Urease-gelatin interdigitated microelectrodes for the conductometric determination of protease activity. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, *24*, 489-492.
- [180] Ionescu, R.; Cosnier, S.; Marks, S. Protease amperometric sensor. *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 6327-6331.
- [181] Baş, D.; Boyacı, I.H. Rapid method for quantitative determination of proteolytic activity with cyclic voltammetry. *Electroanalysis*, **2010**, *22*, 265-267.
- [182] Stoytcheva, M.; Zlatev, R.; Cosnier, S.; Arredondo, M. Square wave voltammetric determination of trypsin activity. *Electrochimica Acta* (accepted).
- [183] Yan Chen, Jiawang Ding, Wei Qin. Potentiometric determination of trypsin using a polymeric membrane polycation-sensitive electrode based on current-controlled reagent delivery. *Bioelectrochemistry*, (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.04.002>.



Detection of glycoalkaloids using disposable biosensors based on genetically modified enzymes



Michelle Arredondo Espinoza^a, Georges Istamboulie^{b,*}, Ana Chira^c, Thierry Noguer^b, Margarita Stoytcheva^a, Jean-Louis Marty^b

^a Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, California Calle de la Normal S/N, Blvd. Benito Juárez, CP 211000 Mexicali, B.C., Mexico

^b Université de Perpignan Via Domitia, IMAGES EA4218, Building S, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

^c National Institute of Research and Development for Biological Sciences, Centre of Bioanalysis, 296, Splaiul Independentei, Bucharest 060031, Romania

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2013

Received in revised form 26 February 2014

Accepted 5 April 2014

Available online 18 April 2014

Keywords:

Glycoalkaloids

Acetylcholinesterase

Butyrylcholinesterase

Biosensors

ANNs

ABSTRACT

In this work we present a rapid, selective, and highly sensitive detection of α -solanine and α -chaconine using cholinesterase-based sensors. The high sensitivity of the devices is brought by the use of a genetically modified acetylcholinesterase (AChE), combined with a one-step detection method based on the measurement of inhibition slope. The selectivity was obtained by using butyrylcholinesterase (BChE), an enzyme able to detect these two toxins with differential inhibition kinetics. The enzymes were immobilized via entrapment in PVA-AWP polymer directly on the working electrode surface. The analysis of the resulting inhibition slope was performed employing linear regression function included in Matlab. The high toxicity of α -chaconine compared to α -solanine due to a better affinity to the active site was proved. The inhibition of glycoalkaloids (GAs) mixture was performed over AChE enzyme wild-type AChE and BChE biosensors resulting in the detection of synergism effect. The developed method allows the detection of (GAs) at 50 ppb in potato matrix.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Potatoes contain natural protective substances against diseases and pathogen infestation, known as glycoalkaloids (GAs)¹ [1]. GAs are considered as the main cause of potatoes bitter taste [2], and α -chaconine and α -solanine are the predominant glycoalkaloids [3]. They have been extensively studied because of their neurotoxic effects in humans and animals [4], and are related to cholinesterase (ChE) inhibition (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase) [5]. The toxicity mechanism [6], described in the literature, proceeds in a two-step pathway: primary phospholipid membrane disruption [7] and subsequent AChE inhibition [8], leading to neurological disorders [5]. Some toxicity symptoms, which normally appear between 8 and 12 h after ingestion, involve headaches, dizziness, and gastrointestinal disorders; severe cases exhibit apathy, trembling, stupor

and visual disturbances, hallucination, convulsion, partial paralysis, coma, and death [9,10]. The general safety level has been established at 200 mg/kg of fresh tubers [9]. A bitter burning sensation and metallic aftertaste are characteristics for GA concentrations ranging from 200 to 300 mg/kg [11–13]. The α -chaconine toxicity has been reported to be three times higher than that of α -solanine [14]. The synergistic effect of α -chaconine and α -solanine mixtures was reported as a real and potentially important phenomenon [15,16]. Recently GA inhibition has been described as reversible, competitive, and slightly antagonist [17]. Most cholinesterase-based biosensors developed can be used as detectors of GAs; they have been characterized as fast, low-cost, reliable, and effective tools. The predominant cholinesterases are acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). AChE (EC 3.1.1.7) is mainly responsible for the hydrolysis of neurotransmitter acetylcholine (ACh) at cholinergic synapses [18]; it is abundant in brain, muscle, and erythrocyte membrane [19]. Conversely, BChE (EC 3.1.1.8) has been considered as an “unspecific cholinesterase”; various studies suggested that it is implicated in diverse functions such as hydrolysis of ester-containing drugs and scavenging of nerve agents like organophosphates (OPs), hindering synaptic binding [20]. BChE is likely found in liver, intestine, heart, kidney, and lung [21].

