

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“CARACTERIZACIÓN METROLÓGICA Y OPTIMIZACIÓN DE
BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIDROLASAS”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN INGENIERÍA

PRESENTA
ANA LUISA REYES AVILA

DIRECTOR
DOCTOR ROUMEN KOYTCHEV ZLATEV

CODIRECTORA
DOCTORA MARGARITA STILIANOVA STOYTCHIEVA

Mexicali, B. C.

Junio de 2019

Universidad Autónoma de Baja California



Instituto de Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

"CARACTERIZACIÓN METROLÓGICA Y OPTIMIZACIÓN DE BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIDROLASAS"

Presenta:

M. I. Ana Luisa Reyes Ávila

Director de Tesis:

Dr. Roumen Koytchev Zlatev

Director de Tesis:

Dra. Margarita Stilianova Stoytcheva

Mexicali, Baja California, junio de 2019

Contenido

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
HIDROLASAS	10
<i>Nomenclatura</i>	<i>10</i>
<i>Clasificación de las hidrolasas.....</i>	<i>10</i>
PROTEASAS	11
TRIPSINA	11
<i>Métodos para la cuantificación de tripsina</i>	<i>14</i>
<i>Test convencional de Tripsina.....</i>	<i>16</i>
LIPASA	18
<i>Métodos Volumétricos.....</i>	<i>21</i>
<i>Ensayos Colorimétricos</i>	<i>22</i>
<i>Métodos de Espectrofotometría Visible</i>	<i>23</i>
<i>Método de Espectrofotometría IR.</i>	<i>24</i>
<i>Métodos de Fluorometría.....</i>	<i>24</i>
<i>Métodos de Turbidimetría y Nefelometría.</i>	<i>26</i>
<i>Ensayos radiactivos.....</i>	<i>27</i>
<i>Inmunoensayos.....</i>	<i>27</i>
<i>Métodos Conductométricos</i>	<i>28</i>
<i>Métodos Cromatográficos.....</i>	<i>28</i>
<i>Otros métodos</i>	<i>29</i>
<i>Biosensores</i>	<i>29</i>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
JUSTIFICACIÓN.....	33
OBJETIVOS	34
OBJETIVO GENERAL	34

OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
HIPÓTESIS	35
MARCO TEÓRICO.....	37
BIOSENSORES EN LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS HIDROLASAS	37
¿Qué es un biosensor?	37
Receptores (capas sensibles) y transductores	38
Características de los biosensores	40
Empleo de los biosensores	40
FUNDAMENTO TEÓRICO DE LOS BIOSENSORES PIEZOELÉCTRICOS (QCM)	41
Inmovilización indirecta de la capa sensible	42
Inmovilización directa de la capa sensible	43
Caracterización de la superficie modificada de la QCM.....	44
Cálculo del cambio de masa de la capa sensible degradada por la enzima	44
Ventajas del sensor basado en QCM como transductor	45
FUNDAMENTO TEÓRICO DE LOS BIOSENSORES ESPECTROFOTOMÉTRICOS	46
FUNDAMENTO TEÓRICO DE LOS BIOSENSORES NEFELOMÉTRICOS.....	48
Principio de la Nefelometría	48
Dispersión de la radiación por partículas en disolución	49
Construcción del equipo nefelométrico desarrollado.....	49
FUNDAMENTO TEÓRICO DE LOS BIOSENSORES CONDUCTOMÉTRICOS.....	51
Principio del método de conductometría.....	51
Aplicación del método conductométrico en biosensores	52
FUNDAMENTO TEÓRICO DE LOS BIOSENSORES IMPEDIMÉTRICOS	54
Aplicación del método impedimétrico en biosensores.....	55
EXPERIMENTAL	60
MÉTODO PIEZOELÉCTRICO GRAVIMÉTRICO (QCM)	60
La aplicación de la microbalanza de cuarzo como transductor	60
Preparación de la capa sensible del sustrato.....	61
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	63
Preparación de la capa sensible del sensor	63

<i>Construcción de la parte sensible del sensor</i>	64
<i>Mecanismo del proceso</i>	64
<i>Metodología de la medición</i>	65
MÉTODO NEFELOMÉTRICO	66
<i>Equipo de medición</i>	66
<i>Preparación y caracterización de las nanopartículas</i>	66
<i>Preparación de sustrato (gelatina) cargado con nanopartículas de plata</i>	68
<i>Pistón hueco y su preparación</i>	69
<i>Algoritmo de medición de la actividad enzimática de la tripsina aplicando la nefelometría</i>	70
MÉTODO CONDUCTOMÉTRICO	73
<i>Instrumentación</i>	73
<i>Reactivos y electrodos</i>	75
<i>Preparación y caracterización de la capa sensible nanoestructurada</i>	77
<i>Electrodos conductométricos preparados por la tecnología PCB</i>	79
<i>Composición y preparación de la capa sensible del sensor</i>	80
<i>Algoritmo de medición de la actividad enzimática de la lipasa aplicando la conductometría</i>	81
MÉTODO IMPEDIMÉTRICO	82
<i>Instrumentación</i>	82
<i>Materiales y reactivos</i>	82
<i>Contrucción del sensor</i>	83
<i>Preparación y deposición de la capa sensible de nanocompuesto</i>	84
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
BIOSENSOR PIEZOELÉCTRICO (QCM) PARA LA CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA	86
<i>Respuesta del sensor QCM para la medición de la actividad de la tripsina</i> ...	86
<i>Influencia del grosor de la capa sensible sobre la respuesta del sensor piezoeléctrico</i>	87
<i>Influencia de la presencia de las nanopartículas – comparación de las curvas de calibración</i>	88
<i>Rango de linealidad, límite de detección y reproducibilidad</i>	88

BIOSENSOR ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA.	90
<i>Caracterización espectrofotométrica de la capa sensible del sensor</i>	90
<i>Cuantificación de actividades (concentraciones) bajas de la tripsina</i>	92
<i>Determinación del rango lineal del sensor espectrofotométrico</i>	94
<i>Aplicación del sensor espectrofotométrico para la cuantificación de la bromelaína</i>	95
SENSOR NEFELOMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACION DE LA TRIPSINA	96
<i>Respuesta nefelométrica, curva en coordenadas: corriente de la foto-celda vs. el Tiempo</i>	96
<i>Influencia de la longitud de la onda sobre la respuesta</i>	99
<i>Curvas de calibración para actividades bajas de tripsina</i>	100
<i>Influencia de la concentración de las nanopartículas en el sustrato sobre la respuesta</i>	101
<i>Repetitividad y precisión de las mediciones</i>	102
SENSOR CONDUCTOMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA	104
<i>Construcción de electrodos conductométricos y modificación por capa sensible de nanocompuesto.</i>	104
<i>Respuesta típica del sensor y la influencia de la composición de la capa sensible</i>	105
<i>Optimización de amplitud de respuesta</i>	109
Optimización de pH y la velocidad del agitador	109
Optimización del espesor de la capa sensible	111
<i>Caracterización metrológica del sensor conductométrico</i>	112
Determinación del rango de cuantificación lineal y construcción del diagrama de calibración	112
Evaluación del límite de detección LOD	113
Evaluación del tiempo de respuesta	115
Evaluación de respetabilidad de los sensores	116
<i>Aplicación a muestras reales y validación de resultados.</i>	117
SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA	118
<i>Optimización y caracterización de la composición de la capa sensibles de nanocompuesto</i>	118

<i>Respuesta típica del sensor e influencia de la presencia de nanopartículas</i>	119
<i>Optimización de la amplitud de respuesta y el tiempo de la respuesta</i>	122
Influencia del pH y la velocidad del agitador	122
Influencia del espesor de la capa sensible	123
Influencia de Amplitud y frecuencia de voltaje CA	125
<i>Caracterización del sensor impedimétrico para cuantificación de la actividad de la lipasa</i>	125
Rango de cuantificación lineal, precisión y determinación de LOD	125
Evaluación del tiempo de respuesta	127
<i>Aplicación a muestras reales y validación de resultados</i>	128
CONCLUSIONES	129
MÉTODO PIEZOELECTRICO GRAVIMETRICO (QCM) PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA	130
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA	130
MÉTODO NEFELOMÉTRICO PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA	131
MÉTODO CONDUCTOMÉTRICO PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA	131
MÉTODO IMPEDIMÉTRICO PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA	132
REFERENCIAS	133
ANEXOS	168
ANEXO I: PANCREATITIS Y CÁNCER PANCREÁTICO	168
¿Qué es la pancreatitis?	168
¿Cómo se diagnostica la pancreatitis?	168
¿Qué es el cáncer pancreático?	169
¿Cómo se diagnostica el cáncer pancreático?	169
ANEXO II: SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS EMPLEADAS	172
ANEXO III: POSTER AMIDIQ 2016	174
ANEXO IV: ARTÍCULO EN REVISTA JCR CON FI: 1.369	175
ANEXO V: ÍNDICE DE FIGURAS	189
ANEXO VI: ÍNDICE DE TABLAS	195

RESUMEN

Se desarrollaron cinco sensores sencillos, nano-estructurados, desechables o regenerables, rápidos y de bajo costo para la cuantificación de la actividad de dos enzimas del grupo de las hidrolizas: tripsina y lipasa ampliamente aplicadas en la industria biotecnológica.

Los cinco sensores (tres para la cuantificación de la tripsina y dos para la lipasa) se basan en la medición de la velocidad de la descomposición de la capa sensible del sensor por hidrolisis catalizada por la enzima, aplicando transductores piezoeléctricos (micro-balanza de cuarzo) y ópticos (espectrofotométricos y nefelométricos) en el caso de la tripsina, así como impedimétricos y conductométricos en caso de la lipasa.

Los sensores desarrollados fueron caracterizados metrológicamente y sus características se optimizaron con respecto a: tiempo de la respuesta, rango linear y precisión de la cuantificación, límite de detección (LOD), sensibilidad y reproducibilidad de la respuesta.

Finalmente, los sensores desarrollados fueron validados aplicándolos para medición de las actividades enzimáticas de muestras reales en comparación con métodos y sensores existentes estandarizados. Los resultados obtenidos en la caracterización metrológica y la validación de los sensores objeto de la tesis son presentados y discutidos.

INTRODUCCIÓN

Las hidrolasas pertenecen a un grupo de enzimas que catalizan reacciones bioquímicas de hidrólisis de sustratos de una manera muy específica en el sistema digestivo de los animales y seres humanos. Debido de su especificidad las enzimas del grupo de las hidrolasas están entre las enzimas las más aplicadas en la biotecnología.

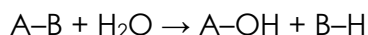
La cualificación precisa y rápida de las actividades de las hidrolasas aplicadas en los procesos biotecnológicos tiene gran importancia para mantener constante la eficiencia de los procesos. Además, su actividad es un criterio importante en el diagnóstico médico especialmente en el caso de los desórdenes pancreáticos.

La necesidad a cuantificar las actividades de las enzimas del grupo de las hidrolasas genera un gran interés en el desarrollo de sensores y métodos de determinación de su actividad enzimática y continuamente optimizar sus características metrológicas.

Este trabajo está dedicado al desarrollo, caracterización y optimización de las características metrológicas de sensores para la cuantificación de las actividades de dos tipos de enzimas del grupo de hidrolasas: las proteasas y las lipasas. Todos los sensores desarrollados se basan en la medición de la velocidad de la descomposición de una capa sensible del sensor por hidrólisis catalizada por la enzima, aplicando transductores piezoeléctricos (micro-balanza de cuarzo) y ópticos (espectrofotómetro) en el caso de la tripsina, así como impedimétricos y conductométricos en caso de la lipasa.

Hidrolasas

Una hidrolasa es una enzima capaz de hidrolizar un enlace químico. Por ejemplo, una enzima que catalice la reacción siguiente será una hidrolasa:



Nomenclatura

La nomenclatura sistemática denomina a estas enzimas como sustrato hidrolasa; no obstante, aún se emplea la nomenclatura tradicional de sustratoasa. Por ejemplo, el ácido nucleico hidrolasa se conoce como nucleasa. Las enzimas digestivas pertenecen a esta categoría.

Clasificación de las hidrolasas

Las hidrolasas pertenecen a la categoría EC 3 en la numeración EC y poseen como subclases las subcategorías siguientes:

- EC 3.1: Actúan sobre enlaces éster. (Esterasas, nucleasas, lipasas, fosfatasas, fosfodiesterasas)
- EC 3.2: Glicosilasas.
- EC 3.3: Actúan sobre enlaces éter.
- EC 3.4: Actúan sobre enlaces peptídicos. (Proteasas o Peptidasas)
- EC 3.5: Actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno no peptídicos.
- EC 3.6: Actúan sobre los anhídridos de los ácidos. (Helicasas, GTPasa)
- EC 3.7: Actúan sobre los enlaces carbono-carbono.
- EC 3.8: Actúan sobre los enlaces haluro.

- EC 3.9: Actúan sobre los enlaces fósforo-nitrógeno.
- EC 3.10: Actúan sobre los enlaces azufre-nitrógeno.
- EC 3.11: Actúan sobre los enlaces carbono-fósforo.
- EC 3.12: Actúan sobre los enlaces azufre-azufre.
- EC 3.13: Actúan sobre los enlaces carbono-azufre.

Las hidrolasas catalizan la hidrólisis de sustratos de una manera muy específica: cada enzima cataliza la hidrólisis únicamente de un grupo de sustratos y es completamente indiferente con respecto de los otros grupos de compuestos presentes.

Proteasas

Las proteasas o peptidasas (**E.C. 3.4**) son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Para ello, utilizan una molécula de agua por lo que pertenecen al grupo de las hidrolasas. 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 (proenzimas, zimógenos, pre-hormonas) en sus formas funcionales finales, separación de proteínas virales, etc. [1].

Tripsina

Las enzimas de tipo tripsina son las proteasas principales en el sistema digestivo humano [2]. La tripsina es producida por el páncreas en

forma de tripsinógeno (enzima inactiva) y luego es activada en el duodeno por la enteroquinasa intestinal a tripsina (enzima activa) mediante corte proteolítico [3]. 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.) [4, 5]. La tripsina es una endopeptidasa digestiva que tiene un peso molecular de alrededor de 24-25 kDa [6, 7] que está presente en el tracto digestivo de muchos animales y juega un papel importante en la activación de endopeptidasas digestivas. La tripsina formada a partir de tripsinógeno (zimógeno o proenzima inactiva de la tripsina) activa a otras moléculas de tripsinógeno y a otros zimógenos como el quimotripsinógeno y la proelastasa [6].

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Usan una molécula de agua para hacerlo y por lo tanto se clasifican como hidrolasas. Es una enzima secretada por el páncreas que participa en la degradación de las proteínas o peptonas, resultantes de la acción de la pepsina gástrica. La proteasa se secreta en forma de proenzima y es activada por el jugo intestinal. Se administra junto con las otras proenzimas pancreáticas (amilasa, lipasa) cuando existe disminución de las secreciones pancreáticas.

Nuestros cuerpos utilizan proteína, un nutriente que se compone de aminoácidos, para ayudar a mantener y reparar los tejidos. La enzima utilizada para digerir la proteína, que es uno de los nutrientes difíciles de digerir, se denomina proteasa. Durante la digestión, nuestros cuerpos utilizan ácido clorhídrico y enzimas proteolíticas o proteasas para la descomposición de las moléculas de proteínas en aminoácidos distintos. A

continuación, se absorbe a través de la pared intestinal. Si el cuerpo no digiere correctamente todas las proteínas, entrarán en el sistema circulatorio y otras partes del cuerpo.

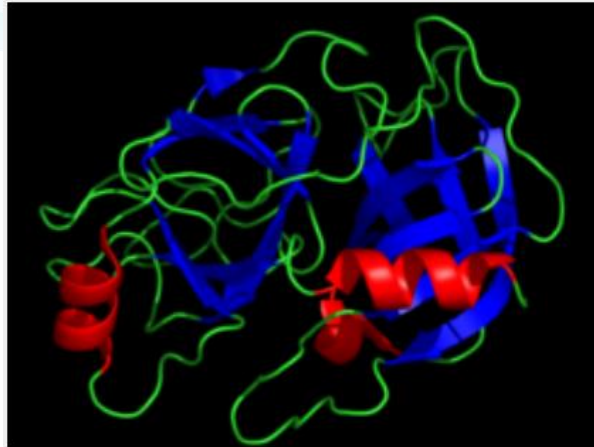


Figura 1. Estructura tridimensional de la tripsina y los órganos de su producción

La tripsina es producida por el páncreas en forma de tripsinógeno (enzima inactiva) y luego es activada en el duodeno por la enteroquinasa intestinal a tripsina (enzima activa) mediante corte proteolítico. 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.)

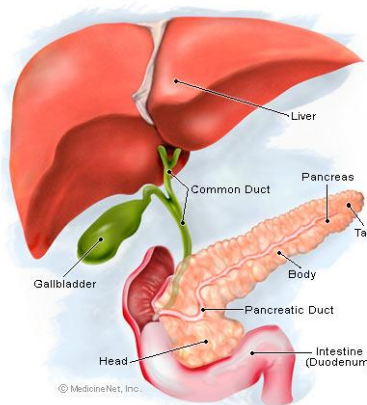


Figura 2. La tripsina es producida por el páncreas en forma de tripsinógeno (enzima inactiva)

Métodos para la cuantificación de tripsina

En medicina, las evaluaciones de la actividad de tripsina sirven como una prueba diagnóstica específica y preliminar de la función pancreática y su alteración: fibrosis quística, pancreatitis crónica, etc. [8-9]. La importancia industrial, biotecnológica, y bioquímica de la tripsina, así como su significación clínica genera un gran interés en el desarrollo de métodos para la actividad de su cuantificación. Estos incluyen principalmente técnicas y sensores basados sobre la acción de la enzima sobre una película de gelatina acoplada con:

- espectrofotometría [10]
- radioinmunología [11]
- medición de la temperatura aplicando dispositivo de Bragg [12]
- medición de la humedad [13]

Millington et al. (1995) sugirió un sensor holográfico diseñado para registrar el cambio en el color (longitud de onda) o el brillo creado cuando la tripsina se escinde en los enlaces peptídicos adyacentes a los residuos de arginina y lisina de la gelatina y causa la hinchazón del holograma [14]. Hu y Jang (2012) también utilizaron una respuesta óptica para diseñar un sensor basado en cristal líquido (LC) [15] para el monitoreo en tiempo real y sin etiquetas de la actividad de la tripsina a través de cambios en la orientación de los LC acoplados a la interacción entre el polielectrolito, y fosfolípido. La utilidad de un biosensor de resonancia de plasmón de superficie comercial de Biosensing Instruments Inc. para investigar la acción proteolítica de la tripsina contra varias proteínas se demostró en el trabajo de Syed et al. (2011) [16]. Chuang et al. (2010) explotaron el desplazamiento de la longitud de onda de la resonancia del plasmón de

la superficie de las nanopartículas de oro coloidal modificadas con gelatina cuando se agregan después de la digestión con gelatina para cuantificar la actividad de la tripsina [17]. Zaccheo et al. (2011) informaron sobre un sensor galvánico autoalimentado basado en células para la detección a simple vista de la tripsina sérica [18]. Aunque es fácil de usar, proporciona una respuesta dentro de 3 h con un límite de detección de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Biloivan et al. (2004) desarrollaron series de sensores electroquímicos más sensibles y más rápidos para la determinación de la actividad de la tripsina [19]. Ionescu et al. (2006 y 2008), Fordyce y Shvarev (2008), Adjemian et al. (2010), Baş et al. (2010), Stoytcheva et al. (2012), Chen et al. (2012), con detección conductométrica, amperométrica, voltamétrica y potenciométrica [8, 20-25]. Kukwikila y Howorka (2010) propusieron la detección electroforética de la actividad de la tripsina con nanoporos, basada en la detección de los bloqueos en la corriente iónica due a la liberación de hidrolizados de proteínas [26]. La determinación eléctrica de la actividad de la tripsina también se realizó utilizando un resistor de película delgada a base de silicio sobre aislante [27]. Hanumegowda et al. (2005), sugirieron sensores de proteasa sin etiqueta basados en resonadores de microesferas ópticas [28], mientras que un sensor de tripsina magnetoelástico inalámbrico fue fabricado por Wu et al. (2006) [29]. Este resumen de la literatura demuestra que el gran potencial de los sensores basados en QCM para la evaluación de la actividad enzimática no se aprovechó para la estimación de la actividad de la tripsina. Hasta donde sabemos, solo Krause et al. (2006) y Stair et al. (2009) informaron sobre el uso de sensores basados en QCM para la determinación de la actividad de las proteasas utilizando QCM [30,31]. La mayor parte de los estudios se han centrado en la cuantificación de la actividad celulasa aplicando la técnica QCM-D [32-36], y en la estimación

de la actividad de la glucosa oxidasa inmovilizada mediante el acoplamiento de QCM y técnicas electroquímicas [37-39].

Test convencional de Tripsina

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 [52] y en el mundo [53, 54]: la severidad de la pancreatitis aguda no se correlaciona con el nivel de aumento en suero de la amilasa y de la lipasa [55-58]; 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 [59-62]; los niveles séricos de las citoquinas son indicadores precoces, pero ciertas citoquinas han mostrado baja especificidad como predictores de la severidad de la enfermedad [63].

La pancreatitis aguda (PA) es la enfermedad pancreática más frecuente en el mundo. Tiene una incidencia estimada de 4,9 a 80 casos por 100.000 personas. Cifras en los EUA muestran un incremento del 100% en el número de hospitalizaciones por PA durante las últimas 2 décadas. De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística en 1999, la PA constituyó la causa número 20 de muerte, con 0,50% de las defunciones en el país. Además, que en subsecuentes años ha escalado como causa de mortalidad.

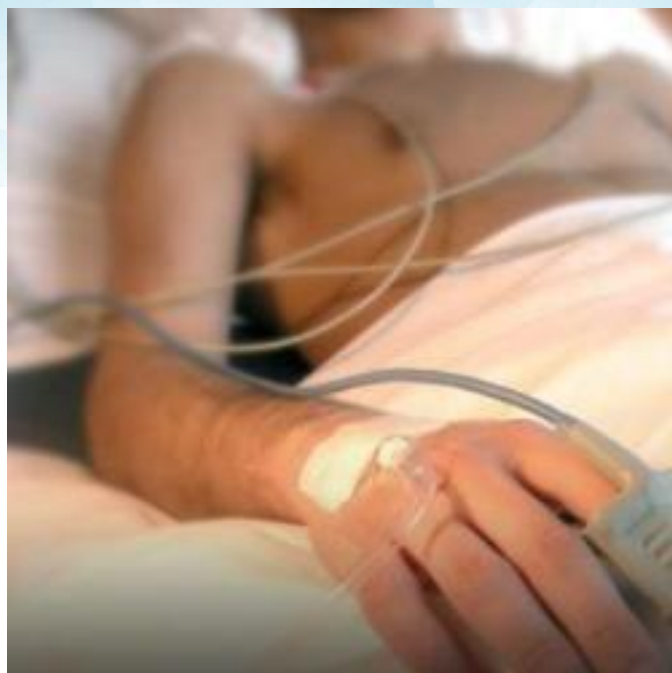


Figura 3 La pancreatitis aguda (PA) es la enfermedad pancreática más frecuente en el mundo, además, que en subsecuentes años ha escalado como causa de mortalidad

La degradación de la gelatina por la tripsina se ha utilizado como prueba de detección semicuantitativa sencilla para el diagnóstico de los desórdenes pancreáticos. Sin embargo, tal prueba no se puede calibrar fácilmente. Los métodos cuantitativos sensibles desarrollados hoy en día para la determinación de la tripsina son basados en reacciones de bioafinidad o utilizan dispositivos que miden el cambio de la temperatura, de la presión [64] y de la humedad [65] en las películas de gelatina. 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.

Lipasa

Las lipasas (**EC 3.1.1.3**) *triacilglicerol acilhidrolasa*) son enzimas producidas naturalmente en el páncreas de los animales que participan en los procesos de digestión, degradando las grasas y los aceites de los ácidos grasos y el glicerol [2, 3, 76].

Las lipasas son enzimas solubles en agua, que exhiben la capacidad de actuar en la interfaz entre las fases acuosa y orgánica. Principalmente catalizan la hidrólisis de enlaces éster de sustratos lipídicos insolubles en agua. Sin embargo, algunas lipasas también son capaces de catalizar los procesos de esterificación, interesterificación, transesterificación, acidólisis, aminólisis y pueden mostrar propiedades enantioselectivas [77].

Las características únicas y el potencial biotecnológico de las lipasas han llevado a su aplicación en las industrias de alimentos, detergentes, productos farmacéuticos, cuero, textiles, cosméticos y papel [4, 78]. Como una alternativa prometedora a la catálisis química convencional fue sugerida recientemente la producción de biodiesel por transesterificación catalizada por lipasa [79] un método eficiente ahorrando energía, y amigable con el medio ambiente.

Las lipasas son de origen vegetal, animal y microbiano, pero sólo lipasas bacterianas y fúngicas, tales como: *Candida antártica* (Novozym 435), *Candida Rugosa* (Lipasa AY), *Pseudomonas cepacia* (lipasa PS), *Pseudomonas fluorescens* (lipasa) AK), *Pseudomonas aeruginosa* y *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL) se producen en escala industrial [80, 81]. Entre los microorganismos productores de las lipasas disponibles, los hongos filamentosos pertenecientes a varias especies de los géneros

Aspergillus [82, 83], *Rhizopus* [84, 85] *Penicillium* [86-88] y *Trichoderma* [89-91] han sido descritos como útiles productores de lipasas para fines industriales.



Figura 4. Imagen generada por computadora de un tipo de lipasa

La creciente demanda industrial de lipasas ha llevado a la identificación de nuevos y prospectivas cepas microbianas altamente productivas a lipasa con altos niveles de actividad enzimática y especificidad al sustrato. Eso resulto en la generación de un gran interés en la aplicación de métodos analíticos y sensores para la determinación rápida, confiable, específica, selectiva y sensible de la actividad de las lipasas. Investigadores como Jensen, 1983 [92], Thomson et al., 1999 [93], Beisson et al., 2000 [94], Gupta et al., 2003 [95], Starodoub, 2006 [96], y Hasan, 2009 [77] presentaron revisiones de la mayoría de estos métodos.

A continuación, se enlista una breve revisión de los métodos y sensores ya existentes para la cuantificación de la actividad de las lipasas basados sobre una gran variedad de principios se proporciona abajo junto con sus ventajas y las deficiencias.

Eso resulto en la generación de un gran interés en la aplicación de métodos analíticos y sensores para la determinación rápida, confiable, específica, selectiva y sensible de la actividad de las lipasas. Se enlista una revisión de los métodos y sensores ya existentes para la cuantificación de la actividad de las lipasas basados sobre una gran variedad de principios:

- *Métodos Volumétricos*
- *Ensayos Colorimétricos*
- *Métodos de Espectrofotometría Visible*
- *Método de Espectrofotometría IR*
- *Métodos de Fluorometría*
- *Métodos de Turbidimetría y Nefelometría*
- *Ensayos radiactivos*
- *Inmunoensayos*
- *Conductometría*
- *Métodos Cromatográficos*
- *Biosensores*
- *Otros métodos*

Los otros inconvenientes comunes de casi todos los sensores y métodos existentes para la medición de la actividad de la lipasa son, una vez más: el requerimiento de personal especializado, así como reactivos y

equipos costosos. Estas desventajas se pueden superar con el desarrollo de nuevos sensores que cumplan con los requisitos de sus aplicaciones específicas. Por lo tanto, las actividades relativamente altas de las lipasas aplicadas industrialmente requerían sensores extremadamente sensibles que sean más bien simples, rápidos y precisos. El desarrollo y la caracterización de sensores para la medición de la actividad de la lipasa que cumplan dichos requisitos es el tema del presente trabajo.

Métodos Volumétricos.

Se aplica la titulación para la evaluación de la actividad de la lipasa por los ácidos grasos libres producidos por hidrólisis de los triacilgliceroles catalizada por la lipasa. El método implica incubación de la muestra de 24 h a 40°C y titulación alcalina (NaOH) al punto final de los ácidos liberados utilizando fenolftaleína como indicador [97] o una titulación continua de los productos generados aplicando un pH-stat. El tiempo de incubación, así como la separación rápida de la emulsión del sustrato y la enzima limitó su aplicación y condujo a su modificación orientada a la reducción del tiempo de incubación y optimización de condiciones experimentales [98].

Los sustratos ideales son los triacilgliceroles de cadena larga como la trioleína que es un sustrato de la lipasa altamente específico y también el aceite de oliva [99, 100]. El alto contenido de trioleína en aceite de oliva (hasta 30%) y su menor costo lo hace más adecuado en ensayos de actividad de lipasa. Otro sustrato comúnmente utilizado es la tributirina que no es tan específica como trioleína, pero exhibe la propiedad de formar dispersiones acuosas en ausencia de emulsionantes [101]. El ácido butírico y butirato de sodio liberados son solubles en agua, en contraste con la

trioleína, el aceite de oliva y los productos de su lipólisis. El sustrato recomendado de la farmacopea europea del ensayo estándar de evaluación de la actividad de la lipasa es aceite de oliva, estabilizada en una emulsión aplicando goma arábiga que aumenta su interfaz [102].

A pesar de sus deficiencias: largo tiempo de análisis (2 determinaciones por hora), baja sensibilidad ($1 \mu\text{mol mL}^{-1}$), complicado procedimiento, y errores debidos a la titulación incompleta, la titulación (volumetría) permanece como método de referencia para la determinación de la actividad de las lipasas.

Ensayos Colorimétricos

Los ensayos colorimétricos también se basan en la cuantificación de los productos de lipólisis. Los ácidos grasos producidos se convierten en complejos cúpricos de color azul extraídos por un solvente orgánico seguido por una evaluación por espectrofotometría [103, 104]. El método se mejoró reduciendo el tiempo de análisis acortando la incubación y eliminando los pasos de transferencia de fase (4 determinaciones por hora) [105-111]. El aumento de sensibilidad se logró seleccionando reactivos y disolventes orgánicos adecuados. [110-112]. El método es específico y más sensible (con rango de actividades medidas $0.02\text{-}0.4 \text{ nmol mL}^{-1}$ [113]) en comparación con el método volumétrico (titulación).

Los inconvenientes del método espectrofotométrico están relacionados con el uso de solventes orgánicos tóxicos.

Métodos de Espectrofotometría Visible

Los métodos espectrofotométricos para la determinación de la actividad de la lipasa utilizan sustratos sintéticos de la lipasa transformados por la hidrólisis enzimática en productos capaces de ser detectados por medio de la espectrofotometría. Los sustratos predominantes son: p-nitrofenilo y ésteres de naftilo de cadena molecular larga de ácidos grasos, así como tioésteres. La lipólisis de los ésteres del p-nitrofenílicos (lauratos, palmitatos, oleatos) da lugar al p-nitrofenol de color amarillo, medido a 405-410 nm [114-126]. Además, los ésteres de p-nitrofenol podrían sufrir una hidrólisis no enzimática [94] que representa una fuente de error. La escisión de los naftil ésteres (naftilcaprilato, naftilacetato, naftilpropionato) produce naftol, que forma un complejo de color rojo con sales de diazonium y se mide a 560 nm [127-130]. Los tioésteres usados como sustratos de lipasa producen tioles que reaccionan con el reactivo de Ellman para obtener aniones TNB de color amarillo, evaluados a 412 nm [56- 58]. Estos procesos han sido empleados en un kit de ensayo para la cuantificación rápida y sensible de la actividad de la lipasa (40-1600 mU mL⁻¹) [134, 135] utilizando tributirato de dimercaptopropanol (BALB) como sustrato. Otro kit de ensayo de lipasa fue propuesto por Randox [136] y está basado en el método desarrollado por Panteghini [137]. El límite de detección alcanzado en 570 nm es de 4 mU mL⁻¹.

Un inconveniente común de los métodos espectrofotometría es la baja especificidad de sustratos sintético con respecto de la enzima.

Los métodos alternativos se basan en cuantificación por espectrofotometría del glicerol formado como resultado de los triacilglicerol lipólisis, según el siguiente esquema: escisión de acilglicerol;

oxidación periódica de glicerol a formaldehído; Conversión de formaldehído con ácido cromotrópico a un cromóforo violeta que luego es espectrofotométrico cuantificado [138].

Otros ensayos [139-141] hacen uso de una serie de reacciones enzimáticas acopladas para convertir el glicerol liberado y convertirlo en un colorante: quinoneimina monitorizado a 545 nm. En el kit de ensayo de lipasa de BioVision [142], el glicerol se cuantifica enzimáticamente al monitorear un cambio Oxi-Red 570nm. Se detecta actividad de lipasa a niveles tan bajos como 0.02 mU por pozo. Los métodos espectrofotométricos permiten realizar hasta 4 determinaciones por hora, pero su número podría incrementarse hasta 16- 96 determinaciones por hora utilizando sistemas automatizados con soportes o lectores de microplacas de 96 pocillos.

Método de Espectrofotometría IR.

El método se basa en el análisis IR acoplado con la Transformada de Fourier del Espectro registrado utilizando triacilgliceroles como sustrato de la lipasa [143, 144]. Los ácidos grasos y sus ésteres pueden ser evaluados en base a sus coeficientes molar de absorción y la ley de Beer en 1730–1750 cm^{-1} [145].

Métodos de Fluorometría.

La fluorometría es una técnica analítica sensible que permite monitoreo continuo de la actividad enzimática. Los métodos fluorométricos usan: 1) sustratos cromogénicos, o 2) ácidos grasos liberados cromogénicos. Como sustratos cromogénicos se usa una variedad de

ésteres de ácidos grasos derivados del ácido parinarico [146-149], cumarina (umbeliferona) [150-154], compuestos pirénicos [155-158], resorufina [159], fluoresceína [160], etc. El ácido parinarico es un cromóforo natural, que proporciona fluorescencia a 432 nm con una longitud de onda de excitación a 320 nm. Se aplicó con éxito a la medición de la actividad de la lipasa pancreática con un límite de detección de 0.1 ng en un pH 8. Un aumento significativo de la fluorescencia del ácido parárico libre se observó en presencia de detergentes [94].

El inconveniente del ensayo es la oxidación del ácido parinarico por el Oxígeno atmosférico. [94]. Se sintetizaron numerosos ésteres de ácidos grasos cumarínicos y fueron probados como sustratos de lipasa cromogénica [154, 161]. La sensibilidad alcanzada es 0.1-5 nmol [153]. Sin embargo, una hidrólisis espontánea ocurre a pH 8,8.

La aplicación de derivados de acilglicerol pirénico causa un aumento de la intensidad de fluorescencia máxima los ácidos grasos liberados en la hidrólisis catalizada por lipasa. La escisión del sustrato fluorescente 1, 2-dioleoil-3- (piren-1-il) decanoilrac- glicerol da un ácido graso fluorescente [162]. Sin embargo, los derivados del acilglicerol pirénico también están poco hidrolizados por las lipasas. [149, 157].

Otro kit de análisis de lipasa ofrecido por Marker Gene Technologies Se basa en el uso de oleato de resorufina como sustrato el cual es fluorescente en longitud de onda larga. La liberación de resorufin durante la escisión se cuantifica por fluorometría [163].

Otro método basado en la hidrólisis catalizada por lipasa implica la conversión de ácidos grasos libres en cromogénicos utilizando rodamina B y midiendo la fluorescencia emitida a 535 nm con una longitud de onda de excitación a 485 nm [164-166]. El método es rápido, podría ser automatizado, y permite la determinación simultánea de un gran número de muestras utilizando diversos sustratos.

Métodos de Turbidimetría y Nefelometría.

La turbidimetría es un método para determinar la concentración de una sustancia en una solución midiendo el cambio de Intensidad de la luz en la dirección de propagación del incidente. La cuantificación de la actividad de la lipasa se realiza monitorizando la disminución con el tiempo de la absorbancia de una emulsión de triacilglicerol, debido a su degradación con liberación de ácidos grasos libres [167-174]. El método turbidimétrico de Neumann [168, 169] fue Comercializado por Boehringer-Mannheim.

Otra técnica involucró el uso de unos compuestos especiales conocidos como Tweens como sustratos con actividad determinada por el aumento de la absorbancia debido a la precipitación de los productos de la lipólisis como sales de calcio [175, 176]. El método es 36 veces más sensible que el ensayo titrimétrico con Tween 20, y 4 veces más sensible que el ensayo espectrofotométrico con p-nitrofenilo palmitato [95].

La nefelometría implica la medición de la intensidad de la luz dispersa. La determinación nefelométrica de la actividad de la lipasa podría realizarse rápidamente en un lapso de 2 a 4 minutos [175-177]. En general, la turbidimetría y la nefelometría son métodos muy convenientes

para la evaluación rápida de la actividad de la lipasa. Los problemas que surgen y algunas soluciones de estos métodos fueron reportados por Tietz [173].

Ensayos radiactivos.

Las dos técnicas principales de ensayos radioactivos aplicadas incluyen: 1) uso de sustratos de lipasa radioactivos (marcados) y cuantificación de los productos liberados y 2) uso de sustratos no marcados y determinación de los ácidos grasos libres marcados ya una vez liberados. Los sustratos radioactivos comúnmente utilizados son los oleoylglicerol marcados con ^{14}C o ^3H , así como yodo-131 [178-181]. La cantidad del producto detectable es del orden de nanogramos [92]. Los ácidos grasos están marcados con ^{63}Ni [182]. Los ensayos radiactivos son métodos analíticos específicos y sensibles que no permiten un seguimiento continuo, pero llevan mucho tiempo, debido a la extracción de los ácidos grasos, además de hacer uso de sustancias radiactivas.

Inmunoensayos

Los inmunoensayos son conocidos como técnicas altamente específicas y sensibles para la determinación de la actividad de las lipasas. Estos métodos son de primordial importancia para el diagnóstico clínico y son aplicados para la cuantificación de lipasas en suero y plasma, tejidos y lisados de cultivos celulares, y duodeno [183-197]. Se han desarrollado varios kits de pruebas clínicas basados en el ensayo ELISA, y son útiles en el rango desde 500 ng mL^{-1} lipasa [198-204].

Estas técnicas no son adecuadas para la evaluación de la actividad de las lipasas originadas por diversas fuentes, porque requieren la selección de una amplia gama de anticuerpos específicos. Además, la enzima podría formar agregados lo que limita la exactitud de los ensayos [205].

Métodos Conductométricos

La evaluación conductométrica de la actividad de la lipasa se basa en la medición de la variación de la conductancia de la solución debido de la liberación de ácidos grasos libres. Se obtuvieron resultados fiables utilizando triacetina [206-1208] que es un sustrato adecuado debido a su solubilidad en agua.

El inconveniente de la técnica es el periodo largo de tiempo de la medición el cual llega a ser de más de media hora. Así también, las mediciones sufren de una alta dependencia de la temperatura.

Métodos Cromatográficos.

Los métodos aplicados actualmente para la medición de lípidos y ácidos grasos liberados son: cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El estado actual del análisis de lípidos por cromatografía en capa fina fue revisado recientemente por Fuchs et al. [209]. El método es sensible y permite detectar picomoles de ácidos grasos. [210].

Un método simple y rápido para la determinación de la actividad de la lipasa utilizando cromatografía de gases con tributirina como sustrato

fue reportado por Kulkarni y Li [211]. Las técnicas cromatográficas involucran procedimientos de tratamiento directo, un corto período de incubación y solo 6 min de tiempo de análisis tras la reacción enzimática.

Los métodos para monitorización directa por HPLC de las reacciones de la lipasa fueron desarrollados por Ergan y André [212]. Mingarro et al. [213] reportó un método HPLC para medición directa de la actividad de lipasa en medios micelares inversos.

Un nuevo ensayo de lipasa in vitro que supera el sustrato y las limitaciones de pH de las técnicas convencionales fue desarrollado por Hao et al. [214]. Se basa en la cuantificación de ácidos grasos por cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas. Sin embargo, las determinaciones cromatográficas siguen siendo caras y consumen mucho tiempo. Además, requieren personal capacitado y equipos de laboratorio sofisticados.

Otros métodos

Un método de quimioluminiscencia, que permite a efectuar un solo ensayo dentro de 5 min fue sugerido por Arima et al. [223]. El método tiene una sensibilidad y una respetabilidad superior a las del método de titulación. El método fue aplicado para la determinación de la actividad de la lipasa en productos farmacéuticos preparativos.

