



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATORIO DE ELECTROQUÍMICA

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO (TEG)

www.bdigital.ula.ve

**Inmovilización de una proteína
recombinante de *Trypanosoma cruzi*
sobre superficies de grafito modificadas
con películas de quitosano**

Autor:

Aitor Patiño Díaz

Tutoría:

Enrique J. Millán (**Tutor**)

Juan L. Concepción (**Co-tutor**)

www.bdigital.ula.ve

Agradecimientos

- *A la ULA, al LEQ y al LEP por habernos facilitado la planta física, reactivos y equipos empleados en el TEG*
- *A Enrique Millán, Yris Martínez, Ricardo Hernández y Carlos Rojas por todas aquellas discusiones, comentarios y peléas que disfruté a lo largo del TEG*
- *A Cherry Rojas, Andrés Leon y Jesus Chacón por haber compartido mis frustraciones experimentales! (Y otras...)*
- *A los profesores que me formaron, especialmente a Hector Acosta y Gustavo Fermín por haberme mostrado como se come la biología molecular*
- *A mi padre, madres y hermanas por el apoyo a lo largo de la carrera*
- *A Faraday, al que inventó los electrodos de grafito y a Carlos Chagas!*

Resumen

En el presente trabajo especial de grado se evaluó una metodología para el desarrollo de un método de diagnóstico portátil para la enfermedad de Chagas. La tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas-Mazza ha sido muy desatendida mundialmente, es una de las principales causas de cardiopatías y de otras enfermedades del megaesófago y megacolon. A nivel farmacéutico existen pocos tratamientos, siendo la mayoría poco efectivos y presentan efectos nocivos para el paciente, por lo que las estrategias de control epidemiológico dependen de múltiples métodos de diagnóstico y de campañas educativas en las poblaciones afectadas.

En vista de la factibilidad del desarrollo de inmunosensores electroquímicos para el diagnóstico de esta enfermedad, demostrada por Maiz A.R., se continuó con la línea de investigación de los laboratorios de Enzimología de Parásitos (LEP) y Electroquímica (LEQ) para evaluar la respuesta del sistema de transducción biológica del kit ELISA *T. cruzi* del LEP sobre superficies de grafito modificadas con películas de quitosano.

La construcción del inmunosensor consistió en modificar electrodos de grafito con películas de quitosano, generadas mediante técnicas de electrodeposición, sobre los cuales se realizaron ensayos ELISA con sueros confirmados chagásicos por el kit del LEP. El ensayo enzimático se realizó empleando peróxido de hidrógeno y algunos mediadores electroquímicos reportados en la literatura empleando voltametría cíclica como técnica de detección.

El grado de desacetilación (GDA) del quitosano empleado para generar las películas fue caracterizado mediante técnicas espectroscópicas y análisis volumétrico, teniendo un valor promedio de 82,47%. Con esta muestra de quitosano se estandarizó el proceso de deposición de películas mediante técnicas de cronopotenciometría, de los cuales se derivó que el potencial óptimo de deposición es de -1,25 V para las superficies de grafito. Con este potencial se depositaron, sobre electrodos de grafito, películas de quitosano con distintos tiempos de electrólisis cuyas respuestas voltamétricas sugirieron que fueron de distintos espesores.

Mediante las técnicas electroanalíticas empleadas, fue posible evaluar la formación del complejo inmunológico en cada etapa evaluando la respuesta voltamétrica de la hidroquinona, mediador empleado por Maiz A.R. en el primer trabajo de esta línea de investigación. Sin embargo no se pudo observar la actividad enzimática del marcador conjugado a los anticuerpos secundarios (HRP) empleando como mediadores electroquímicos hidroquinona, yoduro de potasio y ácido ferroceno carboxílico en conjunto con el peróxido de hidrógeno, a diferencia de lo que se pudo observar empleando como mediador el catecol cuyos resultados sugieren que es el mediador adecuado para la fabricación del inmunosensor.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Aspectos Generales	1
1.1.1. Enfermedad de Chagas	1
1.1.2. Evolución de la enfermedad de Chagas	2
1.1.3. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	3
1.2. Antecedentes	7
1.2.1. Biosensores electroquímicos	7
1.2.2. Inmunoensayo	9
1.2.3. Inmunosensores electroquímicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	12
1.2.4. Caracterización de las superficies electródicas	15
1.2.5. Deposición de Películas de Quitosano	16
1.3. Hipótesis	18
1.4. Objetivos	18
1.4.1. General	18
1.4.2. Específicos	18
2. Parte Experimental	19
2.1. Laboratorios	19
2.2. Equipos	19
2.3. Materiales y Reactivos	19
2.4. Soluciones	21
2.5. Técnicas Empleadas	21
2.6. Procedimientos Experimentales	25
2.6.1. Preparación de los electrodos	25
2.6.2. Sistema Electroquímico	25
2.6.3. Tratamiento Mecánico de los electrodos de trabajo	25
2.6.4. Tratamiento Electroquímico	26
2.6.5. Voltametrías cíclicas	26
2.6.6. DSC-TG del quitosano	26
2.6.7. Determinación del grado de desacetilación (GDA)	26
2.6.8. Determinación del potencial de deposición de las películas de quitosano	27
2.6.9. Deposición de las películas de quitosano	27
2.6.10. Ensayos Colorimétricos	28
2.6.11. Adsorción de la Pgr24 sobre quitosano	28
2.6.12. Reactivos Inmunológicos	29

2.6.13. Inmunoensayos Electroquímicos	29
3. Caracterización Electroquímica de las Superficies de Carbono	30
3.1. Electrodo de Pasta de Carbono	30
3.2. Electrodo de Grafito	32
3.3. Estudios voltamétricos de mediadores electroquímicos sobre superficies de grafito . .	36
4. Deposición de Películas de Quitosano	40
4.1. Caracterización del Quitosano empleado en este TEG	40
4.1.1. Parámetros físicos: factor de humedad	40
4.1.2. Titulación Conductimétrica	41
4.1.3. Análisis espectroscópico	42
4.2. Caracterización de las Películas de Quitosano	43
4.2.1. Deposición de películas	43
4.2.2. Voltametría Cíclica de los electrodos modificados con quitosano	44
5. Desarrollo y Caracterización del Sistema Inmunosensor	46
5.1. Adsorción PGR24	46
5.2. Inmunoensayo ELISA con detección voltamétrica empleando hidroquinona como mediador	49
5.3. Determinación de la actividad enzimática de la HRP : Controles positivos	52
5.4. Determinación de la actividad enzimática de la HRP : Evaluación de distintos me- diadores	57
6. Conclusiones y Recomendaciones	59
6.1. Conclusiones	59
6.2. Recomendaciones	59
A. Caracterización Electroquímica de los Electrodo de Trabajo	61
B. Caracterización del Quitosano	69
C. Desarrollo del inmunosensor	71

Índice de figuras

1.1.	Imagen de <i>T. cruzi</i> rodeado de glóbulos rojos. (tomado de: http://www.parbio.es/)	1
1.2.	<i>Rhodnius prolixus</i> , el vector principal de transmisión en Venezuela. (tomado de : www.chagas.org.ve)	3
1.3.	Representación gráfica del proceso de reconocimiento y generación de la señal en un inmunosensor	7
1.4.	Esquema de la interacción del mediador químico con el centro redox de la HRP	8
1.5.	Superficies moléculares y representación de las regiones de interacción de un antígeno tipo e IgG humanas. 1.5a Representación de un antígeno, con sus epítopes antigénicos resaltados en rojo. 1.5b Inmunoglobulinas IgG humanas, en gris se representan las cadenas pesadas de los anticuerpos y en rojo las cadenas ligeras. Las regiones variables (de interacción) del IgG se encuentran en la región de unión entre las cadenas ligeras y pesadas mientras que la región constante se dispone en la unión de las dos cadenas pesadas (tomado de www.visualscience.com)	9
1.6.	Representación del proceso de reconocimiento antígeno-anticuerpo típico de los ensayos ELISA.	11
1.7.	Ciclo de reacción del sitio activo de la peroxidasa al catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno. (tomado de [51])	12
1.8.	Estructura química del quitosano	16
1.9.	Reacción de equilibrio para la formación de películas del quitosano	17
2.1.	2.1a Perturbación realizada sobre el electrodo mediante experimentos cronoamperométricos. 2.1b Respuesta típica de una perturbación cronoamperométrica.	22
2.2.	2.2a Perturbación realizada sobre el electrodo mediante experimentos cronopotenciométricos. 2.2b Respuesta típica de una perturbación cronopotenciométrica.	22
2.3.	Experimento voltamétrico y respuesta típica para un sistema de transferencia electrónica rápida. 2.3a Perturbación realizada sobre el electrodo mediante experimentos voltamétricos. 2.3b Respuesta típica de una perturbación voltamétrica.	24
2.4.	Representación de los parámetros de reversibilidad de una respuesta típica para un sistema de transferencia electrónica rápida. ΔE_p es la diferencia de potenciales de oxidación y reducción, I_{pa}/I_{pc} es el cociente de las intensidades de pico para cada pico. 2.4a Representación de algunos parámetros relacionados con la reversibilidad electroquímica mediante experimentos voltamétricos. 2.4b Respuesta voltamétrica para superficies con distintos ordenes de magnitud en ks (tomado de www.ceb.cam.ac.uk).	24

3.1.	Respuesta voltamperométrica de los electrodos de pasta de carbon (grafito/nujoll) en medio buffer PBS ELISA pH 7,4 a 50 mV/s. 3.1a Ventanas de potencial del medio de potencial con distintos electrodos de pasta de carbon (grafito/nujoll), 3.1b Voltametría cíclica de soluciones de hidroquinona 5 mM con distintos electrodos de pasta de carbono (grafito/nujoll)	31
3.2.	Respuesta voltamétrica del electrodo de pasta de carbono (grafito/nujoll/quitosano) en una solución de hidroquinona 5 mM en medio buffer PBS ELISA pH 7,4 0,5 M a 50 mV/s	32
3.3.	Respuesta voltamétrica de la superficie de grafito en una solución de ferrocianuro de potasio 5 mM en nitrato de potasio 0,5 M a 50 mV/s	33
3.4.	Representación de algunos parámetros que permiten evaluar la reversibilidad electroquímica de las superficies de grafito para la respuesta voltamperométrica del ferrocianuro de potasio en nitrato de potasio. 3.4a Diferencia de potenciales de pico a diferentes velocidades de barrido, 3.4b cociente de las intensidades de pico a diferentes velocidades de barrido	33
3.5.	Reducción reversible de quinonas en medio ácido.	34
3.6.	Voltametría Cíclica de la hidroquinona en ácido sulfúrico. 3.6a Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M a 50 mV/s para electrodos activados y sin activar, 3.6b Intensidad de picos en función del cuadrado de la velocidad de barrido para electrodos de grafito activados	35
3.7.	Representación de algunos parámetros que permiten evaluar la reversibilidad electroquímica de las superficies de grafito para la respuesta voltamperométrica de la hidroquinona en ácido sulfúrico. 3.7a Diferencia de potenciales de pico a diferentes velocidades de barrido, 3.7b cociente de las intensidades de pico a diferentes velocidades de barrido	36
3.8.	Esquema del inmunocomplejo de revelado y mecanismo de TE	37
3.9.	3.9a Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS pH 7,4 con electrodos de grafito tratados mecánicamente. 3.9b Diferencia de potenciales de pico para la respuesta de la hidroquinona a diferentes velocidades de barrido	38
3.10.	Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 con peróxido de hidrógeno	38
3.11.	Estudios voltamperométricos de los mediadores electroquímicos empleados en la literatura en PBS pH 7,4 a 50 mV/s.3.11a Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM con electrodos de grafito tratados mecánicamente. 3.11b Respuesta voltamperométrica de una solución de catecol 5 mM con electrodos de grafito tratados mecánicamente. 3.11c Respuesta voltamperométrica de una solución de yoduro de potasio 5 mM con electrodos de grafito tratados mecánicamente. 3.11d Respuesta voltamperométrica de una solución de ácido ferroceno carboxílico 3 mM con electrodos de grafito tratados mecánicamente.	39
4.1.	Termogravimetría acoplada a calorimetría de barrido diferencial (TG-DSC) del quitosano empleado en este trabajo	41
4.2.	Respuesta de la valoración conductimétrica de una solución de quitosano (80 mg) en 50 mL de solución acuosa de HCl 0,036 M mediante NaOH $2 \times 10^{-2} N$	42
4.3.	4.3a FT-IR corregido del quitosano empleado en este trabajo, 4.3b las bandas de absorción empleadas en la determinación del GDA mediante los métodos de Brugnerotto y Baxter	43

4.4. Respuestas cronoamperométricas de soluciones de quitosano 1% en ácido acético 1% con electrodos de grafito activados y sin activar	44
4.5. Respuesta voltamperométrica de una solución de ferrocianuro de potasio 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 a 50 mV/s con electrodos modificados con quitosano. 4.5a Contraste de la respuesta para los electrodos de grafito modificados con películas de quitosano y desnudos, 4.5b Respuesta de los electrodos de grafito modificados con películas de quitosano depositadas por 10, 20 y 30 minutos	45
5.1. Curvas de adsorción del antígeno sobre electrodos modificados con películas de quitosano depositadas por 10 y 30 minutos, determinadas mediante el método de Lowry	47
5.2. Curvas de adsorción del antígeno sobre electrodos modificados con películas de quitosano depositadas por 10, 20 y 30 minutos, determinadas mediante método de Bradford	48
5.3. Retención del antígeno sobre electrodos modificados con películas de quitosano. 5.3a masa del antígeno retenida para cada electrodo modificado en el tiempo, 5.3b % de saturación relativa para cada electrodo modificado en el tiempo	48
5.4. Inmunoensayo: adsorción del antígeno. (5.4a) Esquema inmovilización del antígeno, (5.4b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, Pgr ₂₄ y caseína	49
5.5. Inmunoensayo: etapas de bloqueo y reconocimiento de anticuerpos. (5.5a) Esquema reconocimiento de anticuerpos chagásicos, (5.5b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo (suero:X1,X2)	50
5.6. Inmunoensayo: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.6b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:X1,X2), (5.6a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.	50
5.7. Inmunoensayo: revelado enzimático. (5.7a) Inmunosensor para Chagas sobre carbón vítreo tomado del TEG de Maiz, (5.7b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 suplementada con H ₂ O ₂ para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado.	51
5.8. Representación de la diferencia de potenciales para los dos procesos redox que sufre la hidroquinona en medio PBS ELISA pH 7,4. La etapa 1 corresponde al electrodo desnudo (G), la 2 al electrodo con quitosano (G-Quit), la 3 al electrodo G-Quit-P24, la 4 al G-Quit-P24-Caseína, la 5 al G-Quit-P24/cas-X1 y la 6 al G-Quit-P24/cas-X1-Ab-HRP	52
5.9. Control Positivo: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.9b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:anti-Pgr ₂₄), (5.9a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.	53
5.10. Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.10b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (10 min deposición) y anti IgG conjugados a HRP, (5.10a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (10 min deposición).	54

5.11. Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.11b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (30 min deposición) y anti IgG conjugadas a HRP , (5.11a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (30 min deposición).	54
5.12. Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.12b) Respuesta voltamperométrica de una solución de yoduro de potasio 5 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (30 min deposición) y anti IgG conjugadas a HRP , (5.12a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (30 min deposición).	55
5.13. Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.13b) Respuesta voltamperométrica de una solución de catecol 5 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (30 min deposición) y anti IgG conjugadas a HRP , (5.13a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (30 min deposición).	55
5.14. Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.14b) Respuesta voltamperométrica de una solución de ácido ferroceno carboxílico 3 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (30 min deposición) y anti IgG conjugadas a HRP , (5.14a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (30 min deposición).	56
5.15. Inmunosensor: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.15b) Respuesta voltamperométrica de una solución de yoduro de potasio 5 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:X1), (5.15a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.	57
5.16. Inmunosensor: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.16b) Respuesta voltamperométrica de una solución de ácido ferroceno carboxílico 3 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:X1), (5.16a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.	58
5.17. Inmunosensor: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.17b) Respuesta voltamperométrica de una solución de catecol 5 mM y 10 mM H ₂ O ₂ en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:X1), (5.17a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.	58
C.1. Representación de los cálculos de la adsorción del antígeno sobre electrodos de grafito modificado con películas de quitosano	72

Índice de tablas

2.1. Equipos empleados	19
2.2. Características de los reactivos empleados	20
2.3. Resistencias de los electrodos de pasta de carbono preparados	25
4.1. Recopilación de los valores de GDA obtenidos para el quitosano empleado en este trabajo	42
4.2. Cargas de la electrólisis de la deposición de las películas de quitosano	44
A.1. Parámetros relacionados con la reversibilidad electroquímica del ferrocianuro de potasio sobre electrodos de carbón vítreo desnudos, reportados por Maiz, A.R.	61
A.2. Hoja de cálculos para la reversibilidad electroquímica del sistema ferrocianuro de potasio 5 mM en nitrato de potasio 0,5 M, voltametría cíclica con electrodos de grafito activados	62
A.4. Hoja de cálculos para la reversibilidad electroquímica del sistema hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M, voltametría cíclica con electrodos de grafito activados	63
A.6. Hoja de cálculos para la reversibilidad electroquímica del sistema hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M, voltametría cíclica con electrodos de grafito sin activar	64
A.8. Promedios relacionados con la reversibilidad electroquímica del ferrocianuro de potasio 5 mM en nitrato de potasio 0,5 M sobre electrodos de grafito desnudos y activados	65
A.10. Promedios relacionados con la reversibilidad electroquímica del ferrocianuro de potasio sobre electrodos de grafito desnudos sin activar	66
A.12. Promedios relacionados con la reversibilidad electroquímica de la hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M sobre electrodos de grafito desnudos y activados	67
A.14. Promedios relacionados con la reversibilidad electroquímica de la hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M sobre electrodos de grafito desnudos sin activar	68
B.1. Parámetros empleados en el cálculo del GDA por los métodos de Brugnerotto ($GDA = 100 - 31,92 \frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 12,20$) y Baxter ($GDA = 100 - \frac{A_{1655}}{A_{3450}} * 115$)	69
B.2. Estandarización del NaOH empleado en la titulación del quitosano	69
B.3. Titulación conductimétrica del quitosano mediante NaOH 0,02 N	70
C.1. Cálculo de la cantidad de antígeno retenida sobre electrodos modificados con películas de quitosano de 10 min	71
C.2. Cálculo de la cantidad de antígeno retenida sobre electrodos modificados con películas de quitosano de 20 min	71

C.3. Cálculo de la cantidad de antígeno retenida sobre electrodos modificados con películas de quitosano de 30 min	72
C.4. Potenciales de pico para la hidroquinona en PBS pH 7,4	73

www.bdigital.ula.ve

Abreviaturas y simbolos

α factor de simetría de las barreras de energía relativas para la TE

ΔE_p diferencia de potenciales de pico

γ cociente de los coeficientes de difusión

ν velocidad de barrido

Ψ parámetro adimensional para los cálculos de TE

E_p potencial de pico

F constante de faraday

I_p intensidad de corriente de pico

I_{pa}/I_{pc} cociente de las intensidades de pico

ks constante de TE

n numero de electrones transferidos

R constante de gases

(vs Ag/AgCl) referido al potencial del electródo de plata/cloruro de plata

(vs SCE) referido al potencial del electródo de calomelanos

Ab Anticuerpos primarios

H₂Q hidroquinona

Pgr₂₄ Proteína glicosomal recombinante de 24 kDa

Ab-HRP anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante

Ag/AgCl electrodo de plata/cloruro de plata

CA cronoamperometría

CP cronopotenciometría

FT-IR espectroscopía infrarojo con transformada de Fourier

GDA grado de desacetilación

HRP peroxidasa de rábano picante

LEP laboratorio de enzimología de parásitos

LEQ laboratorio de electroquímica

PBS buffer fosfato salino

SCE electrodo de calomelanos saturado

TE transferencia electrónica

TG-DSC termogravimetría acoplada a calorimetría de barrido diferencial

VC voltametría cíclica

www.bdigital.ula.ve

Introducción

1.1. Aspectos Generales

1.1.1. Enfermedad de Chagas

En 1909, Carlos Chagas descubrió un organismo unicelular flagelado en el intestino de un insecto triatomino hematófago que infectaba las viviendas de personas que vivían en el Estado de Minas Gerais, Brasil [1]. Chagas llamó a este nuevo organismo *Schizotripanum cruzi* (posteriormente llamado *Tripanosoma cruzi*, en honor a su maestro Oswaldo Cruz [2]). *T. cruzi* (fig. 1.1) causa la tripanosomiasis americana y ha sido calificada en las últimas décadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la enfermedad parasitaria de mayor importancia social en el continente americano [3]; así sólo en América latina para el año 2012, se estimó que cerca de 10 millones de habitantes estaban infectados y otros 90 millones estaban expuestos a la enfermedad; por ello, el mal de Chagas es un serio problema de salud pública en este continente [4–7].



Figura 1.1: Imagen de *T. cruzi* rodeado de glóbulos rojos. (tomado de: <http://www.parbio.es/>)

Aunado a esta situación, las terapias desarrolladas hasta el momento para el tratamiento de la enfermedad han sido diseñadas para actuar durante la fase inicial de la infección y no tienen la

eficacia necesaria para eliminar totalmente los parásitos, llegando a ocasionar efectos secundarios en los pacientes que los conducen a cesar del tratamiento, lo cual promueve la emergencia de cepas de parásitos resistentes a estos fármacos [8, 9].

Cabe destacar que, aunque la mayoría de pacientes chagásicos se distribuyan en América latina, la enfermedad de Chagas ha empezado a tener un impacto a nivel mundial debido, principalmente, a los cambios en el hábito de su vector, a la migración humana [10] y por la realización de transfusiones de sangre contaminada, elevando su incidencia a nivel mundial.