* Corresponding author. Fax: +33 468662223.

E-mail addresses: Michelle.arredondo@uabc.edu.mx (M.A. Espinoza), gistamboulie@yahoo.fr (G. Istamboulie), ana_chira@yahoo.com (A. Chira), noguer@univ-perp.fr (T. Noguer), margarita@uabc.edu.mx (M. Stoytcheva), jlmarty@univ-perp.fr (J.-L. Marty).

¹ Abbreviations used: ChEs, cholinesterases; AChE, acetylcholinesterase; AChE-B131, recombinant acetylcholinesterase (from *Drosophila melanogaster*); BChE, butyrylcholinesterase; ATCh, acetylthiocholine chloride; BTCh, butyrylthiocholine chloride; PVA-AWP, poly(vinyl alcohol)-based photopolymer; GAs, glycoalkaloids; OP, organophosphates; ANNs, artificial neural network.

Chromatographic techniques such as gas chromatography or HPLC have been shown to be suitable for the detection of GAs [22], but they suffer from long analysis times, and require separation/preconcentration steps. Chemical sensors [23] and biosensors [24] have been described for many years as being good candidates as substitutive or complementary tools to these conventional methods, as they can provide qualitative information about the composition of food samples with minimum preparation.

To date, several cholinesterase-based sensors have been described to detect toxins in water and food, for the control of OPs [24], carbamates [25], mycotoxins [26], heavy metals [27], and glycoalkaloids [28]. The approach of this study was to use a cholinesterase-based sensor to clarify, evaluate, determine, and describe AChE inhibition by mixtures of GAs.

Materials and methods

Chemicals and stock solutions

Both glycoalkaloid GAs are from potato sprouts and purchased at analytical degree: α -solanine, $\geq 95\%$ (Sigma Aldrich), and α -chaconine $\geq 98\%$ (Carl Roth). The 1 mM GA solutions were prepared in 5 mM acid acetic and stored under dark conditions at 4 °C. Genetically modified AChE B-131 from *Drosophila melanogaster* was produced by the Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM) (Montpellier, France). In this enzyme, the C terminal hydrophobic peptide was replaced by a glycolipidic anchor, allowing a better solubility, and the hydrophilic fragment K141-N174 was replaced by a 3-histidine tail, allowing its purification by nickel affinity (CRBM).

Butyrylcholinesterase (BChE) from horse serum was purchased from Sigma Aldrich.

Before immobilization, enzymatic activities were spectrophotometrically measured using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB-Ellman's reagent) provided by Sigma. The substrates acetylthiocholine chloride (ATCh) and butyrylthiocholine (BTCh) were purchased from Sigma. A 0.1 M ATCh stock solution was daily prepared in 0.9% NaCl and stored at 4 °C.

Graphite (Electrodag 423SS) and silver/silver chloride (Electrodag 418SS) pastes were obtained from Acheson (Plymouth, UK). Cobalt phthalocyanine-modified carbon paste was purchased from Gwent Electronic Materials, Ltd. (Gwent, UK). Poly(vinyl)chloride (PVC) sheets (200 × 100 × 0.5 mm), supplied by SKK (Denzingen, Germany), were used as support for the screen-printed electrodes. A glycerophthalic paint (Astral, France) was used as insulating layer. The photocrosslinkable polymer poly(vinyl alcohol) PVA-AWP (Toyo Gosei, Japan) was used for immobilization of enzymes.

Screen-printed three-electrode systems with cobalt-phthalocyanine-modified carbon as working electrode, graphite as counter-electrode, and Ag/AgCl as reference electrode, were fabricated using a DEK248 screen-printing system (Weymouth, UK).

Biosensor preparation

The immobilization of enzymes was performed by physical entrapment in a poly(vinyl alcohol)-based photopolymer (AWP). The AWP polymer was mixed with enzymatic solution at a ratio of 70:30% (v/v). The mixture was vortex-mixed and briefly centrifuged to eliminate the foam. A volume of 3 μ L was then spread onto the working electrode using a micropipette. The concentration of the initial AChE solution was adjusted in order to obtain a final enzyme loading of 1 mU/biosensor. The electrodes were then exposed for 3 h under a neon lamp (15 W) at 4 °C to carry out photopolymerization and were ready to use after drying for 48 h at 4 °C [29].

Procedures

The activity of ChEs immobilized on the electrodes was determined by electrochemical monitoring of the thiocholine formed on enzymatic hydrolysis of ATCh and BTCh. Amperometric measurements were performed using an electrochemical analyzer (Potentiostat – Galvanostat PG581, Uniscan, UK). The program of the artificial neural network (ANN) was written in MATLAB 2009a 7.8v using the neural networks toolbox 6.0.2v (MathWorks, USA).