Biosensores

Varios biosensores fueron desarrollados para determinación de sustratos de lipasas y productos de lipólisis., utilizando enzimas inmovilizadas

revisados por Starodub [96]. Por ejemplo, los biosensores amperométricos, para la determinación de triglicéridos son contruidos aplicando inmovilización de lipasa, glicerol quinasa y glicerol-3- fosfato oxidasa en varios soportes: acetato de celulosa. [216], PVC [217], alcohol polivinílico [218], cáscara de huevo [219], o nanopartículas de quitosano y óxido de zinc como una película compuesta [220] depositada sobre la superficie de un electrodo de Pt.

Un sensor capacitivo con una estructura tipo sándwich: Au/S(CH₂)₁₇CH₃/ substrato/electrolito fue reportado [221] donde la actividad de la enzima se cuantifica por monitoreo de la velocidad de desorción de los productos de la lipólisis midiendo el aumento de la capacitancia del electrodo.

Recientemente se desarrolló un sensor basado sobre la aplicación de una microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D) [222]. La triolina utilizada como sustrato de lipasa fue depositada sobre la superficie del electrodo de oro de la microbalanza QCM-D. La degradación de la película de trioleína por la enzima fue continuamente monitoreada midiendo los cambios en frecuencia y disipación y los dos parámetros se correlacionaron a la actividad de la lipasa. Los biosensores son considerados como herramientas analíticas prometedoras debido a la rapidez y sensibilidad de las determinaciones y su bajo costo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tripsina EC 3.4 (*peptidasas*) es una enzima del grupo de las hidrolasas que degrada las proteínas. La cuantificación precisa y rápida de la actividad de la tripsina es muy importante para el control de algunos procesos biotecnológicos así como para el diagnóstico médico ya que la determinación de la actividad de esta enzima es un indicador específico y fiable de la función pancreática, ya que la alteración de la actividad de la tripsina es una señal para alguna enfermedad como cáncer pancreático, fibrosis quística, pancreatitis aguda (PA), etc., siendo la PA una importante causa de morbilidad y mortalidad en México y en el mundo.

Las lipasas E.C. 3.1.1.3,) (*triacilglicerol acilhidrolasa*), enzimas del grupo de las hidrolasas catalizan la hidrólisis de grasas y aceites en ácidos grasos y glicerol tienen aplicaciones industriales. Los sectores de alimentos, detergentes, farmacéuticos y biocombustibles son las áreas industriales más significativas de las aplicaciones de lipasa [1-5, 78, 226-231] que requieren una evaluación simple, rápida y precisa de la actividad enzimática. La actividad de la lipasa es crucial para el mantenimiento de la estabilidad de los procesos industriales y también es un importante indicador en la medicina, de algunas enfermedades pancreáticas.

Hasta ahora se han desarrollado muchos tipos de sensores y métodos para la cuantificación de la actividad de la tripsina y lipasa, basados en técnicas de medición como espectrofotometría, titulación, ensayo radioactivo, inmunoensayo, conductometría, cromatografía, microbalanza de cristal de cuarzo, etc. [12, 14, 20, 21, 65, 66]. Sus inconvenientes comunes son: los procedimientos complicados y largos; se aplican por personal especializado y altamente capacitado; se requieren

reactivos y equipos de laboratorio costosos y sofisticados, incluso materiales radiactivos.

Debido de los problemas mencionados se necesitan sensores y métodos para la determinación de las actividades de la tripsina y la lipasa que son simples, rápidos, precisos, de bajo costo, capas de ser aplicados por personal no capacitado en la industria biotecnológica.

JUSTIFICACIÓN

La medición rápida, simple y confiable de la actividad de las enzimas del grupo de las proteasas tiene una importante aplicación en la industria biotecnológica donde la información sobre la actividad de las enzimas utilizadas es crucial para la eficiencia del proceso. También la determinación precisa de la actividad de las enzimas del grupo de las hidrolasas es importante en el diagnóstico médico de los desórdenes pancreáticos tales como:

- Pancreatitis Aguda,
- Cáncer pancreático,
- fibrosis quística, entre otras.

Desafortunadamente los métodos aplicados recientemente el sector industrial y médico son complicados, lentos, costosos y requieren personal altamente capacitado para su realización. Debido de eso se necesitan métodos y sensores simples, rápidos, precisos y económicos para ser aplicados en industria y la medicina.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es: desarrollo, caracterización metrológica y optimización (maximización de la amplitud y minimización del tiempo de la respuesta) de sensores para la cuantificación de la actividad de las enzimas del grupo de las proteasas: tripsina y lipasa.

Objetivos Particulares

1. Determinación de las características metrológicas y analíticas de los sensores nanoestructurados de tripsina y lipasa utilizando soluciones patrones
2. Estudio de la influencia de los parámetros operacionales mencionados sobre la amplitud de la respuesta y el tiempo de la respuesta:
 - pH y velocidad de agitación
 - tipo del sustrato aplicado como elemento sensible
 - composición y tamaño de las nanopartículas
 - la carga de la capa sensible con nanopartículas
 - estado de la superficie de las nanopartículas (presencia o ausencia de modificación)
3. Optimización de los valores de los 5 parámetros mencionados para maximizar la amplitud y minimizar el tiempo de la respuesta
4. Validación de los resultados obtenidos aplicando los sensores desarrollados por comparación con los métodos estandarizados.

HIPÓTESIS

Las enzimas del grupo de las hidrolasas catalizan la degradación de sus sustratos por hidrólisis la velocidad del cual es proporcional de la actividad de la enzima. Este hecho permite aplicar transductores avanzados tales como: piezoeléctrico, óptico, impedimétrico y conductométrico para la detección de la velocidad de la degradación de una capa sensible hecha de un sustrato de la enzima.

La degradación enzimática de la capa sensible resulta en la disminución de su grosor, lo que hace posible su detección por impedancia eléctrica y conductometría, y su masa permite la aplicación de una QCM, así como la dispersión de la luz en la solución de la muestra que facilita a su vez la aplicación de la nefelometría. Así el registro de estos parámetros como función del tiempo dará como resultado curvas cinéticas de la degradación de los sustratos, que caracterizan las actividades enzimáticas.

La carga de la capa sensible aplicada en un sensor en base a QCM con nanopartículas conformada por un material con masa específica mucho más elevado que el sustrato (como Fe_2O_3) resultara en un aumento en el cambio de la masa provocado por el proceso enzimático, incrementando de esta manera la amplitud de la respuesta. De igual manera la salida de las nanopartículas reflejantes la luz de la capa sensible amplificará la respuesta óptica.

De la misma manera, la carga del sustrato aplicado en los sensores con base en la impedancia eléctrica y conductometría con nanopartículas hechas de un material con alta resistividad y alta

permeabilidad eléctrica (tales como SiO_2) provocará un cambio significativo en la conductividad y la impedancia de la capa sensible durante su degradación enzimática debido de la liberación de las nanopartículas, incrementando de esta manera la amplitud de la respuesta del sensor.

Las consideraciones presentadas arriba son las bases del desarrollo de los sensores objetivo de este trabajo.

MARCO TEÓRICO

Biosensores en la cuantificación de la actividad enzimática de las hidrolasas

¿Qué es un biosensor?

Los biosensores, según la definición de la IUPAC, son “Dispositivos que utilizan reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células enteras para detectar compuestos químicos usualmente por electricidad, señales térmicas u ópticas” [140].

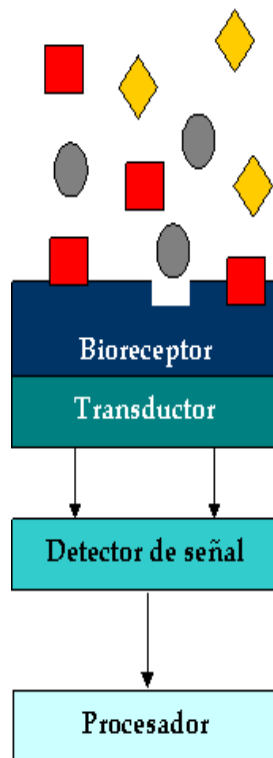


Figura 5. Biosensor con construcción convencional. Un biosensor es un dispositivo analítico constituido por un componente biológico de reconocimiento inmovilizado, el cual está comunicado con un sistema de transducción que transforma la señal bioquímica en señal

Un biosensor se puede definir como un dispositivo compuesto por dos elementos fundamentales: un receptor biológico (por ejemplo: proteínas, ADN, células, etc.) preparado para detectar específicamente una sustancia aprovechando la especificidad de las interacciones biomoleculares y un transductor o sensor, capaz de interpretar la reacción de reconocimiento biológico que produce el receptor y "traducirla" en una señal cuantificable. Los dos constituyentes del biosensor están integrados conjuntamente y es precisamente esta unión de dos mundos opuestos la que le confiere a los biosensores sus características especiales de sensibilidad y selectividad.

Es frecuente confundir el término "biosensor" con un dispositivo que mide moléculas biológicas, cuando en realidad el nombre "biosensor" hace referencia a la parte receptora biológica que lleva incorporada en su interior. Por ejemplo, es poco conocido que el medidor de glucosa es un biosensor, ya que en su interior combina un electrodo (transductor) con una capa de enzimas glucosaoxidasas (receptor), encargadas de catalizar la reacción de descomposición de la glucosa. Cuando la reacción enzimática tiene lugar, el electrodo detecta un cambio redox, que es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la sangre del paciente.

Receptores (capas sensibles) y transductores

Desde que en el año 1962 surgió el primer concepto de biosensor (biosensor de glucosa, Clark, 1962) el campo de investigación sobre biosensores ha ido creciendo de una forma exponencial hasta convertirse en un área fundamental de trabajo.

Son muchos los dispositivos biosensores que se han desarrollados y muy variados los mecanismos físico-químicos de transducción que se han empleado para traducir la interacción biológica en una señal cuantificable y útil para el usuario. La clasificación de los biosensores viene impuesta tanto por la naturaleza de la biocapa receptora elegida como por el tipo del transductor empleado. Como elementos biológicos receptores se pueden emplear enzimas, anticuerpos, receptores proteicos, secuencias de oligonucleótidos, fragmentos subcelulares como mitocondrias, secciones de tejidos animales y vegetales, células completas, etc. y como transductor, dispositivos ópticos, electroquímicos, y mecano-acústicos, principalmente. La combinación de las diversas capas receptoras con los diferentes transductores puede dar lugar a una gran variedad de dispositivos biosensores.

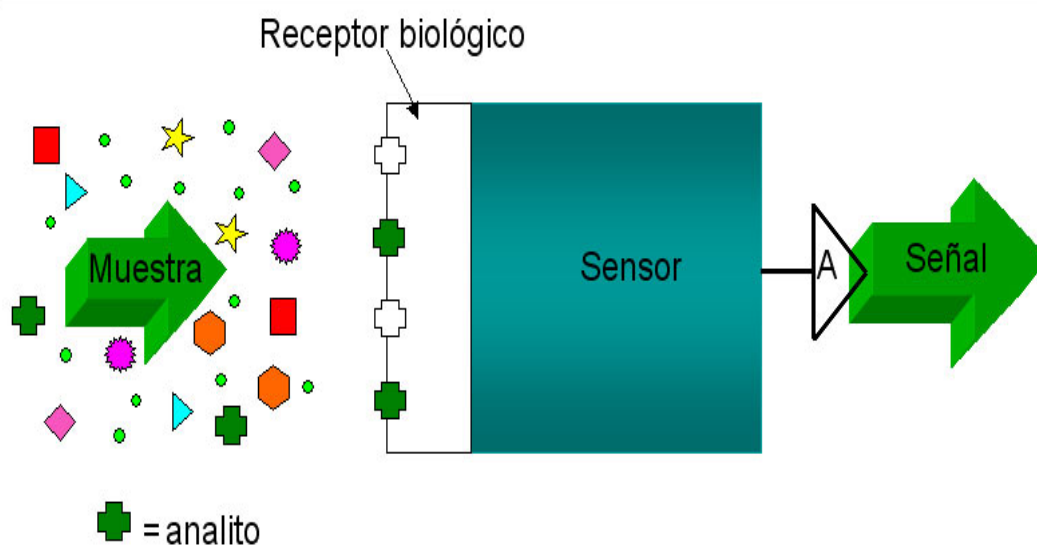


Figura 6 Esquema del funcionamiento de un biosensor. La muestra a analizar se pone en contacto con el dispositivo, siendo posible detectar sólo al analito (+) para el que está diseñado el receptor biológico. Cuando tiene lugar la reacción de reconocimiento biológico se producen una serie de cambios físico-químicos detectados por el transductor, que produce una señal cuantificable, directamente proporcional a la concentración del analito.

Características de los biosensores

Además de la sensibilidad y selectividad, una de las características fundamentales que hace atractivos a la mayoría de los biosensores es la posibilidad de realizar el análisis de la sustancia a determinar en tiempo real y de forma directa a diferencia de cualquier análisis biológico o clínico que requiere siempre un marcador (ya sea colorimétrico, fluorescente o radioactivo). Estas dos características confieren a los biosensores la posibilidad de realizar no sólo un análisis cualitativo (sí/no) y cuantitativo, sino también la posibilidad de evaluar la cinética de la interacción (constante de afinidad, asociación, disociación, etc.) y, por tanto, elucidar los mecanismos fundamentales de dicha interacción. Pocas técnicas biotecnológicas permiten la evaluación en tiempo real de las cinéticas de interacción, por lo que la tecnología de los biosensores se está imponiendo en todas aquellas áreas donde es fundamental conocer los detalles cinéticos de la interacción biomolecular, por ejemplo, en la evaluación de fármacos potenciales, diagnóstico clínico e incluso para el mantenimiento de la estabilidad de determinados procesos industriales.

Empleo de los biosensores

Las técnicas de análisis de laboratorio más habituales, ya sea de sustancias químicas o biológicas, suelen ser laboriosas, consumen mucho tiempo y en la mayoría de las ocasiones requieren personal especializado para su manejo. Frente a ellas los biosensores ofrecen la posibilidad de obtener medidas directas, continuas, de forma rápida y con alta sensibilidad. Muchos biosensores ofrecen también las ventajas de poseer un tamaño reducido y portabilidad, por lo que se podrían utilizar en cualquier lugar, como el hogar, la consulta del médico, y dentro de la

industria, en determinados procesos in situ. Esto además significa que la cantidad de muestra para hacer el análisis es relativamente baja (de micro a nanolitros), lo cual es de suma importancia si se trata de análisis de sangre o de ADN o si la muestra es costosa o difícil de conseguir.

En las últimas décadas se ha desarrollado de manera prometedora el campo de los biosensores, adaptándolos para la detección exacta de varios compuestos biológicos incluyendo la tripsina y la lipasa.

Desafortunadamente, los biosensores ópticos [14, 66] y electroquímicos [20, 21] propuestos para la cuantificación de la tripsina son respectivamente no suficientemente sensibles o utilizan un principio de detección sofisticado.

Una alternativa sencilla a los métodos de laboratorio existentes mencionados para la cuantificación de proteasas es la aplicación de un biosensor sencillo y económico desechable utilizando como elemento sensible una capa degradable por la enzima en combinación con un transductor piezoeléctrico o fotométrico.

Fundamento teórico de los biosensores piezoeléctricos (QCM)

En el biosensor piezoeléctrico gravimétrico usa una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) como un transductor altamente preciso y estable que contiene un cristal de cuarzo modificado (ver la Figura 5).

Los sensores QCM son contruidos con una fina lámina de cristal de cuarzo situado entre dos electrodos, donde la frecuencia de oscilación del sensor viene dada por el grueso de la lámina de cuarzo y el corte del

cristal original para obtener la lámina. El sistema que se utilizó en este trabajo está compuesto por un cristal de cuarzo de corte AT o BT y de 5-25 mm de diámetro. Son fáciles de construir y de usar, no son costosos. Permiten la detección directa del analito en tiempo real. La determinación es sensible, independiente de la temperatura. Puede medir cantidades muy pequeñas (10^{-9} g hasta 10^{-12} g en condiciones óptimas).

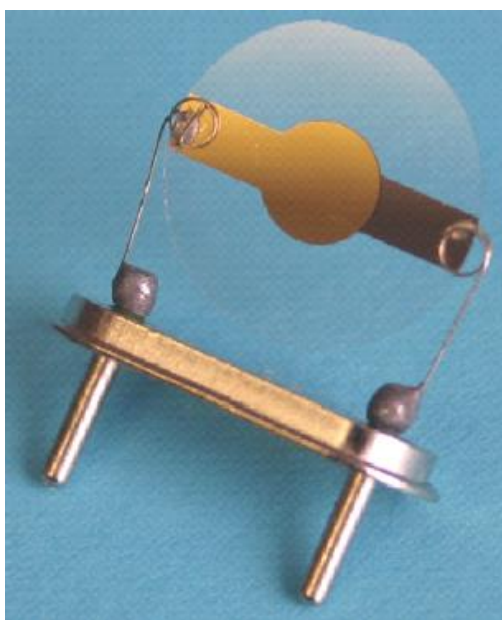


Figura 7. Los sensores QCM son contruidos con una fina lámina de cristal de cuarzo situado entre dos electrodos

La modificación de la superficie del electrodo de trabajo ubicado sobre la parte sensible del cristal de cuarzo para la fabricación de los biosensores se efectuó aplicando dos técnicas diferentes.

Inmovilización indirecta de la capa sensible

Se efectúa por la formación de enlaces químicos utilizando los grupos amino reactivos del polipirrol funcionalizado electrogenerado sobre la superficie del electrodo de Au de la QCM. Por ejemplo, se puede usar una mezcla del sustrato con el monómero del pirrol y aplicar electropolimerización del sustrato con grupos amino del monómero del pirrol en solución acuosa de 0.1 M LiClO_4 a un potencial de +0.80 V/ ECS. El espesor de la capa formada se controla por coulombimetría (ver Figura 8).

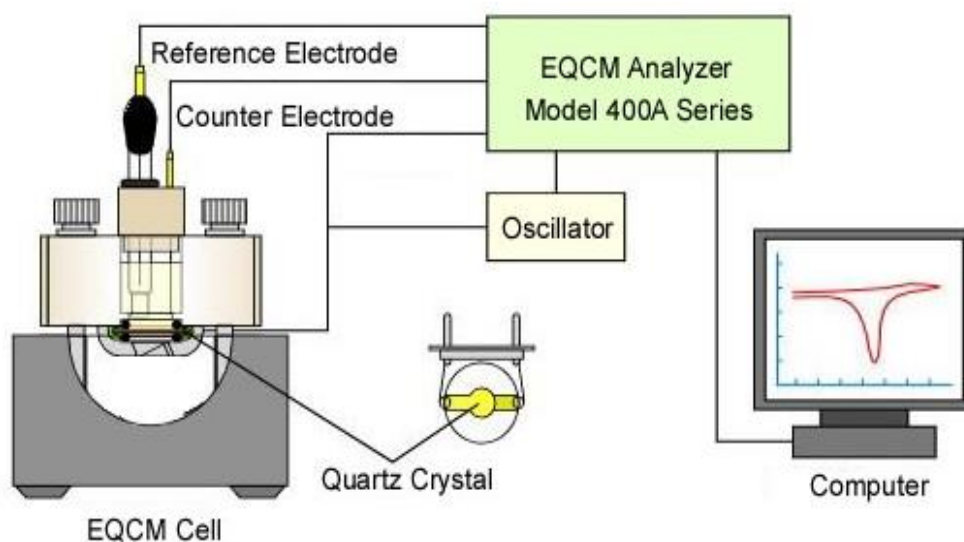


Figura 8. El cristal del QCM y el equipo QCM para electrodeposición de la capa sensible

Inmovilización directa de la capa sensible

Se puede efectuar por adsorción sobre la superficie del electrodo de trabajo de la QCM. Por ejemplo, micro volúmenes de la solución de sustrato se depositan con una micropipeta sobre la superficie del cristal de

cuarzo (sobre su electrodo de Au) y el solvente se deja evaporar. Este método se presenta en la Figura 9.

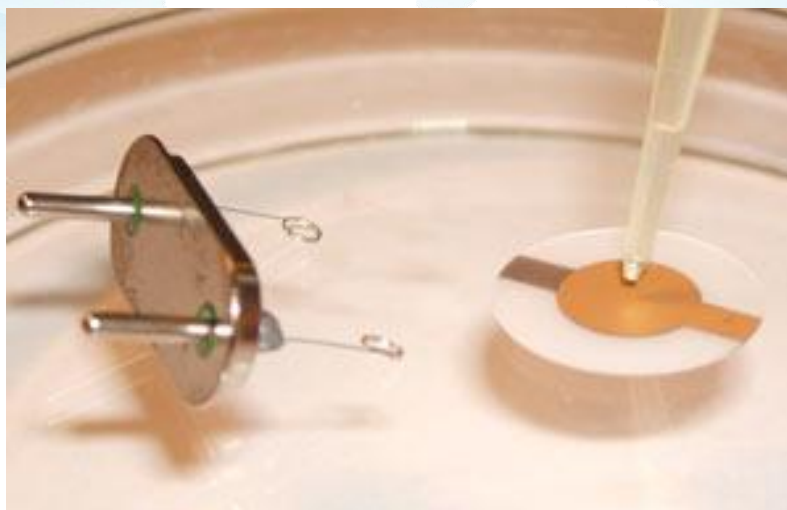


Figura 9. Deposición de la capa sensible por adsorción

Caracterización de la superficie modificada de la QCM

La caracterización de la superficie del electrodo de la QCM modificado se puede efectuar por SEM. Los métodos propuestos de inmovilización del sustrato se pueden estandarizar para asegurar la formación reproducible de las capas sensibles con una distribución homogénea de la molécula biológica.

Cálculo del cambio de masa de la capa sensible degradada por la enzima

La microbalanza de cristal de cuarzo se basa en la medición 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) (ecuación de Sauerbrey):

$$\Delta f = -f_0^2(\Delta m/A) / N \rho$$

Donde: f_0 es la frecuencia de oscilación inicial; A es el área del cristal y ρ es su densidad; N es una constante.

En presencia de la enzima en la solución a analizar, la masa del sustrato fijado sobre el electrodo del cristal de la QCM se reduce como resultado de la digestión del sustrato por la enzima. Por consecuencia, la frecuencia de oscilación de la QCM aumenta porque se baja la carga del cristal que sirve como elemento de resonancia. La velocidad de cambio de la masa y de la frecuencia es proporcional a la actividad enzimática.

Ventajas del sensor basado en QCM como transductor

El sensor nano estructurado tiene las ventajas siguientes:

- gran sensibilidad de medición de la actividad enzimática debido a la capacidad de la QCM a detectar cambios de la masa de proteína muy pequeños (10^{-9} hasta 10^{-12} gramos).
- larga vida debido de la regeneración de la película sensible
- medición directa en tiempo real de la actividad enzimática registrando el aumento de la frecuencia de la QCM provocado por la pérdida de la masa de la proteína o aumento de la absorbancia

de la luz por la turbidez de la solución provocada por la degradación de la película sensible contenida nanopartículas

- construcción sencilla
- no necesita personal calificado para su uso
- bajo costo

Fundamento teórico de los biosensores espectrofotométricos

Un biosensor espectrofotométrico también consta de una capa sensible (sustrato degradable por la enzima determinada) depositada sobre un portador. Como transductor se usa un fotómetro capaz a medir el cambio de la intensidad de la luz con una longitud de la onda determinada, provocado por la degradación de la capa sensible durante su contacto con la enzima. La actividad enzimática se calcula utilizando una curva de calibración predeterminada.

En el caso de los sensores piezoeléctrico y fotométrico la adición de nanopartículas provoca aumento de la amplitud de la respuesta. La aplicación de nanopartículas cargadas con proteína, fijas sobre una película depositada por fuerza magnética sobre el cristal de cuarzo de la QCM y/o una tira plástica permite inmovilizar la película sensible de manera estable y regenerable. La regeneración de dicha película sensible ya desactivada (debido a las mediciones) se retira utilizando un flujo de agua y poniendo el cristal o la tira en contacto con las nano-partículas cargadas con proteína para que se forme una nueva película sensible.

En este trabajo se aplicó un enfoque sencillo y de muy bajo costo que permite la cuantificación rápida y sensible de la actividad de la

tripsina, por medio de sensores espectrofotométricos que constan de dos partes:

1. Tiras desechables de muy bajo costo que sirven como bio-receptor (la parte sensible del sensor) y cubeta que contiene la muestra



Figura 10. Tira desechable que sirve como bio-receptor

2. Espectrofotómetro, un equipo accesible y de bajo costo que sirve como transductor, detector y procesador de la señal.



Figura 11. Espectrofotómetro, sirve como transductor

La aplicación de este enfoque permite desechar únicamente la parte sensible del sensor cuando se pierde su actividad con el tiempo.

1. La disminución del volumen de la muestra líquida que contiene la enzima
 2. El aumento del área de sustrato en contacto con la muestra
 3. El aumento de la carga del sustrato con nanopartículas
- causarán aumento de la turbidez de la muestra y la respuesta respectivamente durante la degradación del sustrato por la enzima acompañada con liberación de nanopartículas

Las nanopartículas de carbono y metálicas son insolubles en el agua que previene la alteración de los resultados que ocurre en caso de aplicación de tinta como carga del sustrato.

Fundamento teórico de los biosensores nefelométricos

Principio de la Nefelometría

La nefelometría se basa en el efecto Tyndall o Willis-Tyndall de dispersión de la luz. Como respuesta se mide la intensidad de la luz dispersada por las partículas que se encuentran en la cubeta de medición. La nefelometría consiste en la medición de la radiación causada por partículas (en disolución o en suspensión), midiendo así la potencia de la radiación dispersada en un ángulo distinto al de la dirección de la radiación incidente.

Cuando una partícula en suspensión es alcanzada por un haz de luz, existe una porción de la luz que se refleja, otra porción es absorbida,

otra desviada y el resto se transmite. Es por esto que cuando la luz golpea un medio transparente en el cual exista una suspensión de partículas sólidas, la suspensión se observa turbia.

Dispersión de la radiación por partículas en disolución

En el momento en el cual un haz de luz choca contra las partículas de una sustancia en suspensión, la dirección de propagación del haz cambia su dirección. Este efecto depende de los siguientes aspectos:

1. Dimensiones de la partícula (tamaño y forma).
2. Características de la suspensión (concentración).
3. Longitud de onda e intensidad de la luz.
4. Distancia de la luz incidente.
5. Ángulo de detección.
6. Índice de refracción del medio.

Construcción del equipo nefelométrico desarrollado

Una foto-celda (9) colocada a 90 grados con respecto del haz de luz (6) (ver Figura 7) mide la intensidad de la luz desperdigada por las nanopartículas. La muestra líquida (5) contiene la enzima y se coloca en la cubeta fotométrica (3) cuyas cuatro paredes son transparentes.

El sustrato de la enzima cargado con nanopartículas se coloca en un pistón hueco cuadrado (7) cerrado, en su parte superior e inferior con mayas porosas. Un electroimán (1) equipado con resorte (2) mueve el pistón hacia arriba y abajo para intensificar el contacto entre el sustrato y

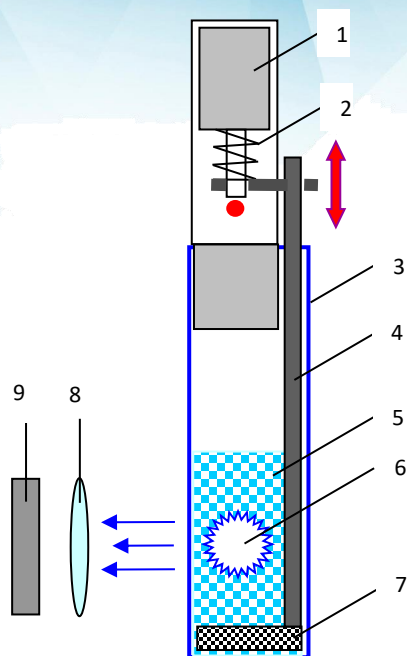


Figura 13. Diagrama de un nefelómetro



Figura 12. Fotografías de una cubeta nefelométrica

la enzima. De esta manera la muestra que contiene la enzima pasa a través del tambor entrando en contacto con el sustrato. Las nanopartículas liberadas por la gelatina como resultado de su hidrólisis, salen del pistón por los poros de la maya y se distribuyen en el todo el volumen de la muestra debido de la agitación causada por el movimiento del tambor. Las nanopartículas dispersan la luz y su intensidad se mide con la foto-celda (9) y un medidor de corriente.

Fundamento teórico de los biosensores conductométricos

Principio del método de conductometría

La conducción de la corriente eléctrica a través de las disoluciones iónicas se realiza por los iones de la disolución, los cuales se mueven en distintos sentidos (de acuerdo con el signo de su carga) bajo la acción del campo eléctrico producido por la diferencia de potencial aplicada entre los dos electrodos en ella introducidos.

➤ Para estas disoluciones es válida la Ley de Ohm:

$$V = I \cdot R$$

R es la resistencia del conductor (en **Ohm**, Ω),

V es la diferencia de potencial aplicada (en voltios, V)

I es la intensidad de corriente que circula a través de la disolución (en amperios, A).

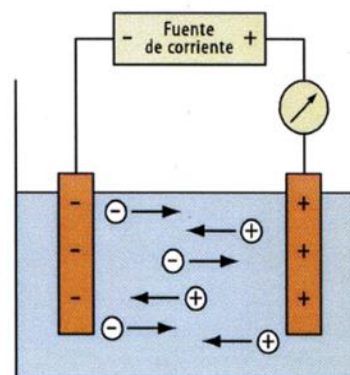


Figura 14. Fundamento de la Conductometría

La conductometría es una herramienta muy simple pero poderosa para caracterizar propiedades de soluciones aplicada ampliamente en una gran variedad de áreas científicas e industriales. Por ejemplo, Samadi-Maybodi et al. [72] informó la determinación de cisteína y metionina por conductometría; Ahmadzadeh et al [73] reportó estudios conductométricos de reacción de complejación; Prkić et al. investigó el comportamiento del bromuro de cesio en una solución acuosa de aceite de butano-2 aplicando la conductometría [74] y Yousef et al. [75] estudió los complejos de ácido fólico con algunos iones metálicos por aplicación de conductometría, etc. El método conductométrico informado por Ballot [206-208] se basa en la aplicación de sustancias de alta conductividad como triacetina o trioleína como sustrato de lipasa. El principal inconveniente de este método claramente reconocido por el autor es el largo tiempo de respuesta, siendo éste de más de media hora.

Aplicación del método conductométrico en biosensores

En este trabajo se desarrolló y caracterizó un método conductométrico adecuado para aplicaciones industriales. Este se basa en la determinación conductométrica de la tasa de hidrólisis del sustrato catalizada por la lipasa, proporcional a la actividad de la lipasa: mientras más alta la actividad enzimática es más alta tasa de hidrólisis.

Si el sustrato de lipasa se deposita como una capa delgada y sensible con grosor d sobre un electrodo conductométrico con área A , la degradación enzimática por la lipasa causará una disminución del grosor a lo largo del tiempo. La disminución de ese grosor será proporcional a la actividad enzimática de la lipasa y dará como resultado la disminución

correspondiente de la resistencia **R** (aumento de la conductividad G) de acuerdo con la Ecuación 1:

$$R = 1/G = \rho d/A \quad (1)$$

con **ρ** como la resistividad del material de la capa sensible.

La alta resistividad del aceite de oliva ($\rho = 10^7$ ohmios m [232]) lo convierte en una sustancia adecuada para ser utilizada como modificador de electrodo conductométrico. Por otro lado, si el aceite de oliva se carga con nanopartículas de un material que posee una mayor resistividad eléctrica como el SiO₂ (con una resistividad $\rho = 10^{17}$ Ohms m [233]), se formará un nanocompuesto de muy alta resistencia. En este caso, se forma una red de sílice que se filtra a través de la matriz de aceite y que posee una buena adherencia en superficies sólidas, según lo informado por Adelman et al. [234]. Este tipo de nanocompuesto ya fue probado y aplicado como una capa sensible por los autores anteriormente mencionados en métodos fotométricos y QCM para la determinación de la actividad de la lipasa [225, 235-237].

La resistencia de la capa sensible del nanocompuesto de aceite de oliva / SiO₂ determinará la resistencia total de la interfaz: electrodos conductométricos modificados con nanocompuestos / solución tampón que contiene lipasa. Teniendo en cuenta la Ecuación (1), está claro que la conductancia (resistencia) de la interfaz será proporcional al grosor de la capa sensible que, a su vez, depende de la actividad de la lipasa.

La degradación enzimática del aceite de oliva que a la que se adhieren las nanopartículas de SiO_2 en el nanocompuesto provocará la liberación de éstas de la capa sensible a la solución tampón que contiene lipasa. Como resultado, se producirá un cambio mucho mayor en la resistencia de la capa sensible en comparación con la aplicación de aceite de oliva simple como una capa sensible debido a la mayor resistencia de las nanopartículas. Esto dará como resultado la amplificación de la sensibilidad del método conductométrico propuesto.

Basado en estos supuestos, el desarrollo de un método rápido, simple, preciso y rentable para la cuantificación de la actividad de la lipasa, junto con su caracterización en términos de rango de cuantificación lineal, LOD, precisión, tiempo de respuesta y repetibilidad. La respuesta conductométrica se registra durante la degradación enzimática del nanocompuesto modificador del sustrato de lipasa en los electrodos conductométricos.

Fundamento teórico de los biosensores impedimétricos

Siendo una técnica adecuada para la caracterización de interfaces, la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) [238, 239] parece ser apropiada para la evaluación de la tasa de degradación de una capa de sustrato de lipasa puesta en contacto con una solución que contiene lipasa. El prolongado tiempo necesario para el registro de frecuencia y las muy particulares formas de graficar los datos de impedancia hacen que el EIS sea difícil de usar en la práctica en un análisis industrial real.

Aplicación del método impedimétrico en biosensores

En este trabajo se propone un enfoque que permite superar los inconvenientes mencionados del EIS. Se basa en el registro de impedancia eléctrica a lo largo del tiempo durante la degradación enzimática de una capa de sustrato depositada en el electrodo de trabajo (indicador) aplicando un voltaje de CA de pequeña amplitud con frecuencia constante. El término impedancia eléctrica se usa en lugar del EIS comúnmente usado porque no se aplica ningún espectro de frecuencia sino una frecuencia única de la tensión de CA impuesta con una pequeña amplitud.

La deposición de una capa delgada de un sustrato de lipasa no conductora como el aceite de oliva (con una resistividad ρ de 1.25×10^7 ohmios [232] y permitividad dieléctrica $\epsilon = 3.1-3.35$ [240, 241]) En un electrodo metálico y al ponerlo en contacto con una solución tampón conteniendo lipasa, dará lugar a la formación de una placa de capacitor electrolítico. El electrodo metálico y la solución tampón conductora servirán como las dos placas de condensadores, mientras que la capa de sustrato no conductora entre ellas servirá como capa dieléctrica del condensador. La capacitancia C del capacitor formado se puede expresar mediante la ecuación:

$$C = \epsilon A/d \quad (2)$$

con A , el área de superficie de la capa dieléctrica y d su espesor. La permitividad dieléctrica ϵ caracteriza el grado de polarización eléctrica del sustrato bajo la influencia de un campo eléctrico externo.

La degradación enzimática de la capa de sustrato que sirve también como condensador dieléctrico provocará su disminución del espesor, lo que propiciará los cambios de capacitancia correspondientes de acuerdo con la Ecuación 2, lo que inducirá los cambios de reactancia capacitiva X_c correspondientes. X_c es una parte integral importante de la impedancia eléctrica de la interfaz de la solución que contiene el electrodo / lipasa modificada. Como se sabe, X_c depende del valor de C y la frecuencia aplicada ω como se acordó en la ecuación: $X_c = 1/\omega C$ [242, 243] la cual, después de la sustitución C en su expresión de la ecuación 2 se obtiene:

$$X_c = d/\omega \epsilon A \quad (3)$$

Otras partes integrales importantes de la interfaz de impedancia son las resistencias conectadas en serie y en paralelo al condensador de la interfaz. La capa dieléctrica posee una resistencia R alta pero limitada, prácticamente conectada en paralelo con las placas de capacitor, lo que provoca una fuga de flujo de corriente. El valor de R depende del grosor de d y el área A de la capa dieléctrica y de la resistividad ρ del material, de acuerdo a la ecuación:

$$R = \rho d/A \quad (4)$$

Por lo tanto, como se ve en las Ecuaciones 3 y 4, los dos componentes de impedancia más significativos X_c y R dependen del grosor de la capa de sustrato d , mientras que la última depende del tiempo transcurrido de la actividad enzimática de la lipasa. Lo mismo es válido también para las resistencias ajenas a las series relacionadas con la

interfaz: electrodo modificado / lipasa conteniendo la solución tampón, mientras que al mismo tiempo todos los demás parámetros como: ω , ϵ , ρ y A permanece constante. Así, el espesor d disminuye a lo largo del tiempo (resultante de la degradación enzimática de la capa de sustrato) provocará cambios correspondientes de la impedancia eléctrica de la interfaz que puede servir como medida de la actividad de la lipasa (respuesta del sensor).

Como ya se mencionó anteriormente, el camino complicado de la presentación de datos EIS (además del largo tiempo de respuesta) no permite su empleo directo en la evaluación de la actividad de la lipasa. En el pasado, se emplearon gráficos de la corriente alterna frente a la tensión alterna aplicada en un cierto rango de frecuencias en las mediciones de impedancia. Los parámetros de las curvas en forma de óvalos resultantes del cambio de fase de corriente alterna conocido como "figuras Lissajous" se emplearon para la evaluación de impedancia [244]. Recientemente, gráfico de impedancia de plano complejo (erróneamente denominado como gráficos de Nyquist según Macdonald [245]) se emplea para expresar la respuesta EIS que tiene la desventaja de no indicar la respuesta de frecuencia directamente [244-247] lo que no permite su fácil interpretación.

En este trabajo se propuso un enfoque que permite la aplicación de mediciones de impedancia para la evaluación simple y rápida de la actividad de la lipasa, basado en la aplicación de un voltaje de CA con una pequeña amplitud y frecuencia fija única. Por lo tanto, los cambios de impedancia causados por la disminución del espesor de la capa sensible d a lo largo del tiempo podrían evaluarse fácilmente registrando el ángulo

del cambio de fase de la corriente alterna Φ a lo largo del tiempo. Como es sabido [244-246] el cambio de fase de la corriente CA Φ es uno de los parámetros que dependen de la impedancia y, por lo tanto, puede servir como su medida. La corriente CA capacitiva se adelanta al voltaje de CA impuesto y su cambio de fase $\Phi = -90^\circ$ solo en caso de cargas estrictamente capacitivas (ideales). Para cargas puramente resistivas (activas), la corriente alterna sigue el voltaje de CA y $\Phi = 0^\circ$ mientras que para las cargas mixtas resistivas-capacitivas reales (incluidas las pérdidas) el cambio de fase estará entre 0° y -90° , dependiendo de todos los valores X_c y R [242] que a su vez depende de d . Por ejemplo, para X_c and R conectado en serie $\Phi = \tan^{-1}(X_c/R)$ [242].

A pesar de que la trioleína es un sustrato de lipasa muy específico [237] el aceite de oliva es más adecuado en los ensayos de actividad de la lipasa debido a su menor costo; además, el aceite de oliva contiene de 4 a 30% de trioleína [248]. El aceite de oliva también posee una ventaja más: su capacidad para formar un nanocompuesto. Adelman y al. [234] encontró que se forma una red de sílice, que se filtra a lo largo de la matriz de aceite y se produce una gelificación que ocasiona una buena adhesión en superficies sólidas debido a la naturaleza percolante de las nanopartículas de sílice, es decir, se forma un nanocompuesto de aceite de oliva/nanopartículas de SiO_2 . Tal nanocompuesto fue aplicado con éxito anteriormente por los autores como una capa sensible en los métodos fotométricos y QCM para la determinación de la actividad de la lipasa [225, 235, 236].

La adición de nanopartículas de SiO_2 mejora las propiedades dieléctricas y de resistividad del aceite de oliva debido a su mayor

permitividad y resistividad dieléctricas en comparación con las del aceite de oliva simple ($\epsilon = 7$ vs. 3.35 y $\rho = 10^{17}$ vs. 10^9 ohms m respectivamente) [232, 240, 241]. Así, durante la degradación de la capa sensible del nanocompuesto por la hidrólisis catalizada por la lipasa, las nanopartículas de SiO_2 dejarán la capa sensible pasando a la solución provocando un cambio mayor de la capacitancia de la capa sensible y la resistencia (la impedancia) amplificando de esta manera la respuesta del sensor y, por lo tanto, causando aumento de la sensibilidad éste.