La enfermedad de Chagas tiene cuatro formas principales de transmisión, las cuales son: vectorial (la más importante), transfusional y transplacentaria [11].

- La transmisión vectorial se produce a través del insecto hematófago del orden *hemiptera*, familia *reduviidae*, sub familia *triatominae*, *Rhodnius prolixus* [12] (fig 1.2) el cual, al momento de alimentarse con la sangre del individuo del que se nutre defeca, dejando en sus heces el parásito tripomastigote metacíclico (forma infectiva de *T. cruzi*) en el hospedador vertebrado. El parásito puede ingresar a través de las mucosas oculares, bucales y/o nasales o por la herida ocasionada por la picadura del insecto cuando la persona se frota la piel debido a la irritación causada por la misma y desplaza las heces hasta la lesión permitiendo la entrada del parásito al torrente sanguíneo [13].
- La transmisión por vía transfusional implica el paso de sangre infectada a individuos sanos, ya sea a través de heridas que entran en contacto con la sangre contaminada, por transfusiones que se realizan a través de los bancos de sangre o por transplantes de órganos infectados [3].
- La transmisión transplacentaria es la que ocurre de madre a hijo a través de la placenta, se estima que la madre transfiere los parásitos al feto a lo largo de su gestación, denominándose Chagas congénito.
- La transmisión oral, aunque menos común que las anteriores, ha sido reportada en Brasil y Venezuela, es la que tiene mayor infectividad debido a la ingesta masiva del parásito [5].

1.1.2. Evolución de la enfermedad de Chagas

Tras su invasión al hospedador vertebrado humano, *T. cruzi* produce una reacción inflamatoria local aguda, el parásito penetra una amplia variedad de células y llega a transformarse dentro de ellas en amastigotes (forma reproductiva del parásito). Después de algunas divisiones celulares, los parásitos se transforman en tripomastigotes (forma sanguínea invasiva), las células afectadas mueren y liberan a los parásitos que llegan al torrente sanguíneo y se distribuyen por todo el cuerpo, invadiendo cualquier tipo de órganos o tejidos, incluyendo células gliales en el sistema nervioso central, músculo cardíaco, tracto urogenital, el plexo mesentérico en el intestino y el sistema retículo endotelial [5–7].

En su evolución, la enfermedad de Chagas presenta las siguientes fases:

Fase Aguda: se caracteriza por una prominente parasitemia sanguínea, acompañada de fiebre, adenopatías generalizadas, hepatomegalia y esplenomegalia discreta, síntomas generales de infección, agrandamiento del área cardíaca y alteraciones en pruebas electrocardiográficas; pasada esta fase, muchas veces desaparecen los síntomas de forma parcial o total. Esta fase es óptima para el diagnóstico directo de la enfermedad [5] debido a la parasitemia sanguínea.



Figura 1.2: *Rhodnius prolixus*, el vector principal de transmisión en Venezuela. (tomado de : www.chagas.org.ve)

Fase Indeterminada: algunos casos agudos, en un período de dos a tres meses, dan lugar a la fase indeterminada que se caracteriza por la persistencia de la infección sin presentar problemas clínicos, aunque suele ser asintomática, puede presentarse fiebre, anorexia, linfadenopatía, hepatosplenomegalia leve y miocarditis. Debido a la baja parasitemia presentada por los pacientes en esta fase, el diagnóstico de la enfermedad durante la fase indeterminada se realiza generalmente por métodos indirectos [6], donde se analizan muestras de sangre del paciente para determinar la presencia del parásito.

Fase Crónica: es sintomática y puede aparecer años o décadas después de la infección inicial. Durante esta fase la enfermedad afecta al sistema nervioso, al sistema digestivo y al corazón, algunas infecciones crónicas dan como resultado desórdenes neurológicos (demencia), daño en el músculo cardíaco (miocardiopatía) y algunas veces la dilatación del tracto digestivo (megacolon y megaesófago), también puede haber pérdida de peso del paciente [7]. Generalmente, la acumulación de daños sobre los distintos órganos conlleva a la muerte de los pacientes durante esta fase.

La diversidad de síntomas dificulta el diagnóstico de la enfermedad y muchas veces el paciente no es tratado correctamente, de allí su mortalidad. Esto ocasiona que un porcentaje de las muertes relacionadas a cardiopatías en América Latina no se relacionen con la enfermedad de Chagas, sino que se clasifican como complicaciones cardíacas inespecíficas, esto tiene un efecto silenciador sobre la conciencia social que existe actualmente sobre esta tripanosomiasis. La única forma de evaluar el impacto de la enfermedad de Chagas es mediante datos estadísticos sobre la cantidad de afectados y su distribución geográfica, esto se puede realizar diagnosticando las poblaciones en riesgo a través de nuestro continente.

1.1.3. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Además, el diagnóstico de esta enfermedad presenta algunas dificultades debido a la poca especificidad de algunos métodos; así se han reportado reacciones cruzadas en los ensayos inmunológicos.

cos con otras enfermedades parasitarias (Lepra, Leishmania) y virales (Dengue hemorrágico y/o clásico), razón suficiente para que una persona potencialmente chagásica deba someterse a diversos exámenes (electrocardiograma, xenodiagnóstico y serodiagnóstico). En vista de la problemática expuesta por Urbina y Docampo [8] junto con Benchimol Barbosa [5], es necesario desarrollar estrategias de diagnóstico efectivas y específicas para esta parasitemia que permitan tener cierto control epidemiológico de esta enfermedad. Diagnosticar una enfermedad significa evidenciar la presencia de un organismo patógeno mediante un ensayo clínico, este ensayo debe ser reproducible y no debe conducir a ambigüedades [7]. Un método de diagnóstico efectivo debe demostrar su reproducibilidad por métodos estadísticos, siendo también recomendable que los tiempos de análisis sean cortos, ya que esto disminuye los costos del diagnóstico. Para la enfermedad de Chagas los métodos de diagnóstico se pueden dividir en dos clases dependiendo de la forma en la que se evalúa la infección del paciente por el parásito, este método puede ser directo o indirecto.

Métodos Directos: estos pretenden evaluar la presencia del patógeno por evidencia directa, implica realizar pruebas que determinen la presencia del parásito en el huésped. Para el caso de la enfermedad de Chagas se pueden describir, entre otros [14]:

Gota de Sangre: mediante observación directa al microscopio de la sangre de un paciente es posible detectar la infección durante la fase aguda, este método en general es poco práctico debido al corto tiempo de esta fase en la enfermedad, y a pesar de que es específico, ya que se observa el parásito directamente, no se puede emplear durante las otras fases de la enfermedad debido a que el mismo no permanece por mucho tiempo en el torrente sanguíneo del huésped [14].

Hemo cultivo: parte de la muestra de prueba es inoculada en animales de laboratorio o cultivada en diferentes medios, se deja transcurrir un tiempo bajo condiciones controladas para verificar la infección (animales de laboratorio), u observación de crecimiento celular (medios de cultivo). Este método tiene la principal desventaja que requiere de tiempos largos de análisis, además del costo de los medios de cultivo y del peligro de su manejo [5].

Métodos Indirectos: en estos métodos se evalúa la respuesta del sistema inmune del paciente, que produce proteínas de reconocimiento llamadas inmunoglobulinas o anticuerpos, específica para los antígenos del parásito [6], en términos generales estos métodos determinan la presencia de los anticuerpos específicos para la enfermedad de Chagas mediante ensayos inmunológicos (inmunoensayos). Para determinar la presencia de estas proteínas se deben emplear moléculas reporteras o un transductor adecuado que permita su detección, generalmente esto se lleva a cabo en ensayos secuenciales sobre superficies sólidas llamados inmunoensayos. En general se han descrito una gran cantidad de ensayos inmunológicos para diversas patologías, diferenciándose en: la fase en la que se realiza el ensayo (métodos secos u acuosos), el soporte al sistema de reconocimiento biológico que se emplea y el método de detección. Estas pruebas siguen una serie de etapas en las que se inmoviliza una biomolécula de reconocimiento sobre un soporte, luego se realizan una serie de lavados e incubaciones para realizar un complejo inmunológico (de alta especificidad a la patología) y evaluar su presencia mediante una técnica analítica o un ensayo bioquímico. La etapa de revelado puede llevarse a cabo por diversos métodos como la aparición de un precipitado, el decaimiento de partículas radiactivas, fluorescencia, espectrofotometría o mediante reacciones enzimáticas acopladas. [15] Entre estos métodos, podemos destacar los siguientes ensayos inmunológicos:

ELISA Indirecto: sus siglas provienen del inglés por *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*, es una prueba inmunológica que se realiza sobre placas de microtitulación de poliestireno en las que se inmovilizan antígenos y se ensayan los anticuerpos (Ab primarios) provenientes del suero del paciente. En una segunda etapa, estos anticuerpos, que han sido previamente capturados por los antígenos sobre la superficie de poliestireno, son reconocidos por anticuerpos secundarios que están acoplados a una enzima reportera. Este anticuerpo secundario es capaz de reconocer la región constante de los anticuerpos primarios, por lo que al estar enlazado a una enzima con actividad biológica es posible realizar un ensayo bioquímico para determinar la presencia de anticuerpos específicos para la patología de interés. Mediante la determinación de uno de los sustratos de la enzima, es posible determinar la actividad de la misma por vía fotométrica en medio acuoso. La especificidad de este método depende principalmente del antígeno empleado [16] y una de sus principales ventajas es que permite la cuantificación de anticuerpos primarios unidos mediante curvas de calibración [17].

Dot Blot: este ensayo se realiza sobre una membrana de nitrocelulosa, se inmoviliza el antígeno y se ensaya de forma similar a ELISA pero la actividad enzimática se manifiesta bajo la aparición de un precipitado coloreado sobre la membrana. Este método es efectivo y específico pero con la desventaja de no poder cuantificar ninguno de los componentes empleados durante el ensayo [6].

MABA: (del inglés *Multiple Antigen Blot Assay*) esta prueba es similar al Dot Blot tanto en la fase empleada (sólida) como el revelado mediante la aparición de un precipitado coloreado, en este ensayo se inmovilizan varios antígenos sobre la fase sólida en diversas zonas, lo que permite el diagnóstico de múltiples patologías a partir del suero de un paciente [14].

Biosensores Electroquímicos: mediante técnicas electroquímicas y el uso de electrodos modificados, es posible desarrollar una metodología de diagnóstico que permita obtener información tan útil como la que proveen los métodos clásicos [18, 19]. Es posible realizar los ensayos inmunológicos sobre electrodos de diversa naturaleza química como oro, platino, carbón vítreo, grafito o nanotubos de carbono al ser tratados mecánica y/o electroquímicamente [20]. Estos biosensores son transductores híbridos que comprenden una molécula captadora, empleada para lograr el reconocimiento biológico, inmovilizada sobre la superficie del electrodo. En esencia, estos dispositivos emplean un ciclo químico que facilita el paso de electrones desde el marcador molecular hacia la superficie del electrodo donde ocurre la reacción de óxido reducción, generando la señal [21, 22]. Mediante la señal generada por esta reacción redox es posible cuantificar los componentes de interés del inmunoensayo con alta especificidad y sensibilidad de forma análoga al ELISA clásico, en algunos casos sin la necesidad de realizar pruebas patrón. [23–29].

Es importante resaltar que si se dispone de un antígeno adecuado es posible realizar virtualmente cualquier ensayo inmunológico que sea específico para una patología determinada lo cual ha sido demostrado en la literatura [16, 19, 21, 22, 30–32], un antígeno es una proteína del patógeno que estimule al sistema inmunológico para la producción de anticuerpos.

Existen principalmente dos formas de obtener un antígeno, ya sea purificando proteínas a partir del organismo patógeno o produciéndolas mediante técnicas de ingeniería genética en forma de proteínas recombinantes. En la actualidad es mucho más conveniente expresar estos antígenos como proteínas recombinantes en organismos modelo como *E. coli* o *S. cerevisiae* debido a que el costo de mantenimiento e infraestructura de las instalaciones donde se cultivan los últimos es significativamente menor a las requeridas para los patogénicos, además, es más simple la manipulación de los

cultivos para el crecimiento de los organismos modelos. Otra gran ventaja de producir antígenos recombinantes es que mediante técnicas de ingeniería genética existe la posibilidad de manipular su secuencia de aminoácidos, lo que permite un control de los sitios de reconocimiento (epitopes) en el antígeno aumentando la especificidad y sensibilidad de los ensayos inmunológicos, además, se pueden incluir secuencias para facilitar la purificación mediante columnas cromatográficas de afinidad[16, 19, 20, 31, 33].

En el LEP se ha desarrollado una proteína recombinante denominada Pgr₂₄ que permite el reconocimiento, por pruebas inmunológicas, de anticuerpos específicos a *T. cruzi*, en los más de 50 000 pacientes diagnosticados en Venezuela hasta la actualidad no se han reportado reacciones cruzadas con otras enfermedades parasitarias o virales. Esta proteína es simple de purificar en grandes cantidades en tiempos muy cortos y se ha demostrado que es estable bajo las condiciones de operación de un inmunosensor electroquímico [14]. La tarea de construirlo pasa por la modificación u optimización de la superficie de un electrodo que proporcione la estabilidad adecuada de los diversos componentes que se emplean en el inmunoensayo, una vez se determine que existe una interacción favorable del antígeno sobre la superficie del biosensor, es importante verificar las señales de los diversos componentes empleados en el ensayo inmunológico de manera a obtener una respuesta única y diferenciable del elemento reportero, que asegure la especificidad de la señal. Adicionalmente, una caracterización cinética y termodinámica de la respuesta permite establecer los parámetros operacionales del biosensor y verificar la reproducibilidad del método, lo que permitirá en un futuro el escalamiento del sistema de diagnóstico.

www.bdigital.ula.ve

1.2. Antecedentes

1.2.1. Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos conforman una familia de dispositivos que permiten cuantificar analitos de diversos tipos al combinar un componente de naturaleza biológica inmovilizado sobre un transductor sólido, como regla general el componente biológico responde a la presencia del analito de interés con gran especificidad, este transductor híbrido genera una señal cuya respuesta permite cuantificar el analito de interés, para los biosensores electroquímicos las señales son reacciones redox que se dan a cabo sobre la superficie del transductor (electrodo)[29].

Dentro de la familia de biosensores, la transducción de la señal y el reconocimiento es específico para cada dispositivo [34], son capaces de cuantificar (entre otros) metabolitos [28, 35, 36], azúcares [37, 38], ácidos nucleicos [39, 40] y anticuerpos específicos para una patología (inmunosensores) [23, 41–43]. Desde un punto de vista instrumental un inmunosensor es un tipo de biosensor que permite la detección de anticuerpos (Ab) realizando el ensayo inmunológico sobre el dispositivo (fig. 1.3). Estos disponen de un elemento de captura inmovilizado sobre la superficie que es de naturaleza biológica, generalmente es un antígeno que se expone a la presencia de una población de anticuerpos provenientes del suero de un paciente. Si existe reconocimiento de los epitopes antigénicos por los anticuerpos del paciente se formará el inmunocomplejo, que generalmente no puede ser detectado por técnicas electroquímicas ya que estas proteínas no son electroactivas [14].

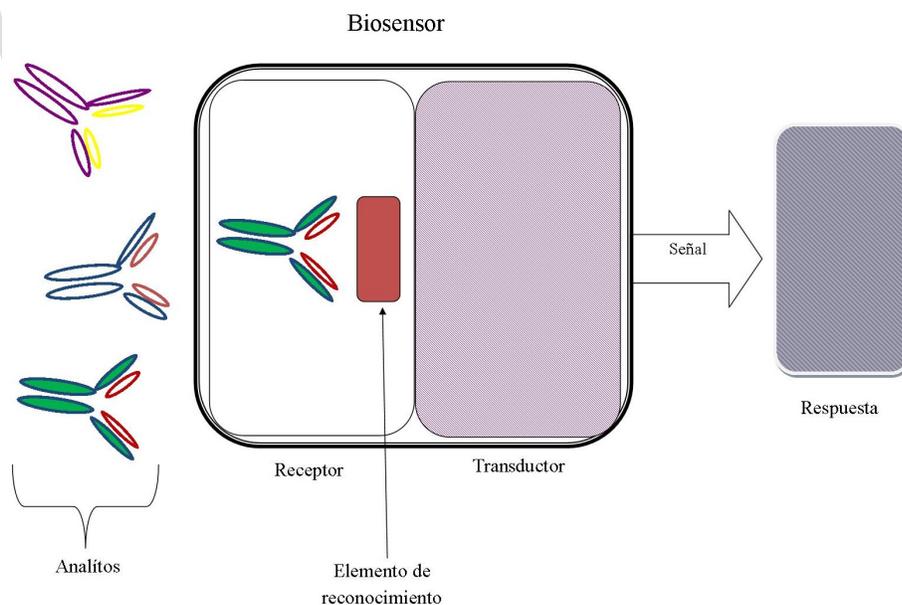


Figura 1.3: Representación gráfica del proceso de reconocimiento y generación de la señal en un inmunosensor

Para determinar la formación del complejo antígeno-anticuerpo es necesario introducir un elemento reportero que de forma directa o indirecta forme un intermediario que pueda ser detectado, esto se puede lograr empleando anticuerpos acoplados a enzimas redox (Ab-HRP) cuya actividad se determina por técnicas electroanalíticas; cabe destacar que estos también son denominados anti IgG humanos debido a que reconocen específicamente la región constante de los anticuerpos que

proviene de humanos. La detección electroquímica de la actividad enzimática se realiza gracias a su centro catalítico, donde se transfieren electrones entre los sustratos para formar los productos, así, observando la formación o degradación de uno de los sustratos de la reacción es posible determinar la actividad de la enzima y por ende la formación del complejo antígeno anticuerpo.

El desarrollo de métodos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas amerita que estos sean específicos, eficientes y rápidos además de económicos y portátiles para permitir el análisis de muestras en sitios alejados del laboratorio como zonas rurales. Escogiendo como estrategia de diagnóstico un inmunosensor, se disminuye el tiempo de análisis sin ir en detrimento de la calidad del diagnóstico de métodos como PCR, ELISA o MABA.

Un método de diagnóstico con las características descritas previamente se puede lograr al combinar las técnicas electroquímicas y las pruebas serológicas en un inmunosensor, ya que es posible realizar los ensayos enzimáticos sobre electrodos de diversa naturaleza química como oro, platino, carbón vítreo, grafito o nanotubos de carbono al ser tratados mecánica y/o electroquímicamente [13, 14, 18, 44, 45]. En esencia estos dispositivos emplean un ciclo químico que facilita el paso de electrones desde el marcador molecular hacia la superficie del electrodo donde ocurre la reacción redox, generando la señal [22, 26, 31]. El mecanismo global de transferencia de carga depende de la naturaleza del marcador siendo posible registrar directamente su presencia en el caso de ser electroactivos; sin embargo este tipo de marcaje es poco utilizado comparado al uso de enzimas redox donde se evalúa su actividad biológica mediante la determinación de uno de sus productos de reacción (mediador químico o sustrato) mediante técnicas electroquímicas. Como regla general el mediador (fig. 1.4) interactúa con el centro redox de la enzima, donde ocurre la transferencia de los electrones con el sustrato de la enzima, y de ahí hacia la superficie del electrodo [20], mediante la señal generada por esta reacción es posible cuantificar los componentes de interés del inmunoensayo con alta especificidad y sensibilidad [15, 23, 43], aunque la disponibilidad de un antígeno adecuado es la etapa clave en este proceso.

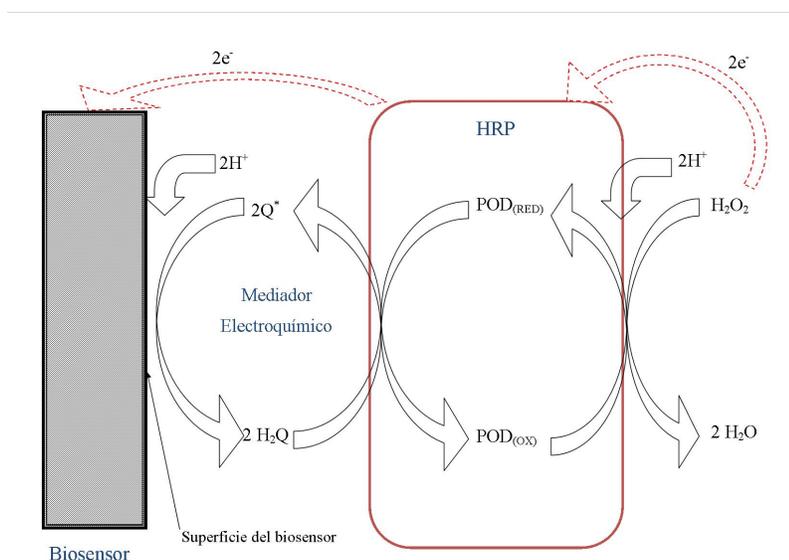


Figura 1.4: Esquema de la interacción del mediador químico con el centro redox de la HRP

1.2.2. Inmunoensayo

Los inmunosensores electroquímicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas desarrollados hasta la actualidad mantienen un formato general para realizar el inmunoensayo. Este formato es llamado ELISA indirecto y permite detectar IgG humanos (fig. 1.5b) que reconozcan a un antígeno específico inmovilizado sobre una fase sólida, mediante anticuerpos acoplados a peroxidasa; en una prueba hipotética la superficie se ensaya para la actividad de peroxidasa, lo que permite comprobar si hubo una interacción favorable entre el antígeno y los anticuerpos del suero (fig. 1.5).