The present work is focused on the on-line measurement of this rate to determine the affinities of two GAs and resolve complex samples. The amperometric measurements were carried out as follows: the biosensor was vertically inserted into an analytical cell containing phosphate buffer under constant magnetic stirring at constant temperature (30 °C) and an applied potential of +100 mV vs Ag/AgCl.

The GAs detection was first made in a three-step procedure as follows: First, the initial response of the electrode at the injection of the ATCh (0.5 mM) was recorded in duplicate, then the electrode was incubated in a solution containing a known concentration of GAs for 2 min, and finally the residual response of the electrode in the presence of GAs and ATCh was recorded again. The percentage of inhibition was correlated with the insecticide concentration.

In a second time, a one-step inhibition method was used to determine mixtures of α -solanine and α -chaconine: The initial response of the electrode at the injection of the ATCh (0.5 mM) was recorded and GA solution was added at the steady state. The inhibition was then quantified by measuring the slope of signal decrease, as described in a previous work [29] (see Fig. 1). All measurements were repeated at least 3 times, and the average inhibition was recorded with standard deviation.

The analysis of the inhibition data was performed by using the linear regression function included in Matlab. This function is capable of fitting any equation to a set of experimental data. In this work the following equation was used to model the inhibitory response from the enzymatic biosensor: $y(t) = -m_i t + b$, where $y(t)$ (nA/s) is the activity of the enzyme through the time, m_i is the slope of inhibition by interactions between GAs and enzyme, b is the intersection point.

The mixtures of the two inhibitors were performed by factorial design [30].

ANN modeling

It is important to note that for single inhibitions, m_i has enough information to detect and discriminate GAs inhibitors, but when a complex mixture is being tested, m_i is the result of the interaction of all affinities of the glycoalkaloids involved into the mixture. m_i contains complex information, which cannot be discriminated or modeled by linear equations. An artificial neural network was used to model the combined response of the GAs studied.

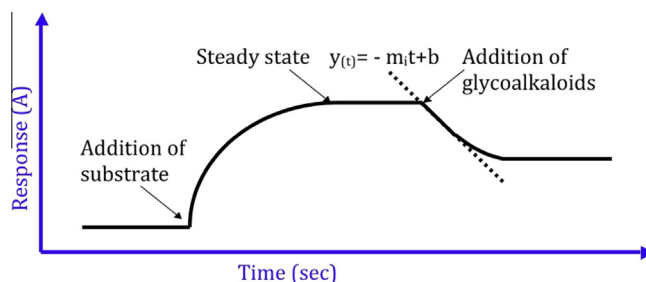


Fig. 1. Scheme of the protocol used for one-step measurement of ChE inhibition by α -chaconine and α -solanine.

The mixed response to α -solanine and α -chaconine was measured by two biosensors; to carry out this, a total of 33 mixed solutions were prepared. From these mixtures, a set of 25 solutions randomly chosen was used as training patron and 8 mixtures as a test set. The concentration ranges were chosen according to the quantification range of each inhibitor.

Results and discussion

Spectrophotometric studies of AChE-B131 activity in the presence of GAs

In order to classify the GAs inhibition as competitive, noncompetitive, or uncompetitive, it is essential to carry out single inhibitions. We studied the kinetics of AChE hydrolysis in the presence of different fixed concentrations of α -solanine and α -chaconine. Assays were performed by spectrophotometry under room conditions to determine the relationship between substrate

concentrations in the absence and presence of two GA concentrations (Fig. 2).

As clearly shown on the Lineweaver–Burk representation ($1/v$ versus $1/[S]$, Fig. 2), a decrease of maximum rates was observed in the presence of 0.5 and 1 μ M GAs ($V_{m0} = 0.50 \text{ AU min}^{-1}$, $V_{mapp(0.5 \mu\text{M})} = 0.29 \text{ AU min}^{-1}$, and $V_{mapp(1 \mu\text{M})} = 0.16 \text{ AU min}^{-1}$), as well as an increase of apparent Michaelis constants α -chaconine ($K_M = 10 \mu\text{M}$, $K_{Mapp(0.5 \mu\text{M})} = 19 \mu\text{M}$, and $K_{Mapp(1 \mu\text{M})} = 32 \mu\text{M}$) and in the presence of 0.5 and 1 μ M α -solanine ($K_m = 10 \mu\text{M}$, $K_{mapp(0.5 \mu\text{M})} = K_{mapp(1 \mu\text{M})} = 2.2 \mu\text{M}$).

These results are characteristic of a mixed-type inhibition; additionally a total inhibition was observed for a GA concentration of 50 μ M.