Sobre la base de estos supuestos, se desarrolló y caracterizó un sensor impedimétrico desechable rápido, simple y rentable para la cuantificación de la actividad de lipasa industrial en términos de rango de cuantificación lineal, LOD, precisión, tiempo de cuantificación y repetibilidad. El cambio de fase de la respuesta de corriente CA se registró en función del tiempo dado que la respuesta del sensor se debió a una aplicación de voltaje CA con una pequeña amplitud y frecuencia fija durante la degradación enzimática de una capa de nanocompuesto de sustrato de lipasa depositada en la superficie del electrodo indicador.

EXPERIMENTAL

Método Piezoeléctrico Gravimétrico (QCM)

La aplicación de la microbalanza de cuarzo como transductor

Se construyó un sensor para la medición de la actividad de las hidrolasas (tripsina) basado en el empleo de la microbalanza de cuarzo (QCM) aplicada como transductor.

La QCM es un dispositivo que consta de un cristal de cuarzo el cual vibra con una frecuencia de resonancia que depende de la masa total del cristal vibrante. En este caso se utilizó una QCM marca CHI 440 con frecuencia de 8 MHz.

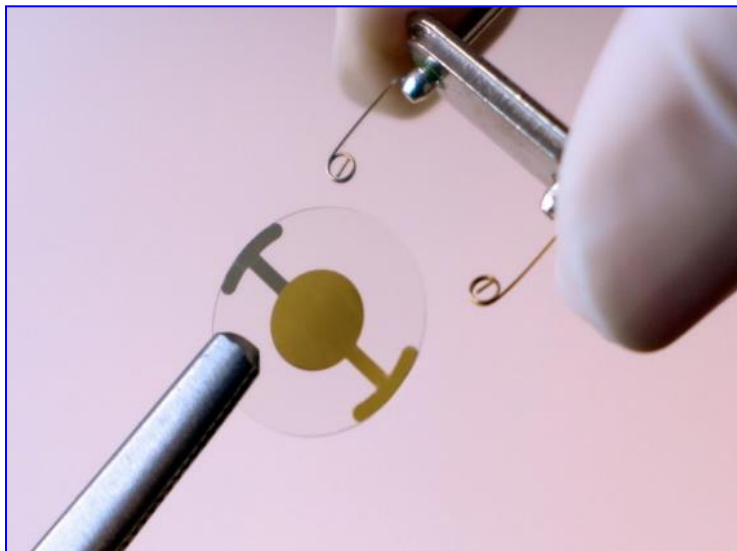


Figura 15. Foto del cristal de cuarzo de 8 MHz usado en la QCM

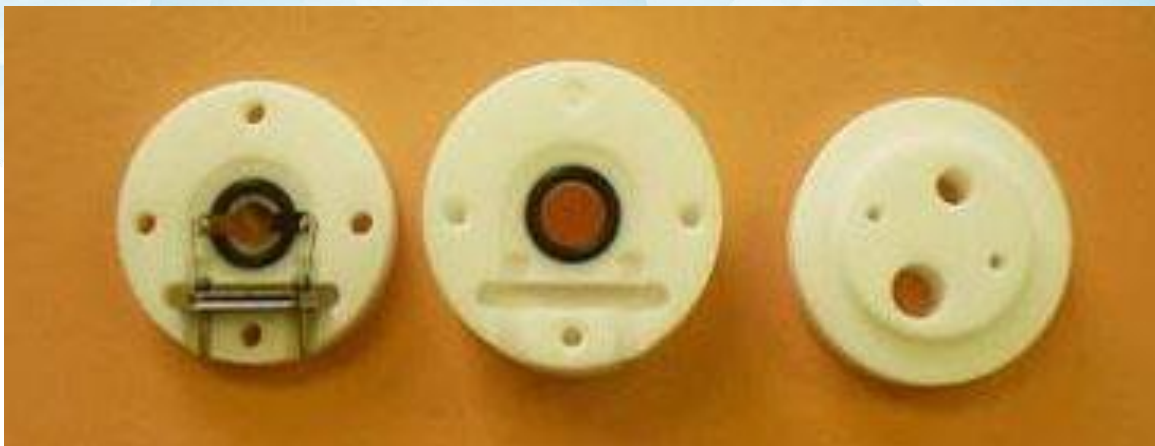


Figura 16. La QCM marca CHI 440 con el cristal de 8 MHz

Preparación de la capa sensible del sustrato

Como sustrato (de la enzima tripsina) depositado como capa sensible sobre el cristal de cuarzo fue utilizada gelatina de Tipo A, G2500 (de la compañía SIGMA).

Todos los experimentos fueron realizados en medio acuoso con pH 8 contenido tripsina.

Las nanopartículas de plata (Ag) fueron preparados por electrolisis entre 2 electrodos de plata en agua a 60°C aplicando un voltaje de 25 volts durante 4 minutos cambiando la polaridad de los electrodos cada 30 segundos para prevenir la disolución si uno de los electrodos siempre sirve como ánodo.

No se utilizaron nanopartículas comerciales secas dado que las nanopartículas son hidrófobas y no se pueden mezclar con la solución acuosa de la gelatina, éstas se agrupan y no se distribuyen uniformemente en el volumen de la gelatina. La mezcla gelatina – nanopartículas fue preparada agregando gelatina al agua caliente electrolizada ya cargada con nanopartículas de plata.

Las mediciones de QCM se han realizado utilizando el modelo CHI400A microbalanza electroquímica del cristal de cuarzo que incluye: potencióstato / galvanostato CHI440A, con circuitos de osciladores, y una celda para la muestra.

Se aplicaron cristales de cuarzo con diámetro de 13,7 mm con un disco dorado de diámetro de 5,11 mm depositado en el centro del cristal. El constante de la microbalanza (de acuerdo con los datos del proveedor) era de: $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$ y para el cristal de cuarzo de 8MHz, la masa como función de la frecuencia de resonancia es 1.4 ng/Hz^{-1} .

Método espectrofotométrico

Preparación de la capa sensible del sensor

Fueron aplicadas dos técnicas para la preparación de la capa sensible del sensor sobre la tira:

- aplicación de cinta fotográfica
- deposición por "spin coating"

Se empleó la primera técnica debido a que las películas obtenidas por "spin coating" no eran uniformes, motivo que causó baja reproducibilidad de los resultados de medición.

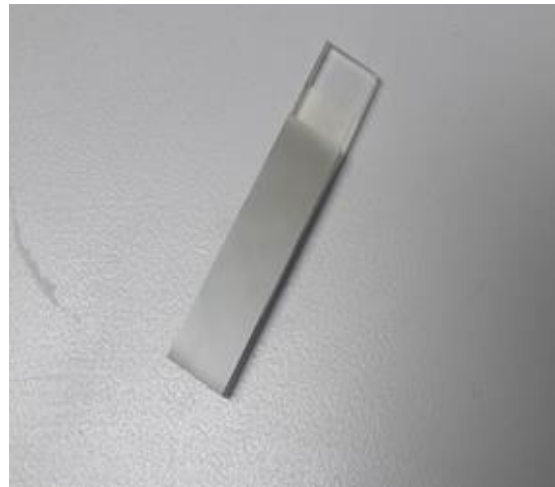


Figura 17. Aplicación de cinta fotográfica como capa sensible

Construcción de la parte sensible del sensor

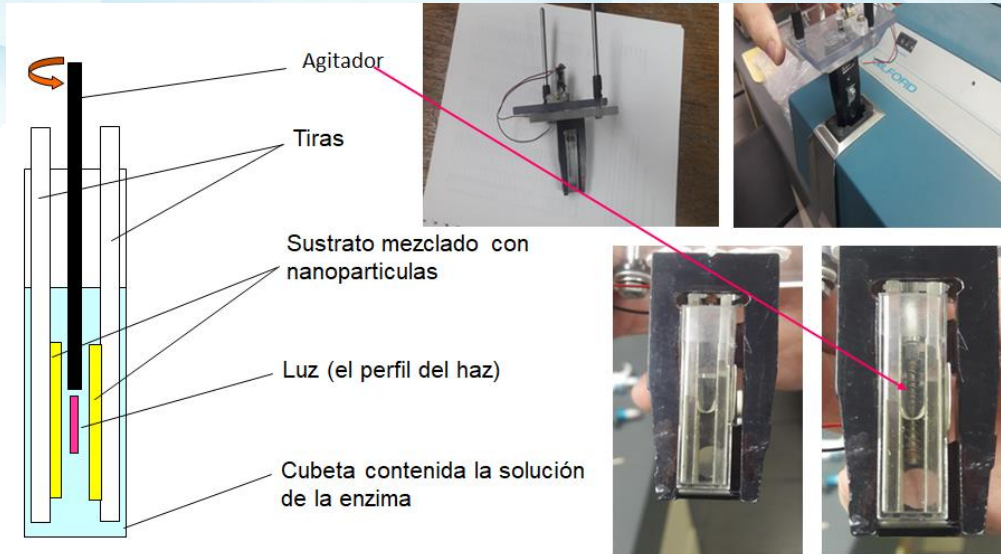


Figura 18. Construcción de la celda espectrofotométrica

Mecanismo del proceso

Debido de la degradación del sustrato por la hidrólisis catalizada por la enzima tripsina se liberan las nanopartículas cargadas en la gelatina, que aumentan la turbidez de la solución. El aumento de la turbidez es la medida de la actividad de la enzima.

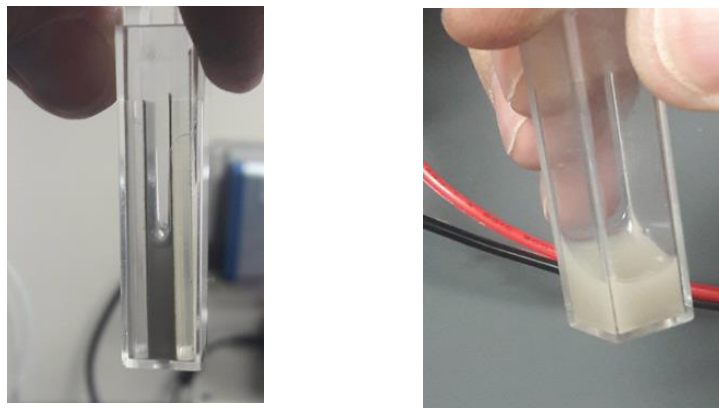


Figura 19. La turbidez de la solución contenida la tripsina después de la degradación de la capa sensible

Metodología de la medición

Cuantificación de muestras artificiales para estudiar la influencia de los parámetros sobre la amplitud de la respuesta:

1. Se coloca 1 mL de agua en la cubeta y se introduce en el espectrofotómetro.
2. Se enciende el agitador y empieza el registro de la curva en coordenadas: Absorbancia de la luz a 450 nm vs el Tiempo.
3. Se agrega la solución de la enzima siguiendo el registro de la curva



Figura 20. Algoritmo para la cuantificación de las muestras artificiales

Método nefelométrico

Equipo de medición

El equipo de medición consta de un nefelómetro, una fuente de voltaje para la lámpara y otra fuente para electroimán. La foto-celda está conectada a un convertidor Corriente - Voltaje



Figura 21. Equipo de medición para el método nefelométrico

Preparación y caracterización de las nanopartículas

Las nanopartículas de plata se producen por disolución anódica de electrodos de plata en agua desionizada. Se usan dos electrodos de plata como ánodo y cátodo cambiando su polaridad cada 3 segundos para obtener una disolución uniforme en los dos electrodos.

Debido a la baja conductividad del agua desionizada se aplica voltaje mayor a 100V y temperatura 95°C. La concentración de las nanopartículas depende del tiempo de la electrolisis, y las concentraciones más bajas se obtuvieron por dilución de una solución concentrada.

Las nanopartículas fueron caracterizadas por microscopio SEM. Se determinó su tamaño: 75 nm.

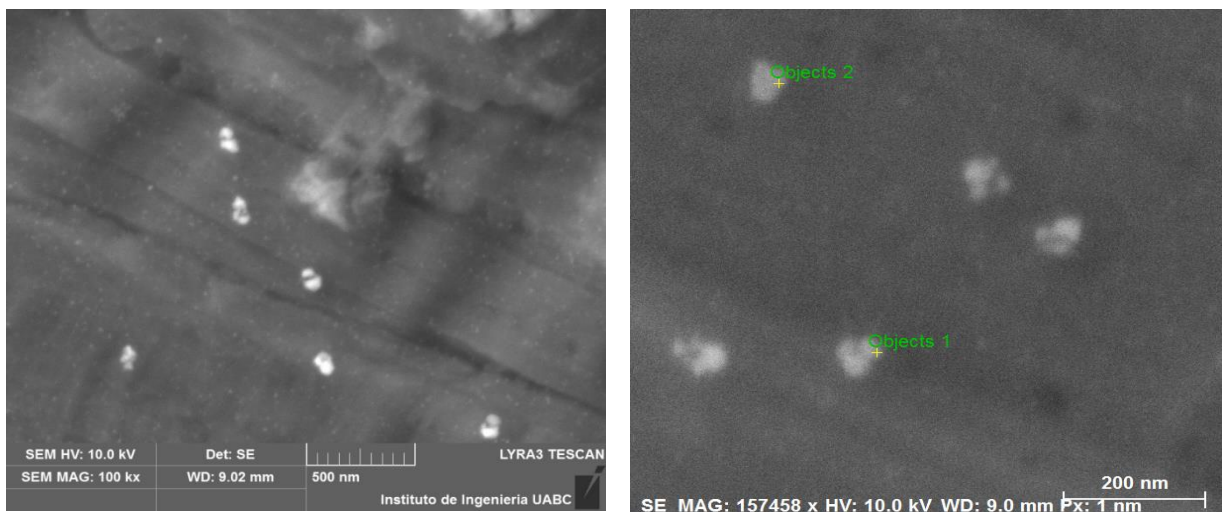


Figura 22. Nanopartículas caracterizadas por microscopio SEM

Preparación de sustrato (gelatina) cargado con nanopartículas de plata

A 1 g de gelatina se agrega 5 mL de agua fría conteniendo nanopartículas y se calienta en baño María hasta la disolución completa de la gelatina. Después de su enfriamiento se forma una masa de gelatina rígida que se muele/fragmenta al polvo y sirve como sustrato.

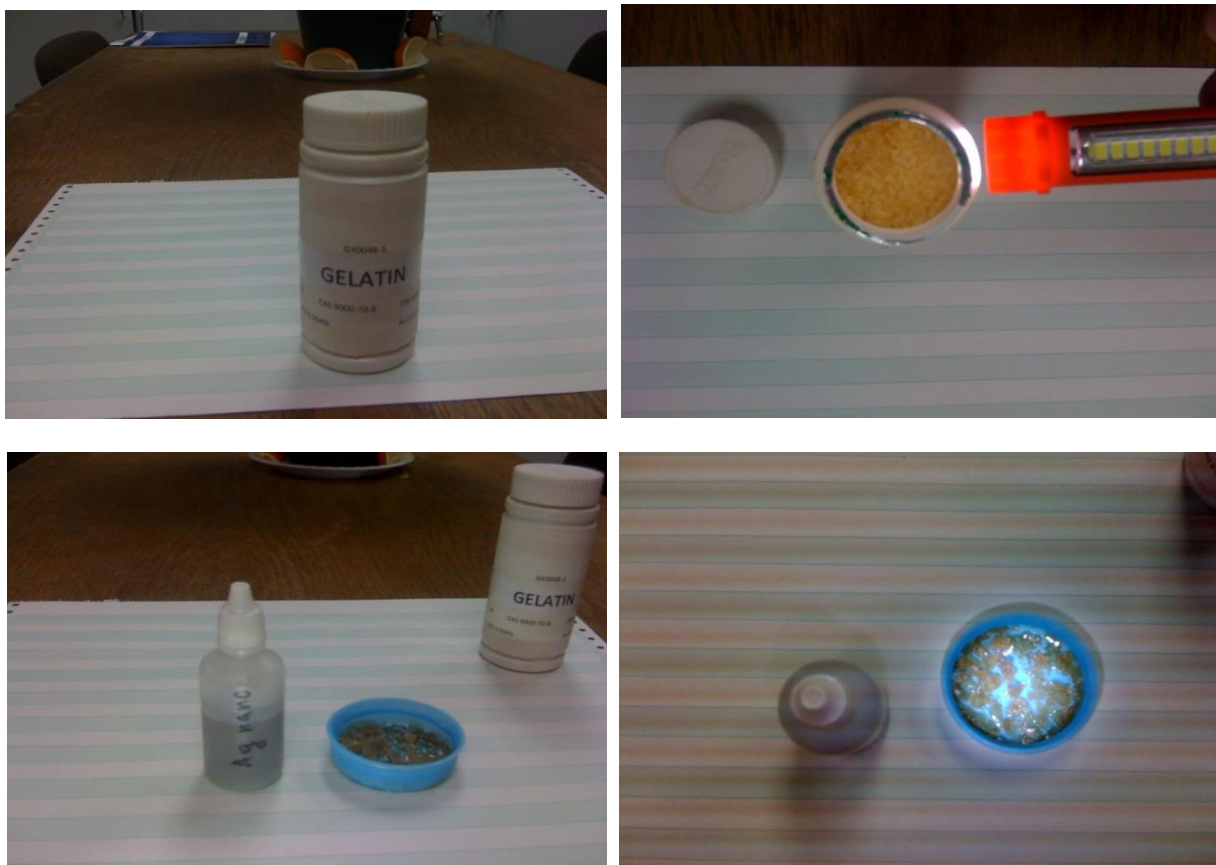


Figura 23. Preparación del sustrato cargado con nanopartículas de plata.

Pistón hueco y su preparación

El polvo de la gelatina cargado con nanopartículas se coloca dentro del pistón hueco y se cierra la maya.



Figura 24. Preparación del pistón hueco

Algoritmo de medición de la actividad enzimática de la tripsina aplicando la nefelometría

1. Se agrega 1 mL de agua desionizada en la cubeta fotométrica
2. Se enciende la luz del nefelómetro
3. Se coloca la cubeta en el nefelómetro
4. Se emerge el pistón con sustrato (gelatina) cargado con nanopartículas de plata
5. Se sujeta la palanca del pistón al caimán del electroimán
6. Se activa el circuito electrónico controlando el movimiento del electroimán y el pistón



Figura 25. Cubeta nefelométrica. Preparación



Figura 26. Inserción del pistón en la cubeta nefelométrica

7. Se graba la línea de base durante 10 s
8. Se agrega 1 mL de la muestra que contiene la tripsina en la cubeta fotométrica continuando la grabación

9. Se termina la grabación y el movimiento del pistón 1 minuto después y se lava la cubeta



Figura 27. Finalización del experimento tras el registro del movimiento del pistón durante 1 minuto

Método conductométrico

Instrumentación

Se utilizó un potenciostato alimentado por USB: Modelo CompactStat.h 20250, Ivium Technologies, Netherlands, ejecutó el software IviumStat en el modo AC para la detección para las mediciones conductométricas básicas. Se empleó el instrumento de conductividad YSI 3200 para las mediciones conductométricas adicionales. Se utilizaron dos electrodos idénticos (ver a continuación para obtener detalles) como dispositivos de trabajo y auxiliares conectados al potenciostato en la configuración de dos electrodos. En todos los experimentos se empleó un soporte de electrodos de microcélulas EG&G PARC, modelo K0264 equipado con un agitador magnético.

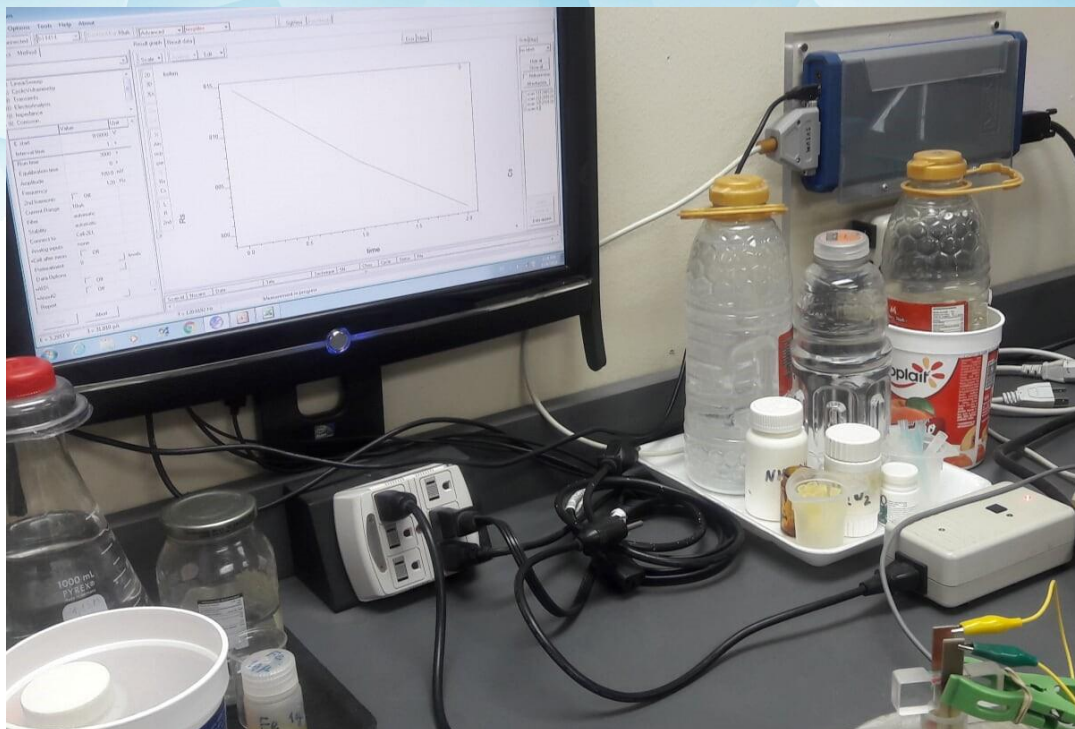


Figura 28. Empleo del software IviumStat

El software IviumStat que se ejecuta en el modo de detección de CA genera los datos de salida para muchos parámetros del sistema: electrodo – solución, tal como: resistencia R , capacitancia C , cambio de ángulo de fase de corriente de CA ϕ a lo largo del tiempo a una amplitud y frecuencia constantes de voltaje de CA controladas por el usuario. La gráfica registrada de la Resistencia contra el tiempo se convierte en la gráfica de la conductancia contra tiempo aplicando la ecuación $G = 1/R$. Los gráficos mencionados se pueden utilizar como curva cinética de la hidrólisis de la capa de sustrato catalizada por la lipasa.

El procesador ultrasónico modelo UP 800, ChromTech se utilizó para la preparación de la solución de nanocompuesto. El microscopio

electrónico de barrido, modelo JEOL JSM-840 se empleó para la caracterización de la superficie del electrodo modificado por nanocompuestos.

Reactivos y electrodos

Se utilizó lipasa, (25.1 U.S.P. mg^{-1}) de Sigma para la preparación de la solución de lipasa de reserva utilizada en todos los experimentos. Se preparó un tampón fosfato (pH 8) con cantidades apropiadas de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 de grado analítico disuelto en agua destilada aplicada para la preparación de soluciones enzimáticas estándar de acuerdo con las recomendaciones del productor de la lipasa, así como una solución tampón de soporte para las muestras que contienen lipasa.



Figura 29. Materiales para la preparación la capa sensible nanoestructurada

Se utilizó CHCl_3 de pureza PA (Fermont, EE. UU.) para la disolución del nanocompuesto facilitando la modificación de los electrodos conductométricos por deposición del nanocompuesto.

El nanocompuesto se preparó en la superficie modificada mediante nanopartículas de SiO_2 (99.8%, 10–20 nm, SkySpring Nanomaterials, Inc., USA, product # 6864HN) y aceite de oliva agregando directamente al CHCl_3 seguido de sonicación por el procesador ultrasónico durante 1 minuto.



Figura 30. Preparación la capa sensible nanoestructurada

Luego, volúmenes de microlitros se depositaron sobre las superficies del electrodo conductométrico para su modificación. Las cadenas orgánicas de la capa dan a las nanopartículas propiedades superhidrófobas y oleofílicas que permitieron la formación uniforme de la capa de nanocompuesto después de la evaporación del disolvente orgánico. La relación de aceite de oliva a SiO_2 se optimizó experimentalmente como se presenta a continuación.

Preparación y caracterización de la capa sensible nanoestructurada

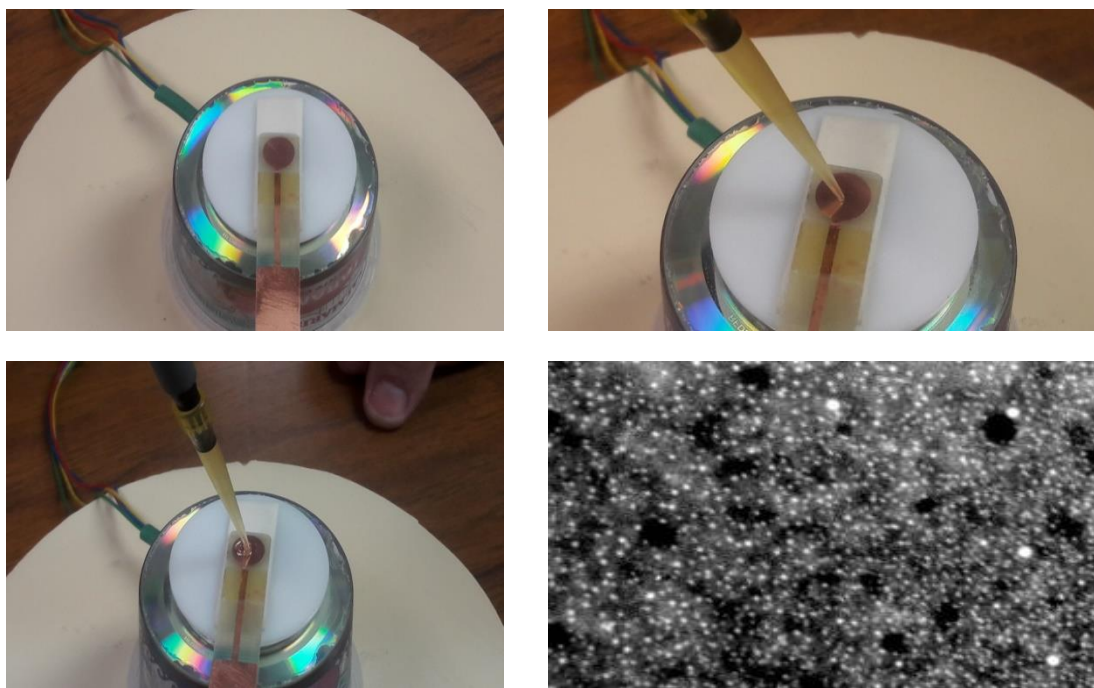


Figura 31. Preparación y caracterización de la capa sensible nanoestructurada

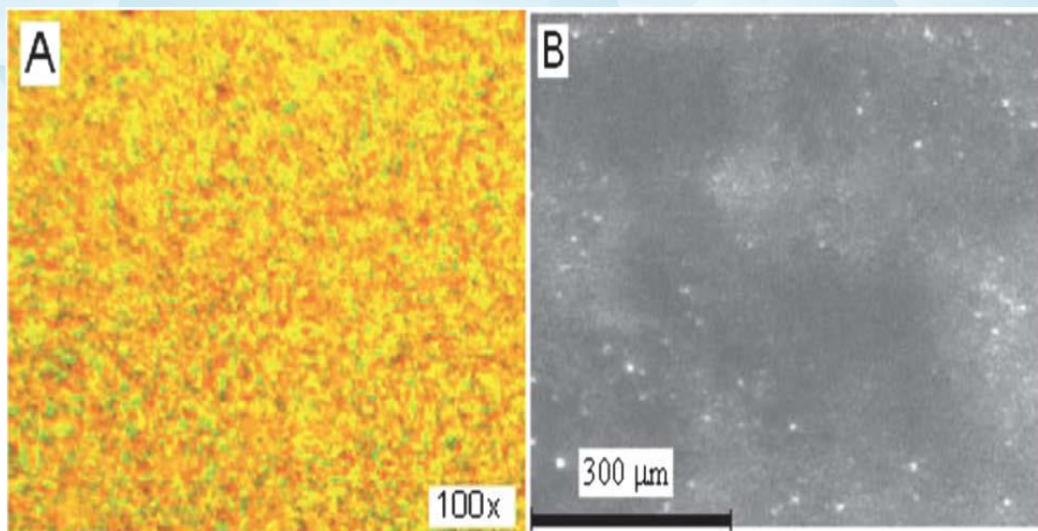


Figura 33. Caracterización por microscopio óptico

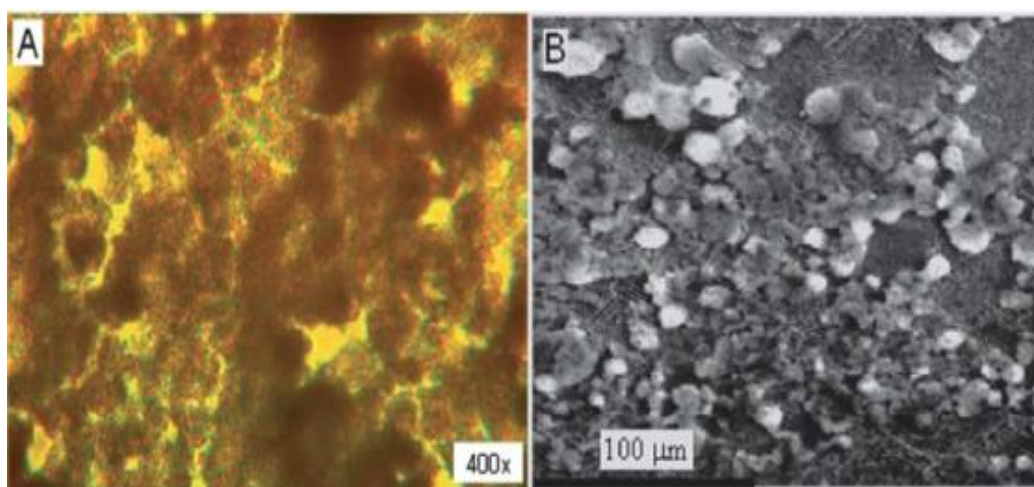


Figura 32. Caracterización por SEM

Electrodos conductométricos preparados por la tecnología PCB

La tecnología común y de muy bajo costo de PCB se aplicó para la elaboración de electrodos conductométricos desechables de 1 x 5 cm, empleando un sustrato laminado de fibra de vidrio de PCB FR-4 de 0,9 mm de espesor con lámina de Cu. Los electrodos de disco de Cu producidos con una superficie de trabajo de 0,5 cm² (8 mm de diámetro) se aplicaron en todos los experimentos. El resto del laminado de Cu en las barras se aisló con una máscara de soldadura epoxi común utilizada en la tecnología PBC para evitar el contacto con la muestra.

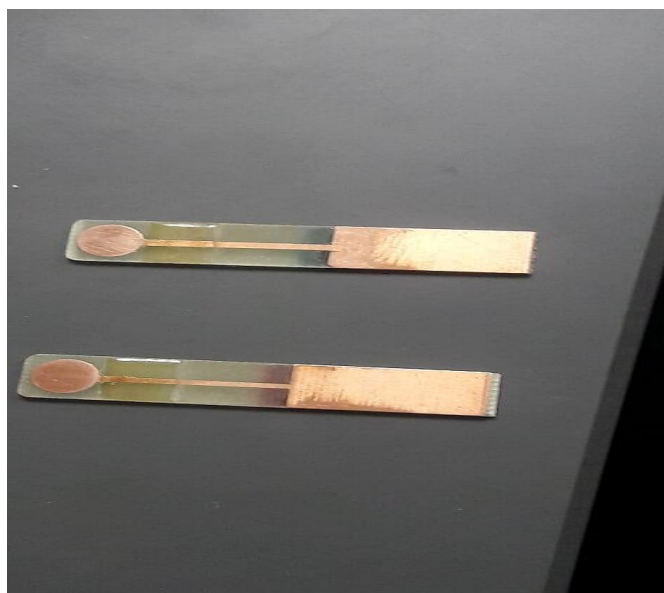


Figura 34. Electrodos preparados aplicando la tecnología de producción de PCBs

Composición y preparación de la capa sensible del sensor

A pesar de que la trioleína es un sustrato de lipasa muy específico [237], se utilizó un aceite de oliva virgen extra comercial como sustrato de lipasa en todos los experimentos debido a su bajo costo, además contiene hasta un 30% de trioleína [248].

El procedimiento propuesto por los autores mencionados anteriormente [225, 235-237] para una preparación y deposición del nanocompuesto se modificó y aplicó en este trabajo.

Los electrodos conductométricos se modificaron mediante la deposición de 5 a 10 μL de la solución de cloroformo en la superficie del electrodo mediante una micropipeta. Después de la evaporación del solvente orgánico, aparece una capa sensible blanquecina. Después de la medición de la actividad de la lipasa, la capa sensible puede eliminarse con una servilleta suave y el electrodo puede regenerarse mediante la deposición de una nueva capa sensible.

La reproducibilidad satisfactoria de los resultados (ver la sección de Resultados y Discusión) permite que un gran número de electrodos predeposados se preparen y utilicen como desechables debido a su costo extremadamente bajo.

Algoritmo de medición de la actividad enzimática de la lipasa aplicando la conductometría

1. Se agrega 0.1 mL de bufer con pH 8.5 más 4 ml de agua desionizada en la celda conductométrica
2. Se agrega la barita magnética y se sumergen los dos electrodos colocados al soporte dentro de la celda y se prende el agitador magnético
3. Se registra la línea de base (blanco) durante 60 segundos
4. Se agrega la muestra que contiene la lipasa y se registra la curva de resistencia vs el tiempo (alrededor de 3 minutos).

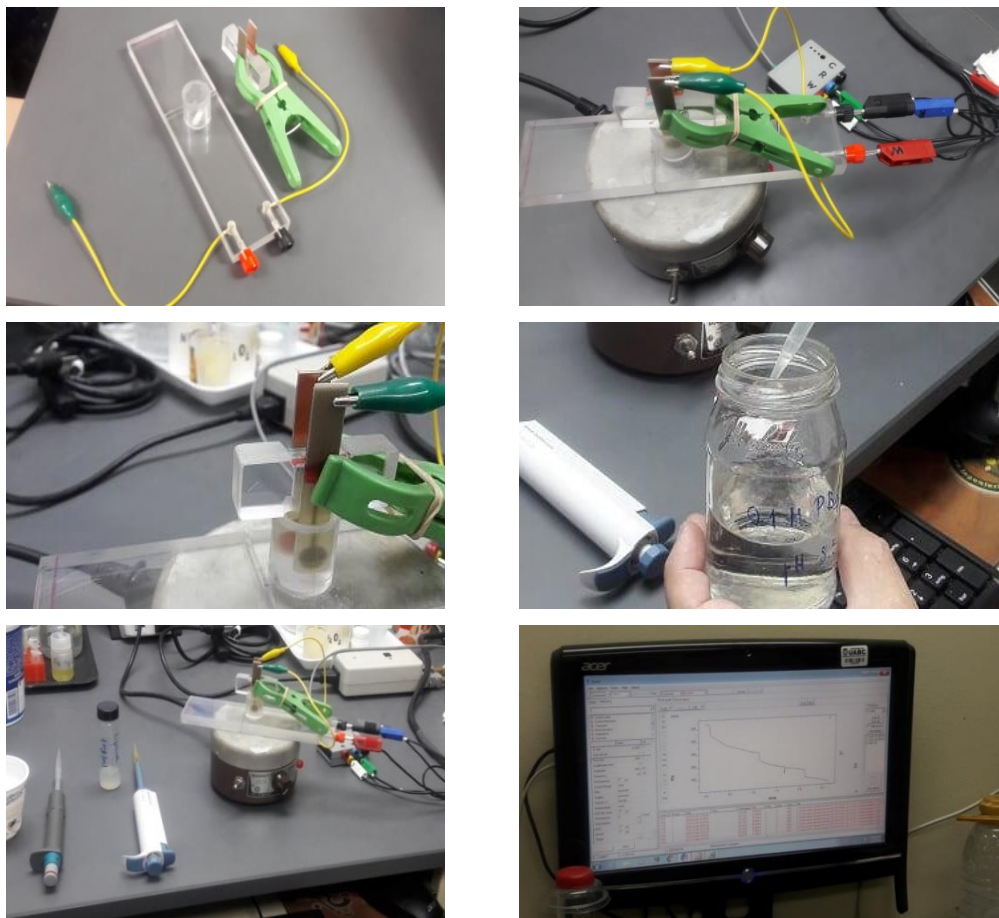


Figura 35. Algoritmo de medición aplicando la conductometría

Método impedimétrico

Instrumentación

Potenciostato Modelo CompactStat.h 20250, Ivium Technologies, Netherlands fue empleado para las mediciones de impedancia controladas por IviumStat software corriendo en el modo de detección de CA. Este modo permite el registro simultáneo frente al tiempo de múltiples parámetros como: el ángulo de cambio de fase de la corriente de CA, la capacitancia y la resistencia a una amplitud y frecuencia de voltaje de CA fijas. Un soporte de electrodo de microceldas EG&G PARC modelo K0264 debidamente modificado equipado con un agitador magnético fue empleado como celda de medición.

El procesador ultrasónico ChromTech, modelo UP 800, se usó para la sonicación del nanocompuesto disuelto en un solvente orgánico antes de su deposición sobre las superficies de los electrodos. La caracterización de la superficie del electrodo modificado se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido, modelo JEOL JSM-610 LV, mientras que el microscopio óptico modelo XJP-H100 conectado a una PC fue utilizado para su inspección.

Materiales y reactivos

Se utilizó lipasa, (25.1 U.S.P. mg^{-1}) de Sigma en todos los experimentos y se empleó aceite de oliva extra virgen comercial (Bertolli, Italia) como sustrato enzimático. Se emplearon nanopartículas de óxido de silicio de superficie modificada y dispersables (99.8%, 10–20 nm, SkySpring Nanomaterials, Inc., USA, product # 6864HN) cubiertas por una capa de cadena orgánica que les confiere propiedades superhidrofóbicas y

oleofílicas para la preparación del nanocompuesto a base de aceite de oliva. El nanocompuesto se disolvió preliminarmente en ciclohexano (C_6H_{12}) de Sigma para facilitar su deposición sobre la superficie del electrodo. El tampón de fosfato de pH 8 utilizado en todos los experimentos se preparó disolviendo cantidades apropiadas de grado analítico de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 en agua desionizada.

Construcción del sensor

Los electrodos de varilla (10 x 50 mm) del sensor se elaboraron a partir de un sustrato de fibra de vidrio de PCB FR-4 de 0,6 mm de espesor laminado con una capa de cobre de 35 μm de espesor utilizando la tecnología de PCB de bajo costo común (ver Figura 36).

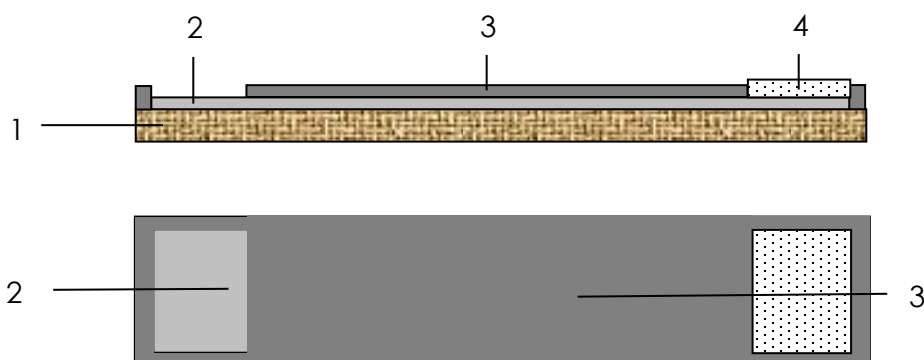


Figura 36. Construcción del sensor: vista superior (izquierda) y sección transversal (derecha): 1 - sustrato epoxi PCB; 2 - capa de Cu; 3 - capa aislante de epoxi; 4 - capa sensible de nanocompuesto

El tamaño del área de Cu laminado fue de 7.1 x 47 mm y dos almohadillas de cobre iguales de 7.1 x 7.1 mm (área de 0.5 cm² cada una) situadas en los extremos inferior y superior de la barra sirviendo como electrodo de trabajo y terminal de contacto para el potenciostato. El resto del laminado de cobre se aisló con una máscara de soldadura epoxi

comúnmente utilizada en la tecnología PCB. El área de trabajo de algunos de los electrodos se recubrió electroquímicamente con oro y níquel para evaluar la influencia de la naturaleza del metal.