Las reacciones requeridas para formar el complejo de revelado ($[\text{Pgr}_{24}]_{(\text{ads})}([\text{Ab}][\text{Ab}-\text{HRP}]_y)_x$) sobre los electrodos son el equivalente a realizar un ensayo para diagnosticar la enfermedad de Chagas en sueros de humano, en este caso se capturan los anticuerpos de suero de pacientes que reconozcan específicamente los epitopes del antígeno inmovilizado (fig. 1.5a), en este caso es la proteína recombinante de *T. cruzi* (Pgr_{24})[21, 33].

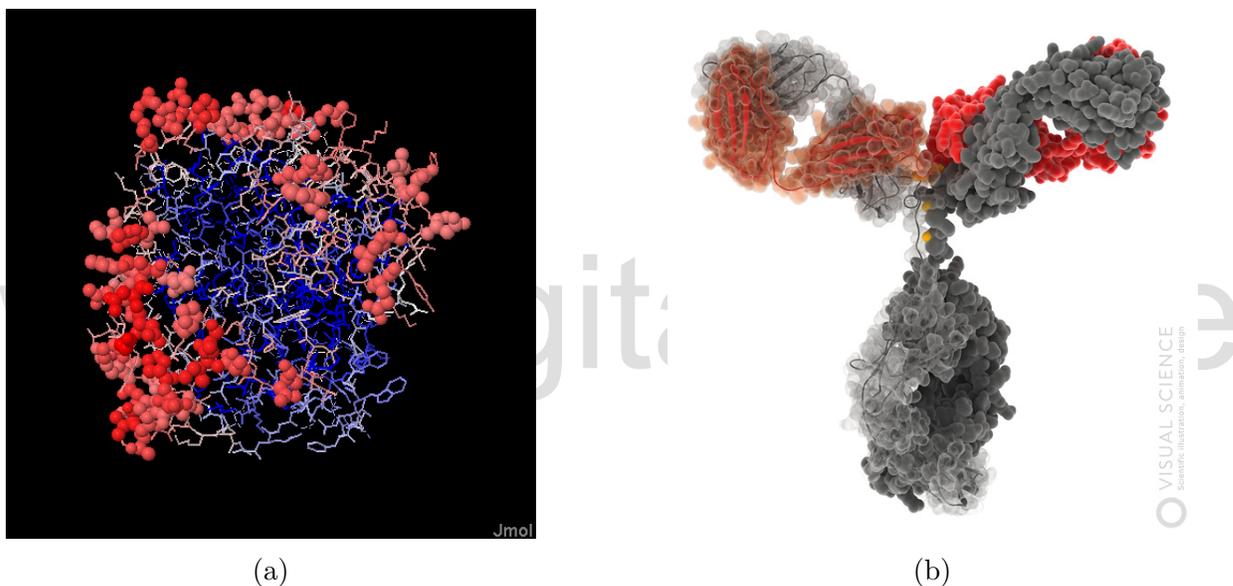


Figura 1.5: Superficies moleculares y representación de las regiones de interacción de un antígeno tipo e IgG humanas. 1.5a Representación de un antígeno, con sus epítipes antigénicos resaltados en rojo. 1.5b Inmunoglobulinas IgG humanas, en gris se representan las cadenas pesadas de los anticuerpos y en rojo las cadenas ligeras. Las regiones variables (de interacción) del IgG se encuentran en la región de unión entre las cadenas ligeras y pesadas mientras que la región constante se dispone en la unión de las dos cadenas pesadas (tomado de www.visualscience.com)

Para realizar un ensayo ELISA indirecto con detección electroquímica se deben llevar a cabo tres reacciones sobre una fase sólida, ella debe ser biocompatible y estable bajo las condiciones del ensayo y debe permitir la detección del mediador empleado durante la reacción de revelado por técnicas electroanalíticas [20, 22]. Estas reacciones son:

■



La primera reacción consiste en la inmovilización del antígeno sobre el transductor (electrodo), se lleva a cabo de forma pasiva sobre superficies biocompatibles, sin embargo la mayoría

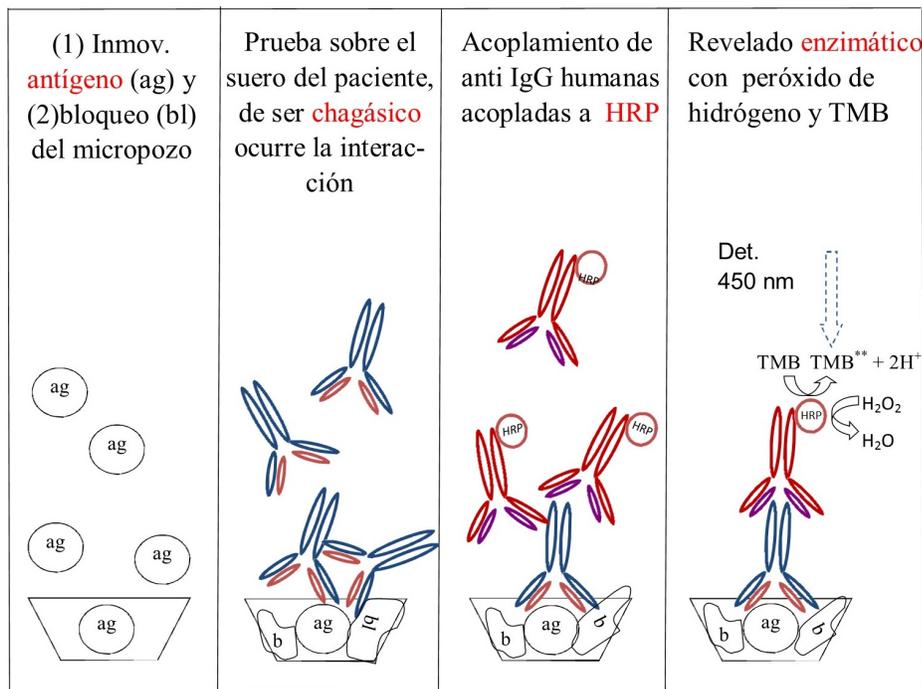


Figura 1.6: Representación del proceso de reconocimiento antígeno-anticuerpo típico de los ensayos ELISA.

La HRP es usada extensamente en aplicaciones bioquímicas principalmente por su capacidad de amplificar señales débiles permitiendo la detección de biomoléculas en el orden entre 10^{-6} g hasta 10^{-9} g, además tiene una alta constante catalítica (k_{cat}) y permiten una amplia variedad de cosustratos con diversas propiedades fisicoquímicas. Esta enzima es clasificada como una holoenzima ya que su actividad enzimática no depende exclusivamente de los aminoácidos que pertenecen a su estructura primaria, sino de un grupo prostético que le confiere la capacidad de transferir electrones entre sus sustratos. Esta holoenzima contiene un grupo prostético hemo que cataliza la reacción de descomposición del peróxido mediante transferencia electrónica simple [26, 51], tal y como se muestra en la figura 1.7; en la misma se puede apreciar que el sitio activo sufre dos cambios en el estado de oxidación conforme cataliza la descomposición del peróxido y transfiere los equivalentes al cosustrato. El primer paso consiste en la ruptura de la molécula de peróxido, para formar agua e incorporar uno de los átomos de oxígeno al compuesto 1 que fue identificado por Theorell en 1941 [52]. Este compuesto es un catión radical π , tiene dos equivalentes respecto a la HRP nativa y un átomo de Fe^{IV} coordinado al O, este intermediario (compuesto 1) es capaz de reducir una gran cantidad de sustratos orgánicos mediante transferencia electrónica simple, el electrón deslocalizado sobre los orbitales moleculares conjugados π es intercambiado por un protón del cosustrato para oxidar el compuesto 1 al compuesto 2. Este último intermediario, que también contiene un átomo de Fe^{IV} coordinado al O puede oxidar un segundo sustrato para generar una molécula de agua y reducir el átomo de hierro a Fe^{III} [24, 47, 51, 52].

Las claves para realizar un ensayo inmunológico acoplado a enzimas sobre superficies electrónicas son asegurar el desarrollo de las reacciones inmunológicas sobre las superficies, escoger un cosustrato y una técnica para determinarlo. ELISA clásico emplea cosustratos cromogénicos solubles que presentan cambios en las bandas de absorción de la región del UV visible al ser descompuestos enzimáticamente, en MABA se emplean cosustratos cromogénicos que se vuelven insolubles al

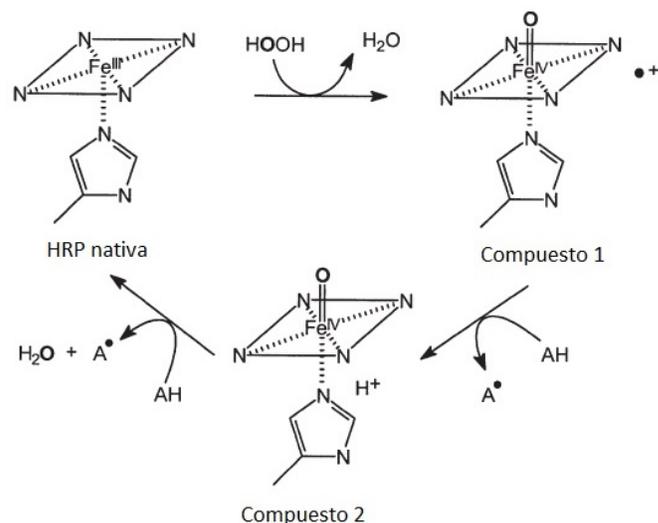


Figura 1.7: Ciclo de reacción del sitio activo de la peroxidasa al catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno. (tomado de [51])

oxidarse, lo que permite la detección del complejo inmunológico gracias al precipitado coloreado que se forma durante la etapa de revelado, en inmunosensores la detección se puede realizar por técnicas que dan resultados análogos a los ensayos clásicos, por ejemplo, mediante cronamperometría es posible cuantificar uno de los sustratos al establecer un potencial sobre la superficie del electrodo, se puede obtener una señal en corriente que es proporcional al sustrato que reacciona sobre el sensor. También hay sensores voltamperométricos que permiten analizar varios sustratos del ensayo enzimático, de esta forma se obtiene un panorama más amplio de las especies involucradas en la prueba, lo que representa una ventaja respecto a los métodos clásicos, ya que a partir de un ensayo se puede diagnosticar una enfermedad sin requerir ensayos control ni valores de recorte como en el ELISA clásico.

Otra ventaja en el uso de inmunosensores respecto a los métodos clásicos es que ellos son capaces de determinar los sustratos del ensayo enzimático y sus variaciones en tiempo real, sin requerir etapas de arresto de la reacción de revelado comunes al ELISA clásico. La determinación del cosustrato permite diagnosticar la enfermedad de Chagas mediante un inmunoensayo con un antígeno adecuado revelando las IgG humanas con anticuerpos anti IgG humanos acoplados a peroxidasa, dicha estrategia ha sido ampliamente demostrada [13, 18, 20, 31–33, 44].

1.2.3. Inmunosensores electroquímicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

En la última década la literatura reporta tres estrategias principales para el desarrollo de inmunosensores que permitieron el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, las variaciones se dieron en el antígeno empleado, la superficie electródica y el mediador electroquímico. Los estudios iniciales sobre inmunosensores emplearon extractos de *T. cruzi* como antígeno en ensayos ELISA a través de técnicas cronamperométricas, evaluando la reacción enzimática de la HRP mediante la adición de H₂O₂ y el mediador, Ferreira y col. [44] desarrollaron un inmunosensor donde se inmovilizó una fracción de un lisado de *T. cruzi* purificada por electroforesis en gel. Se empleó un electrodo serigrafado de oro modificado con cisteamina (2×10^{-2} M por 2 h) y luego con glutaraldehído (2,5% en buffer fosfato pH 7,5 por 1h) para inmovilizar el extracto (35 μ g) so-

bre la superficie electródica mediante incubación a 4 °C durante una noche, el sistema reportero empleado fué anti IgG humano de cabra acoplados a peroxidasa (HRP), la reacción enzimática fué evaluada empleando $H_2O_2 + KI$. Los inmunosensores fueron ensayados con sueros de pacientes chagásicos y no chagásicos confirmados previamente por la prueba ELISA e inmunofluorescencia indirecta, los resultados para este sensor permitieron establecer valores de recorte de forma similar al método ELISA aunque, debido a la composición del antígeno, se reportaron altos niveles de reactividad cruzada con los sueros de pacientes infectados por esquistosomiasis y leishmaniasis. Por otra parte Ribone y col. [13] inmovilizaron el extracto de *T. cruzi* sobre electrodos de oro modificando las superficies con tioles, que fueron empleadas para capturar IgG anti *T. cruzi* de sueros comprobados chagásicos crónicos y fueron revelados empleando anti IgG humanos acoplados a peroxidasa. El ensayo enzimático se realizó sumergiendo el biosensor en una solución que contuvo $H_2O_2 + FcMe$; el ferrocenometanol (FcMe) actuó como mediador de la actividad enzimática de la HRP y permitió la detección amperométrica del complejo inmunológico. Los autores no reportaron reactividad cruzada para sus ensayos pero tampoco emplearon sueros confirmados enfermos de otras enfermedades por lo que no se verificó la especificidad del ensayo de forma adecuada ya que, debido a la naturaleza de las interacciones antígeno-anticuerpo, es de esperar que siguiendo la metodología reportada por los autores se generen falsos positivos ensayando sueros de pacientes enfermos con otras enfermedades. Por su parte, Pereira y col. [45] modificaron un sistema integrado de microfluidos enlazado a electrodos serigrafados de grafito para la detección de IgG humanas específicas a *T. cruzi*, los electrodos fueron modificados mediante la electrodeposición de nano partículas de oro y la inmovilización de un extracto del parásito. El biosensor permitió la detección de la IgG mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, la detección amperométrica se desarrolló al revelar el complejo con 4-ter-butylcatecol (4-TBC) y H_2O_2 a 100 mV. El 4-TBC actuó como mediador electroquímico y cumplió un rol similar al KI [44, 53, 54] o FcMe [13, 55] ya que permitió la detección electroquímica de la actividad enzimática de la HRP. Dejando a un lado la elección del antígeno, esta estrategia es atractiva debido a que combina la especificidad del ensayo inmunológico con la capacidad automatización y miniaturización de los sistemas microfluídicos, sin embargo está más enfocada a ser una alternativa real al método ELISA lo que implica que el diagnóstico se debe realizar en una planta física adecuada con baja portabilidad.

Cabe destacar que el principal defecto que comparten las estrategias iniciales es que debido a la naturaleza del antígeno inmovilizado, los anticuerpos capturados con los extractos no son necesariamente específicos a *T. cruzi*, por lo que se pueden generar falsos positivos mediante ensayos inmunológicos que siguen este formato, ya que la etapa de revelado enzimático depende de la presencia de la región constante de los IgG humanos que capturan a su vez a los anticuerpos secundarios conjugados a la enzima reportera, la reactividad cruzada ocurre cuando el extracto captura anticuerpos específicos a otra enfermedad y, debido a que la región constante es común para los anticuerpos de cada tipo, se forma el inmunocomplejo de revelado a pesar de que en el suero del paciente no existan anticuerpos específicos para *T. cruzi*.

En trabajos posteriores, estos grupos de investigación desarrollaron una nueva generación de inmunosensores con antígenos específicos para *T. cruzi* y se mejoró la especificidad de los ensayos, así por ejemplo Ribone y col. [55] diseñaron un antígeno quimera que permitió una mejor exposición de los epítopes al inmovilizarlo sobre el biosensor, mejorando la especificidad del ensayo desarrollado previamente [13]. Por otro lado, Foguel y col. [54] desarrollaron inmunosensores desechables empleando electrodos preparados a partir de CD-R de oro (CDtrodos), los CD-R fueron tratados con HNO_3 para eliminar el plástico que protege la superficie de oro. La superficie de oro se funcionalizó con capas auto ensambladas de 4-(metilmercapto)-benzaldehído para inmovilizar el antígeno (Tc85) a 4 °C por 6h. El arreglo empleado para inmovilizar el antígeno es

irreversible y el formato del inmunoensayo llevado a cabo es idéntico a otros descritos [44, 53] por lo que representa una alternativa al ensayo inmunológico empleando materiales reciclados, sin embargo no se realizaron estudios de la reproducibilidad del ensayo y debido a la baja calidad de la superficie del oro de los CD-R es posible que este formato de inmunosensor no se pueda emplear como método de diagnóstico. Recientemente, Ferreira y col. [53] mantuvieron el formato del ensayo introducido por el mismo autor pero inmovilizaron un antígeno recombinante (Tc85-11) sobre el inmunosensor, esto aumentó considerablemente la especificidad del biosensor desarrollado previamente [44], sin embargo, debido a la inespecificidad de la interacción del antígeno y el electrodo, los autores tuvieron que evaluar la inmovilización del antígeno mediante microscopía de fuerza atómica, lo cual aumenta considerablemente el costo de la caracterización de los inmunosensores desarrollados. Por su parte, Diniz y col. [18] ensamblaron un inmunosensor impedimétrico para la determinación de IgG humanos específicos para *T. cruzi*, inmovilizando un antígeno recombinante comercial (Biomanguinhos/FIOCRUZ) sobre electrodos de Au y Pt. En esta investigación los autores determinaron la formación del complejo antígeno anticuerpo ($[Antg]_{(ads)}[Ab]_x$) sobre el inmunosensor mediante técnicas impedimétricas sin emplear sistema reportero ni reacciones acopladas. Gracias a estas técnicas es posible estudiar la interfase electroquímica y determinar la formación del complejo inmunológico, sin embargo, los fundamentos técnicos y el entrenamiento requerido para realizarlas son una desventaja importante a la hora de emplear una metodología como la propuesta en este trabajo de investigación, ya que no son familiares para el personal entrenado para realizar los diagnósticos de la enfermedad de Chagas además de su costo y la dificultad de adaptar esta metodología a estrategias portátiles.

Recientemente, en el laboratorio de Electroquímica se desarrolló un inmunosensor para Chagas [14] empleando una superficie de carbón vítreo modificado con quitosano para la detección de IgG humanas anti *T. cruzi*, sobre la superficie eléctrica se electrodepositó quitosano para conformar una matriz sobre la cual se inmovilizó como antígeno la Pgr₂₄. El biosensor se ensayó sobre sueros de personas confirmadas chagásicas y se emplearon anticuerpos acoplados a HRP para revelar el complejo inmunológico, la actividad enzimática se verificó mediante voltametría cíclica tras la adición de H₂O₂ e hidroquinona, que actuó como mediador.

No existe consenso sobre cuál es el mejor mediador electroquímico para determinar la actividad de la HRP, sólo en los inmunosensores desarrollados para la tripanosomiasis americana se han empleado un total de cuatro mediadores electroquímicos (KI, FcMe, TBC e hidroquinona) con estructuras diversas lo que demuestra la versatilidad de la HRP como enzima marcadora; sin embargo, una característica deseada de un mediador es que tenga una transferencia electrónica rápida y reversible bajo los rangos operacionales del sensor, además, que sean estables frente a los componentes del inmunoensayo y de la reacción enzimática y por último, para el desarrollo de estrategias portátiles, que sean de bajo costo además de estables en el tiempo.

Una clara diferencia en la estrategia empleada en el LEQ [14] comparada con las descritas en las otras investigaciones de la literatura [13, 18, 44, 45, 53–55] es el cambio de superficies (carbono) respecto a electrodos metálicos, aunque parezca una diferencia sutil puede tener consecuencias drásticas en el desarrollo de métodos de diagnóstico portátiles y masivos, ya que las superficies de oro son más catalíticas que las de carbono, lo que aumenta la sensibilidad de los sensores electroquímicos y mejora la calidad de las señales permitiendo la detección de menores cantidades de IgG anti *T. cruzi* en comparación. Sin embargo, los electrodos metálicos sufren reacciones espontáneas de oxidación sobre la superficie lo que conlleva a su pasivación, perdiendo paulatinamente la respuesta hasta que se renueve la superficie del electrodo, y, debido al formato del ensayo inmunológico, es necesario fabricar los inmunosensores in situ para obtener reproduci-

bilidad en las medidas, limitando el tiempo de almacenamiento de los biosensores. Por otra parte, las superficies de oro, al ser modificadas químicamente, pueden enlazar covalentemente los antígenos a la superficie electródica y prescindir de las etapas de bloqueo del inmunoensayo pero estas modificaciones requieren de un tiempo considerablemente mayor al tiempo de construcción total del inmunosensor desarrollado en el LEQ por lo que se adaptó la metodología desarrollada en este laboratorio a superficies de Grafito.

1.2.4. Caracterización de las superficies electródicas

Las superficies electródicas que se han empleado en este TEG son de grafito tales como barras de grafito, electrodos serigrafiados de grafito o electrodos de pasta de carbono y presentan varias ventajas respecto a las superficies de oro o carbón vítreo que se han empleado en el desarrollo de inmunosensores para la enfermedad de Chagas debido a la simplicidad de fabricación, composición modificable y reproducibilidad de la superficie. Por otra parte, el grafito es un alótropo del carbono como el diamante, fullerenos, grafeno y nanotubos de carbono, tiene una morfología variable a lo largo de su estructura y por lo tanto es necesario caracterizar estas superficies para evaluar su comportamiento como electrodo de trabajo ya que su capacidad catalítica puede variar entre lotes de fabricación. Al comparar las minas de grafito a electrodos fabricados con nanotubos de carbono o grafeno se pueden obtener mejoras significativas en la reproducibilidad de las medidas y el rendimiento general de los inmunosensores [20, 22, 31].