Cholinesterases-based sensors

The literature describing in detail the kinetics of GAs inhibition is limited. The assays development for feature inhibition kinetics

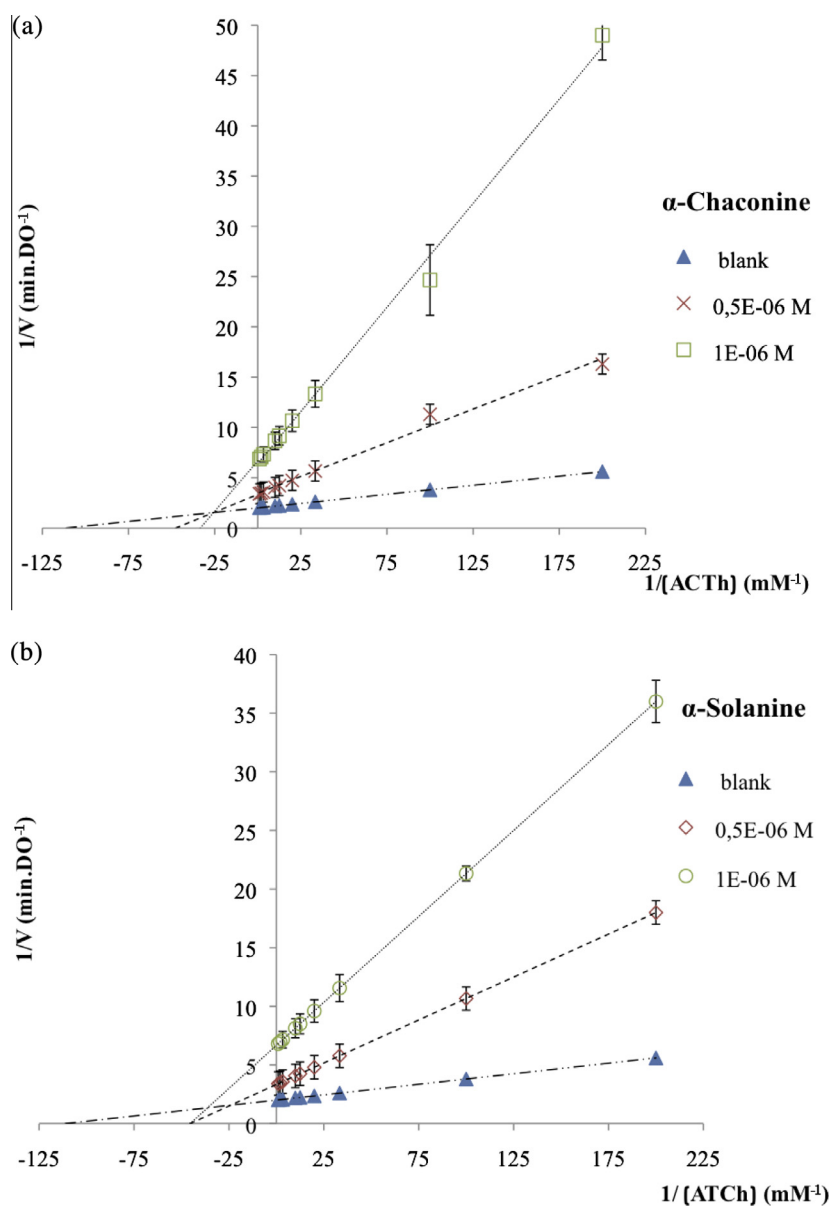


Fig. 2. Lineweaver–Burk plots of AChE-B131 inhibition by α -chaconine (a) and α -solanine (b). Experimental procedure: 300 μ L of 2.5×10^{-3} M DTNB and 100 μ L of (0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 3, 5, and 10 mM) ATCh were added to 500 μ L of 0.1 M phosphate buffer at pH 7, an enzyme-GAs solution containing 0.367 U L^{-1} of AChE-B131, incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ in a temperature-controlled bath were taken at a fixed time interval (2 min); inhibitor concentrations tested: 0, 0.5, 1 μ M.

was performed to establish the reversibility or irreversibility of inhibition. Experiments were realized by amperometric techniques using the cholinesterase-based biosensor previously described [29]. The operational stability of immobilized AChE-B131 was estimated by successively measuring the response of the same enzyme electrode to 0.5 mM ATCh, at 100 mV vs Ag/AgCl. The sensors were washed between tests with distilled water. The biosensors were shown to be stable for at least 10 consecutive measurements and presented a good reproducibility with a signal maximum variation of 5%. The recovered response of inhibited biosensor after rinsing with distilled water was 100%. The average response to 0.5 mM ATCh for $n = 5$ electrodes prepared in the same experimental conditions was 215 ± 11 nA. These reproducibility data refer to the mean value of 10 assays for each electrode.