La construcción sencilla del sensor y el material y tecnología baratos aplicados a su producción hacen que el sensor propuesto sea rentable, permitiendo su aplicación como regenerable y desechable. Su regeneración se puede realizar un número ilimitado de veces mediante la deposición de una nueva capa de nanocompuestos sensibles después de la eliminación de la capa ya usada.

Preparación y deposición de la capa sensible de nanocompuesto

El logro de resultados reproducibles requiere la deposición reproducible de una capa sensible, delgada y uniforme del nanocompuesto sobre la superficie del electrodo. Para este propósito, la composición de la capa sensible y el procedimiento de deposición propuesto por los autores anteriormente mencionados [225, 235, 236] se aplicó después de las modificaciones realizadas de acuerdo con la optimización experimental (ver el texto a continuación). Experimentalmente se encontró que la composición óptima era de 600 mg de aceite de oliva y 84 mg de nanopartículas de SiO_2 . Para facilitar la deposición del nanocompuesto, estas cantidades se agregaron a 1 mL de ciclohexano (C_6H_{12}) y sonicados durante 1 minuto cada vez antes de la modificación de los electrodos.

La modificación de los electrodos de PCB se realizó mediante la deposición de 5, 10, 15 o 20 μL del nanocompuesto disuelto en C_6H_{12} mediante micropipeta bajo spin coating (200 rpm) para obtener una capa

uniforme. La deposición de $5 \mu\text{L}$ (mm^3) de solución de nanocompuesto en ciclohexano en el electrodo de 50 mm^2 produce una capa de $100 \mu\text{m}$ de espesor, 51.3% de la cual se debe al solvente orgánico. El grosor de la capa disminuye hasta aproximadamente $49 \mu\text{m}$ después de la evaporación del solvente orgánico y aparece una capa blanquecina opaca como capa. Esta es estable durante más de 6 meses a temperatura ambiente si está protegida contra el polvo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biosensor piezoeléctrico (QCM) para la cuantificación de la actividad de la tripsina

Respuesta del sensor QCM para la medición de la actividad de la tripsina

Las respuestas del sensor basado en la QCM para cuantificación de la actividad de la tripsina se presentan en la Figura 37 en coordenadas: Frecuencia (Hz) vs. el Tiempo (s). Las condiciones experimentales fueron: pH = 8; Velocidad de agitación: 500 rpm; Temperatura 25 °C.

Curva 1: 0.01 µg/mL, Curva 2: 1 µg/mL, Curva 3: 1000 µg/mL

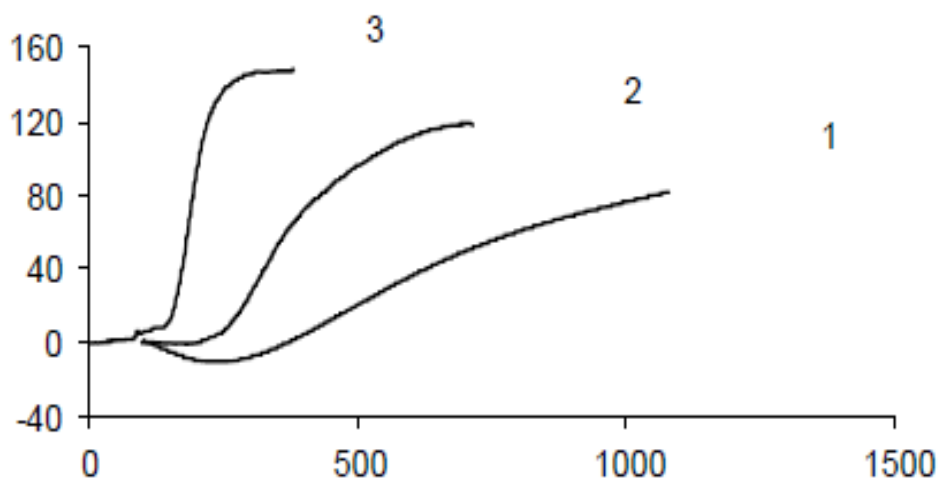


Figura 37. Respuesta del sensor basado sobre la QCM en coordenadas: Frecuencia (Hz) vs. el Tiempo (s)

El incremento de la concentración (actividad) de la tripsina causa aumento de pendiente de la curva de la respuesta.

Influencia del grosor de la capa sensible sobre la respuesta del sensor piezoeléctrico

Se prepararon dos sensores depositando 5 y 10 mL de la solución de la gelatina cargada con nanopartículas sobre el cristal de la QCM. De esta manera se formaron capas sensibles de diferentes grosores en relación 1:2. Se observa que a mayor cantidad de nanopartículas se obtiene una respuesta mayor – curva b.

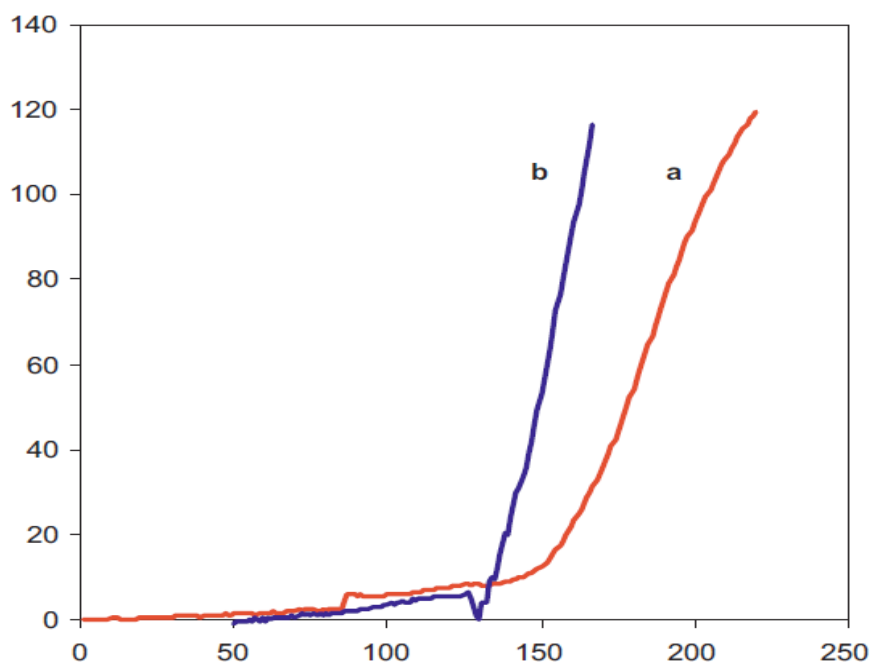


Figura 38. Comparación de las respuestas de sensores con capas sensible de 5 (curva a) y 10 µL (curva b). Concentración de la tripsina: 100 µg/mL, pH = 8; 500 rpm; 25°C.

Influencia de la presencia de las nanopartículas – comparación de las curvas de calibración

La presencia de las nanopartículas resulta en una amplificación de la respuesta del sensor piezoeléctrico, ilustrada en Figura 39. La curva de calibración registrada con nanocompuesto (gelatina + nanopartículas de plata) demuestra un aumento de 2.23 veces el incremento de la amplitud de la respuesta.

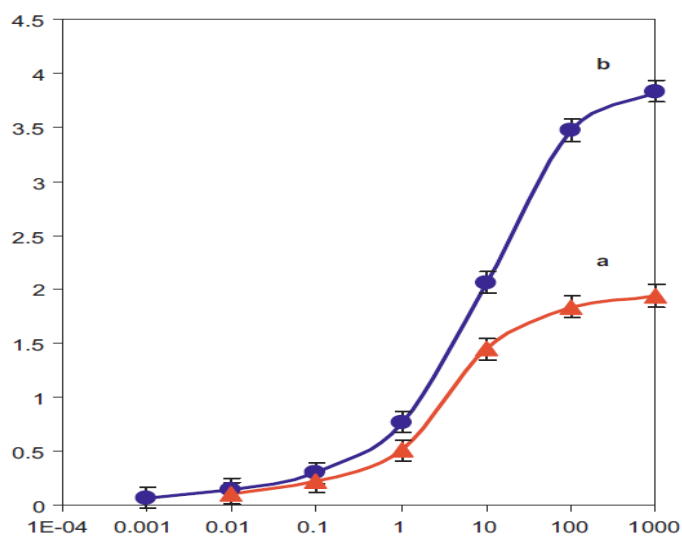


Figura 39. Curvas de calibración en presencia (curva b) y ausencia (curva a) de nanopartículas en la capa sensible

Rango de linealidad, límite de detección y reproducibilidad

El rango de linealidad aplicando el nanocompuesto como capa sensible se determinó en 7.5×10^{-3} U mL⁻¹ hasta 750 U mL⁻¹, en tanto que el límite superior de la capa de gelatina asciende hasta 10 U mL⁻¹. Se observan dos rangos lineales en la curva de calibración: desde 75×10^{-3} U mL⁻¹ hasta 1 U mL⁻¹ y desde 1 U mL⁻¹ hasta 750 U mL⁻¹ mismos que son parte

de la curva de calibración con la forma de letra "S" característica de todos los biosensores enzimáticos.

El límite de detección (LOD) se estableció en: $75 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ (que corresponde a concentración de la tripsina de 0.001 mg mL^{-1}). Para la determinación del límite de detección se aplicó la regla de tres sigma: la amplitud de la señal debe ser 3 veces más grande que la amplitud del ruido. Se hicieron 8 mediciones separadas para determinar el LOD.

La reproducibilidad de las mediciones se determinó midiendo 10 veces (con 10 sensores diferentes) la concentración de tripsina de 100 mg mL^{-1} (equivalente a 0.75 U mL^{-1}) y el error relativo se estableció como 0.94%.

Biosensor espectrofotométrico para la cuantificación de la actividad de la tripsina

Caracterización espectrofotométrica de la capa sensible del sensor

El espectrograma de las nanopartículas de plata en la mezcla: gelatina – nanopartículas se midió por espectrofotometría visible desde 340 hasta 700 nm.

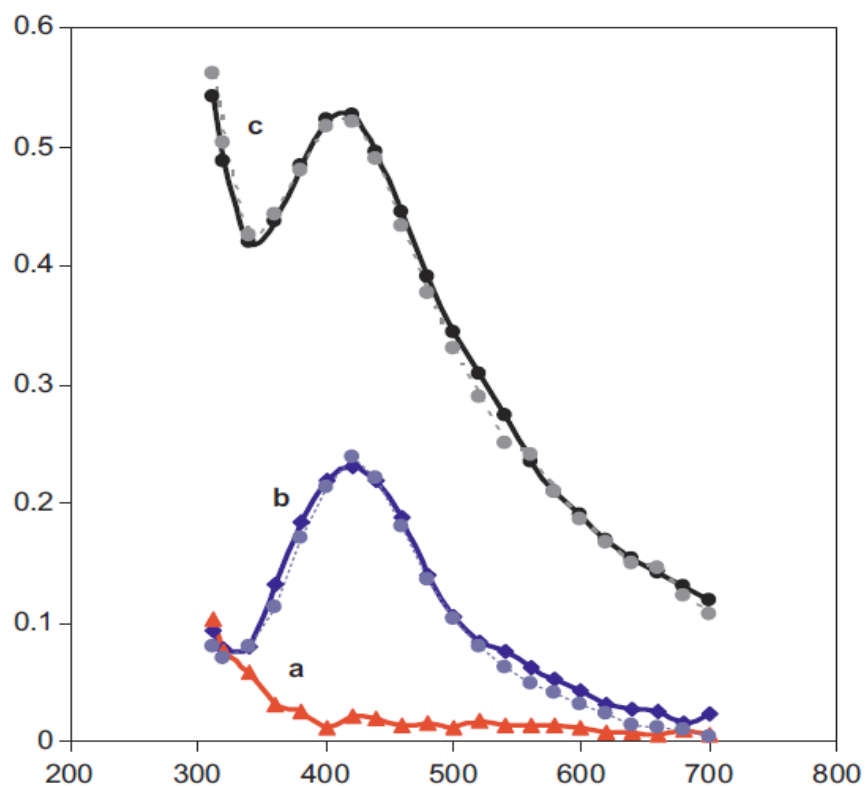


Figura 40. Absorción de la luz vs. la Longitud de la onda. El pico registrado a 420 nm es específico para las nanopartículas de plata. Curva b: nanopartículas de plata en agua; Curva c: gelatina (0.8%) cargada con nanopartículas de plata. Curva a: gelatina pura sin nanopartículas.

Durante los primeros 350 segundos se registra la línea de base a longitud de la onda 450 nm con el agitador encendido. La cubeta contiene agua ($\text{pH} = 7$) o solución de búfer con $\text{pH} = 8$ (en el cual la actividad de la tripsina es máxima). El hecho registra una línea recta horizontal indica que falta algún proceso.

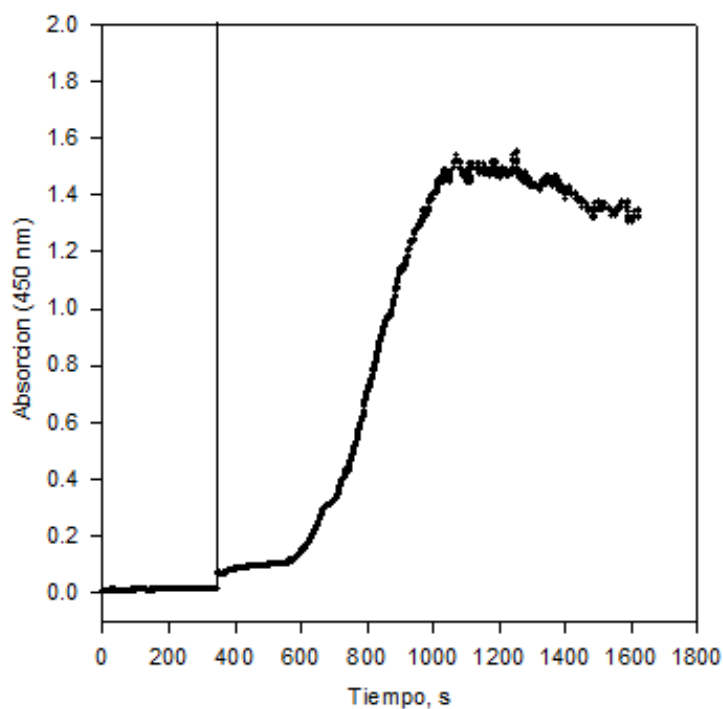


Figura 41. Respuesta del sensor espectrofotométrico: absorción de la luz vs. el tiempo

En el momento $t = 350$ s (la línea vertical en la Figura 41) se agregó la enzima en la cubeta, lo que provocó la degradación del sustrato (la película de gelatina cargada con nanopartículas de AgCl depositada sobre la cinta fotográfica) por hidrólisis catalítica, acompañada con la liberación de las nanopartículas cargadas dentro la gelatina. Las nanopartículas liberadas aumentan la absorción de la luz que pasa a través de la cubeta aumentando de esta manera la lectura del

espectrofotómetro hasta 420 nm – la longitud de la onda específica para las nanopartículas de plata.

La concentración de las nanopartículas dentro la cubeta aumenta con el avance del proceso ($t = 600$ s) hasta la degradación total de la película de la gelatina y la curva llega a su saturación ($t = 1100$ s). Después de este momento las nanopartículas ya liberadas en la solución empiezan a precipitarse por la gravedad, lo que explica el descenso de la curva.

Cuantificación de actividades (concentraciones) bajas de la tripsina

La norma para la concentración de la tripsina en suero para adultos es desde 10 hasta 57 $\mu\text{g/L}$. Se hizo prueba con una muestra artificial utilizando Tripsina comercial de Sigma, USA. Debido de eso se hicieron experimentos de cuantificación de actividades (concentraciones) en el rango mencionado y se construyó la curva de calibración. Las respuestas del sensor y la curva de calibración se presentan en las Figuras 42 y 43.

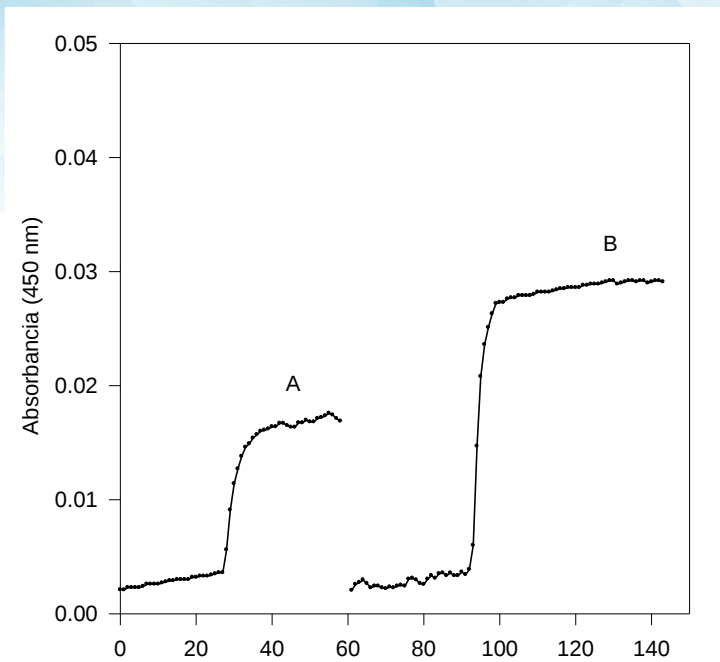


Figura 42. El escalón A corresponde a una adición de tripsina de 10 $\mu\text{g/L}$ y el B de 20 $\mu\text{g/L}$ al búfer de fosfato, pH = 8

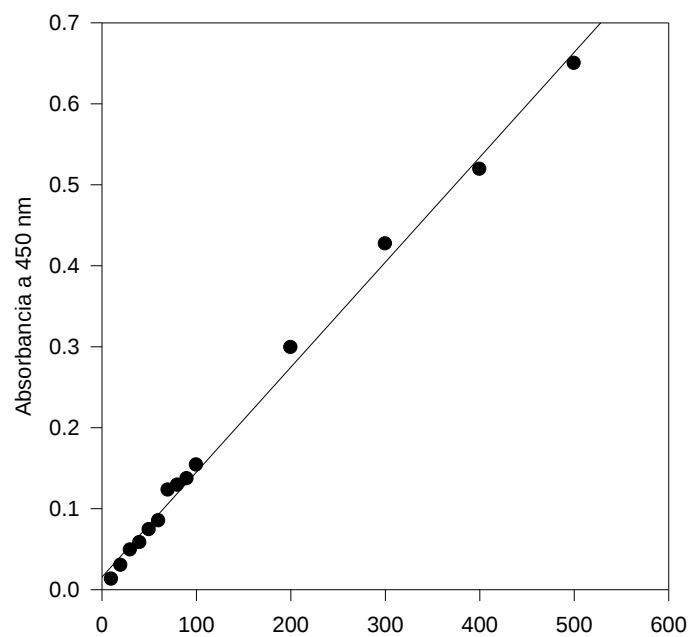


Figura 43. El rango lineal de las actividades medibles aplicando el sensor optimizado es desde 10 hasta 500 $\mu\text{g/L}$

Determinación del rango lineal del sensor espectrofotométrico

Además, fue determinado el rango lineal del sensor midiendo actividades (concentraciones) de la tripsina altas, hasta $500 \mu\text{g L}^{-1}$ y la curva de calibración esta presentada en la Figura 44.

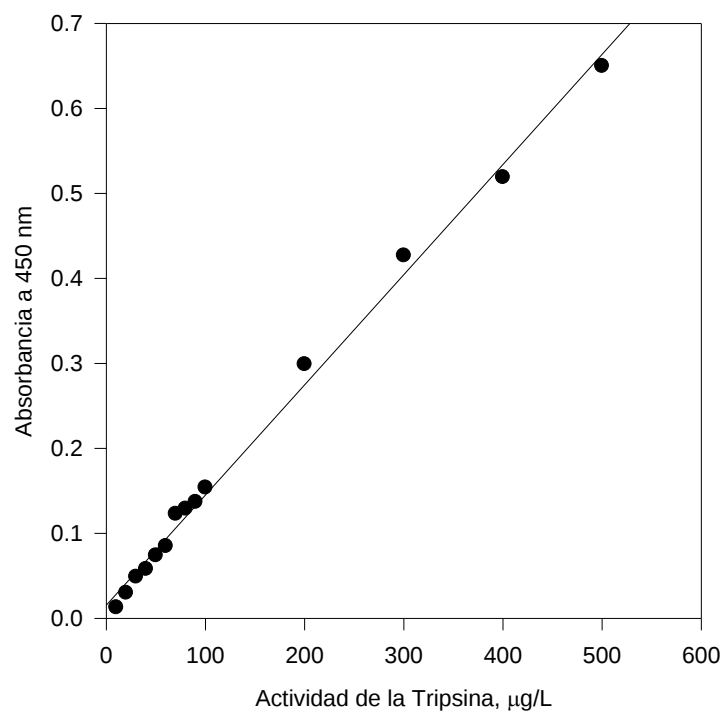


Figura 44. Rango lineal de las actividades medibles aplicando el sensor optimizado es desde 10 hasta $500 \mu\text{g/L}$

Aplicación del sensor espectrofotométrico para la cuantificación de la bromelaína

El sensor espectrofotométrico desarrollado fue aplicado también para la determinación de la actividad de la bromelaína, otra enzima del grupo de las proteasas. La respuesta corresponde a una actividad de 11.3 $\mu\text{g/L}$, equivalente a tripsina. De esta manera se comprobó la universalidad del sensor desarrollado para el grupo de las proteasas (ver Figura 45).

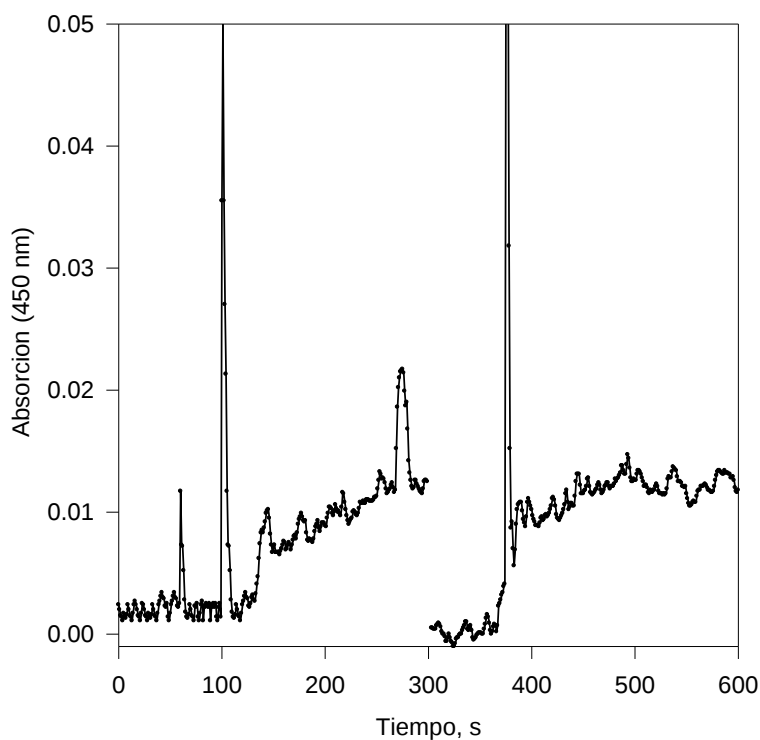


Figura 45. La respuesta del sensor a la bromelaína

Sensor nefelométrico para la cuantificación de la tripsina

Respuesta nefelométrica, curva en coordenadas: corriente de la fotocelda vs. el Tiempo

El movimiento del pistón dentro de la cubeta nefelométrica intensifica el contacto del sustrato (gelatina cargada con nanopartículas de plata) y aumenta de esta manera la concentración de las nanopartículas hasta que se degrada la gelatina en su totalidad. Desafortunadamente el pistón también agita periódicamente la muestra líquida, y hace la curva "ruidosa" (ver Figuras 46 y 48). Para eliminar el ruido se tiene que sincronizar la adquisición de los datos con el movimiento del pistón para que se tome el resultado de la medición en la misma fase del movimiento.

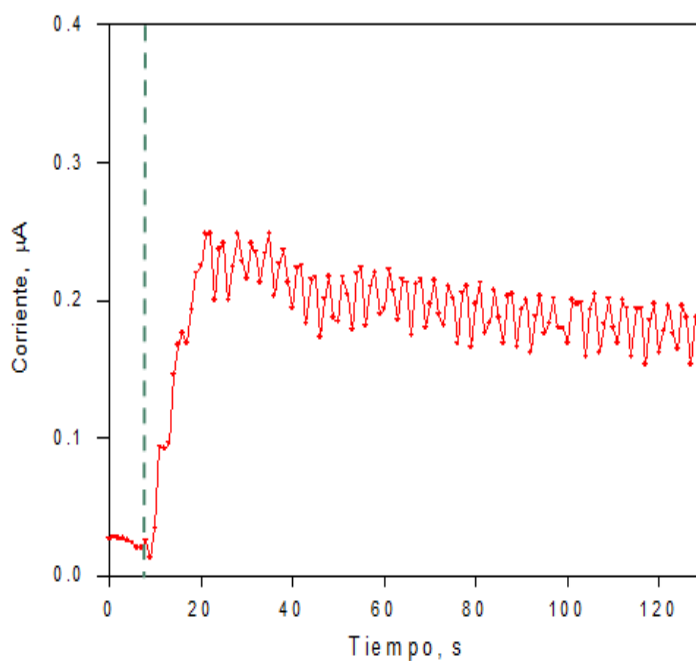


Figura 46. Curva sin sincronización del movimiento del pistón y la adquisición de datos

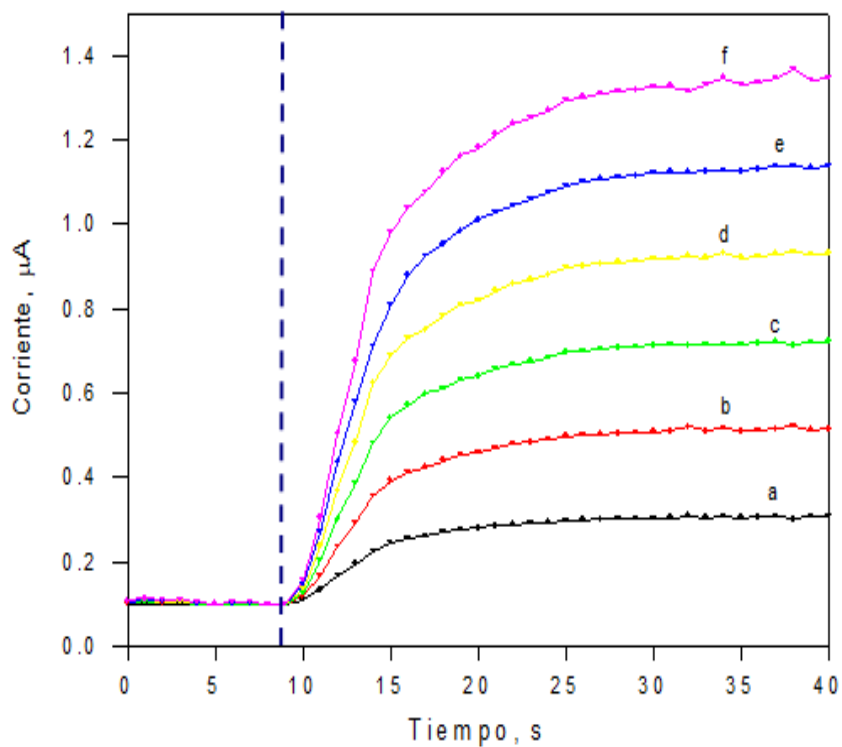


Figura 47. Curva sincronizada en movimiento del pistón y la adquisición de datos

La disminución de la altura del escalón alrededor de 40 segundos después de agregar la tripsina es causada por la aglomeración de las nanopartículas en la fase acuosa. El rango de las concentraciones de la tripsina en la Figura derecha es desde 10 (curva **a**) hasta 60 µg/L (curva **f**)

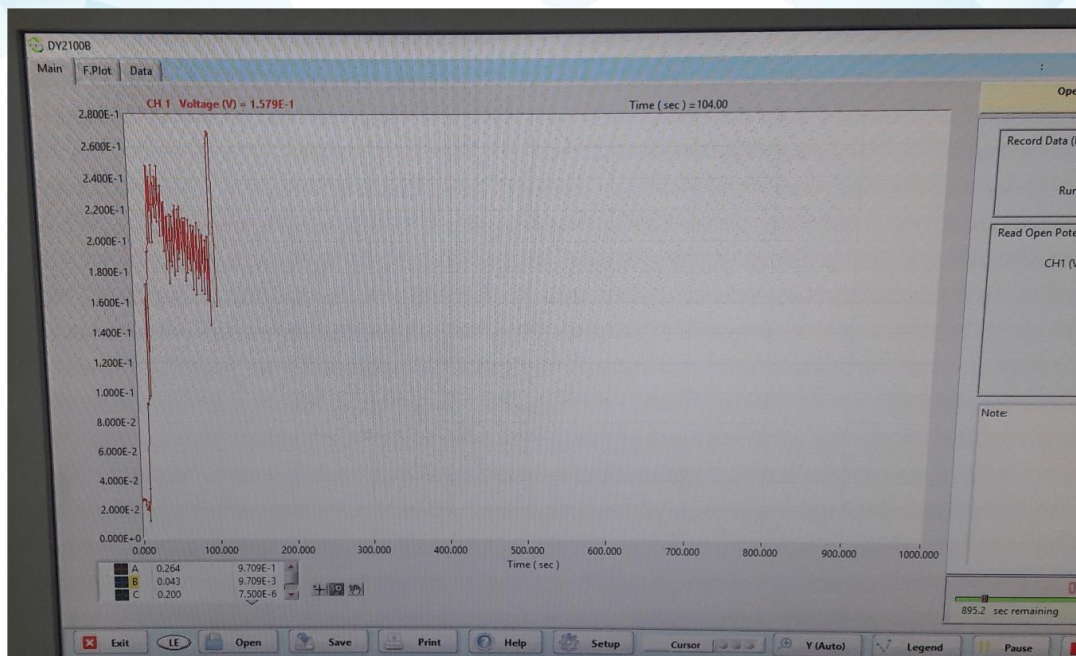


Figura 48. Fotografía de la pantalla de la computadora en el momento del registro de una curva no sincronizada

Influencia de la longitud de la onda sobre la respuesta

Se aplicaron filtros ópticos de 470 (azul), 530 (verde), 580 (amarillo) y 600 (rojo) nm y también luz blanca para evaluar la influencia de la longitud de la onda sobre la amplitud de la respuesta espectrofotométrica.

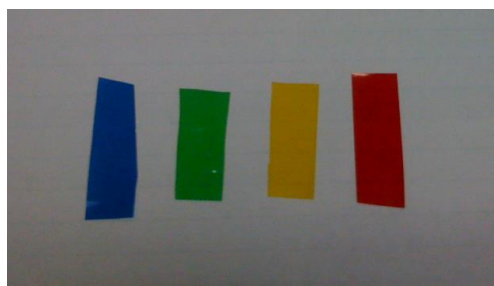


Figura 49. Fotografía de los filtros ópticos aplicados

Tabla 1. Amplitud de la respuesta en función de la longitud de la onda. La respuesta máxima se obtuvo aplicando luz blanca

Longitud de la onda	Altura del escalón, μA (15 $\mu\text{g/L}$ tripsina)
Blanca	0.38
470 nm (azul)	0.26
530 nm (verde)	0.19
580 nm (amarillo)	0.29
600 nm (rojo)	0.31

Curvas de calibración para actividades bajas de tripsina

Como se ha mencionado anteriormente la norma de la tripsina en suero para adultos es de 10 - 57 $\mu\text{g/L}$. En los experimentos se utilizaron muestras artificiales dentro de este rango de concentraciones, preparadas con Tripsina comercial. Dos parámetros proporcionales para la concentración de la tripsina se pueden usar como respuesta del sensor:

- **La pendiente de la curva** en coordenadas: Corriente de la fotocelda – Tiempo (Figura 50, izq.). La unidad de tiempo es por minuto dado que la unidad de la actividad de un enzima es μmol de sustrato por minuto
- **La altura del escalón** de dicha curva (Figura 50, derecha)

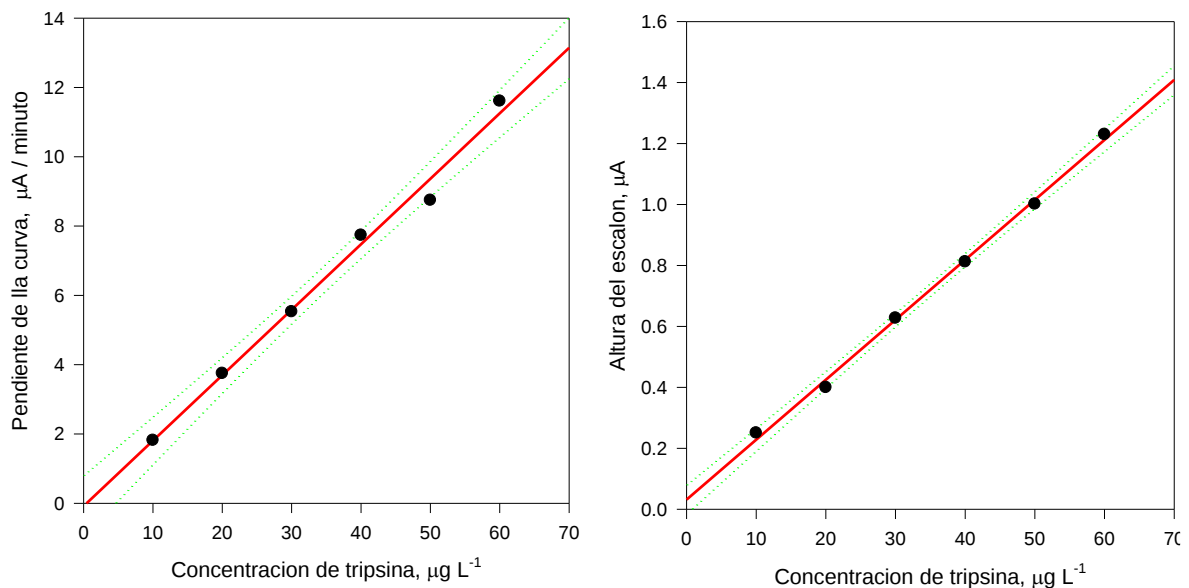


Figura 50. Curvas de calibración nefelométricas aplicando la pendiente (izquierda) y la altura (derecha) del escalón

Como presentado en la Figura 50, la pendiente como respuesta del sensor presenta una mayor sensibilidad que la altura del escalón permitiendo cuantificar actividades (concentraciones) muy bajas de tripsina y aplicarse en análisis médicos.

Influencia de la concentración de las nanopartículas en el sustrato sobre la respuesta

La amplitud de la respuesta nefelométrica se incrementa con el aumento de la superficie (la masa) del sustrato y la concentración de las nanopartículas dentro del sustrato. La masa del sustrato es constante, limitada por el volumen del pistón. La influencia de la concentración de las nanopartículas sobre las curvas de calibración (pendiente vs. concentración y altura del escalón vs. la concentración) esta ilustrada en las siguientes figuras.

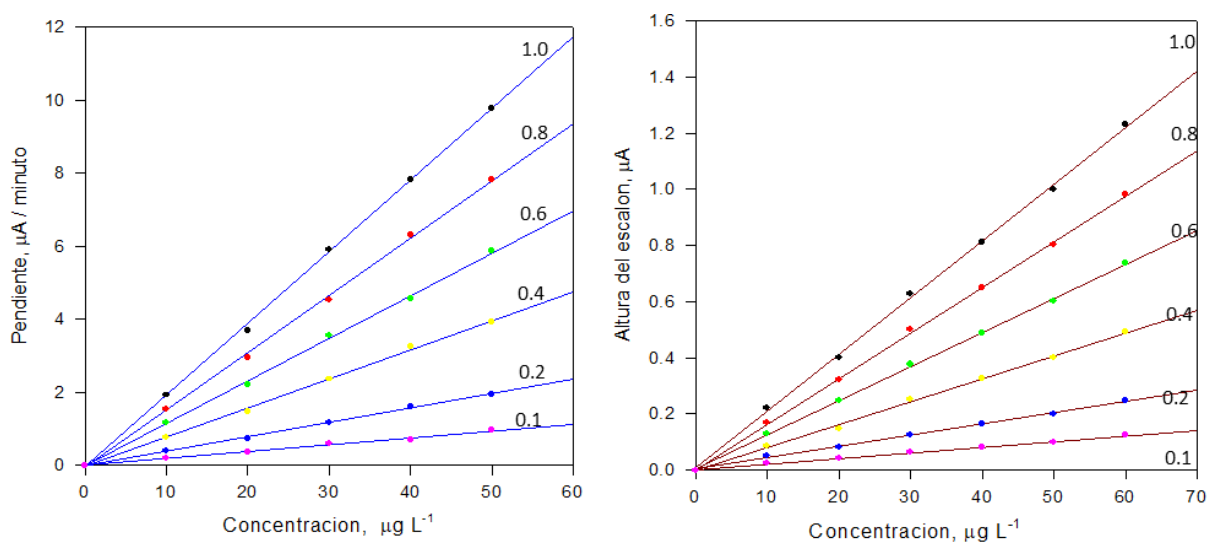


Figura 51. Curvas de calibración en el rango medico de tripsina registradas aplicando diferentes concentraciones de nanopartículas en el nanocompuesto de gelatina cargada con nanopartículas

Las diferentes concentraciones de las nanopartículas se obtuvieron diluyendo la solución inicial conteniendo 20% de nanopartículas, cuya concentración se marcó como 1.0

Repetitividad y precisión de las mediciones

La precisión fue determinada con 6 concentraciones en el rango 10 – 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ aplicando 5 mediciones para cada una concentración. Las variaciones de los resultados en % son presentadas en la Figura y la Tabla siguiente.

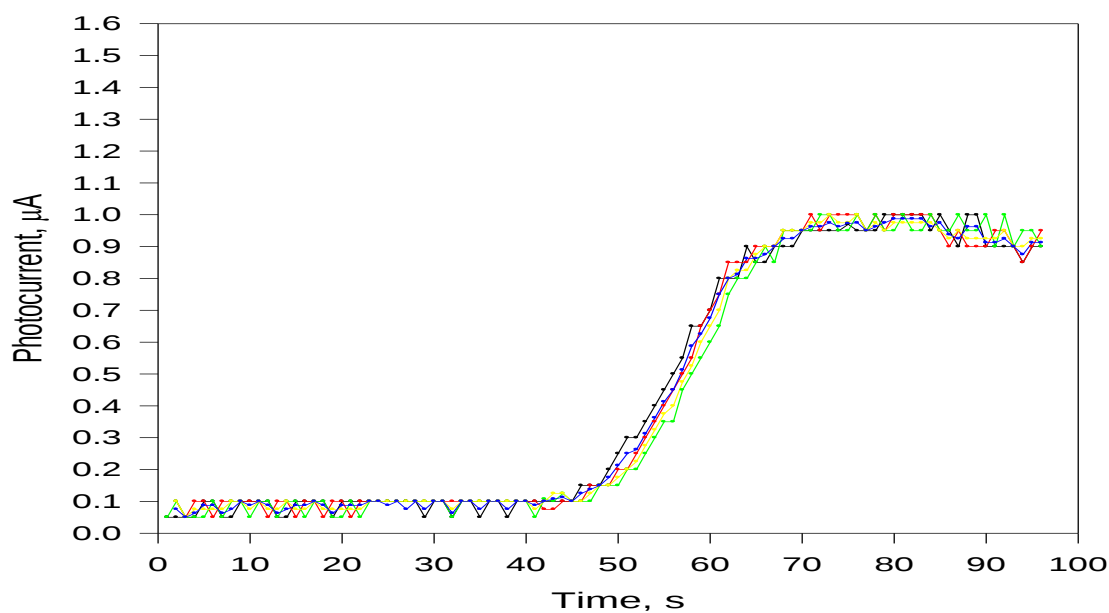


Figura 52. Respuestas del sensor (capa sensible cargada con 8% de nanopartículas) a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ tripsina (5 mediciones diferentes)

Tabla 2. Error relativo de las respuestas: pendiente y altura del escalón

Concentración de la tripsina, $\mu\text{g L}^{-1}$	10	20	30	40	50	60
Precisión (altura), %	1.83	1.56	1.22	1.03	0.97	0.84
Precisión (pendiente), %	1.91	1.73	1.36	1.11	1.02	0.94

La Tabla 2 demuestra que la precisión de los resultados obtenidos usando la altura del escalón como respuesta supera la precisión de los resultados obtenidos usando la pendiente.