El grafito también es un alótropo del carbón vítreo pero presentan diferentes respuestas electroquímicas, se ha reportado mediante estudios de microscopia de efecto tunel que estas diferencias se deben a la estructura cristalina y relación de enlaces sp^2 a sp^3 [56] de ambos electrodos. Adicionalmente, ambas superficies son sensibles al tratamiento mecánico y a la exposición de solventes orgánicos, sin embargo las superficies de grafito son activadas a pH ácido mientras que las de carbón vítreo se activan a pH básico, además se ha reportado en la literatura [57, 58] que la transferencia electrónica (TE), que es una medida de la capacidad catalítica de un material para transferir electrones en un experimento electroquímico, se ve afectada por la distribución de grupos funcionales en la superficie de los electrodos así como el plano basal de las laminas de grafeno que conforman al electrodo de grafito respecto a la interfaz [59, 60].

En el principal antecedente de este trabajo de investigación [14] se evaluó la respuesta voltamétrica del ferrocianuro de potasio en ácido sulfúrico sobre electrodos de carbón vitreo activados en medio básico y se determinó que la misma era característica de un sistema cuasireversible de TE simple, sin embargo estos sistemas abarcan un amplio espectro de condiciones electroquímicas por lo que la TE no fué caracterizada de forma adecuada.

La TE se puede describir cuantitativamente en términos de una constante que se determina estudiando los parámetros de reversibilidad en las respuestas voltamétricas de moléculas modelo a diferentes velocidades de barrido, en la literatura se reportan [61, 62] dos métodos para la determinación de este parámetro que abarcan un espectro de condiciones cinéticas desde reversibles hasta pseudoreversibles, lo que requiere, según la literatura [63], que las diferencias entre los potenciales de pico de reducción y oxidación (ΔE_p) se encuentren cercanas a $59 \text{ mV}/n$ (donde “n” es el número electrones transferidos) y que sean independientes a la velocidad de barrido, además es necesario que el cociente de las intensidades de cada pico se aproximen a la unidad, lo que asegura que la cantidad de especies reducidas sean iguales a las oxidadas durante la voltametría cíclica. Cabe destacar que la TE de la superficie del inmunosensor afecta directamente su desempeño, ya que la detección del complejo inmunológico se realiza mediante la determinación electroquímica

del mediador, una TE pobre implica que el dispositivo requiere del uso de mayores cantidades de reactivo inmunológico y de un mayor tiempo de análisis para generar la misma señal que se obtendría sobre una superficie más catalítica[64–70].

1.2.5. Deposición de Películas de Quitosano

Las superficies de grafito no permiten naturalmente la inmovilización de proteínas por lo que se deben funcionalizar o modificar con polímeros adsorbentes para desarrollar inmunosensores, existen derivados biológicos como el quitosano (fig. 1.8) que constituyen un adsorbente biológicamente amigable y eléctricamente inerte que permite la inmovilización de ADN [40, 71] y proteínas [72–74]. Sus capacidades de adsorción son dictadas por parámetros como el peso molecular y grado de desacetilación [71, 75–78]. El quitosano es un polielectrolito derivado de la quitina formado por unidades de glucosamina y N-acetil glucosamida, la relación entre la glucosamina y derivado acetilado es el grado de desacetilación (GDA) y se han reportado varios métodos para determinarlo de forma efectiva [76, 77, 79–83].

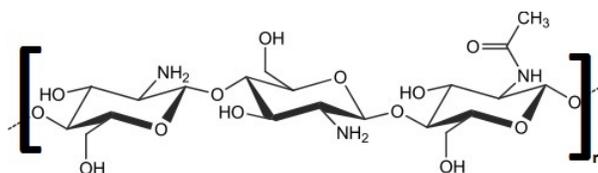


Figura 1.8: Estructura química del quitosano

Existen diversos métodos analíticos para determinar el GDA del quitosano [79, 84] entre los que podemos citar [82, 85] algunos espectroscópicos, que son atractivos debido a la rapidez del análisis y a la facilidad de obtener resultados reproducibles, algunos métodos térmicos [76] y otros volumétricos [77].

En la literatura se destacan dos métodos espectroscópicos que permitieron generar ecuaciones que correlacionan el GDA con relaciones en algunas bandas de adsorción en el espectro IR del quitosano, Baxter y col. [85] emplean la relación de la banda de estiramiento del grupo carbonilo de la acetamida a 1655 cm^{-1} y como referencia la banda de estiramiento de grupos hidroxilo 3450 cm^{-1} siguiendo la relación $GDA = 100 - \frac{A_{1655}}{A_{3450}} * 115$; Brugnerotto y col. [86] por su parte determinan las relaciones entre las bandas a 1320 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} la primera correspondiente al estiramiento C–N del grupo amida y la segunda corresponde al estiramiento C–H mediante la relación $GDA = 100 - 31,92 \frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 12,20$.

Muestras de quitosano con un alto GDA permiten una mayor capacidad de adsorción de biomoléculas ya que la interacción con el biopolímero es de tipo iónica y se da entre los grupos amino libres del polímero, además se ha reportado en la literatura que se pueden incluir dentro de la composición de pasta de carbono, al incluir a la mezcla quitosano [41] (empleando como transductor nano partículas de oro) lo que permitió la fabricación de inmunosensores a base de electrodos de este tipo.

Una de las etapas más importantes en la fabricación de inmunosensores es la funcionalización de la superficie del transductor para permitir el ensamblado del inmunocomplejo, lo que se busca con ese proceso es generar una matriz reproducible sobre la cual se puedan adsorber establemente los componentes biológicos del ensayo [71, 79]. Se han modificado los electrodos de grafito con

películas de quitosano generadas mediante electrodeposición ya que se ha reportado [71, 87, 88] que esta técnica permite un control sobre la morfología de las mismas .

Estudios sobre la electrodeposición de quitosano en soluciones ácidas demuestran que este polímero puede formar películas sobre electrodos a potenciales de reducción, estas películas son estables mecánicamente y permiten la adsorción de proteínas [89–91]. Aunque el mecanismo de deposición para este polímero no se ha descrito totalmente, la formación de películas de quitosano ocurre debido a que su solubilidad depende del pH del medio (fig 1.9), se pueden destacar tres fenómenos importantes durante este proceso, siendo el primero el movimiento electroforético del quitosano en solución producto de la diferencia de potenciales entre los electrodos, en segundo lugar a potenciales catódicos ocurre la evolución de H_2 en el electrodo de trabajo gracias a la electrólisis del agua siguiendo la reacción $2 H_2O + 2 e^- \longrightarrow 2 OH^- + H_2 \uparrow$ y por último también puede generarse hidrógeno moléculas al reducir protones libres del medio siguiendo la reacción $2 H_3O^+ + 2 e^- \longrightarrow 2 H_2O + H_2 \uparrow$. En conjunto estos procesos permiten la precipitación controlada del quitosano sobre la superficie electródica ya que el movimiento electroforético aproxima el polímero al electrodo donde precipita por la generación de un gradiente de pH, efecto del agotamiento de protones libres en las cercanías del electrodo debido las reacciones de evolución de hidrógeno.

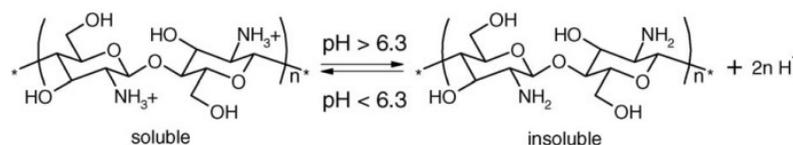


Figura 1.9: Reacción de equilibrio para la formación de películas del quitosano

El proceso de formación de películas desde soluciones ácidas es un proceso dinámico donde ocurre la precipitación del quitosano acoplado a la liberación de burbujas H_2 , la cinética de deposición depende del potencial aplicado al electrodo ya que este afecta el gradiente de pH generado sobre la superficie y también la velocidad de las reacciones descritas anteriormente. El control del pH de la solución de quitosano en conjunto con la elección de un potencial adecuado permiten generar películas de quitosano reproducibles con morfología controlada [88, 90, 92].

1.3. Hipótesis

La inmovilización de la proteína recombinante Pgr₂₄, que permite el reconocimiento seroespecífico para *T. cruzi*, sobre electrodos de grafito, pasta de carbón o serigrafiados de grafito modificados con quitosano podrían generar inmunosensores capaces de diagnosticar la enfermedad de Chagas en sueros de pacientes.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Estudiar la inmovilización de una proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi* sobre superficies de grafito modificadas con películas de quitosano y evaluar la respuesta electroquímica del inmunosensor en muestras de pacientes sanos y enfermos de tripanosomiasis americana.

1.4.2. Específicos

- Caracterizar mediante técnicas electroquímicas las superficies de grafito, pasta de carbón y electrodos serigrafiados de grafito
- Caracterizar el quitosano empleado para modificar las superficies electródicas
- Electrodepositar películas de quitosano de tres diferentes espesores, caracterizándolas mediante técnicas electroquímicas
- Evaluar la adsorción de la Pgr₂₄, proteína recombinante de *T. cruzi* sobre las películas de quitosano mediante ensayos colorimétricos
- Evaluar la inmovilización de los componentes biológicos del inmunosensor mediante técnicas electroquímicas
- Evaluar la respuesta electroquímica del inmunosensor en muestras de suero de pacientes confirmados chagásicos

Parte Experimental

2.1. Laboratorios

Las experiencias fueron realizadas entre el Laboratorio de Electroquímica y en el Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP) de la Universidad de Los Andes, además de contar con la colaboración del Laboratorio de Biodiversidad y Variabilidad Molecular (LBVM-ULA), el Laboratorio de docencia de Química Orgánica (L. Org) y el Laboratorio de Materiales para Tecnologías Emergentes (DITEMA-IVIC) para la realización de algunas pruebas de caracterización.

2.2. Equipos

Tabla 2.1: Equipos empleados

Equipos	Lab	Marca	Modelo
Potenciostato	LEQ	Princeton Applied Research	EG&G PAR 263A
Espectrómetro IR	L.Org	Perkin Elmer	Spectrum RX-1
Conductímetro/pH metro	LEQ	SPER	Scientific Benchtop Meter No.860033
Balanza Analítica	LEQ	Mettler	AJ150
Balanza Analítica	LEP	Ohaus	E11140
Desionizador de Agua	LEQ	Nanopure Infinity Barnstead	D8991
Espectrómetro UV-Visible	LBVM	Biochrom	WPA Biowave DNA
DSC-TG	DITEMA	Mettler	STAR SW 9.3

2.3. Materiales y Reactivos

El LEP proporcionó los materiales biológicos, que fueron caracterizados mediante los protocolos de ELISA, MABA y SDS-PAGE desarrollados en el mismo.

Tabla 2.2: Características de los reactivos empleados

Nombre	Formula Molecular	PM (g/mol)	%	ρ (g/cm ³)	Marca
Cloruro de sodio	NaCl	58,44	99	n/a	Riedel de Häen
Nitrato de potasio	KNO ₃	101,1	99	n/a	Cientifica Andina
Fosfato ácido de sodio	Na ₂ HPO ₄	141,96	99	n/a	Scharlau
Fosfato diácido de potasio	KH ₂ PO ₄	136,1	99	n/a	Scharlau
Acido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98,08	97	1,83	Fluka
Ferrocianuro de potasio	K ₄ Fe(CN) ₆	422,39	99	n/a	AnalaR
Hidroquinona	C ₆ H ₆ O ₂	101,1	99	n/a	Sigma Aldrich
Ioduro de potasio	KI	166,00	99	3,123	Fisher Scientific
Acido ferroceno carboxílico	C ₁₁ H ₁₀ FeO ₂	230,04	97	n/a	Lancaster Avocado
Catecol	C ₆ H ₆ O ₂	110,01	98	1,344	BDH Chem.
Quitosano	[C ₆ H ₁₃ NO ₅] _n	medio	n/a	GDA=85 %	Sigma Aldrich
Acido clorhídrico	HCl	36,45	37	1,12	Riedel de Häen
Hidróxido de sodio	NaOH	40	99	n/a	IQE
Biftalato de potasio	C ₈ H ₅ KO ₄	204,22	99	n/a	Sigma Aldrich
Azul Coomassie G-250	C ₄₇ H ₄₉ N ₃ NaO ₇ S ₂	895,97	n/a	n/a	Merck
Acido fosfórico	H ₃ PO ₄	98	85	1,88	Fluka
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	46,07	95	0,789	Sigma Aldrich
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃	105,98	99	n/a	Sigma Aldrich
Sulfato de cobre	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	249,68	99	n/a	Sigma Aldrich
Tartrato de sodio potasio	KNaC ₄ H ₄ O ₆ · 4 H ₂ O	282,1	98	n/a	Sigma Aldrich
Azida de sodio	NaN ₃	65,01	99	n/a	Sigma Aldrich
Folin ciocalteu	n/a	2X	n/a	n/a	Merck
Alúmina	Al ₂ O ₃	101,96	99	3,96	Elchema

2.4. Soluciones

Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada de $17,2 M\Omega - cm$

PBS ELISA pH 7,4 NaCl 130 mM, Na_2HPO_4 5 mM, KH_2PO_4 15 mM

PBS ELISA pH 7,2 NaCl 130 mM, Na_2HPO_4 10,825 mM, KH_2PO_4 9,174 mM

Lavado ELISA pH 7,4 1 % leche descremada en PBS pH 7,4

Lavado ELISA pH 7,2 0,05 % tween 20 en PBS pH 7,2

Bloqueo ELISA 5 % leche descremada en PBS ELISA pH 7,2

Solución Stock Bradford 350 mg de azul de coomassie G-250 en 100 ml de etanol 95 % con 200 mL de ácido fosfórico 85 %

Solución A-Lowry 2 % Na_2CO_3 en NaOH 0,1 M

Solución B1-Lowry 1 % $CuSO_4$

Solución B2-Lowry 2 % $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4 H_2O$

2.5. Técnicas Empleadas

En la preparación de los electrodos se emplean algunas técnicas que permiten modificar la superficie del electrodo que permiten mejorar su respuesta electroquímica y adsorber los componentes del inmunoensayo, estas son:

Activación cronoamperométrica: es un proceso de oxidación de la superficie del electrodo, para los electrodos de grafito, se realiza aplicando un pulso de potencial (1,8 V vs SCE, fig. 2.1a) en medio de ácido sulfúrico por 60 s, este proceso promueve la formación de grupos funcionales que favorecen la respuesta electroquímica de los electrodos, razón por la cual se realiza antes de cada medida electroanalítica. En la fig. 2.1a se puede apreciar la perturbación que se realiza al electrodo durante este experimento electroquímico, que es llamado cronoamperometría, en esta se fija un potencial (E) al electrodo de trabajo por un tiempo determinado y se registra la corriente (i, fig. 2.1b durante todo el proceso, que es proporcional a la concentración de las especies que reaccionan en la superficie electródica, sin embargo, como en el medio empleado no existen especies electroactivas, la carga consumida durante este proceso (definida como $Q = \int_0^t i(t) dt$ [63]) se debe a la oxidación de la superficie (ya que el potencial aplicado es positivo).

Cronopotenciometría (CP): en esta técnica permite estudiar el potencial de una reacción redox que ocurra sobre la superficie del electrodo al aplicar un pulso de corriente (fig. 2.2a) por un tiempo determinado, la respuesta se registra en términos de potencial y tiempo (fig. 2.2b). La aplicación de esta corriente permite establecer la cinética de la reacción redox que ocurre en la superficie del electrodo ya que la corriente en los experimentos electroquímicos son proporcionales, entre otras variables, a la concentración de las especies que reaccionan sobre la superficie. Al aplicar el pulso de corriente se establecen las condiciones cinéticas del sistema, se registra el potencial del electrodo de trabajo que es una medida de la energía del electrodo para la transferencia de electrones. Este tipo de experimentos son útiles debido a que permiten

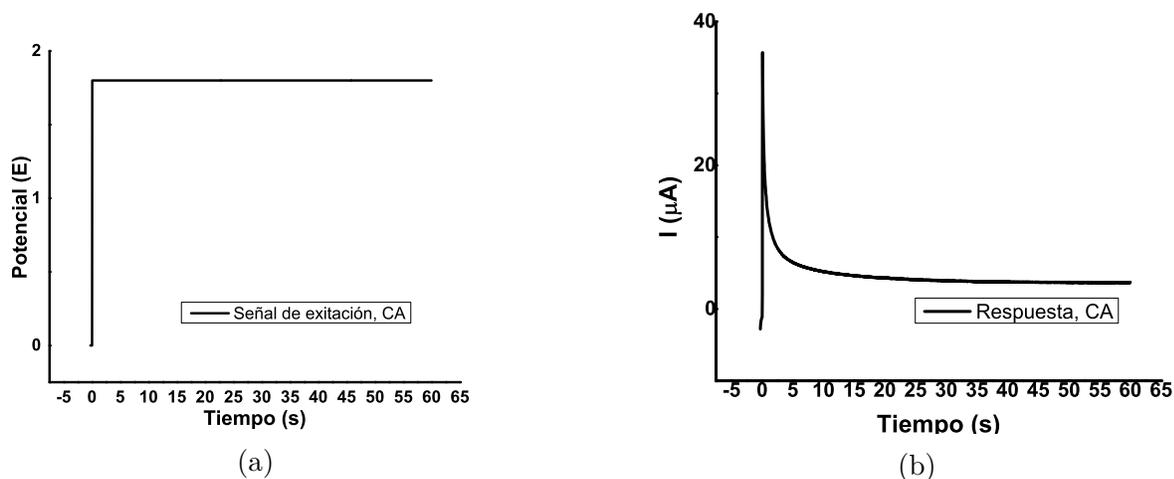


Figura 2.1: 2.1a Perturbación realizada sobre el electrodo mediante experimentos cronoamperométricos. 2.1b Respuesta típica de una perturbación cronoamperométrica.

determinar el potencial al cual ocurre una reacción electroquímica ($O + e^- \longleftrightarrow R$) ya que, los sistemas reversibles satisfacen la ecuación de Nernst [63], que para esta reacción $E = E^0 + \frac{0,059}{n} \log \frac{[R]}{[O]}$. De la ecuación de Nernst se puede concluir, aunque sea una aproximación burda a la dinámica que ocurre en todos los experimentos de CP, que el potencial al cual ocurre una reacción electroquímica es la adición del potencial estandar de reacción (E^0) con un término que depende de la concentración de las especies que reaccionan en la superficie del electrodo; Debido a que en CP se establece la cinética de una reacción electroquímica gracias al pulso en corriente, que insistimos, es proporcional a la concentración de las especies que reaccionan sobre el electrodo, es posible evaluar el potencial de una reacción electroquímica al realizar estos experimentos.

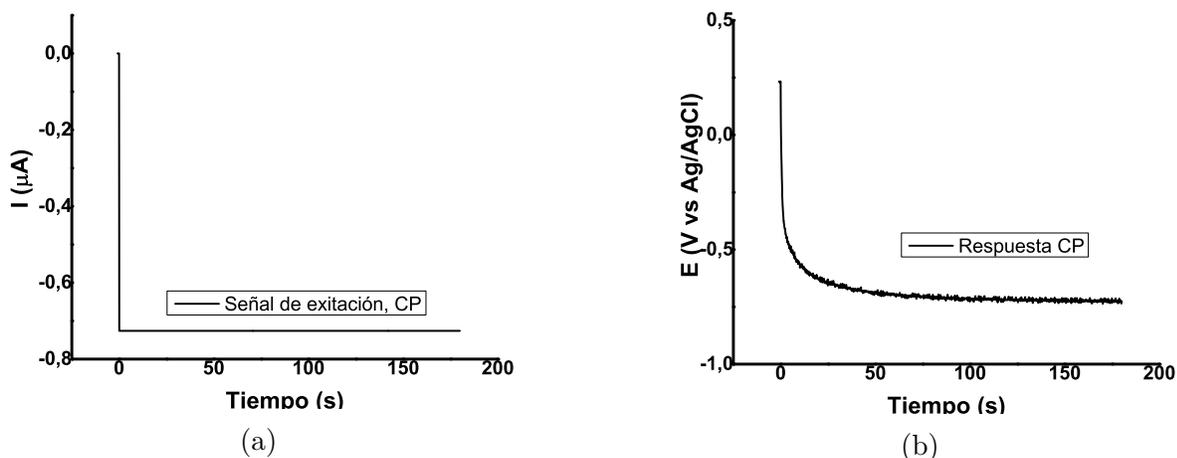


Figura 2.2: 2.2a Perturbación realizada sobre el electrodo mediante experimentos cronopotenciométricos. 2.2b Respuesta típica de una perturbación cronopotenciométrica.

Electrodeposición del quitosano: esta técnica permite formar películas estables de quitosano al aplicar un potencial sobre la superficie del electrodo en un tiempo determinado, las perturbaciones que se realizan sobre el electrodo se llevan a cabo a valores negativos respecto a las que se aprecian en la fig. 2.1a y se registra la corriente generada durante el proceso electroquímico, de forma análoga a la activación de los electrodos sólo que en este caso se

realiza la electrólisis de las soluciones de quitosano ácidas y se forman las películas debido al movimiento electroforético del quitosano (debido a los grupos amino protonados, propiedad que permite su solubilidad en medio acuoso), que migra desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo, donde precipitan debido al aumento localizado del pH que se genera mediante las reacciones de evolución de hidrógeno y electrólisis del agua.