In order to study the effect of GAs on immobilized enzyme, the inhibition rate of the AChE-B131-based sensor was studied using 20 μ M α -chaconine and 5 different concentrations of ATCh (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 mM). The biosensors were washed by distilled water after each inhibition measurement, and they were reused for at least 5 times.

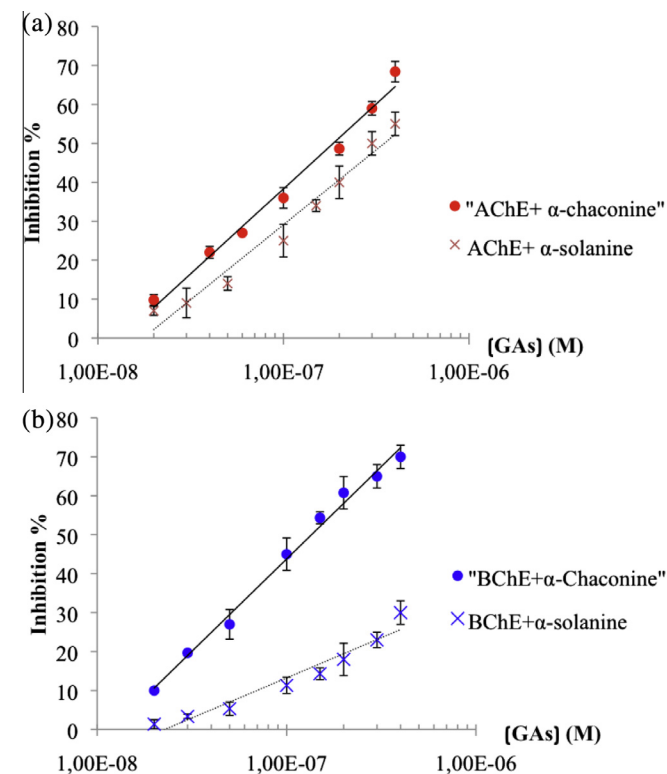


Fig. 3. Inhibition effect of α -chaconine [●] and α -solanine [×] on AChE-B131-based sensor in presence of 0.5 mM ATCh [a]; and BChE-based sensor in presence of 0.5 mM BTCh [b]. Incubation time 2 min. Regression equations: [a●] $y = 18.94 \ln(x) + 343.6$; $r^2 = 0.987$, [a×] $y = 16.72 \ln(x) + 298.52$; $r^2 = 0.97$, [b●] $y = 20.59 \ln(x) + 375.61$; $r^2 = 0.992$, [b×] $y = 8.95 \ln(x) + 157.58$; $r^2 = 0.94$.

Table 1
Inhibition rates of ChE-based sensors measured in presence of 0.5 M of substrate after 2 min incubation with each GA at different concentrations, and with their corresponding mixtures.

	α -Chaconine (M)	Inhibition rate %	α -Solanine (M)	Inhibition rate %	Inhibition rate % (Mixture)
AChE-B131	9.0E-08	36.3 \pm 3.7	9.0E-08	27.3 \pm 2.8	40.4 \pm 6.5
	1.5E-07	46.0 \pm 3.5	1.5E-07	35.8 \pm 3.7	48.7 \pm 5.7
	3.5E-07	62.0 \pm 1.6	3.5E-07	50.0 \pm 2.6	65.4 \pm 2.9
BChE	9.0E-08	41.6 \pm 4.3	9.0E-08	12.3 \pm 1.4	40.5 \pm 5.2
	1.5E-07	52.1 \pm 3.7	1.5E-07	16.8 \pm 3.7	53.3 \pm 4.6
	3.5E-07	69.5 \pm 2.7	3.5E-07	24.4 \pm 4.2	70.7 \pm 3.6

The results demonstrate the reversibility as well as the high reproducibility of inhibition. The average inhibition rate was about 69% ($\sigma = 1.60$) whatever the substrate concentration. It must be stressed that inhibition was not reversed even using high concentrations of substrate, as usually observed in competitive inhibitions.

In order to obtain a highly initial response, the best substrate concentration condition for further experiments was shown to be 0.5 mM. Based on this fact, the next step was to determine the inhibition percentage for different concentrations of inhibitor. Each experiment was repeated three times. Both GAs are reversible inhibitors, but α -chaconine inhibition was shown to be faster than α -solanine, demonstrating its superior toxicity, as illustrated in Fig. 3.

To provide a good understanding of the glycoalkaloid mixture's synergism, it is necessary to analyze and evaluate individual inhibitions. The limit of detection (LOD) was defined according to the standard deviation of the baseline response noise observed in the absence of inhibitor ($\sigma = 3$ nA); thus the LOD corresponds to the lowest GA concentration that induces an inhibition equivalent to 3σ . The limit of quantitation (LOQ) was defined as the inhibitor concentration inducing 10% of inhibition. Fig. 3 shows that inhibition due to α -chaconine was similar using either AChE-B131- or BChE-based sensors (LOD = 15 nM, LOQ = 20 nM). In opposition, α -solanine inhibition was much higher using AChE-B131 (LOD = 23 nM, LOQ = 30 nM) than BChE (LOD = 40 nM, LOQ = 100 nM). Therefore, due to their different behavior, the complementary use of AChE-B131 and BChE could allow one to perform a selective detection of the two GAs investigated in this study.