Sensor conductométrico para la cuantificación de la actividad de la lipasa

Construcción de electrodos conductométricos y modificación por capa sensible de nanocompuesto.

La sección transversal de la barra del electrodo conductométrico se presenta en la Figura 53. El soporte de epoxi reforzado con fibra de vidrio (1) está laminado con una capa de Cu (2). Parte de la lámina de Cu formada como disco de diámetro de 8 mm fue modificada por un nanocompuesto (4) y sirvió como electrodo conductométrico. El resto de la lámina de Cu está parcialmente aislada por una capa delgada de epoxi (3). La parte descubierta de la lámina de Cu situada en el otro extremo del electrodo sirve como terminal al potenciostato. Un par de electrodos modificados de la misma manera se usó en todos los experimentos, situados a una distancia de 1 cm, conectados al potenciostato con configuración de dos electrodos.

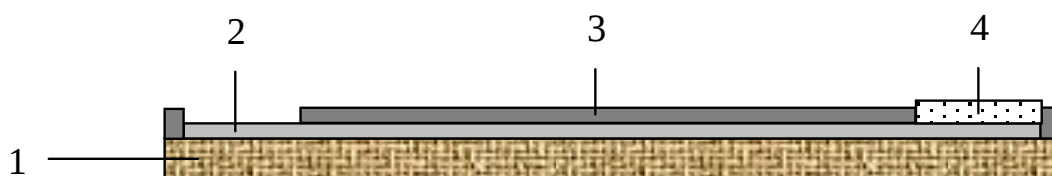


Figura 53. Corte transversal de la barra de electrodo conductométrico modificado con nanocompuesto

Respuesta típica del sensor y la influencia de la composición de la capa sensible

El supuesto principal en el que se basa este trabajo es que la velocidad de degradación catalizada por la lipasa de una delgada capa sensible de nanocompuesto depositado sobre un electrodo conductométrico puede servir como una medida de la actividad de la lipasa. La degradación enzimática del aceite de oliva al que se adhiere las nanopartículas de SiO_2 en la capa sensible del nanocompuesto causa una disminución de su grosor, lo que ocasiona un cambio en su conductividad (resistencia), así como la capacitancia de la interfaz de la solución que contiene lipasa cambia, como se muestra en la Figuras 54.

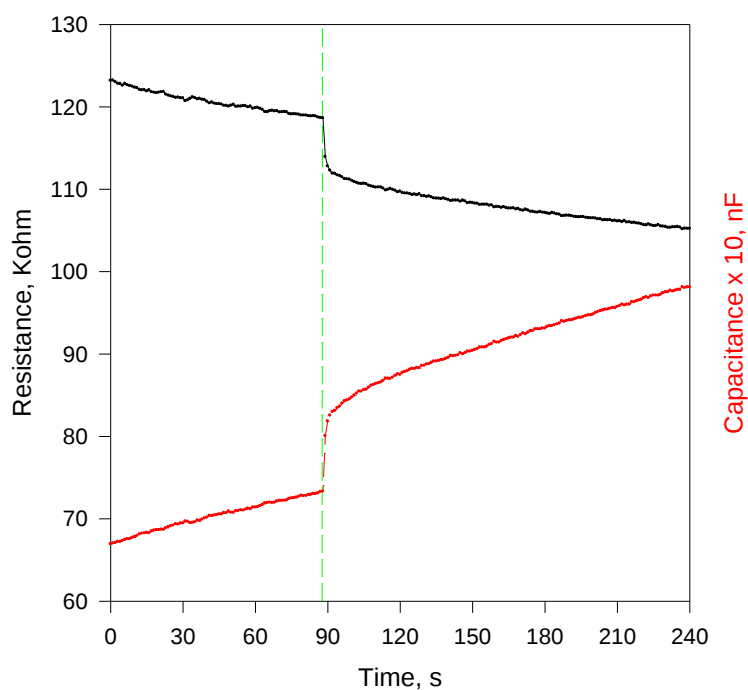


Figura 54. La resistencia y la capacitancia cambian a lo largo del tiempo de la interfaz: electrodo conductométrico modificado con nanocompuesto/ Solución que contiene lipasa con actividad de 0.03 U mL^{-1} . Velocidad de agitador = 300 rpm, amplitud de voltaje de CA = 50 mV p.p. a 120 Hz, pH = 8

Teniendo en cuenta la ecuación (1),

$$R = 1/G = \rho d/A \quad (1)$$

está claro que el cambio de conductividad a lo largo del tiempo sigue el cambio de espesor de la capa sensible que depende de la cinética de la hidrólisis catalizada por lipasa de la capa sensible que modifica el electrodo conductométrico que a su vez depende de la actividad de la lipasa. La degradación enzimática de la capa sensible continúa hasta la saturación de los centros activos de lipasa que determinan la curva en forma de onda en coordenadas: conductancia vs. el tiempo, presentado en la Figura 55. Es por eso que la planicie (estabilidad) que aparece en esta curva corresponde al cambio máximo de la conductividad de la capa sensible de nanocompuesto provocada por la actividad de la lipasa medida. Por lo tanto, la altura de onda puede servir como una medida de la actividad de la lipasa y este parámetro se utilizó como respuesta analítica en este trabajo. La pendiente de la curva también puede servir como respuesta analítica; sin embargo, se prefirió la altura de onda debido a la mejor precisión y reproducibilidad de los resultados.

El segundo supuesto principal en el que se basa este trabajo es que la aplicación de una capa sensible como el aceite de oliva cargado con nanopartículas de SiO_2 (nanocompuesto) que modifica los electrodos conductométricos causará una amplificación de la respuesta del sensor debido a la mayor resistividad del SiO_2 (que posee $\rho = 1017 \text{ Ohmios m}$) comparado con el del aceite de oliva sin cargar ($\rho = 109 \text{ Ohmios m}$) utilizado como sustrato de lipasa. Por lo tanto, los resultados experimentales presentados a continuación pueden servir como una prueba de viabilidad de este supuesto.

Para este propósito, se midió la conductividad de 5 ml de agua desionizada conteniendo 120 μL de tampón fosfato con pH 8, empleando: a) un par de electrodos conductométricos de metal descubierto (electrodos de Cu de 8 mm de diámetro); b) los mismos electrodos modificados por una capa de aceite de oliva de 50 μm de espesor, y c) los mismos electrodos modificados por una capa de nanocompuesto de 50 μm de espesor (aceite de oliva/20% de NP de SiO_2). Los resultados obtenidos empleando el YSI Model 3200 Conductivity Instrument (promedio de 10 mediciones) a 1 cm de distancia entre los electrodos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Influencia de la modificación del electrodo en la resistencia de la interfaz del tampón fosfato / electrodo

Tipo de superficie del electrodo	Electrodo de Cu sin modificar.	Electrodo de Cu modificado con una capa de aceite de oliva de 50 μm de espesor.	Electrodos de Cu modificados con una capa de nanocompuesto de 50 μm de espesor
Conductancia	1139 $\mu\text{S cm}^{-1}$	17.6 $\mu\text{S cm}^{-1}$	7.7 $\mu\text{S cm}^{-1}$

Los valores de espesor de las capas presentados en la tabla se calcularon teniendo en cuenta el diámetro de disco del electrodo (8 mm) y el volumen (5 μL) de la solución de cloroformo depositada del aceite de oliva y el nanocompuesto respectivamente. Como se ve en la tabla, la modificación de los electrodos con aceite de oliva causa una disminución de la conductividad de 64.7 veces en comparación con los electrodos de metal simple, mientras que la modificación de los electrodos con el

nanocompuesto (20% en peso de NP de SiO_2) provoca una disminución de la conductividad de 147.9 veces respectivamente. Estos resultados confirmaron la viabilidad del supuesto mencionado en que se basa este trabajo.

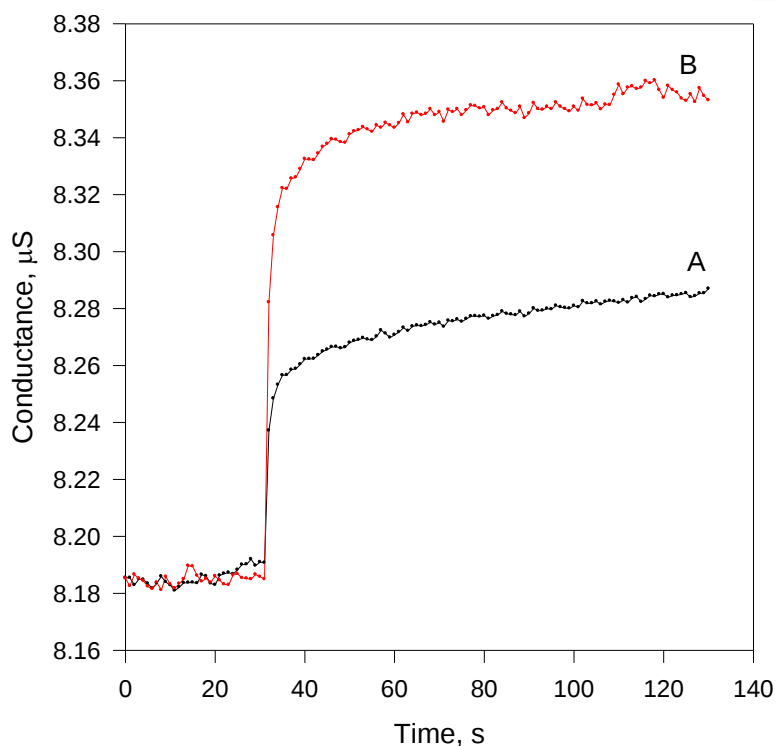


Figura 55. Respuestas del sensor a 0.06 U.S.P. mL-1 lipasa a 300 rpm, 120 Hz, 50 mV p.p. Voltaje CA y capa sensible de: 50 μm de aceite de oliva simple (curva A) y 50 μm de nanocompuesto (curva B)

Se realizó un experimento similar empleando el potenciostato y su software en el modo de detección de CA registrando las respuestas de conductancia (resistencia) aplicando aceite de oliva simple y los electrodos conductométricos modificados con el nanocompuesto en las mismas muestras de actividad de lipasa y las mismas condiciones experimentales. De esta manera se verificó la capacidad de las nanopartículas para amplificar la respuesta analítica y los resultados se

presentan en la Figura 55. Allí, la altura de onda de la curva B registrada con la aplicación del nanocompuesto como modificador de electrodo conductométrico y capa sensible es 1,86 veces más alta que la de la curva A obtenida en la misma actividad de la lipasa, pero solo con la aplicación de aceite de oliva simple, ambos con el mismo grosor inicial de 50 μm .

Optimización de amplitud de respuesta

Optimización de pH y la velocidad del agitador

Según los datos ya presentados sobre la actividad máxima enzimática de la lipasa, el valor de pH óptimo se encuentra en el rango entre 7 y 10 [249, 250]. Como se mencionó anteriormente, todos los experimentos se llevaron a cabo con un pH 8 (tampón fosfato) permitiendo la máxima actividad enzimática de acuerdo con la recomendación del productor de la enzima.

La agitación de la solución tampón que contiene lipasa es necesaria para intensificar el contacto de la lipasa con el nanocompuesto depositado sobre el electrodo conductométrico y servir como sustrato.

Las curvas de conductancia vs tiempo se registraron en rangos de agitación de 100 a 1000 rpm para evaluar su influencia. Los resultados mostraron que la capa de nanocompuesto pierde gradualmente su estabilidad a más de 500 rpm, lo que provoca un aspecto de pendiente negativa de toda la curva debido a una lenta degradación mecánica de la capa sensible de nanocompuesto (ver curva A en la Figura 56). Para obtener resultados estables en todos los experimentos se aplicó una agitación de 300 rpm.

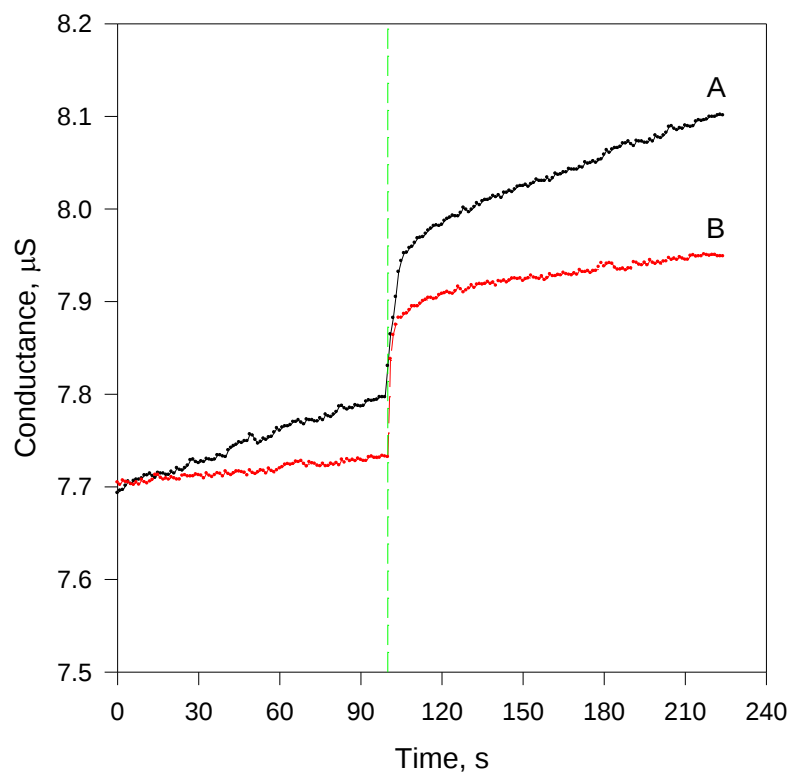


Figura 56. Una respuesta típica de conductancia / tiempo a 0.08 U mg-1 lipasa en tampón fosfato con pH = 8. Tasas de agitación: 300 rpm para curva A y 600 rpm para curva B; Amplitud del voltaje de CA = 50 mV a 120 Hz.

Optimización del espesor de la capa sensible.

Para optimizar el espesor de la capa sensible, se registraron las curvas de conductancia frente al tiempo para la misma actividad de lipasa en las mismas condiciones como son: actividad de la lipasa, amplitud y frecuencia del voltaje de CA, pero aumentando el espesor de la capa de nanocompuesto.

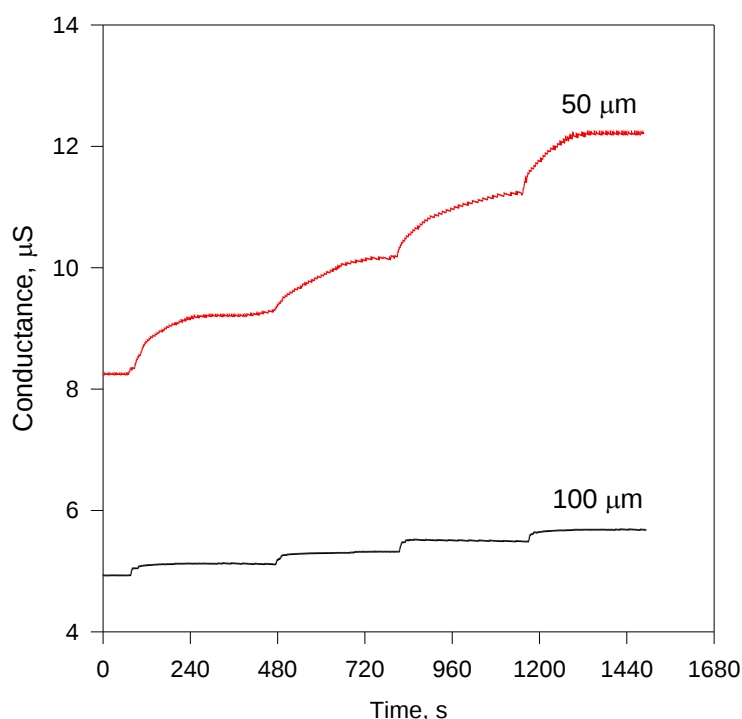


Figura 57. Respuesta analítica de 0.4 U.S.P. mL-1 lipasa a 50 y 100 μm de espesor de capa de nanocompuesto. Velocidad de agitación = 300 rpm; A.C. amplitud de voltaje = 50 mV p.p.at 120 Hz de frecuencia

Para este propósito, se depositaron sobre la superficie del electrodo volúmenes de 5 y 10 μL del nanocompuesto disuelto en cloroformo, lo que produjo espesores de capa de aproximadamente 50 y 100 μm después de la evaporación del solvente orgánico. Los volúmenes de menos de 5 μL no

fueron suficientes para cubrir toda la superficie del electrodo, mientras que los de más de 10 μL formaron un espesor de capa irregular.

Las respuestas del sensor obtenidas con espesores de la capa sensible de nanocompuesto de 50 y 100 μm se muestran en la Figura 57. La capa sensible más gruesa da como resultado una conductancia inicial más baja y una respuesta más baja (alturas de onda) y, por lo tanto, una sensibilidad más baja en comparación con la más delgada.

Caracterización metrológica del sensor conductométrico.

Determinación del rango de cuantificación lineal y construcción del diagrama de calibración

Aplicando la condición optimizada, se determinó experimentalmente que el rango de cuantificación lineal era de 1.1×10^{-2} a $1.17 \text{ U.S.P. mL}^{-1}$ de actividad de lipasa.

Una parte de las respuestas analíticas utilizadas para la construcción del diagrama de calibración se presenta en la Figura 58, mientras que las respuestas analíticas correspondientes a las actividades de lipasa más altas y más bajas del rango de cuantificación lineal se muestran en la Figura 60.

La gráfica de calibración correspondiente que se muestra a la derecha de la Figura 55 se describe con la ecuación: $G = -0.026 + 2.31LA$, donde G es el cambio de conductancia registrado y LA es la actividad de la lipasa en U.S.P. U mL⁻¹. Se encontró que la precisión de cuantificación era de 3.86 a 1.22% para el rango de actividad lineal de 1.1×10^{-2} a 1.17 U.S.P. U mL⁻¹ actividad de la lipasa

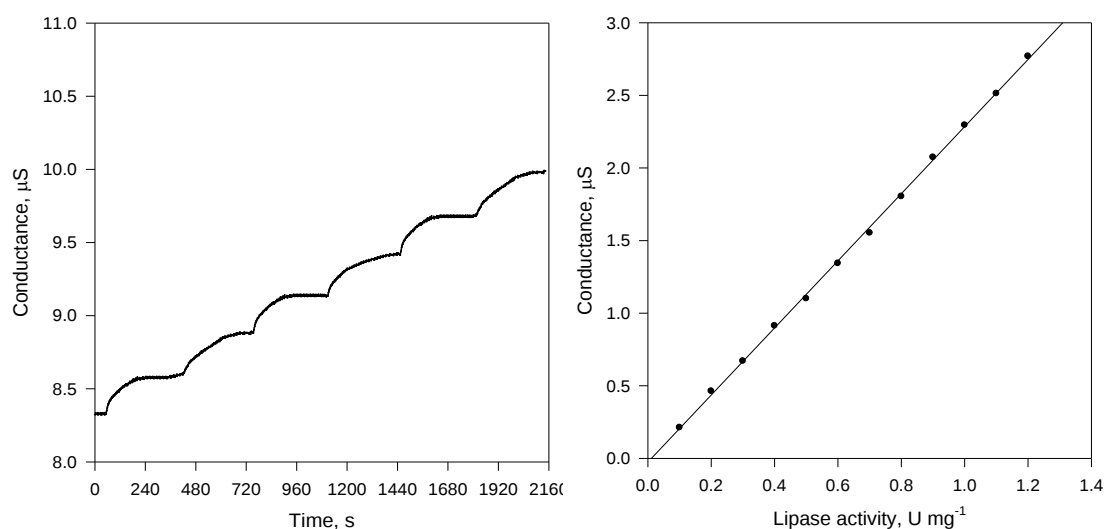


Figura 58. Gráfico de calibración correspondiente Curva de la conductancia vs tiempo para la adición sucesiva de 0.2 U.S.P. mg⁻¹ de lipasa (izquierda). Espesores de capa de nanocompuesto = 2 μm; velocidad del agitador = 300 rpm; A.C. amplitud de voltaje = 50 mV p.p.; frecuencia = 1000 Hz.

Evaluación del límite de detección LOD

El límite de detección (LOD) se determinó como 0.8×10^{-3} U.S.P. actividad de lipasa mg⁻¹ aplicando las reglas sigma 3 a una relación de ingredientes nanocompuestos optimizada (20% de nanopartículas de SiO₂ en aceite de oliva), espesor de capa de 50 μm, 300 rpm, 50 mV de voltaje CA a 120 Hz y pH 8.

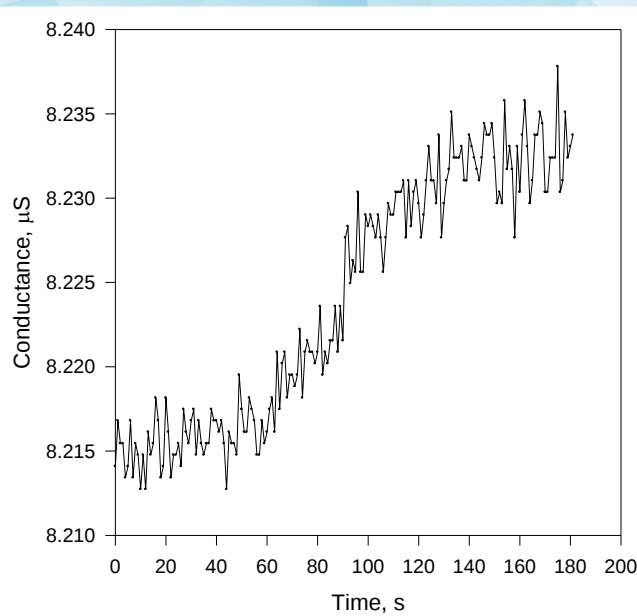


Figura 60. Curva de la conductancia vs el tiempo sin suavizar para 0.8×10^{-3} U.S.P. mg^{-1} actividad de la lipasa.

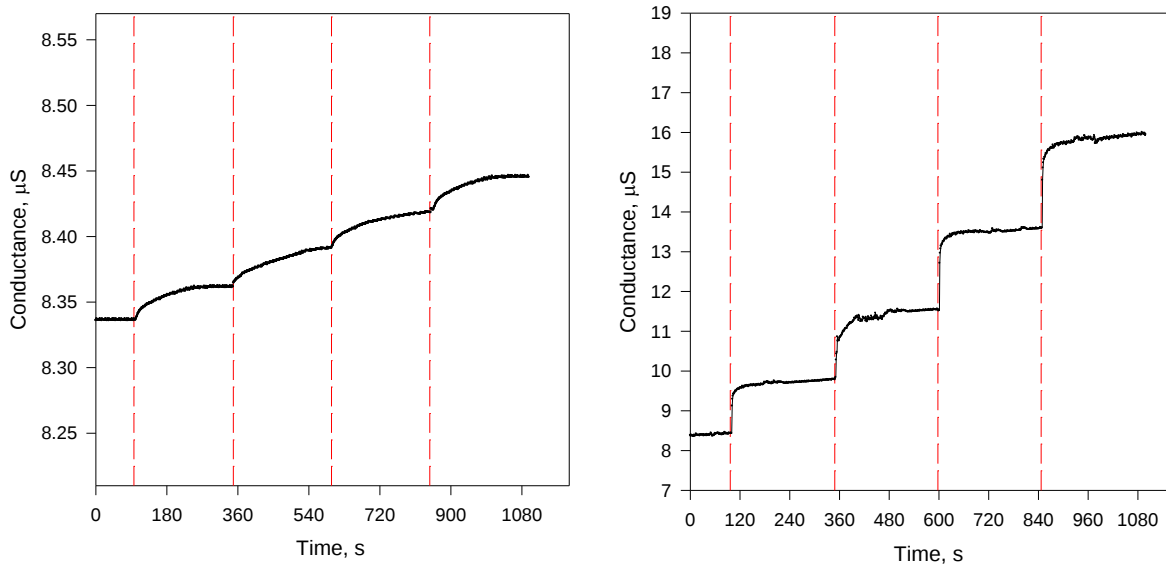


Figura 59. Respuestas analíticas para: izquierda, la actividad lipasa más baja (1.1×10^{-2} U.S.P. mL^{-1}) y Derecha, la más alta (1.17 U.S.P. mL^{-1}) dentro del rango de cuantificación lineal a 300 rpm, 50 mV p.p. A.C. amplitud de voltaje con una frecuencia de 120 Hz y un espesor de capa de nanocompuesto de 50 μm

Este valor LOD se calculó con el promedio de 10 determinaciones de solución de lipasa tras una dilución apropiada sucesiva para obtener la actividad mínima de lipasa que se puede detectar en una curva sin procesar para 0.8×10^{-3} U.S.P. mg^{-1} actividad de lipasa. La curva que se muestra en la Figura 59 es la curva obtenida sin ningún tipo de suavizado.

Evaluación del tiempo de respuesta

Se espera que las actividades más elevadas de lipasa provoquen reacciones enzimáticas más rápidas que resulten en un tiempo de respuesta más corto. En realidad, los experimentos mostraron que el tiempo de respuesta del sensor depende de la actividad determinada de la lipasa: a mayor actividad, más corto es el tiempo de respuesta, como se ve en la Figura 60. Los intervalos de tiempo para alcanzar la estabilidad de la onda en la curva de conductancia - tiempo se evaluaron para las actividades de lipasa dentro del rango de cuantificación lineal presentados en la Tabla 4.

Tabla 4. Tiempo de respuesta en función de la actividad determinada de la lipasa.

Actividad de la lipasa, U.S.P. mL^{-1}	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^{-1}$	$6 \cdot 10^{-1}$	1.5
Tiempo de respuesta, s	86	57.2	39.1	17.8	6.5

Como se ve en la tabla que presenta los resultados tomados de las Figuras 58 y 60, el tiempo de respuesta promedio para la actividad de lipasa medible más baja es de 86 s, mientras que para la actividad más alta se reduce a 6.5 s.

Evaluación de respetabilidad de los sensores

El bajo costo de los electrodos de barra conductométricos permite su uso como desechable y regenerable. En ambos casos, la repetibilidad de la superficie del electrodo modificado es muy importante para obtener resultados confiables y repetibles. La repetibilidad se evaluó mediante una serie de 10 electrodos modificados aplicando el procedimiento descrito en la parte experimental. La misma solución de lipasa conteniendo 1×10^{-1} U.S.P. mg^{-1} en el medio del rango de cuantificación lineal se determinó por cada uno de estos 10 electrodos y las desviaciones relativas con respecto al promedio se presentan en la Figura 61. La desviación máxima como porcentaje no superó el error relativo correspondiente a la actividad de la lipasa aplicada.

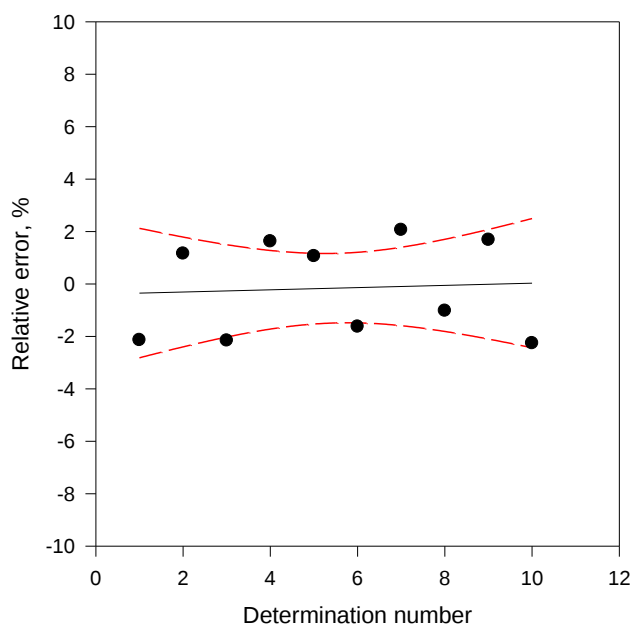


Figura 61. Errores relativos de las determinaciones de 1×10^{-1} U.S.P. mg^{-1} utilizando 10 electrodos de barra conductométricos modificados con nanocompuesto a 300 rpm, 50 mV p.p. A.C. amplitud de voltaje con una frecuencia de 120 Hz y un espesor de capa de nanocompuesto de 50 μm

Aplicación a muestras reales y validación de resultados.

Se realizaron experimentos de validación aplicando el método titrimétrico descrito por Pinsirodom [251] que posee el mismo LOD. Se prepararon muestras enriquecidas de suero de leche sin lipasa de la industria de producción de queso mediante la adición de soluciones de lipasa. Se prepararon tres muestras que pertenecen al rango de cuantificación del sensor lineal más bajo, más alto y medio. Cada muestra se determinó 3 veces y se tomó el resultado promedio. Los resultados mostraron que cada uno de los tres errores relativos era inferior al 3,5%. Este resultado confirma la precisión satisfactoria del método propuesto, tema del presente trabajo.

Sensor impedimétrico para la cuantificación de la actividad de la lipasa

Optimización y caracterización de la composición de la capa sensibles de nanocompuesto

Podría esperarse que el aumento de la relación de masa de aceite de oliva a NP de SiO_2 causara un aumento de la sensibilidad debido a la mayor permitividad dieléctrica del SiO_2 . Desafortunadamente, se produce un aumento en la protección del aceite de oliva en paralelo, lo que dificulta que la enzima tenga acceso a su sustrato, lo que resulta en una disminución de la respuesta del sensor (sensibilidad) acompañada por un aumento en el tiempo de respuesta. Se encontró que 600 mg de aceite de oliva y 84 mg de NP (14% de nanopartículas) es la composición óptima del nanocompuesto.

La estructura de la capa sensible de nanocompuestos depositada después de la evaporación del disolvente orgánico se caracterizó por SEM. La micrografía SEM (ver Figura 62) mostró la formación de grupos de nanopartículas de SiO_2 de 100 a 400 nm en diámetros (los puntos blancos en la figura) como resultado de la agregación de nanopartículas durante la evaporación del disolvente orgánico. Afortunadamente, la formación de grupos de NP no afectó las características del sensor tal como se presentan a continuación y no se agregaron agentes que impidan la aglomeración.

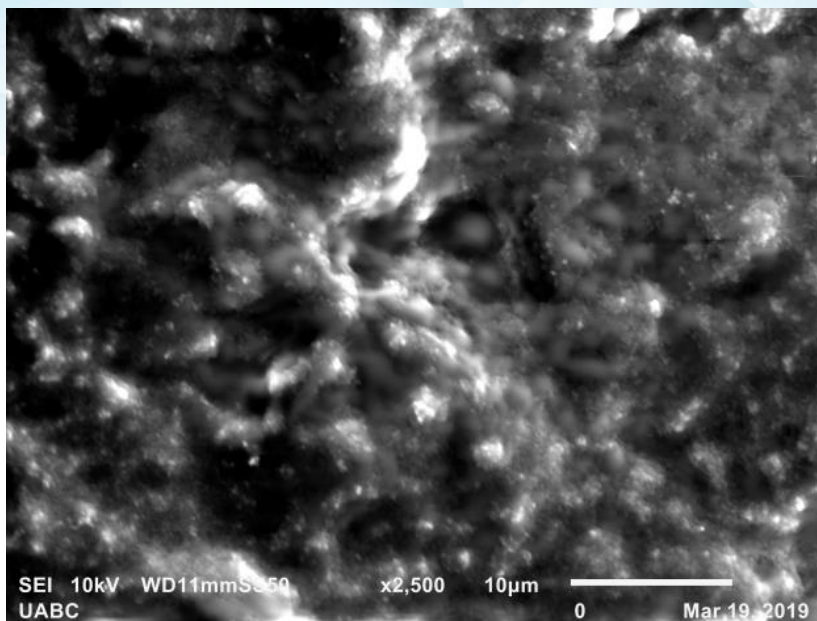


Figura 62. Micrografía SEM de la superficie del electrodo de nanocompuestos modificados (14% de nanopartículas de SiO_2 en aceite de oliva)

Respuesta típica del sensor e influencia de la presencia de nanopartículas

El espesor de la capa sensible a los nanocompuestos disminuye cuando se pone en contacto con la lipasa como resultado de la degradación enzimática del aceite de oliva al que se adhieren las nanopartículas. Esto causa cambios a lo largo del tiempo de los componentes de impedancia X_c y R de la interfaz: electrodo modificado con nanocompuesto/solución conteniendo lipasa (ver Figura 63, izquierda).

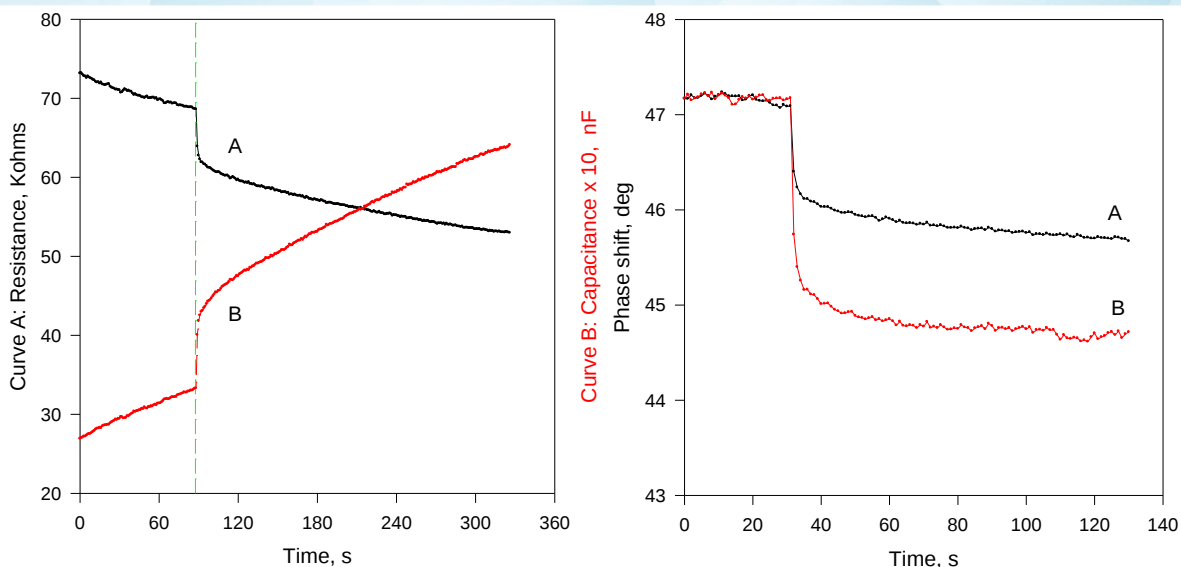


Figura 63. Izquierda: la resistencia (curva A) y la capacitancia (curva B) cambian a lo largo del tiempo en presencia de 2 U.S.P. mL^{-1} lipasa. Derecha: Respuesta del sensor a 0.17 U.S.P. mL^{-1} lipasa a 300 rpm, 120 Hz y amplitud 50 mV p.p. Curva A: capa sensible a aceite de oliva simple de 49 μm ; Curva B: capa sensible de nanocompuesto de 49 μm (aceite de oliva cargado con un 14% de nanopartículas de SiO_2)

Como resultado, los cambios correspondientes del cambio de fase de la corriente de CA aparecen a lo largo del tiempo como se muestra en la Figura 63, a la derecha. La descomposición de la capa sensible y, por lo tanto, la variación del cambio de fase de la corriente de CA continúa hasta la saturación de los centros activos de la lipasa, lo que resulta en una curva en forma de onda frente al tiempo.

Una de las suposiciones en las que se basa este trabajo es la aplicación de un nanocompuesto como capa sensible que espera una amplificación de respuesta del sensor como resultado de la mayor resistividad y la permitividad dieléctrica de las nanopartículas de SiO_2 que las del aceite de oliva simple. La comparación experimental mostró una

respuesta del sensor 1.77 veces mayor (vea la curva B en la Figura 63, derecha) obtenido con una aplicación de nanocompuesto como capa sensible en comparación con la capa de aceite de oliva simple. Este resultado es el máximo y se obtuvo mediante la composición optimizada de la capa sensible de nanocompuesto conteniendo 14% de nanopartículas.

Se obtuvieron resultados idénticos con electrodos de Cu, así como con Au y con placas de Ni, que excluyen la influencia de la naturaleza del material del electrodo en la respuesta del sensor.

Como se ve en la Figura 63, a la derecha, se pueden usar dos parámetros de curva para la evaluación de la actividad de la lipasa: la pendiente y la altura de la onda. El uso de la pendiente ofrece la ventaja de un menor tiempo de respuesta del sensor. Sin embargo, la reproducibilidad de la pendiente depende de la uniformidad de la capa sensible de nanocompuesto, a diferencia de la altura de onda. A pesar del tiempo más largo necesario para el establecimiento de la altura de onda, se empleó como parámetro de respuesta del sensor en este trabajo permitiendo obtener resultados más precisos.

Optimización de la amplitud de respuesta y el tiempo de la respuesta

Influencia del pH y la velocidad del agitador

De acuerdo con los datos ya reportados, la actividad enzimática de las lipasas se maximiza en un rango de pH de 7 a 10, valores relacionados con lipasas de diferentes fuentes y producidos por aplicación de diferentes métodos [249, 250]. Es por eso que se aplicó un tampón de fosfato de pH 8 en todos los experimentos.

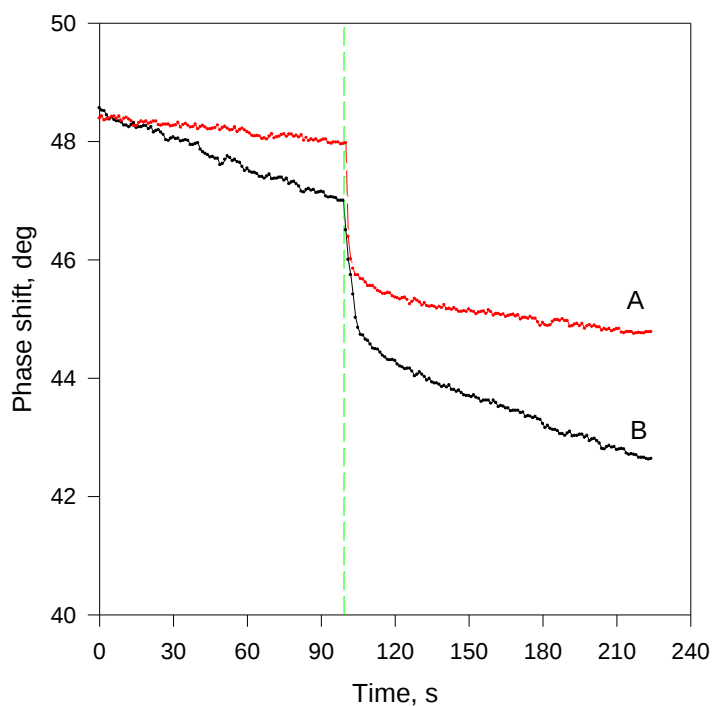


Figura 64. Respuestas del sensor a 0.2 U.S.P. mL-1 lipasa a 120 Hz, amplitud 50 mV p.p. y espesor de capa sensible de nanocompuestos de 49 μm . Velocidad de agitación = 300 rpm para la curva A y 600 rpm para la curva B.

Se registraron curvas de cambio de fase vs. tiempo aplicando tasas de agitación en rangos de 100 a 1000 rpm para evaluar su influencia y se encontró que la tasa de agitador no afecta mucho la respuesta del sensor. Por otro lado, las tasas de agitación elevada causaron la aparición de una pendiente negativa significativa de toda la curva debido a una degradación mecánica lenta de la capa de nanocompuestos (Figura 64, curva B) causando su disminución de espesor. Para minimizar este efecto, se aplicó una velocidad de agitación de 300 rpm en todos los experimentos.