Además de las técnicas empleadas en la modificación de las superficies electródicas, que permiten el ensamblado del inmunoensayo, se requieren algunos métodos para determinar la actividad enzimática de los complejos para poder realizar el diagnóstico de la enfermedad de chagas, existen al menos dos técnicas electroanalíticas útiles para emplear en un ensayo enzimático, ambas son candidatas a ser utilizadas como métodos de diagnóstico debido a su sensibilidad y rapidez, las cuales son:

Cronoamperometría (CA): en esta se fija un potencial al electrodo (E) de trabajo por un tiempo determinado y se registra la corriente (i) durante todo el proceso de forma analoga a las técnicas empleadas en la preparación de los electrodos 2.1, pero en este caso la corriente registrada permite cuantificar uno de los componentes del ensayo enzimático, ya que ella es proporcional a la concentración del componente que reacciona sobre la superficie electródica. Sobre un inmunosensor amperométrico es posible realizar un ensayo inmunológico y determinar la actividad enzimática de los anticuerpos secundarios empleando un mediador y su descomposición se detecta mediante CA. Se puede evaluar la actividad enzimática del complejo de revelado mediante la determinación de uno de sus productos de reacción, de forma análoga al ELISA, ya que requieren del uso de una superficie patrón

Voltametría Cíclica (VC): este método implica variar de manera lineal el potencial del electrodo entre un valor inicial (E_1) y uno secundario (E_2), formando una perturbación $E(t)$ triangular en el tiempo 2.3a. El resultado de esta perturbación se denomina voltampereograma cíclico y se representa como una curva E en función de i (fig. 2.3b). Al realizar una VC es posible observar la presencia de varias especies químicas siempre que sus potenciales de reacción se encuentren entre los potenciales inicial y final escogidos, mediante el análisis de las corrientes en las curvas es posible cuantificar las especies reactivas y evaluar la reversibilidad de un sistema redox, ya que, debido a la naturaleza de la perturbación, es posible controlar el tiempo en el que ocurre la reacción de oxidación y de reducción modificando la pendiente de la perturbación (fig. 2.3a). Un experimento de VC consta de dos barridos, uno positivo donde se observan las reacciones de oxidación y el negativo, donde se observan los procesos de reducción. Para un sistema de transferencia electrónica simple y rápida, se deben observar respuestas como la representada en la fig. 2.4a, donde se pueden determinar los potenciales y corrientes generadas para cada proceso electroquímico, que son parámetros fundamentales para evaluar la reversibilidad de los sistemas electroquímicos. VC permite estudiar la reversibilidad de las reacciones de óxido reducción mediante el análisis de los voltampereogramas y por lo tanto ofrece más información que CA sobre los fenómenos electroquímicos que ocurren en la superficie del electrodo, por esto debería ser empleada en un inmunosensor electroquímico ya que ofrece ventajas como técnica analítica [21, 22, 24, 29, 37, 93, 94].

Además de su potencial de uso en los ensayos enzimáticos, se pueden realizar estudios de VC para estimar la constante de transferencia electrónica, que es un parámetro útil para describir las capacidades catalíticas de un electrodo, ya que modifica la respuesta de un electrodo (fig. 2.4b). Existen métodos semiempíricos, como el de Nicholson, que permiten estimar la constante de transferencia electrónica (k_s) [61, 70, 95], el método consiste en evaluar un parámetro adimensional ($\Psi(\Delta E_p)$) mediante interpolación en una tabla de valores

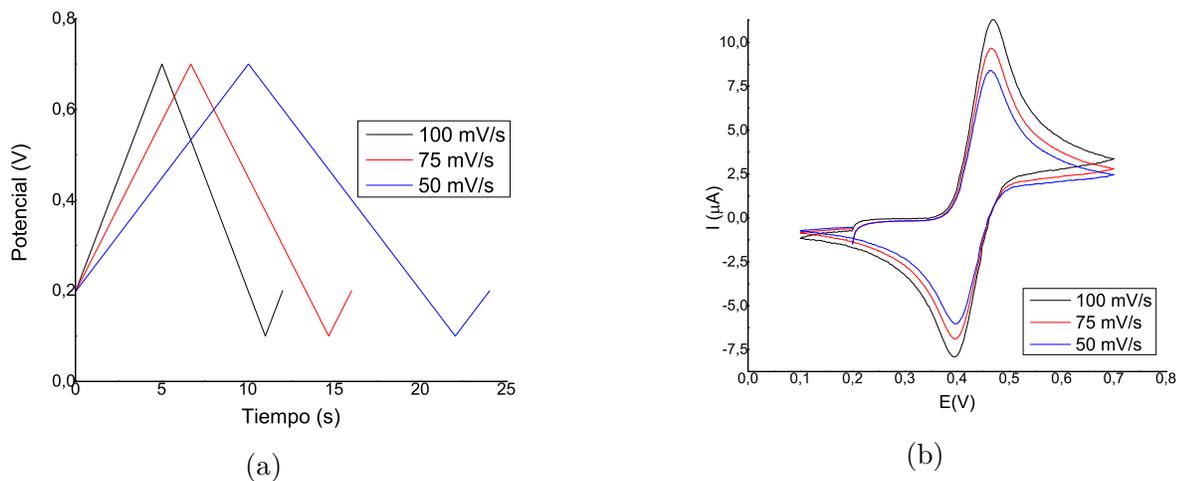


Figura 2.3: Experimento voltamétrico y respuesta típica para un sistema de transferencia electrónica rápida. 2.3a Perturbación realizada sobre el electrodo mediante experimentos voltamétricos. 2.3b Respuesta típica de una perturbación voltamétrica.

y determinar el valor de la constante mediante la relación $\Psi = \frac{\sqrt{\gamma^\alpha * k_s}}{\sqrt{\pi * a * D_o}}$ ($\gamma = \frac{D_o}{D_r}$, donde “D” es el coeficiente de difusión) y $a = \frac{n * F * \nu}{R * T}$ (donde “F” y “R” son las constantes de Faraday y de Gases respectivamente, “T” es la temperatura en Kelvin). Para emplear estos métodos es necesario que el sistema presente una respuesta reversible (fig. 2.4a) y los estudios se realizan a distintas velocidades de barrido para evaluar la cinética bajo distintos intervalos de tiempo.

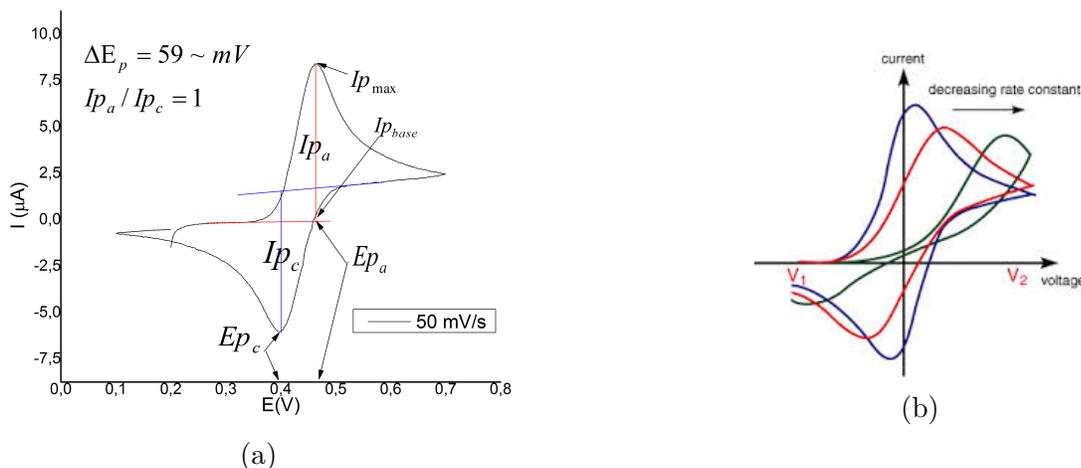


Figura 2.4: Representación de los parámetros de reversibilidad de una respuesta típica para un sistema de transferencia electrónica rápida. ΔE_p es la diferencia de potenciales de oxidación y reducción, I_{pa}/I_{pc} es el cociente de las intensidades de pico para cada pico. 2.4a Representación de algunos parámetros relacionados con la reversibilidad electroquímica mediante experimentos voltamétricos. 2.4b Respuesta voltamétrica para superficies con distintos ordenes de magnitud en ks (tomado de www.ceb.cam.ac.uk).

2.6. Procedimientos Experimentales

2.6.1. Preparación de los electrodos

Los electrodos de trabajo de grafito fueron preparados adaptando la metodología de Morris y col. [57] a partir de barras cilíndricas de grafito que fueron cortadas en secciones de 2,5 cm ($A=0,1734 \text{ mm}^2$) o 4 cm ($A=0,3631 \text{ mm}^2$) cuyo extremo de trabajo fué tratado con resina epoxídica, para impermeabilizar el costado de los mismos.

Estos electrodos fueron lijados con diferentes grados de carburo de silicio hasta la obtención de una superficie uniforme, luego de lo cual fueron pulidos sobre micropaños con alúmina de $1 \mu\text{m}$, $0,3 \mu\text{m}$ y $0,05 \mu\text{m}$ hasta grado espejo.

Los electrodos de pasta de carbono fueron preparados con 2 composiciones distintas, una serie con una composición 2:1 de grafito espectroscópico/nujoll y la otra con una composición 4:1,45:1 de grafito/nujoll/quitosano en escamas (parcialmente disuelto en 2 mL de ácido acético al 1 %).

Las pastas de carbono fueron empacadas en puntas de pipeta desechables de 1 mL cortadas a 1,8 cm de la base y compactadas con un pistón de acero; las conexiones fueron realizadas mediante un alambre de cobre lijado en los extremos y fueron reservados en buffer PBS ELISA pH 7,4 hasta su uso.

En la siguiente tabla se resumen las resistencias asociadas a cada electrodo de pasta de carbón.

Tabla 2.3: Resistencias de los electrodos de pasta de carbono preparados

Electrodo	Grafito/Nujoll (Ω)	Grafito/Quitosano/Nujoll (Ω)
A	0,012	N/C
B	0,110	0,296
C	0,050	N/C

2.6.2. Sistema Electroquímico

Para los experimentos electroquímicos se empleó el mismo sistema que el del inmunosensor desarrollado por Maiz [14], una celda de 1 compartimiento y tres electrodos, como contraelectrodo se empleó una malla de platino contrapuesta al electrodo de trabajo, que fué flameado previo a cada experimento. Como electrodo de referencia se emplearon electrodos de calomelano (SCE) y otro de plata (Ag/AgCl) (en solución de KCl saturado), preparados en el laboratorio y cuyos potenciales fueron verificados versus un electrodo de calomel comercial disponible en el LEQ.

2.6.3. Tratamiento Mecánico de los electrodos de trabajo

Para mejorar la reproducibilidad de las medidas, se adaptó el tratamiento mecánico descrito en la literatura [65, 96], las barras de grafito fueron pulidas sobre micropaños con alúmina de $1 \mu\text{m}$, $0,3 \mu\text{m}$ y $0,05 \mu\text{m}$ hasta grado espejo, luego de lo cual se sonicaron por 30 s en agua desionizada.

Los electrodos de pasta de carbono son pulidos sobre papel de fotografía para renovar la superficie electródica, de acuerdo con lo descrito en la literatura [97–99].

2.6.4. Tratamiento Electroquímico

Luego del tratamiento mecánico, los electrodos de trabajo son tratados electroquímicamente mediante electrólisis a pH ácido para activar catalíticamente las superficies electródicas de forma análoga a lo descrito en la literatura [58, 59].

La activación de las barras de grafito se realiza en el sistema electroquímico descrito anteriormente, realizando la electrólisis de los electrodos en H_2SO_4 1 M por 60 s a 1,8 V (vs SCE).

2.6.5. Voltametrías cíclicas

Las superficies de grafito fueron caracterizadas mediante voltametría cíclica de forma análoga a lo descrito en la literatura [14, 63], empleando cuplas rédox bien conocidas (ferrocianuro de potasio o la hidroquinona) en el sistema electroquímico descrito anteriormente.

La respuesta voltamétrica del grafito fué determinada empleando una solución 5 mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ empleando como electrolito soporte KNO_3 1 M y el buffer ELISA PBS pH 7,4 a velocidades de barrido (ν) 300,250,200,150,75,50,25 y 10 mV/s en una ventana de potencial comprendida entre -600 mV y 800 mV, barrido anódico.

Estos electrodos también fueron caracterizados empleando una solución 10 mM de hidroquinona en H_2SO_4 0,5 M a ν 200,100,75,50,25,10,5 y 1 mV/s en una ventana de potencial comprendida entre los 100 mV y 700 mV, barrido anódico. También se obtuvo la respuesta de la hidroquinona al modificar el medio electrolítico y se determinó 5 mM de hidroquinona en PBS ELISA pH 7,4 empleando las mismas velocidades de barrido en una ventana de potencial comprendida entre los -600 mV y los 800 mV.

Adicionalmente, se estudió la respuesta voltamperométrica del ioduro de potasio, catecol y del ácido ferroceno carboxílico (5 mM) en buffer PBS ELISA pH 7,4 a 50 mV/s en una ventana de potencial comprendida entre los -1 V y 1 V, barrido anódico.

2.6.6. DSC-TG del quitosano

Para determinar el factor de humedad se realizó el estudio de DSC, adaptando el protocolo de Guinesi [76], mediante una termogravimetría acoplado a calorimetría de barrido diferencial que fué realizada en el Laboratorio de Materiales para Tecnologías Emergentes (DITEMA-IVIC). La pastilla introducida al calorímetro pesó 7,4 mg y la rampa de temperatura empleada fué de 0,16477 °C/s.

2.6.7. Determinación del grado de desacetilación (GDA)

El grado de desacetilación del quitosano fué determinado empleando espectroscopía FT-IR y mediante una titulación conductimétrica adaptando el protocolo de Brugnerotto [86].

Para obtener el espectro infrarrojo, la muestra se incorporó en una pastilla de KBr que fué preparada pesando 3 mg de quitosano con 60 mg de la sal. Esta mezcla fué triturada en un mortero por 10 minutos y compactada en una prensa, luego de lo cual se procedió a secarla en una estufa a 80 °C por 20 h. De forma paralela se preparó una pastilla de 60 mg de KBr sin quitosano para

evaluar el blanco en un Espectrómetro FT-IR Spectrum RX-1.

Para la determinación del GDA por conductimetría se adaptaron los protocolos descritos en la literatura [75, 77], se emplearon 100 mL de NaOH 0,02 M (valorada con biftalato de potasio 0,014 N) y 50 mL de una solución 0,036 N de HCl, la solución de quitosano se preparó tomando 30 mL de la solución de HCl en la que se disolvió 80 mg de quitosano hasta un volumen final de 50 mL (agua desionizada).

La solución de NaOH se valoró empleando biftalato como patrón primario, para esto se dispuso de alícuotas de 15 mL de biftalato de potasio (patrón primario) en una fiola a la cual se le agregaron volúmenes de 500 μ L de NaOH. Las mediciones fueron realizadas luego de 30 s de haber agregado la base al patrón primario con un pH metro que fué calibrado el mismo día de su uso mediante soluciones tamponadas patrón de pH 3, 7 y 11.

La determinación del GDA del quitosano se realizó empleando alícuotas de 10 mL de la solución de quitosano ácida dispuesta en un cilindro en agitación, a cada alícuota se le agregan volúmenes de 500 μ L de NaOH. Las mediciones se realizaron luego de 5 min de haber agregado la base a la solución con un conductímetro que fué calibrado el mismo día de su uso mediante soluciones patrón de 1413 μ S/cm, 147 μ S/cm y 12.88 mS/cm.

2.6.8. Determinación del potencial de deposición de las películas de quitosano

La deposición se llevó a cabo adaptando el método de Cheng [92], mediante un pulso de corriente de 200 μ A/cm² por 3 min sobre electrodos de grafito activados y sin activar en una solución de quitosano al 1 % en solución de ácido acético glacial al 1 %, luego de la deposición, los electrodos fueron lavados con 10 volúmenes de 100 μ L de tampón ELISA pH 7,4 y reservados en 300 μ L del mismo hasta su uso.

Los electrodos así modificados fueron caracterizados mediante la respuesta del ferrocianuro por voltametría cíclica en una ventana de potencial entre -500 mV y 800 mV a 50 mV/s en tampón ELISA pH 7,4.

2.6.9. Deposición de las películas de quitosano

Para preparar estas películas sobre las superficies de grafito se adaptaron los protocolos descritos en la literatura para las otras superficies [87, 88, 90], se empleó la solución al 1 % de quitosano en ácido acético glacial al 1 % previamente preparada.

Las películas de quitosano fueron electrodepositadas sobre superficies de grafito tratadas mecánicamente mediante electrólisis de la solución de quitosano en tiempos de 10, 20 y 30 minutos a un potencial de -1,25 V (vs SCE), luego de la deposición los electrodos fueron lavados con 10 volúmenes de 100 μ L de tampón ELISA pH 7,4 y reservados en 300 μ L del mismo hasta su uso.

Los electrodos modificados fueron evaluados por voltametría cíclica empleando ferrocianuro de potasio e hidroquinona, para ello se determinó la respuesta de estas especies en una ventana de potencial entre -500 mV y 800 mV a 50 mV/s en tampón ELISA pH 7,4. Una vez finalizadas las

experiencias los electrodos fueron lavados con 10 volúmenes de 100 μL del tampón y se evaluó la respuesta del tampón en las mismas condiciones para evaluar la retención de las especies sobre las películas de quitosano.

2.6.10. Ensayos Colorimétricos

Las determinaciones de las concentraciones de proteína se realizaron mediante ensayos colorimétricos comunes para los laboratorios de biología molecular como lo son el método de Lowry y el método de Bradford, los protocolos que fueron empleados en estas determinaciones fueron adaptados del trabajo de Sapan y col. [100].

Método de Lowry

Para generar el complejo de cobre se tomó 1 mL de la solución B1, 1 mL de la B2 y se mezclan con 98 mL de la solución A.

Para estimar la concentración de proteínas se empleó una curva de calibración con patrón de albúmina de suero bovino (BSA) de 10 a 50 μg .

El ensayo colorimétrico fué realizado diluyendo las alícuotas de proteína a 600 μL con agua desionizada, a estas se agregaron 3 mL del complejo de cobre y se dejó reposar la mezcla por 10 min a temperatura ambiente refugiado de la luz. Luego de la incubación se agregaron 300 μL del reactivo de folín diluido al 50 % en agua, se agitó e incubó la mezcla por 30 minutos adicionales refugiado de la luz y finalmente se determinó la absorbancia a 600 nm.

Método de Bradford

Para preparar la solución de trabajo se filtraron 40 mL de solución stock Bradford en papel Whatman #1, se tomaron 30 mL del filtrado y se mezcló con 15 ml de etanol 95 % y 30 ml de ácido fosfórico 85 % en agitación, finalmente la mezcla se llevó a 500 mL con agua desionizada y se guardó en un frasco ambar previo a su uso.

Para estimar la concentración de proteína de las alícuotas se empleó una curva de calibración usando albúmina de suero bovino como patrón en el rango de 10 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El ensayo colorimétrico se realizó tomando 100 μL de alícuotas de proteína, se agregaron 700 μL de tampón ELISA pH 7,4 y 200 μL de la solución de trabajo, se agitó la mezcla y determinó su absorbancia a 595 nm.

2.6.11. Adsorción de la Pgr24 sobre quitosano

La capacidad de adsorción de las películas depositadas fué evaluada mediante la exposición de las mismas a soluciones del antígeno.

Se dispuso de dos alícuotas de 1.5 mL de PGR₂₄ (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que se introdujeron en dos tubos falcon de 15 mL, de forma paralela se prepararon dos electrodos con películas de 10 y 30 min que se sumergieron en los tubos con el antígeno por una hora. Cada quince minutos se tomó una alícuota de 200 μL del sobrenadante para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry.

Adicionalmente se prepararon películas de 10, 20 y 30 min sobre electrodos de grafito que se introdujeron en tres tubos falcon, en ellos se dispuso alícuotas de 1,2 mL de PGR₂₄ que se sumergieron en los tubos con el antígeno por una hora. Para la película de diez minutos se tomaron alícuotas a los 10, 15, 20, 25, 30 y 40 min mientras que para las otras películas se tomaron cada 10 min.

2.6.12. Reactivos Inmunológicos

Los reactivos fueron proporcionados por el laboratorio de enzimología de parásitos y se emplearon sin purificaciones adicionales a las establecidas en dicho laboratorio. Como antígeno fuimos suministrados con un stock del antígeno Pgr₂₄ de 31 kDa con una concentración de 200 µg/mL, también obtuvimos dos sueros confirmados chagásicos, uno confirmado no chagásico y un suero anti-Pgr₂₄ de conejo para realizar los diversos ensayos. En todos los casos la etapa de revelado se realizó con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, cuya actividad fue evaluada antes de cada ensayo empleando TMB y H₂O₂, evaluando el viraje del color de la solución. Adicionalmente, el LEP proporcionó alícuotas de HRP puras para evaluar la respuesta del sistema reportero.

2.6.13. Inmunoensayos Electroquímicos

Los inmunosensores fueron construidos sobre superficies de grafito tratadas mecánicamente con películas de quitosano de 10, 20 y 30 min, los electodos se sumergieron en 200 µL de Pgr₂₄ (200 µg/mL) por 30 min luego de lo cual se lavaron con tampón ELISA pH 7,4. En una segunda etapa los electodos fueron incubados en la solución de bloqueo ELISA pH 7,4 por 30 min para restringir los sitios libres dentro de la película de quitosano y se lavaron con la solución de lavado ELISA pH 7,4, posteriormente estos electodos fueron incubados en una dilución 1/10 de los sueros proporcionados por el LEQ (“X1,X2” chagásicos, “L” no chagásico y anti-Pgr₂₄ por 40 min. Finalizada esta etapa los electodos fueron lavados con la solución de lavado ELISA pH 7,4 luego de lo cual se revelan las IgG inmovilizadas, incubando finalmente los electodos con una dilución 1/1000 de anti-IgG humanas conjugados a HRP por 40 min (para el suero anti-Pgr₂₄ se emplearon anti-IgG de conejo conjugados a HRP).

Cada etapa en la construcción del inmunosensor fue caracterizada por voltametría cíclica empleando soluciones de hidroquinona 5 mM en tampón ELISA pH 7,4 en una ventana de potencial entre -600 mV y 800 mV a 50 mV/s.