Effect of mixtures of α -chaconine and α -solanine on ChE sensors

Biosensors incorporating 1 mU of AChE and BChE were used in a second step for the assessment of mixtures of GAs. Table 1 shows the global inhibition induced by mixtures of α -chaconine and α -solanine. The results were compared with the inhibition induced by each individual GA.

We observed that in assays combining α -chaconine and α -solanine, the inhibition rate of ChE sensors was not additive [28].

One-step detection method

To overcome this problem, we recorded the slope of inhibition m_i due to GAs in phosphate buffer. Table 2 presents the measured m_i for mixtures of α -chaconine and α -solanine.

Even if the global inhibition rate of ChE sensors was not additive, the results of the inhibition slope confirm the possibility of detecting the effect of GA mixtures.

As previously specified, a set of 33 mixed solutions of α -chaconine and α -solanine was freshly prepared for the building of the response model. The range concentration for α -chaconine was 10–300 nM and for α -solanine it was 75–400 nM. The set of solutions was randomly subdivided in subsets (viz. training and test), needed for the correct training of the network. One single

Table 2

Inhibition slope of ChE based sensors measured using one-step method in presence of 0.5 M of substrate upon addition of each GA at different concentrations, and their corresponding mixtures.

α -Chaconine (μM)	α -Solanine (μM)	m_i (A/sec) "AChE-B131"			m_i (A/sec) "BChE"		
		α -Chaconine	α -Solanine	Mixture	α -Chaconine	α -Solanine	Mixture
0.05	0.2	2.3E–06	2.7E–06	4.7E–06	1.8E–06	1.4E–06	3.3E–06
0.13	0.3	3.4E–06	3.4E–06	6.7E–06	3.0E–06	1.7E–06	4.8E–06
0.23	0.1	4.1E–06	1.4E–06	5.8E–06	3.8E–06	7.8E–07	4.2E–06
0.2	0.35	4.0E–06	3.7E–06	7.0E–06	3.6E–06	1.9E–06	5.0E–06
0.07	0.4	2.7E–06	3.9E–06	6.8E–06	2.3E–06	2.0E–06	4.3E–06
0.1	0.13	3.1E–06	1.9E–06	5.0E–06	2.7E–06	1.0E–06	3.5E–06
0.25	0.25	4.2E–06	3.1E–06	6.8E–06	3.9E–06	1.6E–06	5.3E–06
0.2	0.2	4.0E–06	2.7E–06	7.1E–06	3.6E–06	1.4E–06	5.7E–06

The standard deviation of slope values range between 10^{-7} and 5.10^{-8} A s $^{-1}$.

Table 3

Summary of the goodness of fits obtained for the two GAs with training ($n = 25$) and external test ($n = 8$) set.

ANN		Slope	Intercept (μM)
Training	α -Chaconine $r = 0.985$	0.99 ± 0.04	0.004 ± 0.01
	α -Solanine $r = 0.991$	0.99 ± 0.06	0.009 ± 0.03
Test	α -Chaconine $r = 0.996$	0.98 ± 0.03	0.003 ± 0.13
	α -Solanine $r = 0.993$	0.99 ± 0.04	0.002 ± 0.09

The best ANN configuration had four neurons in its hidden layer using the tansig transfer function. (r) is the correlation coefficient. Confidence intervals were calculated at the 95% confidence level.

precaution was taken, which was to reserve the extreme values for the training subset, in order to avoid the adjusted ANN to extrapolate these points out of the obtained model.

The used ANN architecture was exhaustively studied from an initial configuration using a single hidden layer. In this case, the slope of inhibition measured for each mixed solution of GAs was used as the input information to the ANN. Thus the number of neurons in the input layer equaled the number of biosensors used, two. Analogously, as there were two concentrations sought, the output layer was formed by two output neurons. The number of neurons in the hidden layer was determined by trial and error seeking the optimal modeling ability of the ANN.

On the basis of our previous experience, some configuration details were fixed a priori [28], including the learning rate (α) and the momentum (β), which took the values of 0.1 and 0.4, respectively. The transfer functions used in the input and output layers were also set to be always linear. Furthermore, the data were range-scaled prior to training so that they had a value between -1 and 1 , having demonstrated that this preprocessing facilitates the modeling process [31].