Para intensificar el contacto de la lipasa con el nanocompuesto que sirve como capa sensible, así como para eliminar los productos de reacción enzimática, la solución tampón que contiene lipasa debe agitarse durante las determinaciones.

Influencia del espesor de la capa sensible

Las variaciones de grosor provocadas por la degradación enzimática serán mayores si se utiliza una capa de nanocompuesto más delgada, lo que causa cambios de capacitancia y resistencia en la interfaz relativamente altos. Como resultado, se puede obtener un cambio mayor de fase de la corriente CA y, por lo tanto, una mayor respuesta del sensor. Por otro lado, sin embargo, también se esperaría que una capa de sensibilidad más gruesa cause una respuesta analítica más estable y reproducible debido a una capa sensible más uniforme y cambios relativamente más pequeños (solo superficiales) de su estructura.

Para optimizar el espesor de la capa sensible, se registraron las curvas de cambio de fase frente al tiempo para la misma actividad de lipasa (concentración) en las mismas condiciones como: amplitud de voltaje CA aplicado de 50 mV p.p. y frecuencia de 120 Hz, aun con el aumento de espesor de la capa de nanocompuesto.

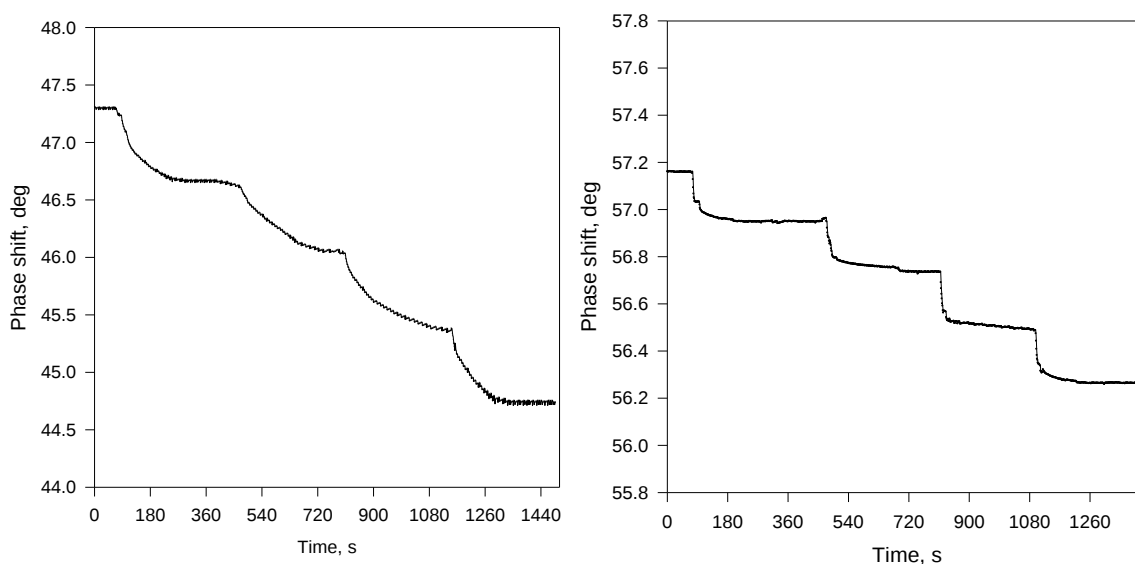


Figura 65. Respuestas del sensor a 0.07 U.S.P. mL⁻¹ lipasa a 300 rpm, 120 Hz y amplitud 50 mV p.p. Espesor de la capa sensible de nanocompuesto = 49 μm (izquierda) y 98 μm (derecha)

Se depositaron capas sensibles a los nanocompuestos con espesores de 49 y 98 μm (después de la evaporación del disolvente orgánico) sobre el electrodo indicador y se registraron las respuestas analíticas, ver Figura 65. Como se predijo anteriormente, la capa sensible más gruesa proporcionó una sensibilidad analítica más baja pero más estable que la más delgada. En este trabajo se aplicó un espesor de capa sensible mínimo de 49 μm que produce una mayor sensibilidad. Sin embargo, las características del sensor podrían ajustarse por el cambio de espesor de la capa de sensibilidad de acuerdo con la actividad de lipasa determinada.

Influencia de Amplitud y frecuencia de voltaje CA

Para determinar el valor de frecuencia que produce el cambio de fase máximo (Respuesta máxima del sensor y, por tanto, sensibilidad máxima) curvas similares a las que se muestran en la Figura 63, a la derecha se registraron en un rango de frecuencia de 10 Hz a 10 KHz en las mismas condiciones y actividad de la lipasa: amplitud de voltaje de 50 mV, espesor de la capa de nanocompuesto de 49 μm y velocidad de agitación de 300 rpm.

La respuesta máxima se obtuvo a 100 Hz, sin embargo, para evitar el ruido inducido desde la línea eléctrica de 60 Hz, se aplicó la frecuencia de 120 Hz en todos los experimentos (La frecuencia de 100 Hz es adecuada para líneas eléctricas de 50 Hz).

Está claro que las amplitudes de voltaje de CA más altas darán como resultado respuestas de corriente más altas; sin embargo, para evitar la aparición de algunas reacciones electroquímicas en la superficie del electrodo y la respuesta no lineal, solo se aplicó una pequeña amplitud de voltaje de CA de 50 mV en todos los experimentos.

Caracterización del sensor impedimétrico para cuantificación de la actividad de la lipasa

Rango de cuantificación lineal, precisión y determinación de LOD

Se encontró que el rango de cuantificación de la actividad de la lipasa lineal era de $0.99 \cdot 10^{-2}$ a $1.68 \text{ U.S.P. mL}^{-1}$ de actividad de lipasa. Las respuestas del sensor correspondientes a las actividades de lipasa más

bajas y más altas del rango de cuantificación lineal se muestran en la Figura 66, izquierda y derecha respectivamente. A mayor actividad de la lipasa la forma de meseta del gráfico de calibración comienza acercarse gradualmente la forma “clásica” de S.

El valor de actividad de lipasa más bajo medible está limitado por la resolución del equipo electrónico usado en pequeñas mediciones de desplazamiento de fase (dos dígitos después del punto decimal).

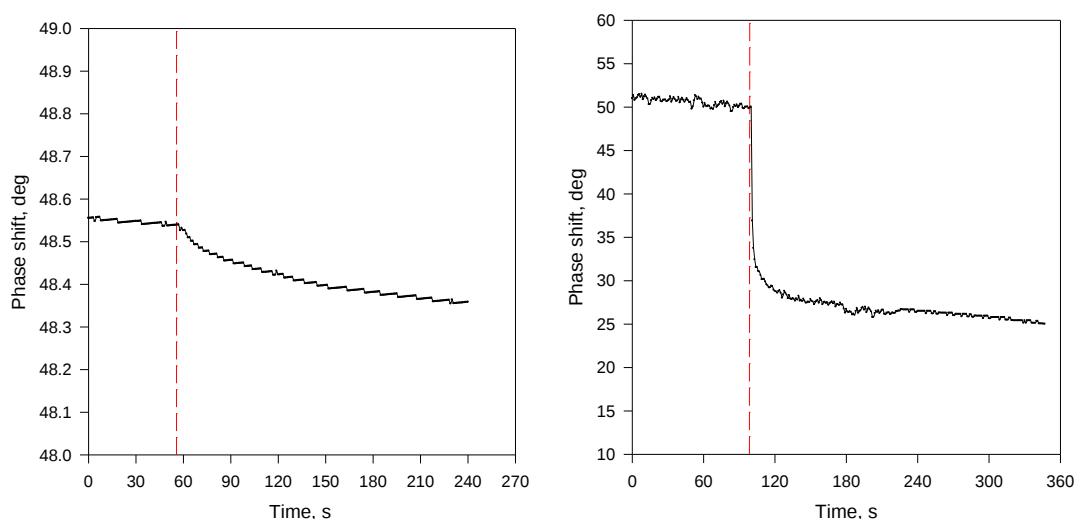


Figura 66. Izquierda: curva de respuesta del sensor suavizada de $1.4 \cdot 10^{-2}$ U.S.P. Actividad de lipasa mL^{-1} y Derecha: curva sin tratamiento de 1.7 U.S.P. mL^{-1} ambos registrados a una velocidad de agitador de 300 rpm, 120 Hz y 50 mV p.p. de amplitud de voltaje CA. Espesor de la capa sensible de nanocompuestos = $49 \mu\text{m}$

La precisión de cuantificación se encontró en el rango de 3.75 a 1.24% para el rango de cuantificación lineal mencionado correspondientemente y la gráfica de calibración correspondiente a este rango se describe mediante la ecuación: $\Phi = -0.84 + 14.24 \text{ LA}$ (como coeficiente de correlación $r^2 = 0.996$) con **LA**, la actividad de la lipasa expresada en U.S.P. U mL^{-1} (ver Figura 67 izquierda). Se encontró que el

límite de detección (LOD) era $8 \cdot 10^{-3}$ U.S.P. U mL⁻¹ actividad de lipasa mg⁻¹ aplicando la regla 3 sigma para una relación de ingredientes nanocompuestos optimizada (14% NP) y un espesor de capa de 49 μ m. La respuesta del sensor correspondiente al LOD se presenta en la Figura 67 a la derecha.

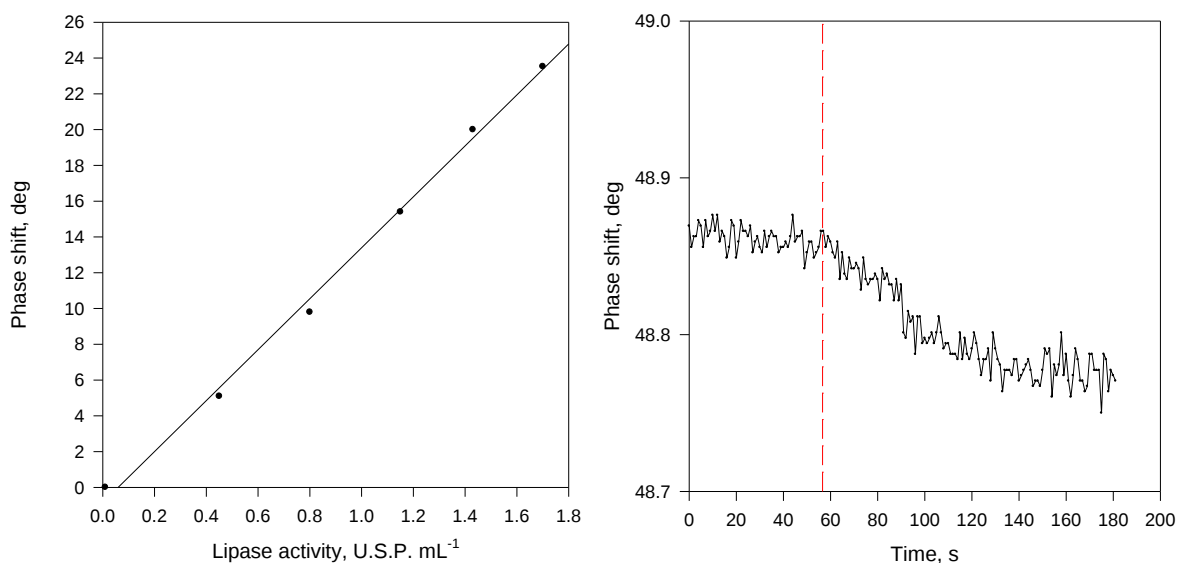


Figura 67. Izquierda: gráfico de calibración; Derecha: curva de respuesta del sensor sin suavizar del LOD = $0.8 \cdot 10^{-3}$ U.S.P. mL⁻¹ actividad de lipasa registrada a una velocidad de agitación de 300 rpm, 120 Hz, amplitud 50 mV p.p. y espesor de capa sensible de nanocompuestos de 49 μ m

Evaluación del tiempo de respuesta

Los experimentos mostraron que el tiempo de respuesta (el tiempo para alcanzar la estabilidad de onda en la curva del cambio de fase frente tiempo) depende de la actividad de la lipasa medida, a mayor actividad, menor tiempo de respuesta. Este parámetro se evaluó para las actividades de lipasa dentro del rango de cuantificación lineal completo. Se encontró que el tiempo de respuesta del sensor para las actividades de

lipasa más bajas era aproximadamente 80 s, mientras que para las actividades más altas era se reducía a 6 s (ver Figura 66 y Tabla 5). Los datos tomados de la familia de curvas entre los dos casos extremos que se muestran en la Figura 6 se utilizaron para construir la Tabla 5.

Tabla 5. Tiempos de respuesta del sensor dentro de la cuantificación lineal

Actividad de la lipasa, U.S.P. mL⁻¹	1 10⁻²	6 10⁻²	1.5 10⁻¹	6 10⁻¹	1.5
Tiempo de respuesta, s	80	57.2	39.1	17.8	6.4

Aplicación a muestras reales y validación de resultados

Los resultados obtenidos con el sensor, tema del presente trabajo, fueron validados mediante la aplicación del método titrimétrico descrito por Pinsirodom [251] poseyendo el mismo LOD.

Para este propósito, se prepararon muestras enriquecidas utilizando suero de leche sin lipasa de la industria de producción de queso. Se agregaron soluciones de lipasa para obtener tres valores de actividad que se ubican en el rango de cuantificación del sensor lineal bajo, alto y medio.

Cada solución enriquecida se determinó 3 veces y se tomó el promedio. Cada uno de los tres errores relativos obtenidos en el rango lineal de la actividad total de la lipasa fue inferior al 4,5%, lo que confirma la precisión satisfactoria del sensor propuesto.

CONCLUSIONES

1. Se desarrollaron métodos: gravimétricos con la aplicación de microbalanza de cuarzo; espectrofotométrico y nefelométrico para la medición de la actividad de la enzima tripsina, así como métodos conductométrico e impedimétrico para la determinación de la actividad de la lipasa ambas enzimas del grupo de las hidrolasas.
2. Se determinaron las características metrológicas y analíticas de los métodos desarrollados utilizando soluciones patrones
3. Se estudió la influencia de los parámetros operacionales mencionados sobre la amplitud de la respuesta y el tiempo de la respuesta:
 - pH y velocidad de agitación
 - tipo del sustrato aplicado como elemento sensible
 - composición y tamaño de las nanopartículas
 - la carga de la capa sensible con nanopartículas
 - estado de la superficie de las nanopartículas (presencia o ausencia de modificación)
4. Se optimizaron los valores de los 5 parámetros mencionados para maximizar la amplitud y minimizar el tiempo de la respuesta. Se lograron los parámetros siguientes:

Método piezoeléctrico Gravimétrico (QCM) para la medición de la actividad de la tripsina

1. Se logró a medir un rango de las actividades de la tripsina desde 7.5×10^{-3} U/mL hasta 7500 U/mL
2. El rango de linealidad fue determinado: desde 0.001 hasta 0.3 $\mu\text{g/mL}$, así como el límite de detección: 75×10^{-4} U mL^{-1} (0.001 $\mu\text{g/mL}$).
3. La reproducibilidad del sensor fue determinada como 0.94% (n=4) para concentración de la tripsina 100 $\mu\text{g/mL}$.

Método espectrofotométrico para la medición de la actividad de la tripsina

1. Se optimizó la construcción del sensor aumentando 4 veces el área de la parte sensible de éste en contacto con la muestra y se disminuyó 3 veces el volumen de la muestra dando como resultado un incremento de 12 veces la amplitud de la respuesta y sensibilidad del sensor respectivamente
2. Se optimizó la velocidad de agitación y se encontró el valor óptimo: 500 rpm. Valores mayores provocan destrucción de la parte sensible del sensor, mientras en velocidades menores el tiempo de cuantificación es más largo.
3. Se encontró que la temperatura óptima para obtener la respuesta máxima del sensor es a 35°C, pero a temperatura ambiente la

amplitud de la respuesta también permite la medición de concentraciones bajas.

Método nefelométrico para la medición de la actividad de la tripsina

1. Se desarrolló y caracterizó analíticamente el método para la cuantificación de la actividad de la tripsina basado en la nefelometría y la aplicación de sustrato cargado con nanopartículas.
2. El rango lineal de las concentraciones de tripsina medibles fue determinado en 5.5 hasta 82 $\mu\text{g L}^{-1}$.
3. El error relativo en el rango lineal de las concentraciones está en el intervalo de 0.84/0.94 hasta 1.83/1.91% para las curvas de calibración con la altura de escalón y la pendiente de la respuesta.
4. La amplitud de la respuesta depende linealmente de la concentración de las nanopartículas con un mismo tamaño cargadas en el sustrato.

Método conductométrico para la medición de la actividad de la lipasa

1. El rango de cuantificación lineal se determinó desde 1.1×10^{-2} hasta 1.17 U.S.P. U mL^{-1} respectivamente.

2. El límite de detección (LOD) se determinó 0.8×10^{-3} U. S. P. U mL⁻¹.
3. El error relativo fue 3.6% a 1.2% en un LOD de 0.8×10^{-3} U. S. P. U mL⁻¹ en el rango lineal de la cuantificación
4. pH optimizado = 8
5. El tiempo de respuesta depende de la actividad enzimática medida de acuerdo con la tabla siguiente:

Actividad de la Lipasa, U.S.P. U mL ⁻¹	1.1×10^{-2}	6×10^{-2}	1.5×10^{-1}	6×10^{-1}	1.5
Tiempo de Respuesta, s	86	57.2	39.1	17.8	6.5

Método impedimétrico para la medición de la actividad de la lipasa

1. Se encontró que el tiempo de respuesta era de 80 a 6 s en el rango de concentración lineal de 0.99×10^{-2} a 1.68 U.S.P. U mL⁻¹ con errores relativos de 3.75% a 1.24% respectivamente
2. El límite de detección (LOD) se determinó en 8×10^{-3} U.S.P. U mL⁻¹.
3. El sensor impedimétrico fue validado por un método titrimétrico estandarizado y la comparación de resultados reveló un buen acuerdo con errores relativos menores al 4.5%.

REFERENCIAS

1. Leticia Casas-Godoy, Francisco Gasteazoro, Sophie Duquesne, Florence Bordes, Alain Marty, and Georgina Sandoval, Chapter 1, Lipases: An Overview, pp. 3-38, in: Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Sandoval Georgina (Ed.), 2018, Springer.
2. H. Brockerhoff and R. Jensen, Lipolytic Enzymes, Elsevier Science, Saint Louis 2014.
3. The Enzymes, ed. P. Boyer, Academic Press, NY, 3rd edn, 1972, vol. 7, p. 575.
4. Hasan F., Shah A.A., Hameed A. (2006) Enzyme and Microbial Technology, 39, 235-251. Industrial applications of microbial lipases, doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
5. Aravindan, R., Anbumathi, P. and Viruthagiri, T. (2007) Lipase Applications in Food Industry. Indian Journal of Biotechnology, 6, 141-158.
6. Walsh K. (1970) Trypsinogens and trypsins of various species. Methods in Enzymology 19, 41-63;
7. Cohen T., Gertler A. (1981). Pancreatic proteolytic enzymes from *Cyprinus carpio* I. Purification and physical properties of trypsin. Chymosin, elastase and carboxypeptidase B. Comparative Biochemistry and Physiology 69 B, 647-653.

8. Chen, Y., Ding, J., Qin, W., 2012. Bioelectrochemistry, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.04.002>.
9. Forsmark C., 2010. Chronic pancreatitis. In: Feldman, M., Friedman, L.S., Brandt, L.J., eds. Sleisinger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, chap 59.
10. Temler, R., Felber, J-P., 1976. Biochim. Biophys. Acta 445, 720-728.
11. Schwert, G., Takenaka, Y., 1955. Biochim. Biophys. Acta 16, 570-575.
12. Kersey, A., Berkoff, T., Morey, W., 1993. Opt. Lett. 18, 1370-1372.
13. Spooncer, R., Al-Ramadhan, F., Jones, B., 1992. Int. J. Optoelectron. 7, 449-452.
14. Millington, R., Mayes, A., Blyth, J., Lowe, C., 1995. Anal. Chem. 67, 4229-4233.
15. Hu, Q-Z., Jang, Ch-H., 2012. ACS Appl. Mater. Interfaces 4, 1791-1795.
16. Syed, M.A., Bhatti, A.S., Li, C., Bokhari, H., 2011. Am. J. Biomed. Sci. 3, 253-257.
17. 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

18. Zaccheo, B., Crooks, R., 2011. *Anal. Chem.* 83, 1185-1188
19. Biloivan, O., Dzyadevych, S., Boubriak, O., Soldatkin, A., El'skaya, A., 2004. *Electroanalysis* 16, 1883-1889.
20. Ionescu, R., Cosnier, S., Marks, S., 2006. *Anal. Chem.* 78, 6327-6331.
21. Ionescu, R., Fillit, C., Jaffrezic-Renault, N., Cosnier, S., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 24, 489-492.
22. Fordyce, K., Shvarev, A., 2008. *Anal. Chem.* 80, 827-833.
23. Adjemian, J., Anne, A., Cauet, G., Demaille, C., 2010. *Langmuir* 26, 10347-10356.
24. Baş, D., Boyacı, I.H., 2010. *Electroanalysis* 22, 265-267.
25. Stoytcheva, M., Zlatev, R., Cosnier, S., Arredondo, M., 2012. *Electrochim. Acta* <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.04.140>
26. Kukwikila, M., Howorka, S., 2010. *J. Phys.: Condens. Matter* 22, 454103-454108.
27. Neff, P. A., Serr, A., Wunderlich, B., Bausch, A., 2007. *Chem. Phys. Chem.* DOI: 10.1002/cphc.200700279
28. Hanumegowda, N.M., White, I.M., Oveys, H., Fan, X., 2005. *Sensor Lett.* 3, 1-5.

29. Wu, S., Cai, Q., Grimes, C.A., 2006. *Sensor Lett.* 4, 160-164(5).
30. Krause, S., McNeil, C.J., Fernández-Sánchez, C., Sabot, A., 2006. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA.
31. Stair, J.L., Watkinson, M., Krause, S., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2113–2118.
32. Ahola, S., Turon, X., Osterberg, M., Laine, J., Rojas, O.J., 2008. *Langmuir* 24, 11592–11599.
33. Hu, G., Heitmann, J.A., Rojas, O.J., 2009. *Anal. Chem.* 81, 1872-1880.
34. Jeong, C., Maciel, A.M., Pawlak, J.J., Heitmann, J.A., Argyropoulos, D.S., Rojas, O.J., 2005. 13th International Symposium on Wood, Fibre and Pulping Chemistry (ISWFPC), Vol. 2: 495-502, Auckland, New Zealand, May 16-19, 2005.
35. Josefsson, P., Henriksson, G., Wågberg, L., 2008. *Biomacromolecules* 9 249–254.
36. Turon, X., Rojas, O.J., Deinhammer, R.S., 2008. *Langmuir* 24, 3880-3887.
37. Chao Chen, Yingchun Fu, Canhui Xiang, Qingji Xie, Qingfang Zhang, Yuhua Su, LihuaWang, Shouzhuo Yao, 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2726–2729.

38. Chao Chen, Qingji Xie, Lihua Wang, Cong Qin, Fangyun Xie, Shouzhuo Yao, Jinhua Chen, 2011. *Anal. Chem.* 83, 2660–2666.
39. Chunyan Deng, Mingrui Li, Qingji Xie, Meiling Liu, Yueming Tan, Xiahong Xu, Shouzhuo Yao, 2006. *Anal. Chim. Acta* 557, 85-94.
40. Banumathi, E., Haribalaganesh, R., Babu, S., Kumar, N., Sangiliyandi, G., 2009. *Microvasc. Res.* 77, 377-381.
41. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., Grassl, M., 1974. in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Volume I, 2nd ed., Academic Press Inc., New York, pp. 515-516.
42. Cai, Q., Wang, R., Wu, L., Nie, L., Yao, S., 1997. *Microchemical Journal* 55, 367-374.
43. 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.
44. Evanoff, D.D. Jr., Chumanov, G. 2005. *Chem. Phys. Chem.* 6, 1221 – 1231.
45. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), NMRS 50/TRS 488-JECFA 15/11; FAS 2/NMRS 50B-JECFA 15/11; COMPENDIUM/1561.

46. Khaydarov, R.A., Khaydarov, R.R., Gapurova, O., Estrin, Y., Scheper, T., 2009. J. Nanopart. Res. 11, 1193–1200.
47. Kersey, A., Berkoff, T., Morey, W., 1993. Opt. Lett. 18, 1370-1372.
48. Schuchert-Shi, A., Hauser P.C., 2009. Anal. Biochem. 387, 202-207.
49. Snabe, T., Petersen, S.B., 2003. Chem. Phys. Lipids 125, 69-82.
50. Soleimani, M., Nadri, S., 2009. Nat. Protoc. 4, 102-106.
51. Yang, M., Chen, C., Wang, X., Zhu, Y., Gu, Y., 2009. J. Biomed. Mater. Res. 91, 354-361.
52. R. Sánchez-Lozada, M. Camacho-Hernández, R. Vega-Chavaje, J. Garza Flores, C. Campos-Castillo, R. Gutiérrez-Vega. Gac. Méd. Méx. 2005 141 2: 123-127.
53. T. Foitzik, E. Klar, H. J. Buhr, C. Herfarth. Eur. J. Surg. 1995 161: 187-92.
54. S. Tenner, G. Sica, M. Hughes, E. Noordhoek, S. Feng, M. Zinner, P. A. Bankset. Gastroenterology 1997 113: 899-903.
55. R. Pezilli, P. Billi, M. Miglioli et al. Dig. Dis. Sci. 1993 38: 1265-1269.
56. P-A. Clavien, J. Robert, P. Meyer, F. Borst, H. Hauser. Ann. Surg. 1989 210: 614-620.

57. S. Kazmierczak, F. Van Lente, E. Hodges. Clin. Chem. 1991 37: 356-360.
58. P. Lankisch, D. Pflichthofer, D. Lehnick. Pancreas 1999 19: 321-324.
59. J. P. Neoptolemos, E. A. Kemppainen, J. M. Mayer, J. M. Fitzpatrick, M. G. Raraty, J. Slavin et al. Lancet 2000 355 9219:1955-60.
60. H. Paajanen, M. Laato, M. Jaakkola et al. Br. J. Surg. 1995 82: 271-273.
61. P-A. Clavien, S. Burgan, A. R. Moossa Br. J. Surg. 1989 76:1234-1243.
62. M-L. Kylänpää-Bäck, A. Takala, E. Kemppainen, P. Puolakkainen, A. Leppäniemi, S-L. Karonen et al. Crit.Care Med. 2001 29: 63-69.
63. A. C. De Beaux, A. S. Goldie, J. A. Ross et al. Br. J. Surg. 1996 83: 349-53.
64. A. D. Kersey, T. A. Berkoff, W. W. Morey. Opt. Lett. 1993 18: 1370-1372.
65. R. C. Spoocher, F. A. Al-Ramadhan, B. E. Jones. Int. J. Optoelectron. 1992 7 449-452.
66. R. B. Millington, A. G. Mayes, J. Blyth, C. R. Lowe. Sens. Actuators B 1996 33: 55-59.
67. A. J. Barrett. N. D. Rawlings, J. F. Woessner. The Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd ed. Academic Press, 2003

68. N. D. Rawlings, A. J. Barrett. *Meth. Enzymol.* 1994 244: 19–61
69. B. Keil. In *The Enzymes*, 3rd ed., Vol. III, P. D. Boyer, Academic Press NY: 1971, pp. 250-275.
70. H. C. Heinrich, E. E. Gabbe, F. Ičlagić. *J. Mol. Medicine* 1979 57: 1237-1238.
71. J. M. Artigas, M. E. Garcia, M. R. Faure, A. M. Gimeno. *Postgrad. Med. J.* 1981 57: 219-22.
72. A. Samadi-Maybodi, K. Abolfazli, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 4 (2009) 684.
73. S. Ahmadzadeh, A. Kassim, M. Y. Abdollahi, G. H. Rounaghi *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011) 4749.
74. W. M. Yousef, K. Alenezi, A. H. Naggar, T. M. Hassan, S. Z. Bortata, O. A. Farghaly *Int. J. Electrochem. Sci.*, 12 (2017) 1146.
75. Ante Prkić, Vesna Sokol, Perica Bošković, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8 (2013) 4886.
76. P. Desnuelle, in *The Enzymes*, ed. P. Boyer, Academic Press, NY, 3rd edn, 1972, vol. 7, p. 575.

77. Hasan, F.; Shah, A.; Hameed, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.*, 2009, 27, 782-798.
78. Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and their industrial applications. An overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2004, 118, 155-170.
79. Fjerbaek, L.; Christensen, V.; Norddahl, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102(5), 1298-1315.
80. Seitz, E. Industrial application of microbial lipases: A review. *J. Amer. Oil Chemists' Society*, 1973, 51(2), 12-16.
81. Guncheva, M.; Zhiryakova, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 68, 1-21.
82. Adinarayana, K.; Bapi Raju, K.V.V.S.N.; Zargar, M.I.; Devi, R.B.; Lakshmi, P.J.; Ellaiah, P. Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species, *Ind. J. Biotechnol.*, 2004, 3, 65-69.
83. Karanam, S.K.; Medicherla, N.R. Enhanced lipase production by mutation induced *Aspergillus japonicus*. *African J. Biotechnol.*, 2008, 7, 2064-2067.

84. Hiol, A.; Jonzo, M.D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 26, 421–430.
85. Shukla, P.; Gupta, K. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-5. *J. Appl. Sci. Environ. Sanit.*, 2007, 2, 35–42.
86. Chahinian, H.; Vanot, G.; Ibrik, A.; Rugani, N.; Sarda, L.; Comeau, L.C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000, 64, 215–222.
87. Lima, V.M. G.; Krieger, N.; Sarquis, M.I.M.; Mitchell, D.A.; Ramos, L.P.; Fontana, J.D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol. Biotechnol.*, 2003, 41, 105–110.
88. Vardanega, R.; Remonato, D.; Arbter, F.; Polloni, A.; Rigo, E.; Ninow, L.N.; Treichel, H.; Oliveira, D.; Luccio, M. A Systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp. *Food Process. Technol.*, 2010, 3, 461–465.
89. Kashmiri, M.A.; Adnan, A.; Butt, B.W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *African J. Biotechnol.*, 2006, 5, 878–882.

90. Rajesh, E.M.; Arthe, R.; Rajendran, R.; Balakumar, C.; Pradeepa, N.; Anitha, S. Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. *EJEAFChe*, 2010, 9, 1177-1189.
91. Treichel, H.; Oliveira, D.; Mazutti, M.; Di Luccio, M.; Oliveira, J. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.*, 2010, 3, 182-196.
92. Jensen, R. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, 1983, 18(9), 650- 657.
93. Thomson, C.A.; Delaquis, P.J.; Mazza, G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1999, 39(2), 165-187.
94. Beisson, F.; Tiss, A.; Rivi re, C.; Verger, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, 2(2), 133-153.
95. Gupta, R.; Rathi, P.; Gupta, N.; Bradoo, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2003, 37, 63-71.
96. Starodub, N.F. Biosensors for the evaluation of lipase activity. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2006, 40(3-4), 155-160.

97. Cherry, I.S.; Crandall, L.A. The specificity of pancreatic lipase; its appearance in the blood after pancreatic injury. *Am. J. Physiol.*, 1932, 100, 266-273.
98. Tietz, N.; Fiereck, E. Serum lipase. *Stand. Methods Clin. Chem.*, 1972, 7, 19-31.
99. Wrolstad, R.; Decker, E.; Schwartz, S.; Sporns, P. *Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*; Wiley: New Jersey, 2005.
100. Pandey, A.; Webb, C.; Soccol, C.R.; Larroche, C. Eds.; *Enzyme technology*; Springer, 2006.
101. Lowe, M. Assays for pancreatic tryglyceride lipase and colipase. In: *Lipase and Phospholipase Protocols*; Doolittle, M; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 59-70.
102. Benzonana, G.; Desnuelle, P. Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycerides en emulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 105(1), 121-136.
103. Duncombe, W.G. The colorimetric determination of long-chain fatty acids in the 0.05–0.5"mole range. *Biochem. J.*, 1963, 88, 7-10.

104. Duncombe, W.G. The colorimetric micro-determination of nonesterified fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta*, 1964, 9(2), 122-125.
105. Dirstine, P.H.; Sobel, C.; Henry, R.J. A new rapid method for the determination of serum lipase. *Clin. Chem.*, 1968, 14(11), 1097-1106.
106. Yang, J.S.; Biggs, H.G. Rapid, reliable method for measuring serum lipase activity. *Clin. Chem.*, 1971, 17(6), 512-518.
107. Myrtle, J.; Zell, W. Simplified photometric copper-soap method for rapid assay of serum lipase activity, *Clin. Chem.* 1975, 21(10), 1469-1473.
108. Blain, J.A.; Akhtar, M.W.; Patterson, J.D.E. Study on lipase activities using organic solvent systems. *Pak. J. Biochem.*, 1976, 10, 41-53.
109. Kim, K.H.; Kwon, D.Y. Rhee, J.S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. *Lipids*, 1984, 19(12), 975-977.
110. Kwon, D.; Rhee, J.S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Amer. Oil Chemists' Society*, 1986, 63(1), 89-92.
111. Lowry, R.L.; Tinsley, I.J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1976, 53, 470-472.

112. Hron, W.T.; Menahan, L.A. A sensitive method for the determination of free fatty acids in plasma. *J. Lipid Res.*, 1981, 22, 377-381.
113. Redding, W.; Mayer, G.G.; Lornell, J.W. A semiautomated assay for nonesterified fatty acids in the 0.02 to 0.4 mueq/ml range. *J. Lipid Res.*, 1983, 24(1), 100.
114. Becker, P.; Abu-Reesh, I.; Markossian, S.; Antranikian, G.; Märkl, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipaseproducing thermophile *Bacillus* sp. on olive oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 48(2), 184-190.
115. Labuschagne, R.B.; van Tonder, A.; Litthauer, D. *Flavobacterium odoratum* lipase: isolation and characterization. *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, 21, 52-58.
116. Pencreac'h, G.; Baratti, J. C. Hydrolysis of p-nitro-phenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test 405 *Current Analytical Chemistry*, 2012, Vol. 8, No. 3 for the determination of lipase activity in organic media. *Enz. Microb. Technol.*, 1996, 18(6), 417-422.
117. Ushio, K.; Hirata, T.; Yoshida, K.; Sakaue, M.; Hirose, C.; Suzuki, T.; Ishizuka, M. Superinducers for induction of thermostable lipase production by *Pseudomonas* species NT-163 and other *Pseudomonas*-like bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 1996, 10, 267-272.

118. Kojima, Y.; Yokoe, M.; Mase, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, 58, 1564-1568.
119. Sigurgísladóttir, S.; Konráðsdóttir, M.; Jónsson, Á.; Kristjánsson, J.; Matthiasson, E. Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. *Biotechnol. Lett.*, 1993, 15(4), 361-366.
120. Kordel, M.; Hofmann, B.; Schomburg, D.; Schmid, R. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.*, 1991, 173, 4836-4841.
121. Winkler, U.K.; Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 1979, 138, 663-670.
122. Huggins, C.; Lapidus, J. Chromogenic substrates. IV. Acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterases. *J. Biol. Chem.*, 1947, 170, 467-482.
123. Stuer, W.; Jaeger, K.E.; Winkler, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 1986, 168, 1070-1074.
124. Vorderwülbecke, T.; Kieslich, K.; Erdmann, H. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, 14(8), 631-639.

125. Liebeton, K.; Zacharias, A.; Jaeger, K.E. Disulfide bonding *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.*, 2001, 183(2), 597-603.
126. Dimitrijevi#, A., Veliškovi#, D., Bezbradica, D., Bihelovi#, F., Jankov, R., Milosavi#, N. Production of lipase from *Pseudozyma aphidis* and determination of the activity and stability of the crude lipase preparation in polar solvents. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2001, 76, 1081-1092.
127. Gandolfi, R.; Marinelli, F.; Lazzarini, A.; Molinari, F. Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, 89(5), 870-875.
128. Lanz W.W.; Williams, P.P. Characterization of esterases produced by a ruminal bacterium identified as *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Bacteriol.*, 1973, 113(3), 1170-1176.
129. Nachlas, M.M.; Blackburn, R. The colorimetric determination of urinary lipase. *J. Biol. Chem.*, 1958, 230, 1051-1061.
130. Degrassi, G.; Uotila, L.; Klima, R.; Venturi, V. Purification and properties of an esterase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of the encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(8), 3470-3472.

131. Furukawa, I.; Kurooka, S.; Arisue, K.; Kohda, K.; Hayashi, C. Assays of serum lipase by the "BALB- DTNB method" mechanized for use with discrete and continuous- flow analyzers. *Clin Chem.*, 1982, 28, 110-113.
132. Lombard, S.; Helmy, M.E.; Piéroni, G. Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *Biochem. J.*, 2001, 358, 773-781.
133. Kurooka, S.; Kitamura, T. Properties of serum lipase in patients with various pancreatic diseases. Analysis by a new serum lipase assay method (the BALB-DTNB method) in combination with gelfiltration and iso-electrofocusing techniques. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1978, 84, 1459-66.
134. BioVision lipase assay.
<http://www.biovision.com/manuals/K723.pdf?osCsid=v2nosiqm7mav4kvsmmmt6qvfm83> (Accessed December 16, 2011).
135. BioAssay Systems' QuantiChrom™ Lipase Assays.
http://www.bioassaysys.com/file_dir/DLPS.pdf (Accessed December 16, 2011).
136. Randox.
<http://www.randox.com/brochures/PDF%20Brochure/LT092.pdf> (Accessed December 16, 2011).

137. Panteghini, M.; Bonora, R.; Pagani, F. Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Ann. Clin. Biochem.*, 2001, 38, 365-70
138. Van Handel, E.; Zilversmit, D. Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. *J. Lab. Clin. Med.*, 1957, 50, 152-157.
139. Saiki, T.; Takagi, Y.; Suzuki, T.; Narasaki, T.; Tamura, G.; Arima, K. Studies on the lipoprotein lipases of microorganisms. Part IV Purification and general properties of the lipoprotein lipase produced by *Mucor javanicus*. *Agr. Bio. Chem. (Tokyo)*, 1969, 33(3), 414-423.
140. Yamaguchi, T.; Muroya, N.; Isobe, M.; Sugiura, M. Production and properties of lipase from a newly isolated chromobacterium. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, 1973, 37(5), 999-1005.
141. Sigma test assay kit.
<http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/enzymatic-assay-of-lipase-typeiii.html> (Accessed December 16, 2011).
142. BioVision lipase assay. <http://www.biovision.com/manuals/K722-100.pdf> (Accessed December 16, 2011).

143. Walde, P.; Luisi, P. L. A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 1989, 28, 3353-3360.
144. O'Connor, C.; Cleverly, D.R. Fourier-transform infrared assay of bile salt-stimulated lipase activity in reversed micelles. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1994, 61 (3), 209-214.
145. Snabe, T.; Petersen, S. Application of infrared spectroscopy (attenuated total reflection) for monitoring enzymatic activity on substrate films. *J. Biotechnol.*, 2002, 95, 145-155.
146. Wolf, C.; Sagaert, L.; Bereziat, G. A sensitive assay of phospholipase using the fluorescent probe 2-parinaroyllecithin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 99, 275-283.
147. McGuire, S.O.; James-Kracke, M.R.; Sun, G.Y.; Fritsche, K.L. An esterification protocol for cis-parinaric acid-determined lipid peroxidation in immune cells. *Lipids*, 1997, 32(2), 219-226.
148. Hingh, Y.; Meyer, J.; Fischer, J.; Berger, R.; Smeitink, J.; Op den Kamp, J.A.F. Direct measurement of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biochemistry*, 1995, 34(39), 12755-12760.
149. Beisson, F.; Ferté, N.; Nari, J.; Noat, G.; Arondel, V.; Verger, R. Use of naturally fluorescent triacylglycerols from *Parinari glaberrima* to detect low lipase activities from *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Lipid Res.*, 1999, 40(12), 2313-2321

150. Dooijewaard-Kloosterziel, A.M.P.; Wuuters, J.T.M. Some properties of the lipase of *Geotrichum candidum* evaluated by a fluorimetric assay technique. *J. Appl. Bacteriol.*, 1976, 40(3), 293-297.
151. Roy, R.N. Fluorimetric assay of the activity of extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia marcescens*, *J. Appl. Bacteriol.*, 1980, 49(2), 265-271.
152. Matthey, M.; Morgan, D. Secretion of extracellular lipases by *Candida lipolytica*. *Biochem. Soc. Trans.*, 1978, 6, 426-428.
153. Severson, D.L.; Fletcher, T.; Groves, G.; Hurley, B.; Sloan, S. Hydrolysis of triolein, cholesterol oleate, and 4-methylumbelliferyl stearate by acid and neutral ester hydrolases (lipases) from pigeon adipose tissue: effect of cAMP-dependent protein kinase. *Can. J. Biochem.*, 1981, 59(6), 418-429.
154. Monpezat, T.L.; Jeso, B.; Butour, J.L.; Chavant, L.; Sancholle, M. A fluorimetric method for measuring lipase activity based on umbelliferyl ester. *Lipids*, 1990, 25(10), 661-664
155. Nègre, A.; Salvayre, R.S.; Dagan, A.; Gatt, S. New fluorometric assay of lysosomal acid lipase and its application to the diagnosis of Wolman and cholesteryl ester storage diseases. *Clin. Chim. Acta*, 1985, 149, 81-88.