Adicionalmente se prepararon inmunosensores construidos sobre superficies de grafito tratadas mecánicamente con películas de quitosano de 30 min, estos electodos modificados fueron sumergidos por 30 min en diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 de anticuerpos conjugados a peroxidasa en PBS ELISA pH 7,4 para evaluar la actividad de la peroxidasa sobre los electodos.

La actividad enzimática de la peroxidasa fue evaluada por voltametría cíclica en una solución 5 mM de hidroquinona en tampón ELISA pH 7,4 suplementada con 0,1 mM, 1 mM y 10 mM de H₂O₂ en una ventana de potencial entre -600 mV y 800 mV a 50 mV/s.

La actividad enzimática de la peroxidasa también fue evaluada por voltametría cíclica en soluciones 5 mM de yoduro de potasio, 5 mM catecol y 3 mM de ácido ferroceno carboxílico en tampón ELISA pH 7,4 suplementada con 10 mM de H₂O₂ en una ventana de potencial entre -1 V y 1,4 V (vs SCE) a 50 mV/s.

Caracterización Electroquímica de las Superficies de Carbono

En la literatura se ha reportado que los electrodos de grafito presentan diferencias en cuanto a la transferencia electrónica incluso para aquellos fabricados por un mismo manufactor, por esta razón nos vimos en la necesidad de caracterizar la respuesta voltamétrica de nuestras superficies y compararlas con las reportadas para carbón vítreo y otras superficies metálicas, por lo cual se emplearon sistemas ampliamente estudiados como el ferrocianuro de potasio o la hidroquinona en distintos medios, para el primero se ha reportado [64, 101] una respuesta reversible sobre electrodos metálicos, la cupla quinona-hidroquinona por su parte es uno de los pocos sistemas orgánicos para los que se ha reportado [66, 67, 102–105] una respuesta reversible en algunos medios y se ha demostrado que es un mediador electrónico efectivo para la HRP, que es la enzima reportera del ensayo ELISA empleado en el diagnóstico de diversas enfermedades mediante sueros de pacientes, incluida la enfermedad de Chagas [21, 22, 24, 29, 37, 93, 94].

3.1. Electrodos de Pasta de Carbono

Con miras a evaluar superficies de carbono alternas a las barras de grafito se estudiaron varias composiciones de electrodos de pasta de carbón, los cuales fueron preparados a partir de grafito espectroscópico (sec. 2.6.1), la respuesta voltamperométrica de estos electrodos en medio de buffer ELISA pH 7,5 se puede apreciar en la figura 3.1a, de la misma se puede destacar que la respuesta difiere significativamente para cada electrodo a pesar de que fueran construidos bajo las mismas condiciones, lo que sugiere que la mezcla de pasta de carbono no fué homogénea. En la figura 3.1b se puede apreciar la respuesta voltamétrica que presentaron estos electrodos frente a soluciones de hidroquinona en medio buffer PBS ELISA pH 7,4; De la misma se puede destacar que a pesar de que los electrodos tuvieran la misma composición química, presentan respuestas diferentes para los procesos de oxidación y reducción debido a que la diferencia de potenciales de pico difiere para cada electrodo, estos resultados sugieren que la TE de la pasta de carbono difiere dentro de los electrodos fabricados, ya que este parámetro está relacionado con la diferencia de los potenciales de pico para los procesos de oxidación y reducción de un electrodo (fig.2.4a).

Estos resultados se podrían explicar al observar las propiedades físicas que describieron los electrodos de pasta de carbono (grafito/nujoll) (sec. 2.6.1), ya que en la tabla 2.3 se pueden apreciar las resistencias que presentaron estos electrodos y se destaca que la misma difiere para cada uno, lo que sugiere que su preparación no fué la adecuada.

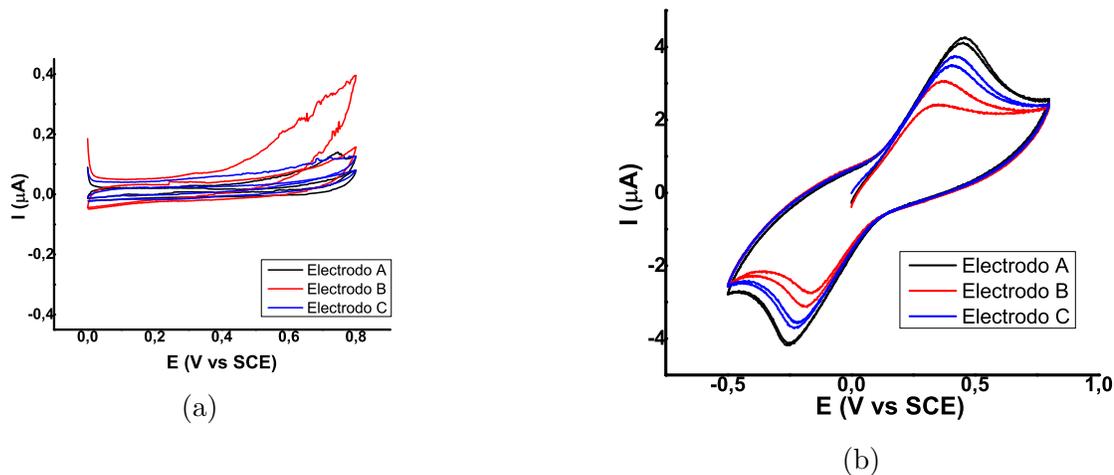


Figura 3.1: Respuesta voltamperométrica de los electrodos de pasta de carbon (grafito/nujoll) en medio buffer PBS ELISA pH 7,4 a 50 mV/s. 3.1a Ventanas de potencial del medio de potencial con distintos electrodos de pasta de carbon (grafito/nujoll), 3.1b Voltametría cíclica de soluciones de hidroquinona 5 mM con distintos electrodos de pasta de carbon (grafito/nujoll)

En cuanto a los electrodos de pasta de carbono modificados con quitosano, no se pudo obtener la estabilidad mecánica necesaria para obtener medidas reproducibles mediante voltametría cíclica, al observar la tabla 2.3 se puede apreciar que de los tres electrodos preparados, solo uno presentó una resistencia adecuada. En la figura 3.2 se puede apreciar la respuesta del electrodo B de pasta de carbono (grafito/nujoll/quitosano) en una solución de hidroquinona 5 mM en medio buffer PBS ELISA pH 7,4 0,5 M a 50 mV/s, de la misma se puede apreciar que la respuesta voltamétrica del electrodo se asemeja a las descritas en la sección 2.5 para sistemas de TE simple y rápida, sin embargo, los ΔE_p para este proceso son mucho mayores que el límite descrito para la reversibilidad ($\simeq 59$ mV/n) lo que sugiere que la TE para esta composición es bastante pobre, incluso para este sistema (hidroquinona) que se ha descrito de TE rápida y reversible [99].

En vista de la baja reproducibilidad de estos estudios preliminares sobre electrodos de pasta de carbono, se continuó con la investigación de las otras superficies de grafito para la construcción del inmunosensor. Queda mencionar que, a pesar de estos resultados, la posibilidad de fabricar inmunosensores sobre superficies de pasta de carbono podría disminuir el costo del método de diagnóstico respecto a los descritos en la literatura, por lo que se debería continuar con su aplicación en futuras investigaciones mejorando el método de fabricación.

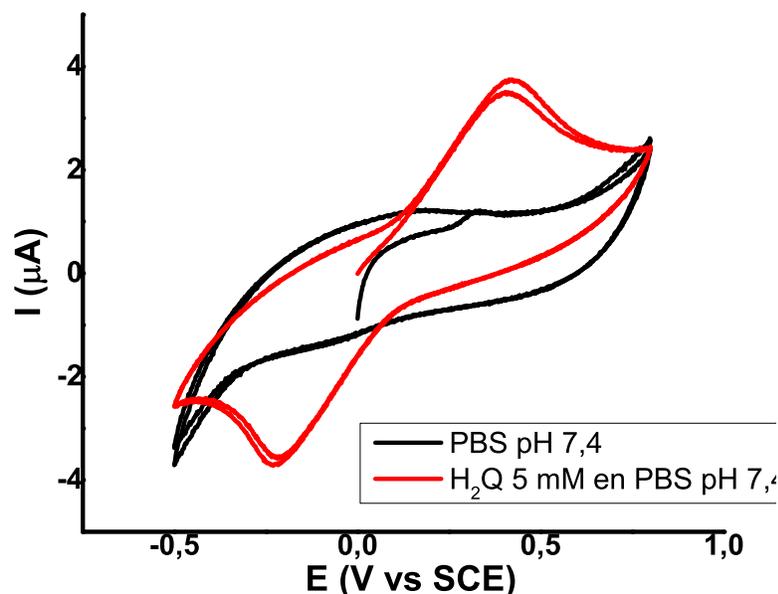


Figura 3.2: Respuesta voltamétrica del electrodo de pasta de carbono (grafito/mujoll/quitosano) en una solución de hidroquinona 5 mM en medio buffer PBS ELISA pH 7,4 0,5 M a 50 mV/s

3.2. Electrodo de Grafito

En la figura 3.3 se muestra la respuesta voltamétrica del ferrocianuro de potasio en nitrato de potasio como electrolito soporte sobre los electrodos de grafito (barra), se aprecia un pico de reducción a 200 mV y otro de oxidación a 300 mV vs Ag/AgCl característicos de la reacción reversible $\text{Fe}(\text{CN})_6^{+2} \longleftrightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{+3} + e^-$, similares a los reportados por Tanimoto y col. [101] donde se observan dos picos similares en su respuesta voltamétrica. De esta figura se aprecia un aumento en la diferencia de los potenciales de pico conforme aumenta la velocidad de barrido (fig. 3.4a), lo que confirma la pseudoreversibilidad de la respuesta sobre grafito ya que de ser reversibles los ΔE_p se encontrarían sobre la traza (línea negra) de referencia a 60 mV y no se modificarían al variar la velocidad de barrido, por otra parte, el cociente de las corrientes de pico (fig. 3.4b) se aproxima a la unidad para estas perturbaciones, que concuerda con lo descrito para estos sistemas [63, 65, 106].

Al comparar detalladamente la diferencia de potenciales de pico (fig 3.4a) para nuestra superficie respecto a las reportadas en carbón vítreo [14] se destaca que la superficie de grafito muestra una menor actividad electroquímica que las de carbón vítreo, dada su mayor separación de la traza de referencia. Este valor fué determinado para las superficies de carbón vítreo en un sistema de ferrocianuro de potasio en medio de ácido sulfúrico como electrolito soporte y se mantiene estable para velocidades de barrido inferiores a los 100 mV/s, lo que es característico de sistemas reversibles [63], para las superficies de grafito esta diferencia de potenciales de pico nunca se estabiliza en las mismas condiciones lo que concuerda con lo reportado para TE pseudoreversible [62, 63, 106], este fenómeno se puede atribuir a las diferencias en las constantes de transferencia para cada superficie ya que este parámetro tiene una influencia directa en la respuesta voltamétrica, como mencionado en la sec. 2.5.

En vista de que el sistema ferrocianuro de potasio en nitrato de potasio mostró una cinética de TE pseudoreversible, se empleó el método de Nicholson para estimar la constante de transferencia electrónica [61, 70, 95], lo que consistió en evaluar el parámetro adimensional ($\Psi(\Delta E_p)$) y determi-

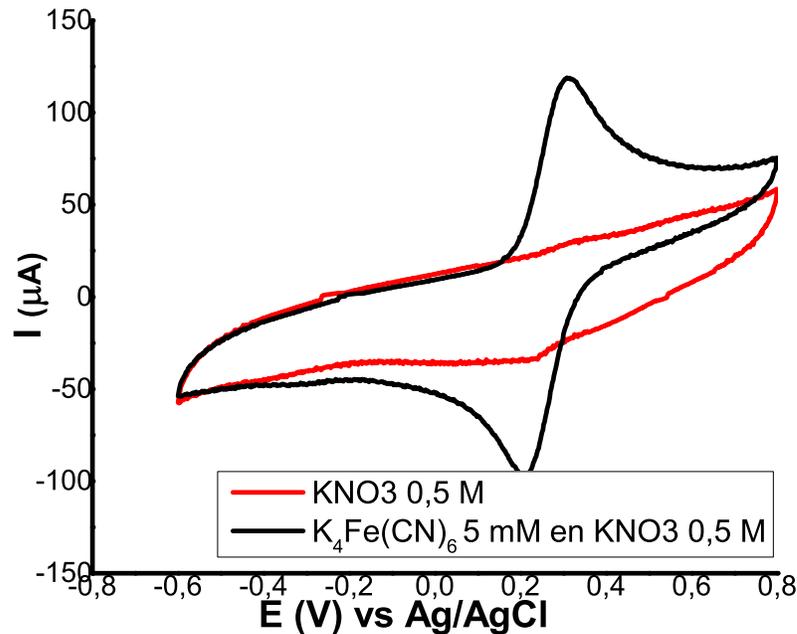


Figura 3.3: Respuesta voltamétrica de la superficie de grafito en una solución de ferrocianuro de potasio 5 mM en nitrato de potasio 0,5 M a 50 mV/s

nar el valor de la constante mediante la relación $\Psi = \frac{\sqrt{\gamma}^\alpha * ks}{\sqrt{\pi * a * D_o}}$ (sec. 2.5). Empleando el coeficiente de difusión de Tanimoto y col. [101] ($D_o = D_r = 7,63 * 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$), la constante de transferencia sobre superficies de grafito tuvo un valor de $ks_{\text{Grafito}} = 5,4 * 10^{-3} \text{ cm}/\text{s}$ mientras que para el carbón vítreo $ks_{\text{Carbon Vítreo}} = 5,1 * 10^{-2} \text{ cm}/\text{s}$, este orden de magnitud de diferencia confirma, conforme a lo reportado en la literatura [60, 107], que la transferencia electrónica es superior sobre superficies de carbón vítreo respecto a las de grafito a pesar de que ambas sean de carbono.

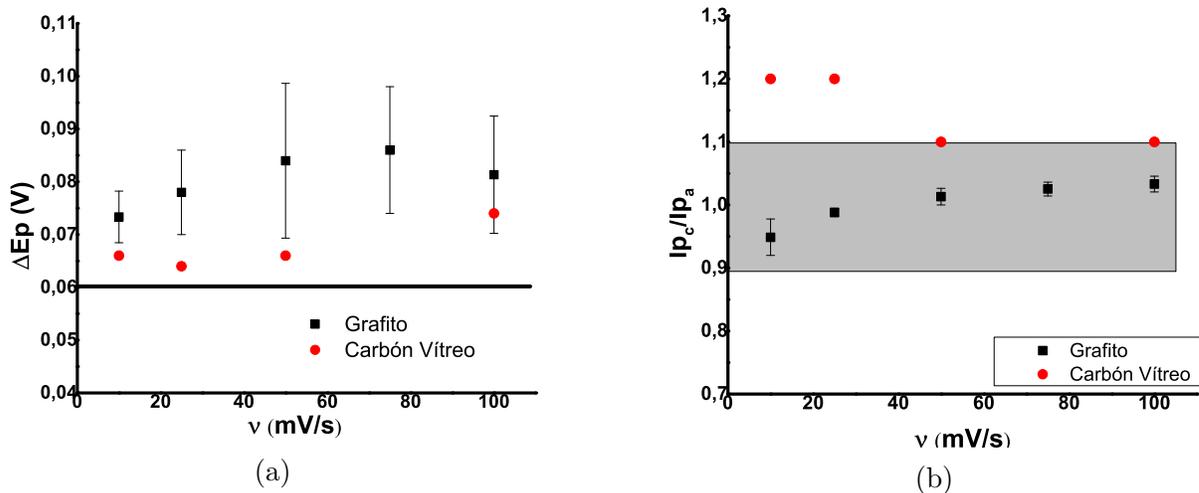


Figura 3.4: Representación de algunos parámetros que permiten evaluar la reversibilidad electroquímica de las superficies de grafito para la respuesta voltamperométrica del ferrocianuro de potasio en nitrato de potasio. 3.4a Diferencia de potenciales de pico a diferentes velocidades de barrido, 3.4b cociente de las intensidades de pico a diferentes velocidades de barrido

Con miras a explorar algunas acciones para mejorar la TE en las superficies de grafito se procedió a evaluar el efecto de la activación de los electrodos mediante la electrólisis ácida descrita en la

sec 2.6.4, la cual fué evaluada sobre la respuesta voltamperométrica de una solución de $K_4Fe(CN)_6$, al analizar estas respuestas no se observaron mejoras significativas hacia la TE ya que la diferencia de los potenciales de pico son comparables para los electrodos tratados mecánicamente. Sin embargo, este tratamiento mejora la reproducibilidad de las medidas, lo que se refleja en una disminución en las barras de error asociadas a las medidas de ΔE_p a bajas velocidades de barrido, este fenomeno concuerda con lo reportado en la literatura [57, 58] lo cual podría ser atribuido a que la transferencia electrónica sobre superficies de grafito depende de la composición del grafito y poco sobre el tratamiento químico o electroquímico de la superficie, sin embargo, debido a la naturaleza del proceso de activación (sec. 2.5), se puede deber a la presencia de grupos funcionales presentes en la superficie electródica antes que lo mencionado respecto a la composición del grafito.

Adicionalmente se evaluó la respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona ya que se ha reportado como un mediador efectivo para la transferencia electrónica de la HRP, el mecanismo de TE de esta molécula ha sido ampliamente estudiada y se ha reportado que, en medio ácido, sufre una reacción reversible con transferencia de 2 electrones y 2 protones para formar quinona (fig. 3.5) [105].

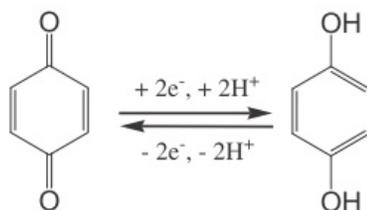


Figura 3.5: Reducción reversible de quinonas en medio ácido.

En la fig 3.6a se contrasta la respuesta voltamétrica de los electrodos de grafito activados y sin activar para una solución 10 mM de hidroquinona en ácido sulfúrico 0,5 M donde se puede apreciar un pico de oxidación en 450 mV para el electrodo activado y de 550 mV para el tratado mecánicamente, de forma análoga los picos de reducción se encuentran en 300 y 400 mV todos los potenciales referidos al de calomelano (vs SCE), lo que se compara con la de la fig. 2.4b donde se muestran resultados con superficies de distintos valores de ks . Debido a que la constante de transferencia electrónica es proporcional a esta diferencia de potenciales, es evidente que el tratamiento electroquímico mejora significativamente este parámetro, lo que concuerda con lo que se ha reportado en la literatura [59], donde los autores sugirieron que el tratamiento oxidativo requerido para la activación, modifica la química superficial del electrodo al oxidar los grupos funcionales expuestos en la superficie luego del tratamiento mecánico. Nuestros resultados sugieren que la TE de la hidroquinona sobre electrodos de grafito depende de su tratamiento electroquímico, que podría inducir la generación de una mayor proporción de grupos oxidados respecto a los electrodos tratados mecánicamente.

El efecto de la activación sobre la respuesta de la hidroquinona para los electrodos de grafito se evidencia en la figura 3.7a, donde se observa la diferencia de los potenciales de pico para este sistema a diferentes velocidades de barrido para electrodos tratados mecánicamente y activados. El aumento del ΔE_p para los electrodos sin activar respecto a los activados para velocidades de barridos idénticas confirman que el tratamiento electroquímico mejora la respuesta voltamétrica de los electrodos mediante una disminución de la diferencia de los potenciales de pico, sin embargo, para los electrodos tratados mecánicamente la ks no pudo ser calculada mediante el método de

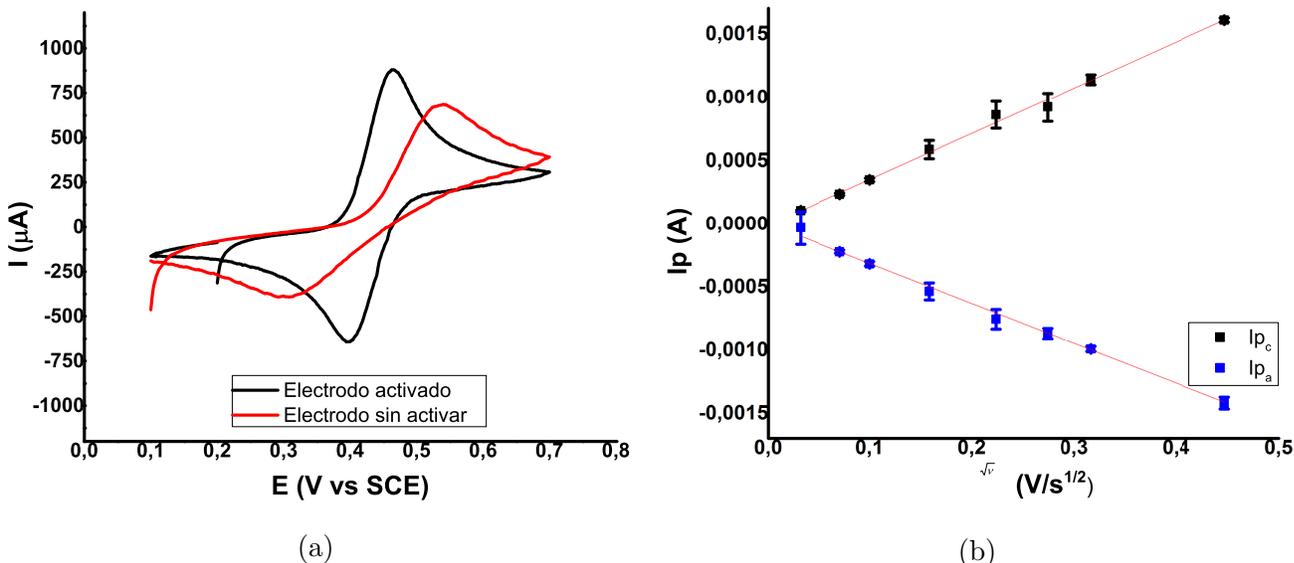


Figura 3.6: Voltametría Cíclica de la hidroquinona en ácido sulfúrico. 3.6a Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M a 50 mV/s para electrodos activados y sin activar, 3.6b Intensidad de picos en función del cuadrado de la velocidad de barrido para electrodos de grafito activados

Nicholson [62] debido a que el sistema se aproxima a la irreversibilidad, lo cual arroja valores de constante de transferencia electrónica negativos.