As can be seen in Table 3, very good correlations were obtained for both the training and the external test data with comparison lines indistinguishable from the theoretical values.

Therefore, the prediction capability of the two models could be considered as satisfactory for both considered pesticides.

Table 4

Results obtained for the determination of α -Chaconine and α -Solanine from spiked potatoes samples.

Sample	Spiked concentrations		Found values (ANN)	
	α -Chaconine ($\mu\text{g/g}$)	α -Solanine ($\mu\text{g/g}$)	α -Chaconine μM ($\mu\text{g/g}^{\rightarrow}$)	α -Solanine μM ($\mu\text{g/g}^{\rightarrow}$)
1	0.8	0.8	0.197 ± 0.012 (0.84)	0.18 ± 0.011 (0.79)
2	0.8	0.1	0.185 ± 0.009 (0.79)	0.025 ± 0.003 (0.11)
3	0.1	0.8	0.026 ± 0.002 (0.11)	0.18 ± 0.014 (0.78)
4	0.5	0.5	0.12 ± 0.011 (0.51)	0.115 ± 0.012 (0.5)
5	0.05	0.1	0.013 ± 0.002 (0.05)	0.025 ± 0.003 (0.11)

$^{\rightarrow}$ In $\mu\text{g g}^{-1}$, calculated from concentration (μM) $\times V_{\text{cell}}$ (L) $\times MW_{\text{GA}}$ (g mol^{-1})/mass of floccule (g).

In summary, we demonstrated a reversible glycoalkaloid inhibition over AChE B-131 and BChE. The mechanism of inhibition is based on noncovalent binding; from all the graphics it is possible to classify the inhibition as nonadditive. However, the study of the inhibition slope and the modeling of the ChE-based response using chemometric tools allowed detection of their presence in mixture.

Effect of potato matrix

The proposed method was carried out in complex real samples to demonstrate its viability. A floccule of potatoes was analyzed directly by adding 2 g of floccule powder into the measurement cell (10 ml), or after spiking of this floccule with several concentrations of α -chaconine over α -solanine. The samples without added GAs revealed no inhibitory effect, whereas the spiked ones showed some inhibition, which could be estimated with the previously trained ANN (Table 4).

As can be seen in Table 4, the values found with the ANN were consistent with the spiked concentrations. Average recovery yields, calculated as $(P1/P0)100$, where $P0$ is the added quantity of GAs and $P1$ is the found quantity, were between 105 and 97% for both toxins.

These results suggested that the proposed method was able to resolve the considered GAs mixtures in the tested real samples.

Due to the wide variety of potential cholinesterase inhibitors, these enzymes are likely to be inhibited by various compounds, including irreversible inhibitors such as OPs, heavy metals, or neurotoxins. Even if some of these molecules may be present on potato skin, they were not found inside the matrix, as evidenced by the absence of irreversible inhibition phenomenon.

Conclusions

This work shows that it is possible to selectively quantify mixtures of the GAs: α -chaconine and α -solanine. The inhibition of cholinesterase by these GAs was investigated. A reversible, mixed-type inhibition was evidenced using single compounds,

and it was shown that mixtures did not induce additive inhibitions. Two amperometric biosensors were built using wild-type BChE from horse serum and genetically modified AChE from *D. melanogaster*. The detection of GAs was realized using a one-step method based on the measurement of the inhibition slope. Although the resulting inhibition is not additive, this method allowed measurement of the effect of two GAs on each biosensor.

Artificial neural network was used to model the combined response of these biosensors at concentrations ranging from 10 to 300 nM for α -chaconine and from 75 to 400 nM for α -solanine.

Finally, the developed system was applied to the determination of GAs in real potato samples. Both GAs could be quantified with low errors from a direct measurement step.

Acknowledgment

Michelle Arredondo Espinoza thanks CONACYT for the financial support provided.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.005>.