156. Nègre, A.; Salvayre, R.S.; Dagan, A.; Gatt, S. Pyrenemethyl laurate, a new fluorescent substrate for continuous kinetic determination of lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1989, 1006(1), 84-88.
157. Duque, M.; Graupner, M.; Stütz, H.; Wicher, I.; Zechner, R.; Paltauf, F.; Hermetter, A. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J. Lipid Res.*, 1996, 37, 868-876.
158. Hermetter, A. Triglyceride lipase assays based on a novel fluorogenic alkyl diacyl glycerol substrate. In: *Methods in Molecular Biology*; Doolittle, M.; Reue, K; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 19-29.
159. Gilham, D.; Lehner, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 2005, 36, 139-147.
160. Del Prado, M.; Hernández-Montes, H.; Villalpando, S. Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Arch Med Res.*, 1994, 25(3), 331-335.
161. Jacks, T.J.; Kircher, W. Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. *Anal. Biochem.*, 1964, 21(2), 279-285 and *Lipases Determination Current Analytical Chemistry*, 2012, Vol. 8, No. 3 406

162. <http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M0612> (Accessed December 16, 2011). MarkerGene™ Fluorescent Lipase Assay Kit
163. <http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M1214> (Accessed December 16, 2011). MarkerGene™ Long Wavelength Fluorescent Lipase Assay Kit.
164. Jarvis, G.M.; Thiele, J.H. Qualitative rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 1997, 29(1), 41-47.
165. Jette, J.-F.; Ziomek, E. Determination of lipase activity by a rhodamine- triglyceride-agarose assay. *Anal. Biochem.*, 1994, 219, 256- 260.
166. Kouker, G.; Jaeger, K.-E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53(1), 211-213.
167. Bumba, J.; Janíček, A. Turbidimetric determination of serum lipase. *Vnitr Lek.*, 1974, 20(11), 1116-20.
168. Neumann, U.; Knitach, K.W.; Ziegenhorn, J.; Roder, A.; Zwez, W.; Krämer, W. Reagens zur lipasebestimmung und verfahren zu seiner herstellung. German Patent 2 904 305, February 5, 1979.
169. Neumann, U.; Kaspar, P.; Ziegenhorn, J. Lipases, turbidimetric method. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4; Bergmeyer, H.U.; Ed.; Weinheim, Verlag Chemie, 1984; pp. 26-34.

170. Prencipe, L. Turbidimetric kinetic method for rapid determination of pancreatic lipase activity in the serum. *Quad Sclavo Diagn.*, 1974, 10(3), 437-46.
171. Puukka; Puukka, R. Automation of the turbidimetric determination of serum lipase. *Ann. Clin. Biochem.*, 1978, 15(6), 326-330.
172. Shihabi, Z.K.; Bishop, C. Simplified turbidimetric assay for lipase activity. *Clin. Chem.*, 1971, 17(12), 1150-1153
173. Tietz, N.; Shuey, D.; Astles, J. Turbidimetric measurement of lipase activity-problems and some solutions. *Clin. Chem.*, 1987, 33(9), 1624-1629.
174. Vogel, W.C.; Zieve, L. A rapid and sensitive turbidimetric method for serum lipase based upon differences between the lipases of normal and pancreatitis serum. *Clin. Chem.*, 1963, 9, 168-181.
175. Arzoglou, P.L.; Ferard, G.; Khalfa, F.; Metais, P. Conditions for assay of pancreatic lipase from human plasma using a nephelometric technique *Clin. Chim. Acta*, 1982, 119(3), 329-335.
176. Zinterhofer, L.; Wardlaw, S.; Jatlow, P.; Seligson, D. Nephelometric determination of pancreatic enzymes II. Lipase. *Clin. Chim. Acta*, 1973, 44(2), 173-178.

177. Kannisto, H.; Lalla, M.; Lukkari, E. Characterization and elimination of a factor in serum that interferes with turbidimetry and nephelometry of lipase. *Clin. Chem.*, 1983, 29, 96-99.
178. Bourguet, N.; Torr  ton, J-P.; Galy, O.; Arondel, V.; Goutx, M. Application of a specific and sensitive radiometric assay for microbial lipase activities in marine water samples from the lagoon of Noum  a. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(12), 7395-7400.
179. Briquet-Laugier, V.; Ben-Zeev, O.; Doolittle, M.H. Determining lipoprotein lipase and hepatic lipase activity using radiolabeled substrates, In: *Methods in Molecular Biology*; Doolittle, M.; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 81-94.
180. Kropp, J.; Knapp, R. (Jr.); Weyenberg, A.; McPherson, D.; Ambrose, K.; Callahan, A.; Bergmann, K.; Biersack, H-J. Evaluation of pancreatic lipase activity by simple urine analysis after oral administration of a new iodine-131-labeled triglyceride. *Eur. J. Nuc. Med.*, 1994, 21, 1227-1230.
181. Whayne, T. Jr.; Morelli, J. Assays for lipoprotein lipase: Comparison of radiolabeled vs. titration method and of triolein vs. intralipid substrate. *Biochemical Medicine*, 1977, 17(3), 248-257.
182. Huang, J.; Roheim, P.S.; Sloop, C.H.; Wong, L. A sensitive, inexpensive method for determining minute quantities of lipase activity. *Anal. Biochem.*, 1989, 179, 413-417.

183. Aoubala, M.; Douchet, I.; Bezzine, S.; Hirn, M.; Verger, R.; De Caro, A. Immunological techniques for the characterization of digestive lipases. In: *Methods Enzymol.* Dennis, E.; Rubin, B.; Eds.; Academic Press, INC, San Diego, 1997; pp. 126-149.
184. De Caro, A.; Bezzine, S.; Lopez, V.; Aoubala, M.; Daniel, C.; Verger, R.; Carrière, F. Immunological characterization of digestive lipases. In: *Methods Mol. Biol.*; Doolittle, M.; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999, pp. 239-256
185. Doolittle, M.; Ben-Zeev, O. Immunodetection of lipoprotein lipase: antibody production, immunoprecipitation, and western blotting techniques. In: *Methods Mol. Biol.*; Doolittle, M. Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 215-237.
186. Grenner, G.; Deutch, G.; Schmidtberger, R.; Dati, F. A highly sensitive immunoassay for the determination of pancreatic lipase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1982, 20, 515-519.
187. Hayakawa, T.; Kondo, T.; Shibata, T.; Kitagawa, M.; Ono, H.; Sakai, Y.; Kiriya, S. Enzyme immunoassay for serum pancreatic lipase in the diagnosis of pancreatic diseases. *Gastroenterol. Jpn.*, 1989, 24, 556-560.
188. Ingen, H.E.; Sanders, G.T.B. Clinical evaluation of a pancreatic lipase mass concentration assay. *Clin. Chem.*, 1992, 38, 2310-2313.

189. Kawamura, M.; Gotoda, T.; Mori, N.; Shimano, H.; Kozaki, K.; Harada, K.; Shimada, M.; Inaba, T.; Watanabe, Y.; Yazaki, Y. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assays for lipoprotein lipase with newly developed antibodies. *J. Lipid Res.*, 1994, 35, 1688-1697.
190. Moller-Petersen, J.; Klaerke, M.; Dati, F.; Toth, T. Immunochemical qualitative latex agglutination test for pancreatic lipase in serum evaluated for use in diagnosis of acute pancreatitis, *Clin. Chem.*, 1985, 31, 1207-1210.
191. Singhbist, A.; Maheux, P.; Azhar, S.; Chen, Y.D.I.; Komaromy, M.C.; Kraemer, F.B. Generation of antibodies against a human lipoprotein lipase fusion protein. *Life Sci.*, 1995, 57, 1709-1715.
192. Sternby, B.; Nilsson, A.; Melin, T.; Borgström, B. Pancreatic lipolytic enzymes in human duodenal contents: radioimmunoassay compared with enzyme activity. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1991, 26, 859-866.
193. Sternby, B.; Akerstrom, B. Immunoreactive pancreatic colipase, lipase and phospholipase A2 in human plasma and urine from healthy individuals. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 789, 164-169.
194. Uhl, W.; Malfertheiner, P.; Drosdat, H.; Martini, M.; Buechler, M. Determination of pancreatic lipase by immunoactivation technology: a rapid test system with high sensitivity and specificity. *Int. J. Pancreatol.*, 1992, 12, 253-261.

195. Vannier, C.; Deslex, S.; Pradines-Figueres, A.; Ailhaud, G. Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. I. Characterization of a specific antibody and relationships between the intracellular and secreted pools of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 13199-13205.
196. Vilella, E.; Joven, J. In vitro measurement of lipoprotein and hepatic lipases. *Methods Mol. Biol.*, 1998, 110, 243-251.
197. Zsigmond, E.; Lo, J.; Smith, L.; Chan, L. Immunochemical quantitation of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol.*, 1996, 263, 327-333.
198. ABO-Biotechnology. <http://www.medicinekit.com/medicinekit/human%20ELISA%20reagent%20case/Human-Lipase-ELISA-Kit/> (Accessed December 16, 2011).
199. ALPCO Immunoassays. <http://www.alpco.com/pdfs/47/47-LPLHU-E01.pdf> (Accessed December 16, 2011).
200. Antibodies. <http://www.antibodiesonline.com/kit/627172/Hormone+Sensitive+Lipase+ELISA/> (Accessed December 16, 2011).
201. Alpha Diagnostic Int. <http://www.4adi.com/objects/catalog/product/extras/1310.pdf> (Accessed December 16, 2011).

202. Bio-Equip. <http://www.bioequip.cn/enshow1equip.asp?equipid=4140&division=2535> (Accessed December 16, 2011).
203. DRG International Inc. <http://www.drg-international.com/ifu/eia-4459.pdf> (Accessed December 16, 2011).
204. MyBioSource.
http://www.mybiosource.com/datasheet.php?products_id=720741
(Accessed December 16, 2011).
205. Iizumi, T.; Nakamura, K.; Fukase, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, 1253-1258.
206. Ballot, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Lipase assay in duodenal juice using a conductimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 1984, 143(2), 109-114.
207. Ballot, C.; Saisonou-Manika, B.; Mealet, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Conductimetric measurements of enzyme activities. *Anal. Chim. Acta*, 1984, 163, 305-308.
208. Ballot, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Conductimetric assay of a bacterial lipase using triacetin as a substrate. *Anal. Letters*, 1982, 15(B13), 1119-1129.

209. Fuchs, B.; Süß, R.; Teuber, K.; Eibisch, M.; Schiller, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 2754-2774. 407 *Current Analytical Chemistry*, 2012, Vol. 8, No. 3
210. Ruiz-Larrea, M.F.; Galdiz-Valdovinos, B.; Rodríguez-Fernández, C. Kinetic study of hepatic triglyceride lipase from rat liver soluble fraction. *Enzyme*, 1982, 27, 215-219.
211. Kulkarni, N.; Gadre, R.V. Simple gas chromatography method for lipase assay. *Biotechnol. Techniques*, 1998, 12(8), 627-628.
212. Ergun, F.; André, G. Simple high performance liquid chromatography methods for monitoring lipase reactions. *Lipids*, 1989, 24(1), 76-78.
213. Mingarro, I.; González-Navarro, H.; Braco, L. Direct HPLC monitoring of lipase activity in reverse micellar media. *J. Liquid Chromatogr.*, 1995, 18(2), 235-244.
214. Hao, G., Yang, L., Mazsaroff, I., Lin, M. Quantitative determination of lipase activity by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, 2007, 18, 1579-1581.
215. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by McNaught, A. D.; Wilkinson, A.; Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

216. Minakshi; Pundir, C.S. Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. *Sensors and Actuators B*, 2008, 133, 251-255.
217. Narang, J.; Minakshi; Bhambi, M.; Pundir, C.S. Fabrication of an amperometric triglyceride biosensor based on PVC Membrane. *Anal. Letters*, 2009, 43(1), 1-11.
218. Pundir, C. S.; Singh, B.S.; Narang, J. Construction of an amperometric triglyceride biosensor using PVA membrane bound enzymes. *Clin. Biochem.*, 2010, 43(4-5), 467-472.
219. Narang, J.; Minakshi; Bhambi, M.; Pundir, C.S. Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane. *Int. J. Biol. Macromolecules*, 2010, 47(5), 691-695.
220. Narang, J.; Pundir, C.S. Construction of a triglyceride amperometric biosensor based on chitosan-ZnO nanocomposite film. *Int. J. Biol. Macromolecules*, 2011, 49, 707-715.
221. Mirsky, V.M.; Krause, C.; Heckmann, K.D. Capacitive sensor for lipolytic enzymes. *Thin Solid Films*, 1996, 284-285, 939-941.
222. QSENSE. <http://www.q-sense.com/proteins> (accessed December 16, 2011).

223. Arima, K., Ichibangase, T., Ohba, Y., Kishikawa, N., Kuroda, N. Simple and rapid chemiluminescence assay for lipase activity in pharmaceutical preparations using proenhancer substrate. *Bunseki Kagaku*, 2006, 55, 307-311.
224. Margarita Stoytcheva, Roumen Zlatev, Zdravka Velkova and Gisela Montero, *Anal. Methods*, 2013, 5, 3811, Nanoparticle modified QCM-based sensor for lipase activity determination
225. Margarita Stoytcheva, Roumen Zlatev, Samuel Behar and Jean-Jacques Bois, *Anal. Methods*, 2013, 5, 1370, A spectrophotometric lipase assay based on substrate–nanoparticle assembly degradation
226. F. Hasan, A.A. Shah, S. Javed, A. Hameed, *Enzymes used in detergents: lipases. Afr. J. Biotechnol.* 9(31), (2010), 4836–4844
227. M. Stoytcheva, G. Montero, L. Toscano, V. Gochev and B. Valdez, in *Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies*, ed. M. Stoytcheva and G. Montero, InTech, Croatia, 2011, pp. 398.
228. Berhanu Andualema and Amare Gessesse, *Biotechnology*, 2012, Volume 11, Issue: 3, Page 100-118, Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review, DOI: 10.3923/biotech.2012.100.118
229. Casas-Godoy L., Gasteazoro F., Duquesne S., Bordes F., Marty A., Sandoval G. (2018) Lipases: An Overview. In: Sandoval G. (eds) *Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology*, vol 1835.

Humana Press, New York, NY, ISBN: 978-1-4939-8672-9, Print ISBN 978-1-4939-8671-2.

230. B. D. Ribeiro, A. M. Castro, M. A. Z. Coelho, and D. M. G. Freire, *Enzyme Research*, 2011, Article ID 615803, 16 pages, Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/615803>
231. R. Sharma, Y. Chisti, U. C. Banerjee, *Biotechnology Advances* 19 (2001) 627 – 662, Production, purification, characterization and applications of lipases
232. M. Raqba, T. Dahass, A. Kafih, O. Dahass, A. Bouchador, M. Belgharza, S. I. Alaoui, A. Stila, N. Filali, R. Rochdi and M. A. El Belghiti, *Der Pharmacia Lettre*, 2016, 8(7), 7-10, Study of the electric resistivity of Vegetable oil: Argan, Avocado and Olive, <http://scholarsresearchlibrary.com>
233. <http://www.iue.tuwien.ac.at/phd/filipovic/node26.html>
234. H. Adelman, B. P. Binks and R. Mezzenga, *Langmuir*, 2012, 28, 1694-1697. Oil powders and gels from particle-stabilized emulsions
235. M. Stoytcheva, R. Zlatev, G. Montero, B. Valdez, IMRC2014-S2B-P001, Volume 1763 (Symposium 2B – Materials for Biosensor Applications) 2015, Nanoparticles Amplified QCM Sensor for Enzyme Activity Evaluation

236. M. Stoytcheva, R. Zlatev, S. Cosnier, M. Arredondo, B. Valdez, Biosensors and Bioelectronics 41 (2013) 862–866 Analytical Methods, High sensitive trypsin activity evaluation applying a nanostructured QCM-sensor, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.039>
237. M. Stoytcheva, G. Montero, R. Zlatev, J. A. León, V. Gochev, Current Analytical Chemistry, 2012, 8, 400-407, Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review.
238. Q. Mohsen, Sahar A. Fadl-allah, Nahla S. El-Shenawy³, Int. J. Electrochem. Sci., 7 (2012) 4510 – 4527, Electrochemical Impedance Spectroscopy Study of the Adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin at Biomimetic Calcium – Phosphate Coating.
239. E. Delgado, W. Aperador, A. Hernández, Int. J. Electrochem. Sci., 10 (2015) 8190 – 8199, Impedance Spectroscopy as a Tool for the Diagnosis of the State of Vegetable Oils Used as Lubricants.
240. <https://tehtab.ru/Guide/GuidePhysics/ElectricityAndMagnetism/DEPLiquids/DielectricConstantOfLiquids/>
241. G. R. Paranjpe, P. Y. Deshpande, Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A, June 1935, Volume 1, Issue 12, 880–886, Dielectric properties of some vegetable oils.
242. <https://www.electronics-tutorials.ws/ac/circuits/ac-capacitance.html>

243. <https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>
244. A. Lasia, *Electrochemical Impedance Spectroscopy and Its Applications in Modern Aspects of Electrochemistry*, B. E. Conway, J. Bockris, and R.E. White, Edts., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, Vol. 32, p. 143-248.
245. J. R. Macdonald, *Annals of Biomedical Engineering*, 1992, Vol. 20, pp. 289-305, Impedance Spectroscopy.
246. Mark E. Orazem, Bernard Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, Second Edition, 2017, Print ISBN: 9781118527399, Online ISBN:9781119363682, DOI:10.1002/9781119363682, John Wiley & Sons, Inc.
247. C. Gabrielli, *Identification of Electrochemical Processes by Frequency Response Analysis*, Technical Report No 004/83, Solartron, Issue 3, Hampshire, March 1998.
248. A. Thomas, *Fats and Fatty Oils*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
249. Rukiye Boran, Aysel Ugur, *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 40(4): 229-241, Partial purification and characterization of the organic solvent-tolerant lipase produced by *Pseudomonas fluorescens* RB02-3 isolated from milk, DOI: 10.1080/10826068.2010.488929

250. Hector Nolasco, Francisco Moyano-Lopez, Fernando Vega-Villasante, *Fish Physiol Biochem*, 37(1): 43-52, Partial characterization of pyloric-duodenal lipase of gilthead seabream (*Sparus aurata*), DOI 10.1007/s10695-010-9414-7
251. 43. P. Pinsirodom and K. Parkin, in *Handbook of food analytical chemistry, water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates*, ed. R. E. Wrolstad, E. A. Decker, S. J. Schwartz and P. Sporns, Wiley, New Jersey, 2005, ch. C3, pp. 370–383.
252. Norbert W. Tietz' and Denise F. Shuey, *Clin. Chem.* 39/5, (1993), 746.
253. Jee, JP., Nam, SH., Park, Y. et al. *Arch. Pharm. Res.* (2012) 35: 1107-1114, Simplified analysis of lipoprotein lipase activity: Evaluation of lipasemic activity of low molecular weight heparin in rats, <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0619-4>
254. Pliego J, Mateos JC, Rodriguez J, Valero F, Baeza M, Femat R, Camacho R, Sandoval G, Herrera-López EJ., *Sensors (Basel)*, 2015, 15(2): 2798-2811, Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using p-nitrophenyl butyrate, doi: 10.3390/s150202798.
255. G. Valincius, I. Ignatjev, G. Niaura, M. Kažemėkaitė, Z. Talaikytė, V. Razumas, A. Svendsen, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 8, 2632-2636, Electrochemical Method for the Detection of Lipase Activity, DOI: 10.1021/ac048230+

Anexos

Anexo I: Pancreatitis y Cáncer pancreático

¿Qué es la pancreatitis?

La pancreatitis es la inflamación y la autodigestión del páncreas. La autodigestión describe un proceso en el que las enzimas pancreáticas destruyen su propio tejido y causan la inflamación del mismo. La inflamación puede ser súbita (aguda) o progresiva (crónica). La pancreatitis aguda generalmente implica un solo "ataque", después del cual el páncreas regresa a su estado normal. La pancreatitis aguda severa puede comprometer la vida del paciente. En la pancreatitis crónica, se produce un daño permanente del páncreas y de su función, lo que suele conducir a la fibrosis (cicatrización).

¿Cómo se diagnostica la pancreatitis?

Además del examen físico y la historia médica completa, los procedimientos de diagnóstico para la pancreatitis pueden incluir los siguientes:

- Rayos X de abdomen - un examen diagnóstico que utiliza rayos invisibles de energía electromagnética para producir imágenes de los tejidos internos, los huesos y los órganos en una placa.
- Exámenes de sangre.
- Ecografía (También llamada sonografía.) - una técnica de diagnóstico de imágenes que usa ondas sonoras de alta frecuencia para crear una imagen de los órganos internos. Las ecografías se usan para visualizar los órganos internos del abdomen como hígado, bazo y riñones, y para evaluar el flujo sanguíneo de varios vasos.
- Colangiopancreatografía endoscópica retrógrada (su sigla en inglés es ERCP) - un procedimiento que le permite al médico diagnosticar y tratar problemas del hígado, la vesícula biliar, los conductos biliares y el páncreas. El procedimiento combina rayos X y el uso de un endoscopio, un tubo con luz, largo y flexible. El endoscopio se introduce por la boca y la garganta del paciente, y luego a través del esófago, el estómago y el duodeno. El médico

puede examinar el interior de estos órganos y detectar cualquier anomalía. Luego se pasa un tubo a través del endoscopio y se inyecta un medio de contraste que permite que los órganos internos aparezcan en una placa de rayos X.

- *Tomografía computarizada (También llamada escáner CT o CAT.) - este procedimiento de diagnóstico por imagen utiliza una combinación de tecnologías de rayos X y computadoras para obtener imágenes transversales (a menudo llamadas "rebanadas") del cuerpo, tanto horizontales como verticales. Una CT muestra imágenes detalladas de cualquier parte del cuerpo, incluidos los huesos, los músculos, la grasa y los órganos. La CT muestra más detalles que los rayos X regulares.*
- *Electrocardiograma (su sigla en inglés es ECG o EKG) - un examen que registra la actividad eléctrica del corazón, muestra los ritmos anormales (arritmias o disritmias) y detecta el daño del músculo cardíaco.*

¿Qué es el cáncer pancreático?

El cáncer de páncreas ocupa el cuarto lugar entre los tipos más comunes de cáncer que afectan a hombres y mujeres. Según la Sociedad Americana de Cáncer, se estimaba que habría 37.680 nuevos casos de cáncer de páncreas en 2015 y se esperaban 34.290 muertes. El cáncer de páncreas ocurre cuando las células malignas crecen fuera de control.

¿Cómo se diagnostica el cáncer pancreático?

Además de la historia médica y el examen médico completo, los procedimientos para el diagnóstico pueden incluir:

- *ultrasonido (También llamado sonografía.) - una técnica de diagnóstico por imágenes que utiliza ondas de sonido de alta frecuencia para crear una imagen de los órganos internos. Los ultrasonidos se utilizan para visualizar los órganos internos del abdomen, como hígado, bazo y riñones y para evaluar la corriente sanguínea a través de los diversos vasos sanguíneos. El ultrasonido se puede realizar usando un dispositivo externo o interno.*

- Escaneado de tomografía computarizada (escaneado de TC o TAC) - un procedimiento de diagnóstico por imágenes que utiliza una combinación de rayos X y tecnología de computación para producir imágenes de secciones (a menudo llamadas cortes), horizontales y verticales del cuerpo. El escaneado de TC muestra imágenes detalladas de cualquier parte del cuerpo, incluidos los huesos, músculos, grasa y órganos. Los escaneados de TC son más detallados que los rayos X generales.
- Imágenes de resonancia magnética (IRM) - un procedimiento para el diagnóstico que utiliza una combinación de imanes grandes, radiofrecuencias y una computadora para producir imágenes detalladas de órganos y estructuras dentro del cuerpo.
- Colangiopancreatografía endoscópica retrógrada (CPER) - procedimiento que permite al médico diagnosticar y tratar problemas de hígado, vesícula, conductos biliares y páncreas. El procedimiento combina los rayos X y el uso de un endoscopio: un tubo largo y flexible que lleva una luz. La extensión se guía a través de la boca y la garganta del paciente, luego a través del esófago, el estómago y el duodeno. El médico puede examinar el interior de estos órganos y detectar cualquier anomalía. Luego se pasa un tubo a través de la extensión y se inyecta una sustancia de colorante la cual permitirá que los órganos aparezcan en una placa de rayos X.
- colangiografía transhepática percutánea (CTP) - se introduce una aguja a través de la piel y en el hígado donde se deposita el colorante (contraste) y las estructuras de los conductos biliares pueden visualizarse a través de los rayos X.
- biopsia de páncreas
- análisis de sangre especiales
- Tomografía por emisión de positrones (PET, por su sigla en inglés) - tipo de procedimiento de medicina nuclear. Esto significa que durante el procedimiento se utiliza una pequeña cantidad de sustancia radioactiva llamada radionúclido (radiofármaco o trazador radioactivo) para ayudar en el examen del tejido en estudio. Específicamente, los estudios con tomografías PET evalúan el metabolismo de un órgano o tejido en particular, de manera que se evalúa la información de la fisiología (funcionamiento) y

anatomía (estructura) del órgano o tejido, así como sus propiedades bioquímicas. Por ello, las tomografías PET pueden detectar cambios bioquímicos en un órgano o tejido que pueden identificar el comienzo de un proceso patológico antes de que puedan observarse los cambios anatómicos relacionados con la enfermedad con otros procedimientos con imágenes, como por ejemplo, la tomografía computarizada (CT, por su sigla en inglés) o la resonancia magnética (MRI, por su sigla en inglés)

<https://www.quimica.es/enciclopedia/Pancreatitis.html>

<https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas/estadisticas>

Anexo II: Simbología y abreviaturas empleadas

°C	Grado Celsius
μA	Microamperios
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μS	Micro siemens
AgCl	Cloruro de plata
Au	Oro
C₆H₁₂	Ciclohexano
CA	Corriente alterna
CHCl₃	Cloroformo
cm	Centímetro
Cu	Cobre
EIS	Espectroscopía de impedancia electroquímica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Fe₂O₃	Óxido de hierro
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Hz	Hercio
K₂HPO₄	Fosfato dipotásico
KH₂PO₄	Fosfato monopotásico
L	Litro
LC	Cristal líquido
LiClO₄	Perclorato de litio
LOD	Límite de detección
MHz	Megahercio
mL	Mililitro

Simbología y abreviaturas empleadas (cont.)

mm	Milímetro
mm²	Milímetro cuadrado
mm³	Milímetro cúbico
mV	Milivolt
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
NP	Nanopartículas
PA	Pancreatitis Aguda
PCB	Placa de circuito impreso
pH	Potencial de hidrogeno
Pt	Platino
PVC	Policloruro de vinilo
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
QCM-D	Microbalanza de cuarzo con disipación
rpm	Revolución por minuto
s	Segundo
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SiO₂	Óxido de silicio
U	Unidad de actividad enzimática
mm	Milímetro
mm²	Milímetro cuadrado
mm³	Milímetro cúbico
mV	Milivolt

Anexo III: Poster AMIDIQ 2016



SENSOR DESECHABLE NANOESTRUCTURADO PARA LA MEDICIÓN RÁPIDA DE LA ACTIVIDAD DE LAS HIDROLASAS

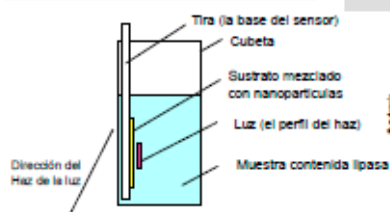
Ana Luisa Reyes, Roumen Zlatev, Margarita Stoycheva

Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, 21280 Mexicali, Baja California, MEXICO
roumen@uabc.edu.mx

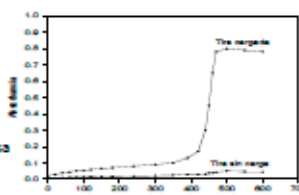
RESUMEN

Las hidrolizas pertenecen a un grupo de enzimas que catalizan reacciones bioquímicas de hidrólisis de sustratos de una manera muy específica y por eso están entre las enzimas las más aplicadas en la biotecnología, incluyendo la producción de biodiesel. La cualificación precisa y rápida de las actividades de las enzimas del grupo de proteasas aplicados en los procesos biotecnológicos tiene gran importancia para mantener constante la eficiencia de los procesos, generando un gran interés en el desarrollo de herramientas de determinación de la actividad enzimática. En este trabajo se proponen sensores nanoestructurados desechables de bajo costo para la medición rápida y sencilla de la actividad de dos enzimas del grupo de las hidrolizas: lipasa y tripsina. La determinación se basa en la medición espectrofotométrica del aumento de la turbidez de la solución que contiene la enzima, causada por el desprendimiento de las nanopartículas incluidas en la película del sustrato enzimático depositada sobre una tira de plástico, durante el proceso de degradación del sustrato. Los sensores fueron caracterizados analíticamente determinando las condiciones óptimas de medición y construyendo las curvas de calibración. Los sensores construidos a la base del enfoque propuesto con sus ventajas: simplicidad, rapidez y bajo costo superan las desventajas de los sensores y métodos existentes y también son aplicables a otros tipos de enzimas.

CONSTRUCCIÓN DEL SENSOR

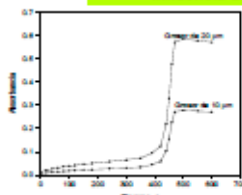


Principio del método: registro de la curva cinética en coordenadas absorbancia de la luz / tiempo durante la degradación enzimática del sustrato



Curva cinética de la degradación del sustrato por la enzima lipasa.
Longitud de la onda: 380 nm
Nanopartículas de carbono: tamaño 80-100 nm
Sustrato: aceite de oliva

Influencia del grosor de la capa del sustrato de aceite de oliva sobre la sensibilidad

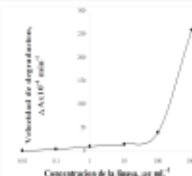


Curvas cinéticas de la degradación enzimática del sustrato por la lipasa. Cuantificación de la luz / tiempo. Sustrato: aceite de oliva cargado con nanopartículas de grafeno, tamaño de 80-120 nm

Tira No	Absorbancia	A - $A_{premedida}$	Error %	Tira No	Absorbancia	A - $A_{premedida}$	Error %	Tira No	Pendiente	P - $P_{premedida}$	Error %	Tira No	Pendiente	P - $P_{premedida}$	Error %
1	0.58	-0.005	0.85	4	0.57	-0.01	1.70	2	0.00557	-0.00013	-2.28	4	0.00573	0.00003	0.52
2	0.56	-0.023	4.27	5	0.61	0.025	4.27	3	0.00562	0.00008	-1.40	5	0.00561	-	-1.57
3	0.60	0.015	2.56	6	0.59	0.005	0.85	3	0.00576	0.00008	1.40	6	0.00590	0.00020	3.50

TABLA 1. Precisión de los resultados de cuantificación de la actividad de la lipasa por el máximo de la absorbancia

TABLA 2. Precisión de los resultados de cuantificación de la actividad de la lipasa por el pendiente de la curva cinética



Curva de calibración para la cuantificación de la actividad de la lipasa construida a la base de curvas cinéticas

Tira No	Absorbancia	A - $A_{premedida}$	Error %	Tira No	Absorbancia	A - $A_{premedida}$	Error %	Tira No	Pendiente	P - $P_{premedida}$	Error %	Tira No	Pendiente	P - $P_{premedida}$	Error %
1	0.358	-0.0006	0.17	4	0.357	-0.0016	0.45	1	0.105	0.003	2.94	4	0.101	-0.001	-0.98
2	0.357	0.0016	0.45	5	0.360	0.0014	0.39	2	0.106	0.004	3.92	5	0.103	0.001	0.98
3	0.361	0.0024	0.67	6	0.359	0.0004	0.11	3	0.099	-0.003	-2.94	6	0.098	0.004	3.92

TABLA 3. Precisión de los resultados de cuantificación de la actividad de la lipasa midiendo la absorbancia del máximo

TABLA 4. Precisión de los resultados de cuantificación de la actividad de la lipasa midiendo la pendiente de la curva

CONCLUSIONES

- Se propuso un nuevo enfoque basado sobre el método espectrofotométrico para la medición de la actividad de las enzimas del grupo de las hidrolizas – lipasa y tripsina. El método está basado en la medición del cambio de la absorbancia de la solución que contiene la enzima, causada por la degradación enzimática de una capa de sustrato cargada con nanopartículas.
- La utilización de nanopartículas aumenta la sensibilidad del ensayo, además, el método propuesto presenta la ventaja de ser más rápido que las técnicas comunes para la medición de la actividad de las lipasas.

Anexo IV: Artículo en revista JCR con FI: 1.369

Int. J. Electrochem. Sci., 14 (2019) xx – yy,

**International Journal of
ELECTROCHEMICAL
SCIENCE**

www.electrochemsci.org

Conductometric Method for Rapid Lipase Activity Quantification

Ana Luisa Reyes¹, Roumen Zlatev^{1,*}, Margarita Stoytcheva¹, Carlos Villa¹, Rafael Villa¹, Benjamin Valdez¹, Gisela Montero¹, Lydia Toscano², Lorenzo Alejandro Sánchez¹, Ricardo Salinas¹, Leslie Hernández¹

¹ Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Blvd. Benito Juárez s/n, 21280 Mexicali B.C., México

² Instituto Tecnológico de Mexicali, Tecnológico Nacional de México, Mexicali B. C., México

*E-mail: roumen@uabc.edu.mx

Received: 1 xxx 2019 / Accepted: 1 xxx 2019 / Published: 1 xxx 2019

A new approach for lipase activity quantification was proposed and applied in a simple, rapid and cost effective conductometric method based on conductance change registration along the time during the enzymatic degradation of a thin nanocomposite substrate layer (SiO₂ nanoparticles loaded olive oil) deposited onto conductometric electrodes. The sensitive layer thickness diminution along the time causes its conductance augmentation proportional to the lipase activity. The proposed method was characterized in terms of lipase activity linear quantification range and LOD, quantification time, precision and reproducibility at optimized pH 8. The relative error was found to be from 3.6% to 1.2% at the linear quantification range from 1.1×10^{-2} to 1.17 U mL^{-1} respectively with a LOD of $0.8 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$. Finally, the method was validated with spiked samples applying spectrophotometric method as reference.

Keywords: Conductometry, Lipase activity quantification, nanocomposite

1. INTRODUCTION

The conductometry is a very simple but powerful tool for solutions properties characterization widely applied in a great variety of scientific and industrial areas. Conductometric methods for organic and inorganic solutions properties studies, measurement of dissolved organic and inorganic substances concentration, complexes formation and properties studies, etc. were reported till now [1-7].

The lipases (EC 3.1.1.3 triacylglycerol acylhydrolase) are enzymes naturally produced in animal pancreas degrading the fats and oils in fatty acids and glycerol [8-10] in the digestion processes. These unique specific properties make the lipases unreplaceable catalysts for some

industries mostly those involved in detergent, leather, textile food, cosmetics, paper, and biofuel production [11–19]. The lipase activity is crucial for the industrial processes stability maintenance, as well as it serves as indicator of some pancreatic diseases in the medicine [20]. That is why many types of sensors and methods for lipase activity quantification have been developed until now based on measuring techniques as spectrophotometry, titrimetry, radioactive assay, quartz crystal microbalance, immunoassay, conductometry, chromatography, etc. [21–36].

The conductometric methods for lipase activity quantification are based on the sample conductance change measurement resulting from the enzyme catalyzed reactions. In general they can be classed as reactions: releasing strong electrolytes, releasing feebly ionizing ampholytes and releasing nonelectrolytes. For example the conductometric method reported by Ballot [32–34] is based on a reaction of the second type: enzymatic degradation of high conductive lipase substrate such as triacetin resulting in solution conductance decrease. The common drawbacks of all the mentioned methods for lipase activity determination including the conductometric ones are: complicated and long procedures (hours) requiring skilled personal, expensive reagents and sophisticated laboratory equipment.

The industrial processes control however requires simple, rapid, precise and cost effective evaluations of relative high enzymatic activities and this paper is dedicated to the development and characterization of a conductometric method suitable for industrial applications. It is based on the conductometric determination of the rate of lipase catalyzed hydrolysis of a substrate sensitive layer deposited as a thin sensitive layer with thickness d on a conductometric electrode with surface area A . The sensitive layer enzymatic decomposition by the lipase causes its thickness diminution along the time proportional to the lipase enzymatic activity resulting in corresponding resistance R diminution (conductivity G increase) according to the Equation 1:

$$R = 1/G = \rho d/A \quad (1)$$

where ρ is the resistivity of the sensitive layer material.

The high resistivity of the olive oil which is a lipase substrate ($\rho = 10^7$ Ohms m [37]) makes it a suitable substance to be used as conductometric electrode modifier serving as a sensitive layer. On the other hand the olive oil loading by nanoparticles made by a material possessing higher electrical resistivity such as SiO_2 (possessing resistivity $\rho = 10^{17}$ Ohms m [38]), a very high resistance nanocomposite will be formed. In this case a network of silica percolating throughout the oil matrix is formed possessing a good adhesion with solid surfaces, as reported by Adelman [39]. Similar type of nanocomposite was already applied as a sensitive layer by the authors earlier in a photometric and a QCM method for lipase activity determination [22–24, 27] and it was proved that its decomposition rate is proportional to the lipase activity rate.

Thus, the method subject of the present work is based on the two following assumptions: i) the high resistance of the sensitive layer (olive oil/ SiO_2 nanocomposite) will determine the total resistance of the interface: conductometric electrodes modified by nanocomposite/lipase containing buffer solution. Taking into account the Equation (1) it is clear that the interface conductance (resistance) will be proportional to the sensitive layer thickness which in turn depends along the time on the lipase

activity. ii) the enzymatic degradation of the olive oil which sticks together the SiO_2 nanoparticles in the nanocomposite will provoke their release from the sensitive layer into the lipase containing solution. As a result much larger sensitive layer resistance change will occur compared with bare olive oil only application as a sensitive layer due to the nanoparticles higher resistivity. This will result in sensitivity amplification of the proposed conductometric method.

Based on these assumptions the development of a rapid, simple, precise and cost effective method for lipase activity quantification is the purpose of the present work together with its characterization in terms of linear quantification range, LOD, precision, response time and reproducibility. The conductometric response is registered during the enzymatic degradation by the lipase of a thin nanocomposite sensitive layer deposited on the conductometric electrodes.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents

Lipase, (25.1 U mg^{-1}) from Sigma was used for the stock lipase solution preparation employed in all the experiments. A phosphate buffer (pH 8) was prepared by appropriate amounts of analytical grade K_2HPO_4 and KH_2PO_4 dissolution in deionized water produced by a MilliQ Water Purification System (Millipore). The buffer was applied for the lipase standard solutions preparation according to the producer recommendations as well as supporting solution for the lipase samples. Commercial extra virgin olive oil and SiO_2 nanoparticles modified by single layer organic chains giving them super-hydrophobic and oleophilic properties (99.8%, 10–20 nm, SkySpring Nanomaterials, Inc., USA, product # 6864HN) were used for nanocomposite preparation. CHCl_3 of PA purity (Fermont, USA) was applied as nanocomposite solvent facilitating its deposition on the electrode surface.