La dependencia lineal de las intensidades de pico para la voltametría cíclica de la hidroquinona en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido es característica de un proceso electroquímico de TE rápida y reversible controlada difusionalmente siguiendo la relación $|I_p| = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} AC_o^* \sqrt{D_{r/o} \nu}$. A partir de las pendientes obtenidas de los picos de oxidación ($m = 0,00361$) y reducción ($m = -0,00316$) es posible determinar el coeficiente de difusión para cada especie, el cual tuvo un valor de $2,23 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ para la quinona y de $1,75 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ para la hidroquinona lo que difiere en dos ordenes de magnitud a los reportados en la literatura para electrodos de pasta de carbono [99] ($D_o = 5,05 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$), sin embargo este fue determinado en Buffer PBS pH 7.

Al detallar los parámetros que permiten evaluar la reversibilidad electroquímica de esta molécula, se destaca que el cociente de las intensidades de pico (fig. 3.7b) no se encuentran exactamente en la unidad, además, los ΔE_p (fig. 3.7a) se encuentran por encima del valor reportado para transferencia de dos electrones reversible (29,5 mV) y son proporcionales a la velocidad de barrido para las superficies activadas, lo cual es característico de sistemas pseudoreversibles [63]. Estas propiedades del sistema permitieron el cálculo de la constante de transferencia electrónica para los electrodos de grafito activados ($ks_{\text{Grafito}} = 1,95 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$) el cual también fue realizado para las respuestas de la hidroquinona en ácido sulfúrico 1 M reportadas por Maiz [14], sobre electrodos de carbón vítreo anodizados ($ks_{\text{CV-MAIZ}} = 7,82 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$). La diferencia entre ambas constantes es de un factor de 4 lo que corrobora que la TE sobre las superficies de carbón vítreo es superior a las de grafito a pesar de que estén constituidas de carbono, además, nuestros resultados sugieren que los electrodos de grafito son sensibles al tratamiento electroquímico ya que, para este sistema, la TE varía desde irreversible a pseudoreversible al realizar la activación de los electrodos de grafito tratados mecánicamente, lo cual implica una mejor respuesta para los electrodos activados.

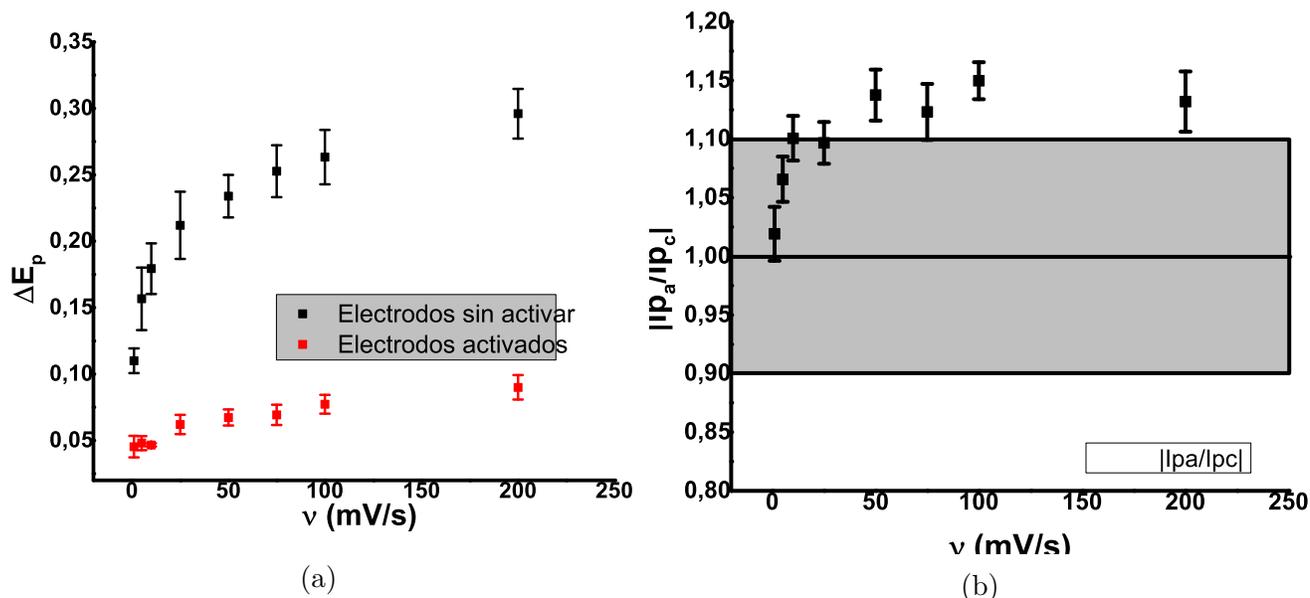


Figura 3.7: Representación de algunos parámetros que permiten evaluar la reversibilidad electroquímica de las superficies de grafito para la respuesta voltamperométrica de la hidroquinona en ácido sulfúrico. 3.7a Diferencia de potenciales de pico a diferentes velocidades de barrido, 3.7b cociente de las intensidades de pico a diferentes velocidades de barrido

Del análisis de los resultados presentados para las diferentes superficies electródica se puede concluir que los electrodos de grafito empleados tienen respuestas adecuadas para aplicaciones analíticas y la construcción del inmunosensor a pesar de que su capacidad de transferencia electrónica sea menor a la reportada sobre carbon vítreo, la activación electroquímica de las superficies mejora la reversibilidad y reproducibilidad de las respuestas del ferrocianuro de potasio y la hidroquinona lo cual podría ser atribuido a la presencia de grupos funcionales en la superficie de los electrodos.

3.3. Estudios voltamétricos de mediadores electroquímicos sobre superficies de grafito

En la figura 3.8 se aprecia el esquema del inmunocomplejo de revelado que se ha propuesto ensamblar sobre la superficie electródica junto con el mecanismo de TE para la HRP, la base del diagnóstico de la enfermedad de Chagas es evaluar la presencia de las IgG anti humanas empleando la actividad enzimática de la peroxidasa conjugada a los anticuerpos secundarios. En un ensayo electroquímico típico, es de esperarse observar el cambio en el perfil de concentraciones del mediador, debido a la transferencia de electrones del peróxido de hidrógeno en el centro activo de la enzima, ya que allí ocurre la descomposición enzimática del peróxido y se oxida la hidroquinona libre en solución formando quinona, lo que se puede observar mediante voltametría cíclica.

Como el mediador es la molécula que permite evaluar la actividad enzimática se ha propuesto su uso para monitorizar el ensayo inmunológico, en vista de que el inmunosensor desarrollado en el LEQ empleó hidroquinona se continuó con su uso, sin embargo en condiciones que permitieran realizar el ensayo inmunológico como el medio buffer PBS ELISA pH 7,4, se ha reportado [105] que el mecanismo de TE de la hidroquinona en medios acuosos a pH moderado o altos presenta

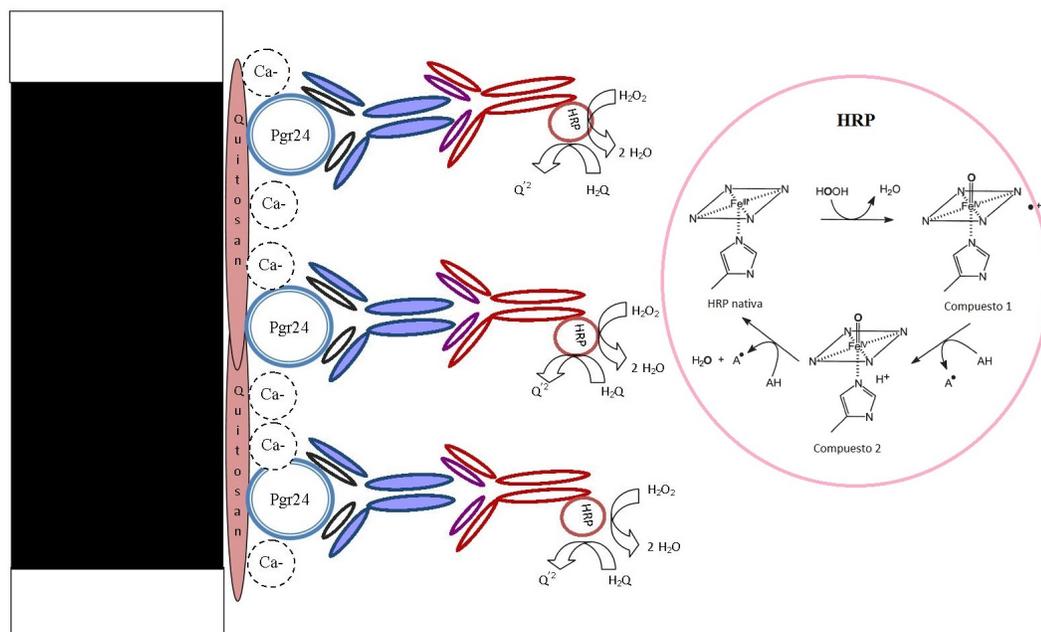


Figura 3.8: Esquema del inmunocomplejo de revelado y mecanismo de TE

dos procesos de transferencia electrónica y dos protonaciones de la siguientes forma:



En medio ácido y acuoso, las reacciones de protonación ocurren tan rápido que se observa la respuesta de la figura 3.6 donde ocurre la transferencia de dos electrones con dos protones en una etapa, a pH alcalino se ha reportado que la hidroquinona no sufre protonación por lo que la quinona sufre una reducción en una etapa de dos electrones [102]. A pH moderados en medios tamponados el mecanismo es mixto ya que la TE puede ir por la vía de la transferencia de dos electrones y un proton o vice versa dependiendo de las condiciones del medio, en vista de que el mecanismo de TE de la hidroquinona es químico y electroquímico fué necesario conocer la respuesta del mediador en unas condiciones que permitan el soporte y formación de los distintos elementos del inmunoensayo.

En la figura 3.9a se observa la respuesta voltamperométrica de la hidroquinona en buffer ELISA pH 7,4, en la misma se pueden apreciar dos procesos diferenciados para esta molécula. En primer lugar hay un pico de oxidación a 250 mV (vs SCE) acoplado a uno de reducción a -40 mV (vs SCE) que se puede asociar a la oxidación y reducción de la hidroquinona con la transferencia de un electrón, a potenciales catódicos aparece un segundo pico de baja intensidad a 460 mV (vs SCE) acoplado a un hombro en 350 mV (vs SCE) que se puede asignar a la formación de un radical quinónico que se encuentra en una proporción relativamente baja comparando las corrientes a las del primer pico. En la figura 3.9b se pueden observar las diferencias de los potenciales de pico para los distintos barridos voltamétricos, se puede apreciar que ninguno de estos parámetros se encuentra cerca del límite de reversibilidad (59 mV) lo que confirma la dificultad en la transferencia electrónica de esta molécula sobre estas superficies en este medio.

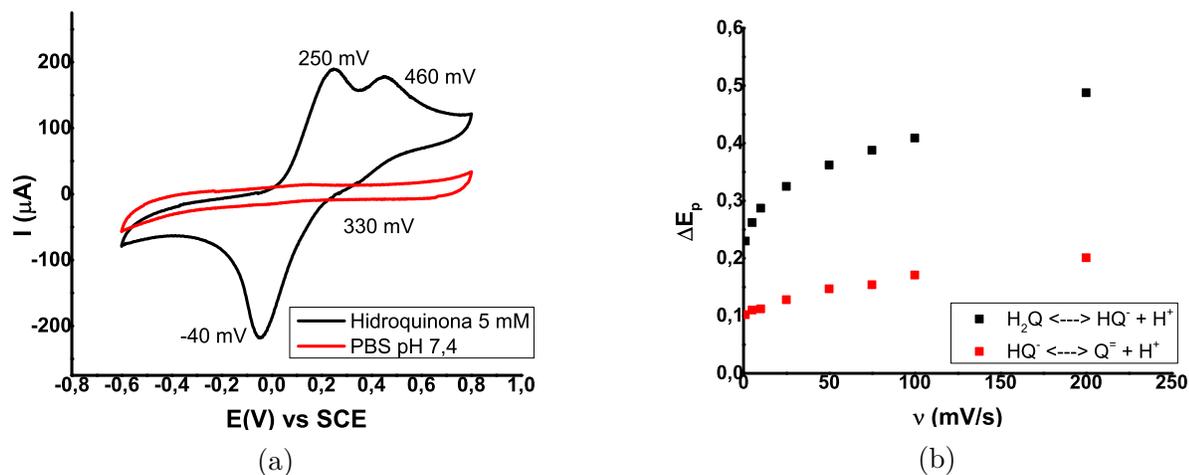


Figura 3.9: 3.9a Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS pH 7,4 con electrodos de grafito tratados mecánicamente. 3.9b Diferencia de potenciales de pico para la respuesta de la hidroquinona a diferentes velocidades de barrido

Se evaluó la reactividad química cruzada empleando un sistema análogo a la solución de revelado enzimático pero con electrodos desnudos, en la misma se dispusieron de alícuotas de H_2O_2 (100 μM , 1 mM, 10 mM y 100 mM) y se realizaron voltametrías cíclicas para evaluar la interacción entre el peróxido y la hidroquinona. En la figura 3.10 se puede apreciar la respuesta voltamperométrica de la hidroquinona suplementada con 100 mM de H_2O_2 , en la misma se observa una disminución en las corrientes de todos los picos, lo que sugiere la descomposición del mediador a partir de esta concentración límite. En base a estas características se empleó como valor límite para el ensayo enzimático 10 mM de peróxido.

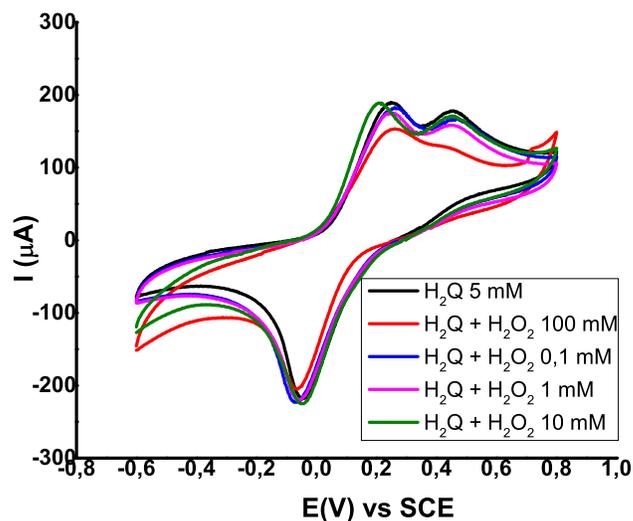


Figura 3.10: Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 con peróxido de hidrógeno

Debido a que la HRP permite el uso de otros cosustratos que la hidroquinona, se evaluó la respuesta de algunos mediadores empleados en la literatura [51] como lo son el yoduro de potasio, el catecol y el ácido ferroceno carboxílico y sus respuestas se agruparon en la fig. 3.11 donde se comparan a la respuesta de la hidroquinona en medio PBS ELISA pH 7,4. Destacan que tanto el

3.3. ESTUDIOS VOLTAMÉTRICOS DE MEDIADORES ELECTROQUÍMICOS SOBRE SUPERFICIES DE GRAFITO

catecol (fig. 3.11b) como el yoduro de potasio (fig. 3.11c) presentan dos procesos de reducción y de oxidación, similar a lo que ocurre para el sistema de hidroquinona. En la figura 3.11c se aprecia la respuesta de los electrodos de grafito en soluciones de yoduro de potasio, de allí se observa una cupla a 350 mV con un pico de oxidación a 500 mV y otro de reducción a 300 mV (vs SCE) que podrían ser atribuidos a la reacción $2I^- + e^- \rightleftharpoons I_2$, también se observa otra cupla a 800 mV con un pico de oxidación a 900 mV y otro de reducción a 650 mV (vs SCE) que podrían ser atribuidos a la reacción $3I^- \rightleftharpoons I_3^- + 2e^-$ o $2I_3^- \rightleftharpoons 3I_2 + 2e^-$ como las reportadas en la literatura [108]. La respuesta voltamétrica del catecol está representado en la figura 3.11b, de allí se puede apreciar que los dos procesos de oxidación y de reducción resaltan de mayor forma que para la respuesta de la hidroquinona, esto se puede explicar debido a que los dos son isómeros, el catecol siempre muestra en su respuesta voltamétrica los dos procesos de oxidación y reducción sin importar el pH ya que sus intermediarios quinónicos son más estables que los de la hidroquinona [105]. Por último, en la figura 3.11d se aprecia la respuesta voltamétrica del ácido ferroceno carboxílico y se destaca que la misma es característica de los sistemas reversibles como la hidroquinona y el ferrocianuro de potasio y los descritos en la sección 2.5, el potencial de oxidación para el proceso fué de 315 mV y el de reducción a 245 mV (vs SCE) lo que sugiere que la respuesta es reversible.

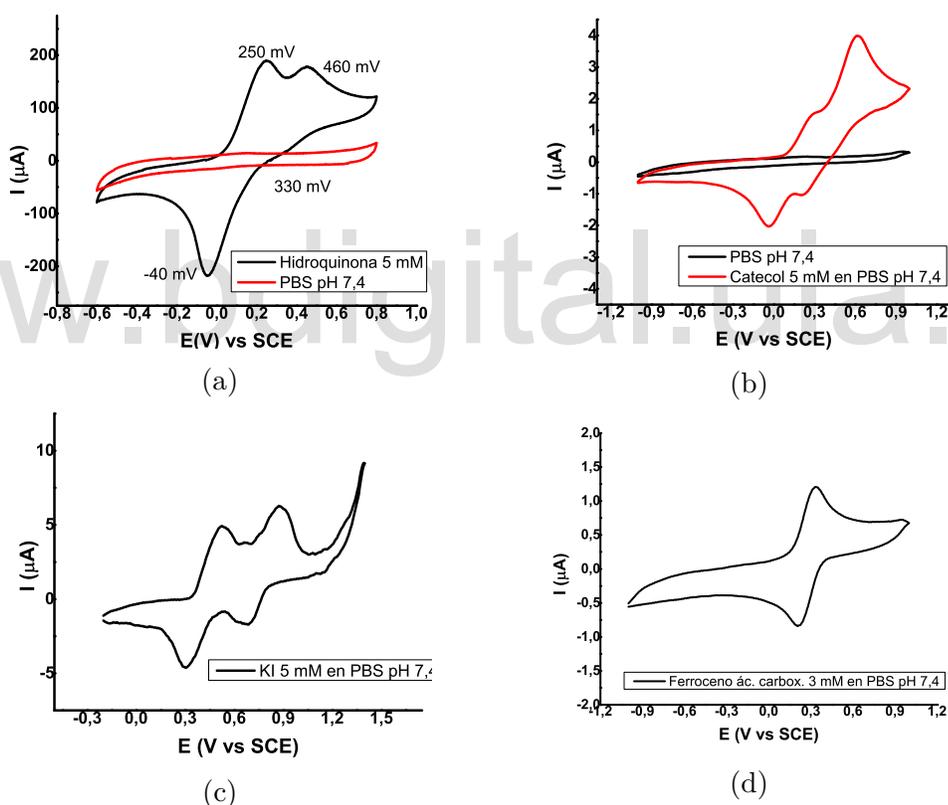


Figura 3.11: Estudios voltamperométricos de los mediadores electroquímicos empleados en la literatura en PBS pH 7,4 a 50 mV/s. 3.11a Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM con electrodos de grafito tratados mecánicamente. 3.11b Respuesta voltamperométrica de una solución de catecol 5 mM con electrodos de grafito tratados mecánicamente. 3.11c Respuesta voltamperométrica de una solución de yoduro de potasio 5 mM con electrodos de grafito tratados mecánicamente. 3.11d Respuesta voltamperométrica de una solución de ácido ferroceno carboxílico 3 mM con electrodos de grafito tratados mecánicamente.

Deposición de Películas de Quitosano

Una de las etapas más importantes en la fabricación de inmunosensores es la modificación de la superficie electródica para permitir el ensamblado de los inmunoensayos requeridos para realizar el diagnóstico de la enfermedad, esta modificación le debe conferir al electrodo la capacidad de adsorber las biomoléculas de los ensayos de forma estable y reproducible. Como ha sido descrito en capítulos anteriores, se modificaron las superficies de los electrodos con películas de quitosano mediante la electrodeposición ya que es una técnica que permite un control sobre la cantidad de material depositada. Debido a la naturaleza química del polímero, su capacidad de adsorción depende de su grado de desacetilación (GDA), razón por la cual es necesario determinar este parámetro con precisión ya que, de ser muy bajo, podría limitar la capacidad de adsorción del antígeno conduciendo a la fabricación de inmunosensores de bajo rendimiento, con altos límites de detección. Por otra parte, de disponer de muestras de quitosano con altos GDA, es posible depositar películas reproducibles desde soluciones ácidas a potenciales de reducción, sin embargo, debido a la naturaleza dinámica del proceso de electrodeposición de estas soluciones (sec. 2.5,2.6.9), es necesario optimizar los parámetros operacionales del proceso para las superficies de grafito mediante técnicas electroquímicas.