References

- [1] M.S. Khan, I. Munir, I. Khan, The potential of unintended effects in potato glycoalkaloids, *Afr. J. Biotechnol.* 12 (2013) 754–766.
- [2] M. Cantwell, A review of important facts about potato glycoalkaloids, *Perishables Handling Newslett.* 87 (1996) 26–27.
- [3] J.G. Roddick, A.L. Rijnenberg, Effect of steroidal glycoalkaloids of the potato on the permeability of liposome membranes, *Physiol. Plant.* 68 (1986) 436–440.
- [4] S.C. Morris, T.H. Lee, The toxicity and teratogenicity of solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*): a review, *Food Technol. Australia* 36 (1984) 118–124.
- [5] P.K. Nema, N. Ramayya, E. Duncan, K. Niranjana, Potato glycoalkaloids: formation and strategies for mitigation, *Sci. Food Agric.* 88 (2008) 1869–1881.
- [6] L.A. Grunenfelder, L.O. Knowles, L.K. Hiller, N.R. Knowles, Glycoalkaloid development during greening of fresh market potatoes (*Solanum tuberosum* L.), *Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5847–5854.
- [7] J.G. Roddick, The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones, *Phytochemistry* 28 (1989) 2631–2634.
- [8] W.H. Orgell, K.A. Vaidya, P.A. Dahm, Inhibition of human plasma cholinesterase in vitro by extracts of solanaceous plants, *Science* 128 (1958) 1136–1137.
- [9] D.B. Smith, J.G. Roddick, J.L. Jones, Potato glycoalkaloids: some unanswered questions, *Trends Food Sci. Technol.* 7 (1996) 126–131.
- [10] S.J. Jadhav, R.P. Sharma, D.K. Salunkhe, Naturally occurring toxic alkaloids in foods, *Crit. Rev. Toxicol.* 9 (1981) 21–104.
- [11] G. Lisinska, W. Leszczynski, *Potato Science and Technology*, Elsevier Applied Science, 1989.
- [12] J.G. Roddick, A.L. Rijnenberg, Synergistic interaction between the potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to lysis of phospholipid/sterol liposomes, *Phytochemistry* 26 (1987) 1325–1328.
- [13] D.B. Smith, J.G. Roddick, J.L. Jones, Synergism between the potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine in inhibition of snail feeding, *Phytochemistry* 57 (2001) 229–234.
- [14] E. Messer, *Potatoes (white)*, in: K.F. Kiple, K.C. Ornelas (Eds.), *Cambridge World History Food*, vol. 1, Cambridge University Press, 2000, pp. 187–200.
- [15] J.A. Woolfe, S.V. Poats, *The Potato in the Human Diet*, Cambridge University Press, 1987.
- [16] T. Johns, S.L. Keen, Taste evaluation of potato glycoalkaloids by the Aymara: a case study in human chemical ecology, *Hum. Ecol.* 14 (1986) 437–452.
- [17] E. Soy, V. Arkhypova, O. Soldatkin, M. Shelyakina, S. Dzyadevych, J. Warzywoda, A. Sacco Jr., B. Akata, Investigation of characteristics of urea and butyrylcholine chloride biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite beta crystals, *Mater. Sci. Eng. C* 32 (2012) 1835–1842.
- [18] D.M. Quinn, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chem. Rev.* 87 (1987) 955–979.
- [19] A. Saxena, A.M. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B.P. Doctor, Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Biochemistry* 36 (1997) 14642–14651.
- [20] L. Raveh, E. Grauer, J. Grunwald, E. Cohen, Y. Ashani, The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145 (1997) 43–53.
- [21] C.A. Prody, D. Zevin-Sonkin, A. Gnatt, O. Goldberg, H. Soreq, Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 3555–3559.
- [22] K. Kobayashi, A.D. Powell, M. Toyoda, Y. Saito, High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous analysis of α -solanine and α -chaconine in potato plants cultured in vitro, *J. Chromatogr. A* 462 (1989) 357–364.
- [23] N.G. Yasri, A.J. Halabi, G. Istamboulie, T. Noguier, Chronoamperometric determination of lead ions using PEDOT: PSS modified carbon electrodes, *Talanta* 85 (2011) 2528–2533.
- [24] N. Ben Ouji, I. Bakas, G. Istamboulie, I. Ait-Ichou, E. Ait-Addi, R. Rouillon, T. Noguier, Solgel immobilization of acetylcholinesterase for the determination of organophosphate pesticides in olive oil with biosensors, *Food Control* 30 (2013) 657–661.
- [25] L. Pogačnik, M. Franko, Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 1–9.
- [26] O.O. Soldatkin, O.S. Burdak, T.A. Sergejeva, V.M. Arkhypova, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1, *Sens. Actuators B* 188 (2013) 999–1003.
- [27] S. Sanllorente-Méndez, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. Application to the determination of arsenic(III), *Sensors* 10 (2010) 2119–2128.
- [28] E.A. Nazarenko, A.P. Soldatkin, C. Martelet, Y.I. Korpan, Potato glycoalkaloids detection based on conductometric sensor coupled to butyryl cholinesterase, *Biopolym. Cell* 20 (2004) 331–336.
- [29] G. Alonso, G. Istamboulie, T. Noguier, J.L. Marty, R. Muñoz, Rapid determination of pesticide mixtures using disposable biosensors based on genetically modified enzymes and artificial neural networks, *Sens. Actuators B Chem.* 164 (2012) 22–28.
- [30] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40.
- [31] G. Istamboulie, M. Cortina-Puig, J.L. Marty, T. Noguier, The use of artificial neural networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: chlorpyrifos and chlorfenvinfos, *Talanta* 79 (2009) 507–511.