2.2. Instrumentation

USB powered potentiostat Model CompactStat.h 20250, Ivium Technologies, Netherlands running IviumStat software in mode AC Detection and YSI 3200 Conductivity Instrument were employed for the basic and the additional conductometric measurements respectively. Two electrodes configuration of the potentiostat was used employing two identical modified by nanocomposite conductometric electrodes. All the measurements were carried out in Model K0264 (EG&G PARC) micro cell electrode stand equipped with a magnetic stirrer. The IviumStat software running in AC Detection mode produces the following output data along the time: electrode/solution interface resistance R and capacitance C as well as the AC current phase angle shift φ resulted from constant AC voltage amplitude and frequency application. The registered resistance R vs. the time plots were converted in conductance G vs. the time ones applying the equation $G = 1/R$. In fact, these plots represent kinetic curves of the substrate layer hydrolysis catalyzed by the lipase.

Model UP 800 Ultrasonic Processor, ChromTech was used for the nanocomposite CHCl_3 solution preparation. Scanning Electron Microscope, model JEOL JSM-840 was employed for characterization of the modified by nanocomposite electrode surface.

2.3. Conductometric electrode construction

The common and very low cost PCB technology was applied for 1 x 5 cm stick conductometric electrodes elaboration employing 0.9 mm thick FR-4 PCB fiberglass substrate laminated by 35 μm thick Cu foil. The conductometric electrode cross section is presented in Figure 1. The Cu foil (2) laminated on the epoxy support (1) served as electric conductor between the electrode terminal (2) and the nanocomposite sensitive layer (4) deposited on a Cu disk 8 mm in diameter with a surface area of 0.5 cm^2 . The electrode terminal and the Cu disc are situated at the two ends of the stick conductometric electrode. The rest of the Cu foil between them was insulated by the common epoxy solder mask (3) used in the PBC technology.

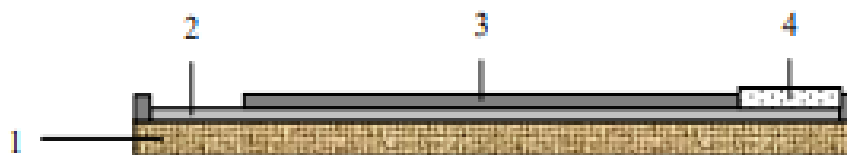


Figure 1. Cross section of the nanocomposite modified stick conductometric electrode with: 1 – sensor epoxy support, 2- Cu laminate, 3- epoxy insulation layer, 4 – nanocomposite sensitive layer

2.4. Sensitive layer composition and preparation

In spite that triolein is the most specific lipase substrate [27] a commercial extra virgin olive oil was used as lipase substrate in all the experiments because of its low cost, moreover it contain up to 30% triolein [35]. The procedure proposed by the authors earlier [22-24, 27] for a nanocomposite preparation and deposition was modified and applied in this work too. The nanoparticles interaction with the olive oil explained by Adelman [39] allowed uniform nanocomposite layer formation on the Cu electrode due to the gelation causing a good adhesion to solid surfaces. The nanocomposite composition: the olive oil to the SiO_2 nanoparticles ratio was optimized experimentally to obtain the shortest response time and the highest sensitivity (see the Results and Discussion section).

The conductometric electrodes were modified by deposition from 5 to 10 μL of the nanocomposite chloroform solution on the Cu disc electrode surface by a micropipette. After the organic solvent evaporation a silk-wise white sensitive layer appears. The electrode can be easily regenerated by a new sensitive layer deposition after the lipase activity measurement. For this purpose the sensitive layer is removed by a soft serviette and a new one is deposited by a micropipette. The reproducibility was found to be satisfactory (see the Result section) which allows a great number of pre-deposited electrodes to be prepared and used as disposable due to their extremely low cost.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Nanocomposite sensitive layer characterization by SEM

The modified by nanocomposite electrode surface was characterized by scanning electron microscopy (SEM), see Figure 2. The organic solvent evaporation resulted in SiO_2 nanoparticles agglomeration and clusters formation of about 400 nm in diameter. The satisfactory reproducibility of the results obtained by a great number of electrodes application at same conditions (see Results and Discussion section) showed that the clusters formation does not affect the analytical characteristics.



Figure 2. SEM micrograph of the nanocomposite sensitive layer (20% SiO_2 nanoparticles in olive oil) deposited on the conductometric electrode surface. Scale: 1000 nm cm^{-1} .

3.2. Typical sensor response and the nanoparticles influence

The main assumption this work is based on is that the enzymatic degradation rate of a thin nanocomposite sensitive layer deposited on the conductometric electrode depends on the measured lipase activity. The sensitive layer enzymatic degradation results in its thickness decrease which can be evaluated measuring the sensitive layer resistance (conductance) according to Eqn. 1. Thus, the conductance can serve as a measure of the lipase activity. The sensitive layer enzymatic degradation continues up to the saturation of the lipase active centers which determine the wave shaped curve in coordinates: resistance / conductance vs. the time, presented in Figures 3 and 4 respectively.

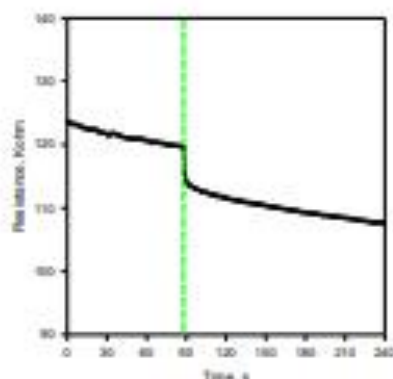


Figure 3. Resistance of the interface: nanocomposite modified conductometric electrode/lipase containing solution possessing activity of 0.03 U mL^{-1} . Stirring rate = 300 rpm, AC voltage amplitude = 50 mV at 120 Hz, pH = 8 (phosphate buffer)

That is why the wave height corresponds to the maximal sensitive layer thickness change able to be provoked by the measured lipase activity. Thus, the wave height can serve as a quantitative measure of the lipase activity as shown below in sub-section 3.4 and this parameter was chosen as analytical response. The slope of the curve can also serve as analytical response but the wave height was preferred because of the better precision and reproducibility of the results.

The second assumption this work is based on is that the SiO_2 nanoparticles loaded olive oil (a nanocomposite) application as a sensitive layer will cause sensor response amplification due to the higher resistivity of the SiO_2 (possessing $\rho = 10^{17}$ Ohms m) compared with that of the bare olive oil ($\rho = 10^7$ Ohms m) used as lipase substrate. This assumption was experimentally tested applying two types of experiments: static and dynamic and the results are presented below.

For the purpose of the static experiments (without lipase addition) the conductivity of 5 mL deionized water containing 120 μL phosphate buffer with pH 8 was measured employing: a) a couple of 8 mm in diameter bare Cu conductometric electrodes, b) the same electrodes modified by 50 μm thick olive oil and c) the same electrodes modified by 50 μm thick nanocomposite (olive oil + 20% SiO_2 NPs). The average of 10 measurements obtained by the YSI Model 3200 Conductivity Instrument application at 1 cm distance between the electrodes are presented in Table 1.

Table 1. Electrode modification influence on the resistance of the electrode/phosphate buffer interface

Cu electrode modifier	No modified	50 μm thick olive oil	50 μm thick nanocomposite
Conductance, $\mu\text{S cm}^{-1}$	1139	17.6	7.7

The sensitive layers thicknesses values presented in the table were calculated taking into account the disk electrode diameter (8 mm), the volume (5 μL) of the deposited chloroform solution as well as the nanocomposite to chloroform volumes ratio. As seen from the table the electrodes modification with olive oil causes 64.7 times conductivity decrease compared with that obtained by the bare metal electrodes while the electrodes modification by nanocomposite (20% wt. SiO_2 NPs) provokes 147.9 times conductivity decrease respectively. Thus the static results confirmed the viability of the second assumption this work is based on.

The nanoparticles influence on the sensor analytical response was also verified by a dynamic experiment: resistance (conductance) vs. the time curves were registered in presence of lipase applying conductometric electrodes modified by bare olive oil and by nanocomposite at same lipase activity and same experimental conditions. The Conductance vs. the Time curves registered by the Ivium CompactStat potentiostat in AC detection mode are presented in Figure 4. The enzymatic degradation of the olive oil sticking together the high resistivity SiO_2 nanoparticles in the nanocomposite mass causes the sensitive layer total thickness diminution accompanied with nanoparticles release into the lipase containing solution. As a result the wave height of curve B registered with nanocomposite application as electrodes modifier was found to be 1.86 times higher than those in curve A obtained at same lipase activity but with bare olive oil application as electrode modifier, both possessing the same initial thickness of 50 μm . Figure 4 presenting the dynamic experiments results also proves the viability of the second assumption this work is based on.

The shape of the conductance vs. the time curves presented in Figure 4 is similar to those registered by the QCM method application [22] reported by the authors earlier also based on enzymatic degradation of nanocomposite sensitive layer, which however was deposited on a QCM crystal. The QCM curve in coordinates: frequency vs. the time is related to the sensitive layer mass (thickness) decrease resulted from its enzymatic degradation. The similarity of the curves shape of the two methods proves the main assumption this work is based on: the enzymatic degradation of the nanocomposite layer by the lipase causes its thickness diminution proportional to the lipase activity.

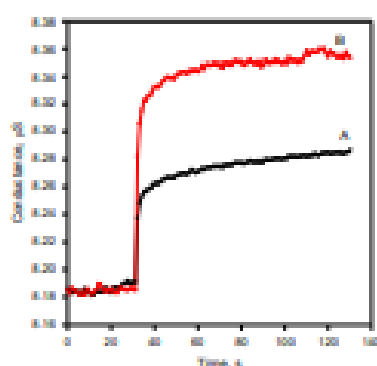


Figure 4. Sensor responses to 0.06 U mL^{-1} lipase at 300 rpm, AC voltage amplitude = 50 mV at 120 Hz. 50 μm bare olive oil (curve A) and 50 μm nanocomposite (curve B) sensitivity layers

3.3. Response amplitude optimization

3.3.1. Stirrer rate and pH optimization

The stirring of the lipase containing buffer solution intensify the contact of the lipase with the nanocomposite sensitive layer deposited on the conductometric electrode and serving as substrate.

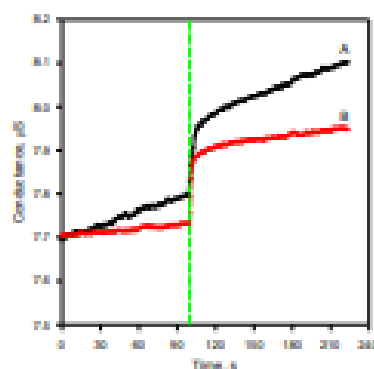


Figure 5. A typical conductance vs. time response to 0.08 U mg^{-1} lipase at pH = 8. Stirring rates: 600 and 300 rpm for curves A and B respectively; AC voltage amplitude = 50 mV at 120 Hz.

Conductance vs. the time curves were registered in the stirring rates range from 100 to 1000 rpm to evaluate its influence. The results showed that the nanocomposite layer gradually loses its stability at more than 500 rpm causing a negative slope appearance of the entire curve due to a slow mechanical degradation of the nanocomposite sensitive layer (see curve A in Figure 5). To obtain stable results in all the experiments were applied a stirrer rate of 300 rpm.

According to the data already reported in the literature about the maximal lipase enzymatic activity the optimal pH value lies in the range between 7 and 10 [40, 41]. As mentioned above all the experiments were carried out at pH 8 (phosphate buffer) allowing the maximal enzymatic activity according to the enzyme producer recommendation.

3.3.2. Sensitive layer thickness optimisation

The sensitive layer thickness was optimized by registering conductance vs. the time curves for same lipase activity at same AC voltage amplitude and frequency but different nanocomposite layer thickness: 50 and 100 μm . For this purpose volumes of 5 and 10 μL of the dissolved in chloroform nanocomposite were deposited on the electrode surface yielding layers thicknesses of about 50 and 100 μm correspondingly after the organic solvent evaporation. Volumes less than 5 μL were not enough to cover the entire electrode surface, while ones larger than 10 μL formed irregular layer thickness.

The sensor responses obtained with 50 and 100 μm sensitive nanocomposite layer thicknesses are shown in Figure 6. The resistance of a thicker sensitive layer is higher and as a result lower initial conductance was registered. The enzymatic degradation of a thicker sensitive layer causes smaller sensor response (wave heights) resulting in a lower sensitivity compared with the thinner one. That is why the minimal possible thickness of 50 μm was chosen for the nanocomposite layer thicknesses.

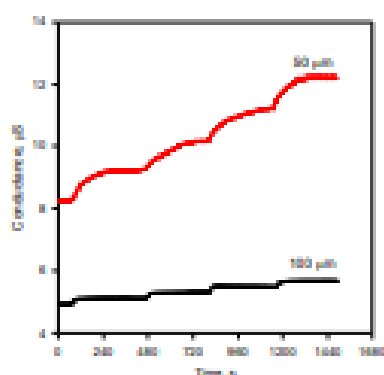


Figure 6. Sensor response of 0.4 U mL⁻¹ lipase at 50 and 100 μm nanocomposite layer thicknesses. Stirrer rate = 300 rpm; A.C. voltage amplitude = 50 mv at 120 Hz frequency

All the reported conductometric methods for lipase activity quantification as those developed by Ballot [32-34] are based on substrate solution conductance measurements during its enzymatic

degradation by the lipase. That is why they suffer from the main problem of the conventional conductometry: strong dependence on the temperature. The achievement of reliable results applying the Ballot conductometric method requires very precise temperature maintenance within 0.01°C because of the temperature influence on the conductometric results of about $2\% \text{ deg}^{-1}$ [32]. In contrast no temperature control was applied to achieve the precision of the method subject of the present work presented in subsection 3.4.4.

3.4. Analytical characterization of the conductometric method

3.4.1. Linear quantification range determination and calibration plot building

The linear quantification range was experimentally determined to be from 1.1×10^{-2} to 1.17 U mL^{-1} lipase activity at the optimized experimental condition: 300 rpm, 50 mV/120 Hz, 50 μm thick nanocomposite layer, pH 8. The calibration plot is presented in Figure 7 right, described by the equation: $G = -0.026 + 2.31\text{LA}$, where G is the registered conductance change and LA is the lipase activity in U mL^{-1} . The corresponding conductance vs. the time curves used for the calibration plot building are presented in Figure 7 left and Figure 9.

The precision of the determination within the linear quantification range was found to be in the range from 3.86 to 1.22 % for the lipase activity range from 1.1×10^{-2} to $1.17 \text{ U.S.P. mL}^{-1}$ respectively. The reported linear quantification range of the Ballot conductometric method [32] lies in the range from 20 to 600 U in 4 mL sample volume (equal to 3 decades), while the sensor subject of the present work reaches 17 decades of lipase's activity within a maximal relative error of 3.86%.

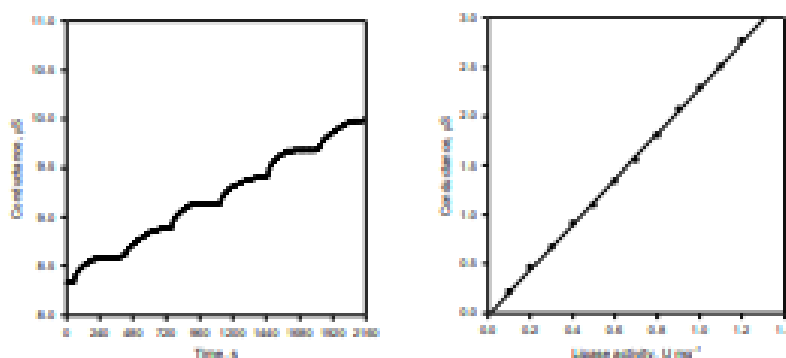


Figure 7. Conductance vs. the time curve for successive addition of 0.2 U mg^{-1} of lipase (left) and the corresponding calibration plot, see Figure 9 also. Nanocomposite sensitive layer thicknesses = 50 μm , stirrer rate = 300 rpm, A.C. voltage amplitude = 50 mv at 120 Hz

3.4.2. LOD evaluation

The limit of the detection (LOD) of the proposed method was determined applying the 3σ rule and it was found to be $0.8 \times 10^{-3} \text{ U mg}^{-1}$ at optimized nanocomposite ingredients ratio (20% SiO_2 nanoparticles in olive oil) and experimental conditions: layer thickness of 50 μm , 300 rpm stirring rate, 50 mV amplitude of the AC voltage at 120 Hz frequency and pH 8. This LOD value was calculated as

average of 10 determinations after successive appropriate dilution to obtain the minimal lipase activity able to be detected. The curve presented in Figure 8 is the raw one without any smoothing.

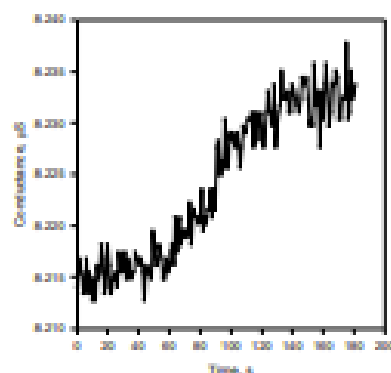


Figure 8. Conductance vs. the time raw unsmoothed curve for $0.8 \times 10^{-3} \text{ U mg}^{-1}$ lipase activity at 300 rpm stirring rate, 50 mV / 120 Hz A.C voltage and 50 μm nanocomposite layer thickness

The LOD of the proposed method comparison with those obtained by the standardized titrimetric method using olive oil as substrate [42] the colorimetric assay using the copper soap as substrate [43] and the conductometric assay using triacine as substrate [32] is presented in Table 2.

Table 2. Limit of detection (LOD) of the key methods applied for lipase activity determination

Method/sensor for lipase activity quantification	LOD (U mg^{-1})	Reference
Titrimetric assay using olive oil as substrate	10^{-2}	[42]
Colorimetric assay using the copper soap as substrate	10^{-1}	[42]
Conductometric assay using triacine as substrate	10^{-2}	[32]
Conductometric assay using nanocomposite sensitive layer	0.8×10^{-3}	This paper

3.4.3. Response time evaluation

As expected it was found that the sensor response time depends on the measured lipase activity: higher the activity, shorter the response time, due to the increased rate of the enzymatic reaction (see Figure 9). The time to reach the wave plateau in the conductance vs. the time curve was evaluated for lipase activities within the linear quantification range using the results taken from Figures 7 and 9 (see Table 3).

Table 3. Response time as a function of the determined lipase activity

Lipase activity, U mL^{-1}	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^{-1}$	$6 \cdot 10^{-1}$	1.5
Response time, s	86	57.2	39.1	17.8	6.5

The average response time for the lowest measurable lipase activity was found to be 86 s while for the highest activity it was as short as 6.5 s. According to the reported data the shortest response

time achieved by the conductometric method application for lipase activity determination developed by Ballot [32-34] was as long as 30 minutes.

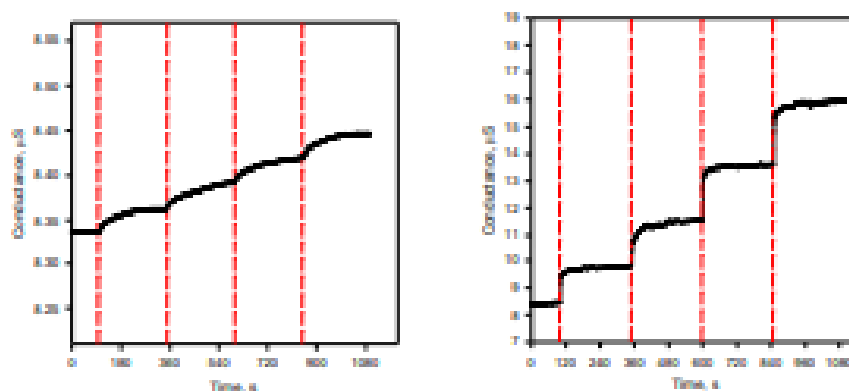


Figure 9. Sensor responses for the lowest (left) and the highest (right) lipase activities within the linear quantification range. Stirring rate = 300 rpm, A.C. voltage amplitude = 50 mV at 120 Hz and nanocomposite layer thickness = 50 μm

3.4.4. Reproducibility evaluation

The low cost of the conductometric stick electrodes allows their use as disposable and regenerable as well. In both cases the reproducibility of the modified electrode surface area is very important to obtain reliable and reproducible results. The reproducibility was evaluated by series of 10 electrodes modified by 50 μm nanocomposite containing 20% nanoparticles.

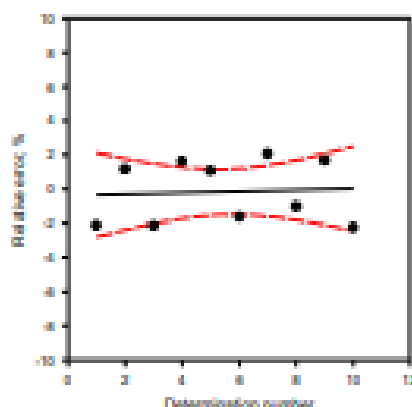


Figure 10. Relative errors of the determinations of $1 \times 10^{-1} \text{ U mg}^{-1}$ using 10 nanocomposite modified stick electrodes (50 μm) at 300 rpm, 50 mV A.C. voltage amplitude at 120 Hz

A lipase solution with 10^{-1} U mg^{-1} activity (a value in the middle of the linear quantification range) was determined by each of these 10 electrodes and the relative deviations in respect to the average are presented in Figure 10. As seen in the figure the maximal deviation of 2.3% not exceeded the relative error corresponding to the applied lipase activity.

3.5. Application to real samples and results validation

Validation experiments were performed applying the titrimetric method described by Pinsirodom [42] possessing same LOD as the method subject of the present work. Five spiked samples in lipase free milk whey from the cheese production industry were prepared by addition of lipase solutions to achieve final activity of 0.5 U mL^{-1} . Each of the 5 samples was determined 3 times and the average results were taken to be presented as A_1 to A_5 in Table 4. As seen there the relative error belongs to the relative error range corresponding to the linear quantification range confirming this way the satisfactory accuracy of the proposed method subject of the present work.

Table 4. Results obtained for 0.5 U mL^{-1} lipase by titrimetry [42] and the proposed method

Measurement number	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	Average
Titrimetric method, U mL^{-1}	0.52	0.52	0.53	0.52	0.51	0.520
Reported sensor, U mL^{-1}	0.50	0.51	0.51	0.50	0.49	0.502
Relative error %	-	-	-	-	-	1.8

4. CONCLUSION

A new approach for the lipase activity quantification was proposed and applied in a simple, rapid and cost effective conductometric method suitable for industrial application. The method is based on the conductance change registration along the time during the enzymatic degradation of a thin nanocomposite (SiO_2 nanoparticles loaded olive oil) substrate layer deposited on the conductometric electrodes. The sensitive layer thickness diminution along the time causes its conductance augmentation proportional to the lipase activity.

The proposed method was characterized in terms of lipase activity linear quantification range and LOD, precision, quantification time and reproducibility at optimized pH = 8. The relative error was found to be from 3.6% to 1.2% at the linear quantification range of 1.1×10^{-2} to 1.17 U mL^{-1} respectively with a LOD of 0.8×10^{-3} U mL^{-1} . Finally, the method was validated with spiked samples applying a spectrophotometric method as reference one.

References

1. A. Samadi-Maybodi and K. Abolfazli, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 4 (2009) 684.
2. S. Ahmadzadeh, A. Kassim, M.Y. Abdollahi and G.H. Rounaghi, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011) 4749.

3. W.M. Yousef, K. Alenezi, A.H. Naggar, T.M. Hassan, S.Z. Bortata and O.A. Farghaly, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 12 (2017) 1146.
4. A. Prkić, V. Sokol and P. Bošković, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8 (2013) 4886.
5. P. Bošković, V. Sokol, A. Prkić and J. Giljanović, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 9 (2014) 3574.
6. B.S. Al-Farhan, A.H. Naggar and O.A. Farghaly, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 13 (2018) 8275.
7. A.A. Al-Rashdi, A.H. Naggar, O.A. Farghaly, H.A. Mauof and A.A. Ekshiba, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 14 (2019) 1132.
8. H. Brockerhoff and R. Jensen, *Lipolytic Enzymes*, Elsevier Science, (2014), Saint Luis, US.
9. P. Desnuelle, in P. Boyer (Ed.), *The Enzymes*, 3rd Ed., Academic Press, NY, US, 7 (1972) 575.
10. R. Sharma, Y. Chisti, U. C. Banerjee, *Biotechnology Advances* 19 (2001) 627
11. F. Hasan, A.A. Shah and A. Hameed, *Enzyme Microb. Technol.*, 39 (2006) 235.
12. R. Aravindan, P. Anbumathi and T. Viruthagiri, *Indian J. Biotechnol.*, 6 (2007) 141.
13. F. Hasan, A.A. Shah, S. Javed and A. Hameed, *Afr. J. Biotechnol.* 9 (2010) 4836.
14. A. Houde, A. Kademi and D. Leblanc, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118 (2004) 155.
15. M. Stoytcheva, G. Montero, L. Toscano, V. Gochev and B. Valdez in M. Stoytcheva and G. Montero (Eds.), *Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies*, InTech, Croatia (2011) 398.
16. B. Andualema and A. Gessesse, *Biotechnology*, 11 (2012) 100.
17. L. Casas-Godoy, F. Gasteazoro, S. Duquesne, F. Bordes, A. Marty and G. Sandoval in G. Sandoval (Ed.) *Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, NY, US. (2018) 1835.
18. B.D. Ribeiro, A.M. Castro, M.A.Z. Coelho and D.M.G. Freire, *Enzyme Research*, Article ID 615803 (2011) 16 pages, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/615803>
19. R. Sharma, Y. Chisti and U.C. Banerjee, *Biotechnology Advances*, 19 (2001) 627.
20. W. Norbert Tietz and D.F. Shuey, *Clin. Chem.*, 39 (1993) 746.
21. R.G. Jensen, *Lipids*, 18 (1983) 650.
22. M. Stoytcheva, R. Zlatev, S. Behar and J.J. Bois, *Anal. Methods*, 5 (2013) 1370.
23. M. Stoytcheva, R. Zlatev, G. Montero and B. Valdez, IMRC2014-S2B-P001, Volume 1763 (2015) (Symposium 2B – Materials for Biosensor Applications).
24. M. Stoytcheva, R. Zlatev, S. Cosnier, M. Arredondo and B. Valdez, *Biosens. Bioelectron.*, 41 (2013) 862.
25. F. Beisson, A. Tiss, C. Riviere and R. Verger, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102 (2000) 133.
26. J.P. Jee, S.H. Nam, Y. Park, H.J. Lee, Y. Park, H.J. Maeng and C.K. Kim, *Arch. Pharm. Res.* 35 (2012) 1107.
27. M. Stoytcheva, G. Montero, R. Zlatev, J. A. León and V. Gochev, *Current Anal. Chem.*, 8 (2012) 400.
28. C.A. Thomson, P.J. Delaquis and G. Mazza, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 39 (1999) 165.
29. R. Gupta, P. Rath, N. Gupta and S. Bradoo, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37 (2003) 63.
30. F. Hasan, A. Shah and A. Hameed, *Biotechnol. Adv.*, 27 (2009) 782.
31. J. Pliego, J.C. Mateos, J. Rodriguez, F. Valero, M. Baeza, R. Femat, R. Camacho, G. Sandoval and E.J. Herrera-López, *Sensors (Basel)*, 15 (2015) 2798.
32. C. Ballot, G. Favre-Bonvin, J.M. Wallach, *Clin. Chim. Acta*, 143 (1984) 109.
33. C. Ballot, B. Saisonou-Manika, C. Mealet, G. Favre-Bonvin and J.M. Wallach, *Anal. Chim. Acta*, 163 (1984) 305.
34. C. Ballot, G. Favre-Bonvin and J.M. Wallach, *Anal. Letters*, 15 (1982) 1119.
35. A. Thomas, *Fats and Fatty Oils*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, (2002) Weinheim, Germany.
36. M. Stoytcheva, G. Montero, R. Zlatev, J.Á. León and V. Gochev, *Current Anal. Chem.*, 8 (2012) 400.
37. M. Raqba, T. Dahass, A. Kafih, O. Dahass, A. Bouchador, M. Belgharza, S.I. Alaoui, A. Stila, N. Filali, R. Rochdi and M.A. El Belghiti, *Der Pharmacia Lettre*, 8 (2016) 7.

- 38. <http://www.iue.tuwien.ac.at/phd/filipovic/node26.html>
- 39. H. Adelman, B.P. Binks and R. Mezzenga, *Langmuir*, 28 (2012) 1694.
- 40. R. Boran, A. Ugur, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 40 (2010) 229.
- 41. H. Nolasco, F. Moyano-Lopez and F. Vega-Villasante, *Fish Physiol. Biochem.*, 37 (2011) 43.
- 42. P. Pinsirom and K. Parkin in R.E. Wrolstad, E.A. Decker, S.J. Schwartz and P. Sporns (Eds.), *Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*, Wiley, New Jersey, US, (2005) 370.

© 2019 The Authors. Published by ESG (www.electrochemsci.org). This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anexo V: Índice de Figuras

Figuras

<i>Figura 1. Estructura tridimensional de la tripsina y los órganos de su producción</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2. La tripsina es producida por el páncreas en forma de tripsinógeno (enzima inactiva)</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3 La pancreatitis aguda (PA) es la enfermedad pancreática más frecuente en el mundo, además, que en subsecuentes años ha escalado como causa de mortalidad.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 4. Imagen generada por computadora de un tipo de lipasa</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5. Biosensor con construcción convencional. Un biosensor es un dispositivo analítico constituido por un componente biológico de reconocimiento inmovilizado, el cual está comunicado con un sistema de transducción que transforma la señal bioquímica en señal.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 6 Esquema del funcionamiento de un biosensor. La muestra a analizar se pone en contacto con el dispositivo, siendo posible detectar sólo al analito (+) para el que está diseñado el receptor biológico. Cuando tiene lugar la reacción de reconocimiento biológico se producen una serie de cambios físico-químicos detectados por el transductor, que produce una señal cuantificable, directamente proporcional a la concentración del analito.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 7. Los sensores QCM son contruidos con una fina lámina de cristal de cuarzo situado entre dos electrodos</i>	<i>42</i>
<i>Figura 8. El cristal del QCM y el equipo QCM para electrodeposición de la capa sensible</i>	<i>43</i>

Figura 9. Deposición de la capa sensible por adsorción.....	44
Figura 10. Tira desechable que sirve como bio-receptor	47
Figura 11. Espectrofotómetro, sirve como transductor	47
Figura 12. Fotografías de una cubeta nefelométrica	50
Figura 13. Diagrama de un nefelómetro	50
Figura 14. Fundamento de la Conductometría	51
Figura 15. Foto del cristal de cuarzo de 8 MHz usado en la QCM.....	60
Figura 16. La QCM marca CHI 440 con el cristal de 8 MHz	61
Figura 17. Aplicación de cinta fotográfica como capa sensible	63
Figura 18. Construcción de la celda espectrofotométrica	64
Figura 19. La turbidez de la solución contenida la tripsina después de la degradación de la capa sensible	64
Figura 20. Algoritmo para la cuantificación de las muestras artificiales	65
Figura 21. Equipo de medición para el método nefelométrico	66
Figura 22. Nanopartículas caracterizadas por microscopio SEM	67
Figura 23. Preparación del sustrato cargado con nanopartículas de plata.	68
Figura 24. Preparación del pistón hueco	69
Figura 25. Cubeta nefelométrica. Preparación	70
Figura 26. Inserción del pistón en la cubeta nefelométrica	71
Figura 27. Finalización del experimento tras el registro del movimiento del pistón durante 1 minuto	72
Figura 28. Empleo del software IviumStat.....	74
Figura 29. Materiales para la preparación la capa sensible nanoestructurada	75
Figura 30. Preparación la capa sensible nanoestructurada	76
Figura 31. Preparación y caracterización de la capa sensible nanoestructurada	77

Figura 32. Caracterización por SEM	78
Figura 33. Caracterización por microscopio óptico	78
Figura 34. Electrodo preparados aplicando la tecnología de producción de PCBs	79
Figura 35. Algoritmo de medición aplicando la conductometría	81
Figura 36. Construcción del sensor: vista superior (izquierda) y sección transversal (derecha): 1 - sustrato epoxi PCB; 2 - capa de Cu; 3 - capa aislante de epoxi; 4 - capa sensible de nanocompuesto	83
Figura 37. Respuesta del sensor basado sobre la QCM en coordenadas: Frecuencia (Hz) vs. el Tiempo (s)	86
Figura 38. Comparación de las respuestas de sensores con capas sensible de 5 (curva a) y 10 μL (curva b). Concentración de la tripsina: 100 $\mu\text{g/mL}$, pH = 8; 500 rpm; 25°C.	87
Figura 39. Curvas de calibración en presencia (curva b) y ausencia (curva a) de nanopartículas en la capa sensible	88
Figura 40. Absorción de la luz vs. la Longitud de la onda. El pico registrado a 420 nm es específico para las nanopartículas de plata. Curva b: nanopartículas de plata en agua; Curva c: gelatina (0.8%) cargada con nanopartículas de plata. Curva a: gelatina pura sin nanopartículas.	90
Figura 41. Respuesta del sensor espectrofotométrico: absorción de la luz vs. el tiempo	91
Figura 42. El escalón A corresponde a una adición de tripsina de 10 $\mu\text{g/L}$ y el B de 20 $\mu\text{g/L}$ al búfer de fosfato, pH = 8.....	93
Figura 43. El rango lineal de las actividades medibles aplicando el sensor optimizado es desde 10 hasta 500 $\mu\text{g/L}$	93
Figura 44. Rango lineal de las actividades medibles aplicando el sensor optimizado es desde 10 hasta 500 $\mu\text{g/L}$	94
Figura 45. La respuesta del sensor a la bromelaína	95

Figura 46. Curva sin sincronización del movimiento del pistón y la adquisición de datos.....	96
Figura 47. Curva sincronizada en movimiento del pistón y la adquisición de datos	97
Figura 48. Fotografía de la pantalla de la computadora en el momento del registro de una curva no sincronizada	98
Figura 49. Fotografía de los filtros ópticos aplicados.....	99
Figura 50. Curvas de calibración nefelométricas aplicando la pendiente (izquierda) y la altura (derecha) del escalón.....	100
Figura 51. Curvas de calibración en el rango medico de tripsina registradas aplicando diferentes concentraciones de nanopartículas en el nanocompuesto de gelatina cargada con nanopartículas.....	101
Figura 52. Respuestas del sensor (capa sensible cargada con 8% de nanopartículas) a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ tripsina (5 mediciones diferentes)	102
Figura 53. Corte transversal de la barra de electrodo conductométrico modificado con nanocompuesto	104
Figura 54. La resistencia y la capacitancia cambian a lo largo del tiempo de la interfaz: electrodo conductométrico modificado con nanocompuesto/ Solución que contiene lipasa con actividad de 0.03 U mL^{-1} . Velocidad de agitador = 300 rpm, amplitud de voltaje de CA = 50 mV p.p. a 120 Hz, pH = 8	105
Figura 55. Respuestas del sensor a $0.06 \text{ U.S.P. mL}^{-1}$ lipasa a 300 rpm, 120 Hz, 50 mV p.p. Voltaje CA y capa sensible de: $50 \mu\text{m}$ de aceite de oliva simple (curva A) y $50 \mu\text{m}$ de nanocompuesto (curva B)	108
Figura 56. Una respuesta típica de conductancia / tiempo a 0.08 U mg^{-1} lipasa en tampón fosfato con pH = 8. Tasas de agitación: 300 rpm para curva A y 600 rpm para curva B; Amplitud del voltaje de CA = 50 mV a 120 Hz.	110

Figura 57. Respuesta analítica de 0.4 U.S.P. mL ⁻¹ lipasa a 50 y 100 μ m de espesor de capa de nanocompuesto. Velocidad de agitación = 300 rpm; A.C. amplitud de voltaje = 50 mV p.p.at 120 Hz de frecuencia.....	111
Figura 58. Gráfico de calibración correspondiente Curva de la conductancia vs tiempo para la adición sucesiva de 0.2 U.S.P. mg ⁻¹ de lipasa (izquierda). Espesores de capa de nanocompuesto = 2 μ m; velocidad del agitador = 300 rpm; A.C. amplitud de voltaje = 50 mV p.p. ; frecuencia = 1000 Hz.	113
Figura 59. Respuestas analíticas para: izquierda, la actividad lipasa más baja (1.1×10^{-2} U.S.P. mL ⁻¹) y Derecha, la más alta (1.17 U.S.P. mL ⁻¹) dentro del rango de cuantificación lineal a 300 rpm, 50 mV p.p. A.C. amplitud de voltaje con una frecuencia de 120 Hz y un espesor de capa de nanocompuesto de 50 μ m.....	114
Figura 60. Curva de la conductancia vs el tiempo sin suavizar para 0.8×10^{-3} U.S.P. mg ⁻¹ actividad de la lipasa.	114
Figura 61. Errores relativos de las determinaciones de 1×10^{-1} U.S.P. mg ⁻¹ utilizando 10 electrodos de barra conductométricos modificados con nanocompuesto a 300 rpm, 50 mV p.p. A.C. amplitud de voltaje con una frecuencia de 120 Hz y un espesor de capa de nanocompuesto de 50 μ m	116
Figura 62. Micrografía SEM de la superficie del electrodo de nanocompuestos modificados (14% de nanopartículas de SiO ₂ en aceite de oliva)	119
Figura 63. Izquierda: la resistencia (curva A) y la capacitancia (curva B) cambian a lo largo del tiempo en presencia de 2 U.S.P. mL ⁻¹ lipasa. Derecha: Respuesta del sensor a 0.17 U.S.P. mL ⁻¹ lipasa a 300 rpm, 120 Hz y amplitud 50 mV p.p. Curva A: capa sensible a aceite de oliva simple de 49	

μm ; Curva B: capa sensible de nanocompuesto de $49\ \mu\text{m}$ (aceite de oliva cargado con un 14% de nanopartículas de SiO_2)	120
Figura 64. Respuestas del sensor a $0.2\ \text{U.S.P. mL}^{-1}$ lipasa a $120\ \text{Hz}$, amplitud $50\ \text{mV p.p.}$ y espesor de capa sensible de nanocompuestos de $49\ \mu\text{m}$. Velocidad de agitación = $300\ \text{rpm}$ para la curva A y $600\ \text{rpm}$ para la curva B.	122
Figura 65. Respuestas del sensor a $0.07\ \text{U.S.P. mL}^{-1}$ lipasa a $300\ \text{rpm}$, $120\ \text{Hz}$ y amplitud $50\ \text{mV p.p.}$ Espesor de la capa sensible de nanocompuesto = $49\ \mu\text{m}$ (izquierda) y $98\ \mu\text{m}$ (derecha)	124
Figura 66. Izquierda: curva de respuesta del sensor suavizada de $1.4\ 10^{-2}\ \text{U.S.P. Actividad de lipasa mL}^{-1}$ y Derecha: curva sin tratamiento de $1.7\ \text{U.S.P. mL}^{-1}$ ambos registrados a una velocidad de agitador de $300\ \text{rpm}$, $120\ \text{Hz}$ y $50\ \text{mV p.p.}$ de amplitud de voltaje CA. Espesor de la capa sensible de nanocompuestos = $49\ \mu\text{m}$	126
Figura 67. Izquierda: gráfico de calibración; Derecha: curva de respuesta del sensor sin suavizar del $\text{LOD} = 0.8\ 10^{-3}\ \text{U.S.P. mL}^{-1}$ actividad de lipasa registrada a una velocidad de agitación de $300\ \text{rpm}$, $120\ \text{Hz}$, amplitud $50\ \text{mV p.p.}$ y espesor de capa sensible de nanocompuestos de $49\ \mu\text{m}$	127

Anexo VI: Índice de Tablas

Tablas

<i>Tabla 1. Amplitud de la respuesta en función de la longitud de la onda. La respuesta máxima se obtuvo aplicando luz blanca</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 2. Error relativo de las respuestas: pendiente y altura del escalón ..</i>	<i>103</i>
<i>Tabla 3. Influencia de la modificación del electrodo en la resistencia de la interfaz del tampón fosfato / electrodo.....</i>	<i>107</i>
<i>Tabla 4. Tiempo de respuesta en función de la actividad determinada de la lipasa.</i>	<i>115</i>
<i>Tabla 5. Tiempos de respuesta del sensor dentro de la cuantificación lineal</i>	<i>128</i>