4.1. Caracterización del Quitosano empleado en este TEG

4.1.1. Parámetros físicos: factor de humedad

Se ha reportado en la literatura [92] que el quitosano es capaz de absorber agua, por lo que presenta un nivel de humedad que fue verificado mediante la termogravimetría acoplada a calorimetría de barrido diferencial que se puede apreciar en la fig 4.1, desde el comienzo del barrido se aprecia que la muestra de quitosano sufre una continua pérdida de masa hasta una temperatura de 100 °C a partir del cual se estabiliza la tasa de pérdida de masa de la pastilla hasta aproximadamente 300 °C donde comienza a descomponerse. Debido a que el proceso asociado a la pérdida de masa por debajo de los 100 °C fue exotérmico y gradual se estima que el 10% liberada de la pastilla se debe al agua asociada al quitosano.

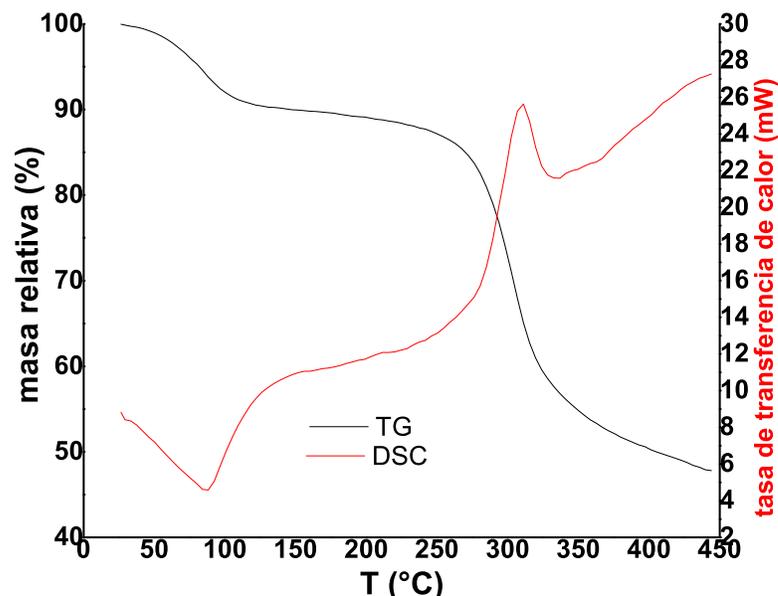


Figura 4.1: Termogravimetría acoplada a calorimetría de barrido diferencial (TG-DSC) del quitosano empleado en este trabajo

4.1.2. Titulación Conductimétrica

En la figura 4.2 se representa la respuesta de la titulación conductimétrica de una solución de quitosano ácido, en la misma se pueden apreciar tres zonas con distintas pendientes que son asociadas a las reacciones químicas globales en cada etapa del análisis. A volúmenes bajos se puede apreciar una disminución en la conductividad de la solución, que se debe a la neutralización del exceso de ácido clorhídrico de la solución de quitosano siguiendo la reacción $\text{HCl} + \text{NaOH} \rightarrow \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$, la disminución del número de protones libres en esta etapa de la valoración es la responsable de la disminución de la conductividad ya se neutralizan para formar la sal. Hay una zona de pendiente 0 entre los 7,8 y 9,8 mL que se asocia a la neutralización de grupos amino protonados del polímero siguiendo la reacción $\text{R}-\text{NH}_3^+ + \text{NaOH} \rightarrow \text{R}-\text{NH}_2\text{Na}^+ + \text{H}_2\text{O}$, cabe destacar que en esta etapa no hay cambios en la conductividad de la solución porque no hay un aumento de iones libres en el sistema al agregar la base ya que el hidróxido retira los protones para formar agua. Finalmente para volúmenes mayores a 10 mL el aumento de la conductancia en la en la solución se debe al aumento de la concentración del hidróxido de sodio en el sistema, ya que todos los equivalentes ácidos han sido neutralizados a lo largo de la valoración.

Debido a que los equivalentes de NaOH consumidos entre 7,8 y 9,8 mL se deben a la reacción de desprotonación de los grupos amino es posible calcular los equivalentes amino presentes en el medio mediante la relación $[\text{NH}_3]^+ = \frac{[\text{NaOH}] \cdot \Delta V}{mq \cdot (1 - Fc)} = 5,57 \cdot 10^{-3} \text{ N}$ donde mq es la masa de quitosano y Fc es el factor de humedad que fué establecido en 10 % gracias a la termogravimetría (fig 4.1). Esta concentración es directamente proporcional al grado de desacetilación mediante la relación $\text{GDA} = [\text{NH}_3] \cdot \text{PE}_{UR} \cdot 100$ donde PE_{UR} es el peso equivalente del monómero desacetilado (161 g/eq), con los parámetros descritos se determinó un GDA para la muestra de quitosano del 89 % que se encuentra ligeramente por encima del reportado por el manufactor y se estima que este valor podría permitir la adsorción de proteínas.

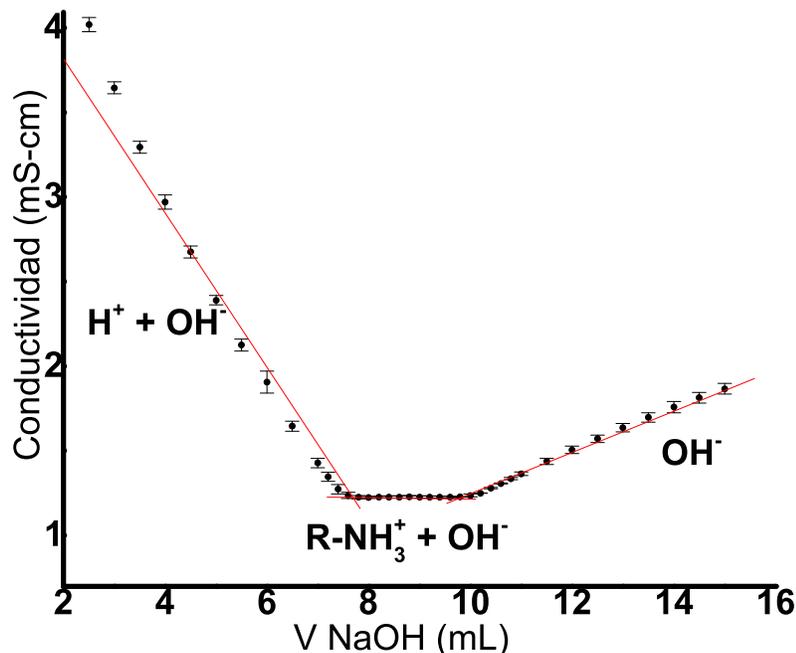


Figura 4.2: Respuesta de la valoración conductimétrica de una solución de quitosano (80 mg) en 50 mL de solución acuosa de HCl 0,036 M mediante NaOH 2×10^{-2} N

4.1.3. Análisis espectroscópico

En la figura 4.3a se puede apreciar el espectro IR corregido (restándole la transmitancia del espectro de la pastilla de KBr sin quitosano) obtenido de la pastilla de quitosano junto con las bandas determinadas para estimar el GDA, la transmitancia de cada banda fue determinada como la diferencia entre la máxima y la línea base. Con las transmitancias de cada banda se calcularon las absorbancias mediante la relación $A_{banda} = \text{Log}T_{banda} \%$ lo cual arroja un GDA del 83,97 % mediante el método de Brugnerotto y del 74,33 % siguiendo el de Baxter (para mayor referencia ver sec 1.2.5). Estas diferencias se pueden atribuir a la elección de las líneas base y al rango de aplicación general de cada ecuación, sin embargo los altos valores de GDA determinados para estos métodos son altos y en cualquier caso son adecuados para permitir la adsorción del antígeno.

En la tabla 4.1 se resumen los resultados de la determinación del GDA del quitosano con los métodos empleados en este trabajo especial de grado que en promedio fue del 82,43 %, estos resultados sugieren que el polímero presenta una alta proporción de grupos amino libre lo que debería permitir la adsorción de proteínas sobre películas de quitosano ya que la interacción entre ellos es electrostática y ocurre principalmente mediante estos grupos funcionales [83, 84, 109].

Tabla 4.1: Recopilación de los valores de GDA obtenidos para el quitosano empleado en este trabajo

Métodos	Conductimétrico	Baxter	Brugnerotto	GDA
GDA	89 %	74,33 %	83,97 %	82,43 %

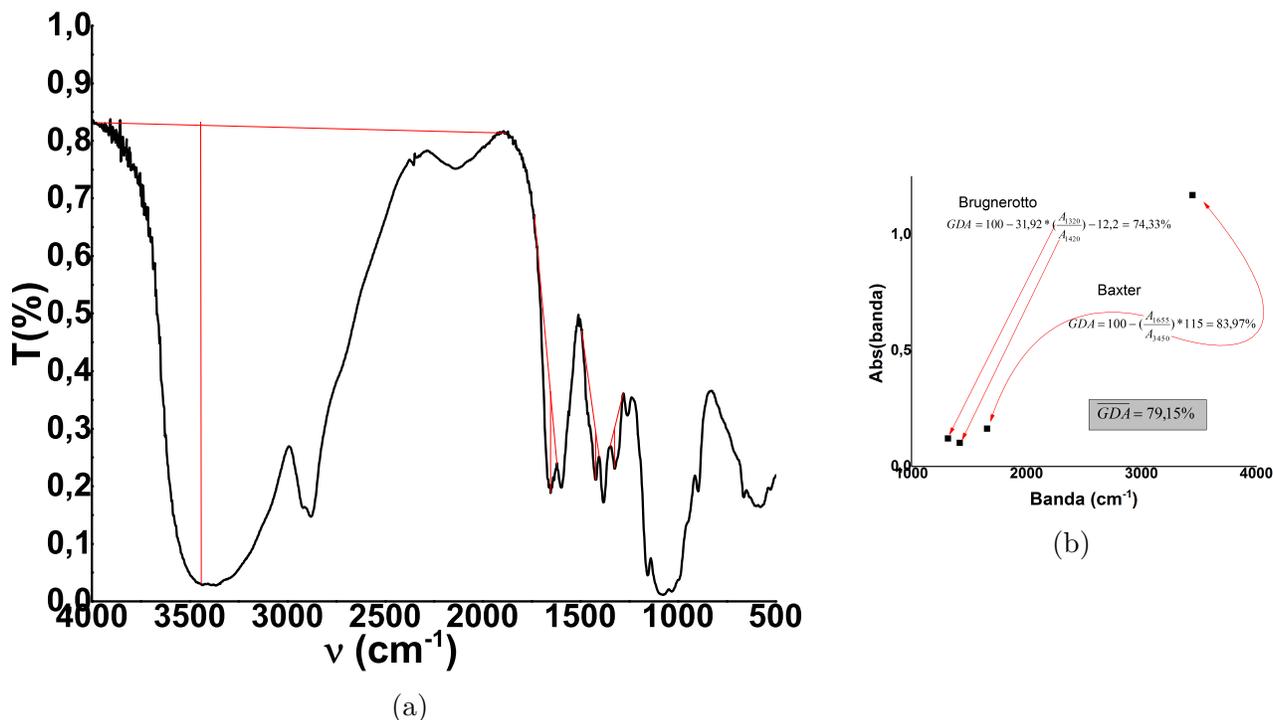


Figura 4.3: 4.3a FT-IR corregido del quitosano empleado en este trabajo, 4.3b las bandas de absorción empleadas en la determinación del GDA mediante los métodos de Brugnerotto y Baxter

4.2. Caracterización de las Películas de Quitosano

4.2.1. Deposición de películas

Para evaluar el potencial óptimo de deposición se realizaron estudios cronopotenciométricos (sección 2.6.8) sobre superficies de grafito activadas, además se contrastó la respuesta cronopotenciométrica de la deposición del quitosano sobre superficies sólo tratadas mecánicamente las cuales se pueden apreciar en la fig. 4.4. Para los electrodos que no fueron activados se estableció un proceso estable a partir de los 40 s en $-1,25$ V vs SCE el cual no varió con el pulso de corriente aplicado, mientras que para los electrodos activados el proceso sufre un retraso, ya que el potencial no permanece estable durante la cronopotenciometría. Estas diferencias en el comportamiento de los electrodos podrían atribuirse a la modificación química de sus superficies que ocurren durante el proceso de activación, durante este proceso de oxidación (sec. 2.6.4) se acumula carga sobre los electrodos de trabajo que favorece la generación de grupos oxidados respecto a un electrodo tratado mecánicamente, al realizar el pulso de corriente necesario para la deposición del quitosano se establecen potenciales de reducción sobre el electrodo, que neutralizan la carga acumulada durante la activación, desactivando la superficie antes de depositar el polímero.

Con el potencial de deposición determinado anteriormente se prepararon películas de quitosano mediante la electrólisis de la misma solución empleada en los estudios cronopotenciométricos, en vista del retraso durante la deposición de las superficies activadas se prepararon las películas sobre electrodos tratados mecánicamente. En la tabla 4.2 se resumen los parámetros de las electrólisis realizadas, la carga fue determinada para cinco películas en cada tiempo de deposición y fue calculado el error porcentual de cada una de ellas. Se puede observar que el error asociado a la carga de la electrólisis disminuye para los tiempos de deposición más largos, lo que sugiere que la reproducibilidad de las películas es mayor conforme aumenta el tiempo de deposición,

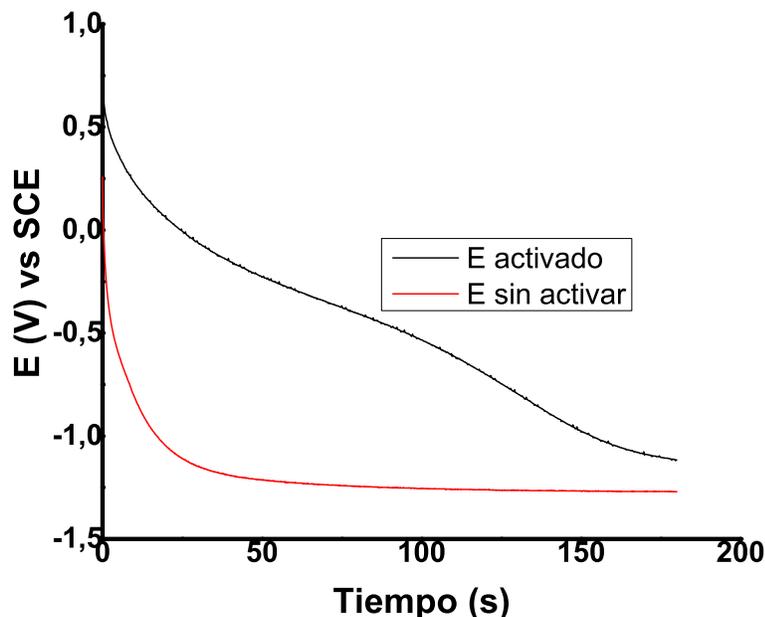


Figura 4.4: Respuestas cronoamperométricas de soluciones de quitosano 1 % en ácido acético 1 % con electrodos de grafito activados y sin activar

aunque sean reproducibles a partir de los diez minutos con una variabilidad que no supera el 7,6 %.

Tabla 4.2: Cargas de la electrólisis de la deposición de las películas de quitosano

t(min)	Q(A)	ΔQ	ΔQ %
10'	-0,06144	4,66 e-3	7,5846 %
20'	-0,1101	8,295 e-3	7,53 %
30'	-0,15691	1,04 e-2	6,67 %

4.2.2. Voltametría Cíclica de los electrodos modificados con quitosano

Se evaluó la respuesta de los electrodos modificados con películas de quitosano mediante voltametría cíclica empleando ferrocianuro de potasio en buffer ELISA pH 7,4 (fig. 4.5a), se puede destacar que las películas de quitosano no tienen un efecto termodinámico sobre la TE del $K_4Fe(CN)_6$ sobre superficies de grafito ya que no ocurren desplazamiento de los potenciales de oxidación o reducción. El aumento de corriente para el electrodo modificado con quitosano se debe a que el biopolímero retiene iones metálicos [84, 109, 110], esto aumenta la concentración relativa de hierro en las cercanías del electrodo respecto al seno de la solución lo que se observa como un aumento en la corriente para los electrodos modificados con películas de quitosano respecto a los desnudos.

Al contrastar esta respuesta para las distintas películas (fig. 4.5b) se puede destacar un aumento de la corriente de los picos de oxidación y reducción conforme aumenta el tiempo de deposición de las películas de quitosano, estos resultados podrían explicarse asumiendo que presentan distintos espesores, ya que si el aumento en las corrientes de pico para los electrodos modificados con quitosano respecto a los electrodos desnudos se deben a la interacción entre el quitosano y el ferrocianuro de potasio, entonces una mayor cantidad de quitosano depositada debería influir en

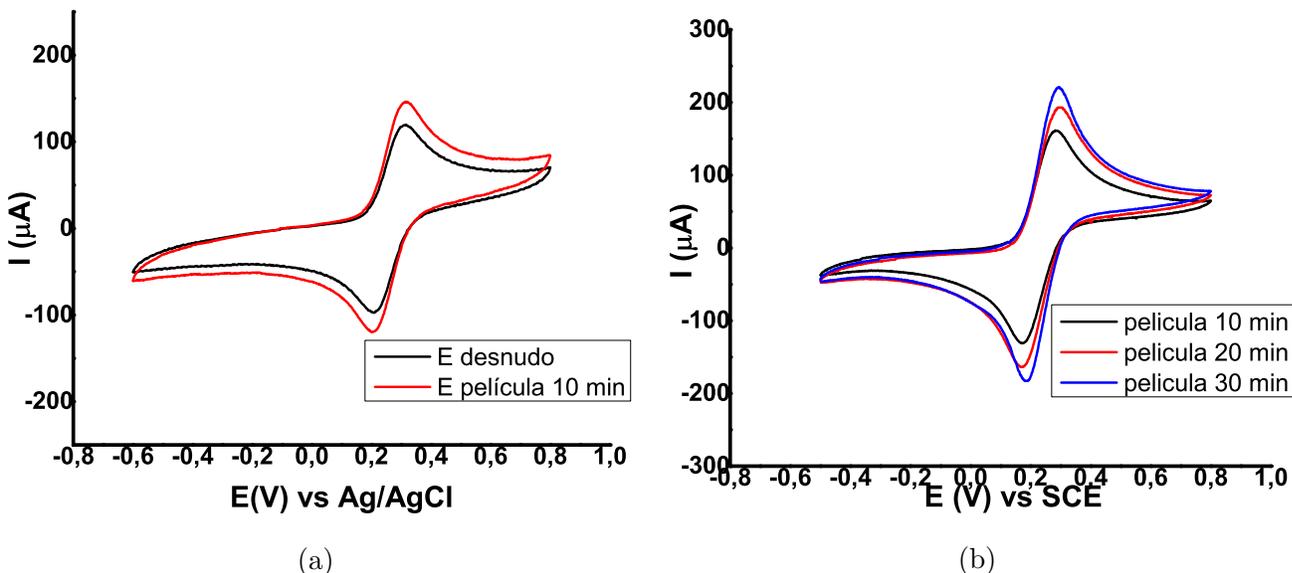


Figura 4.5: Respuesta voltamperométrica de una solución de ferrocianuro de potasio 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 a 50 mV/s con electrodos modificados con quitosano. 4.5a Contraste de la respuesta para los electrodos de grafito modificados con películas de quitosano y desnudos, 4.5b Respuesta de los electrodos de grafito modificados con películas de quitosano depositadas por 10, 20 y 30 minutos

un aumento proporcional en la corriente de picos para este sistema electroquímico.

www.bdigital.ula.ve

Desarrollo y Caracterización del Sistema Inmunosensor

Al optimizar el proceso de modificación de la superficie electródica, es necesario, además de conocer la respuesta electroquímica de los electrodos modificados, verificar la interacción de la superficie modificada con los componentes del ensayo ya que las señales generadas por los inmunosensores se deben a los componentes biológicos retenidos sobre los electrodos. Al determinar que las interacciones son favorables es posible determinar la cinética de retención de cada componente mediante curvas de adsorción, de esta forma es posible optimizar los tiempos de incubación de los reactivos inmunológicos además de estandarizar las señales que se generan para cada superficie modificada. Realizando la voltametría cíclica de las distintas superficies modificadas, es posible observar los efectos cinéticos y termodinámicos que tienen los complejos inmunológicos en la respuesta electródica mediante los métodos descritos en los capítulos anteriores.

5.1. Adsorción PGR24

En vista de que se logró la deposición de películas de distintos espesores se estudió su capacidad para retener el antígeno del inmunoensayo, para ello se prepararon películas de quitosano sobre electrodos de grafito que se sumergieron en alícuotas de Pgr₂₄ y se evaluaron las variaciones de la concentración del sobrenadante en un tiempo de una hora.

En pruebas preliminares (fig. 5.1) se prepararon dos películas de 10 y 30 minutos, se estimó la concentración del sobrenadante empleando el método de Lowry, que permitió evaluar la concentración de la solución del antígeno mediante el análisis de las alícuotas retiradas del sobrenadante durante el ensayo. Las curvas de adsorción del antígeno muestran un comportamiento que depende del tiempo de deposición de la película, estos resultados sugieren que las películas generadas por electrodeposición fueron de distintos grosores ya que al aumentar el tiempo de electrólisis también lo hace la cantidad de quitosano depositada en el electrodo que se traduciría en un aumento de los sitios activos dentro de las películas donde se pueda adsorber el antígeno, razón por la cual las concentraciones mínimas alcanzadas difieren para cada película.

En vista de que el tiempo de deposición de la película de quitosano afecta la capacidad máxima de adsorción del antígeno, se evaluaron las características de adsorción de las películas con mayor precisión, empleando el método de Bradford para la cuantificación de las alícuotas de proteínas (fig. 5.2). En dicha figura se pueden apreciar las curvas de adsorción del antígeno para películas

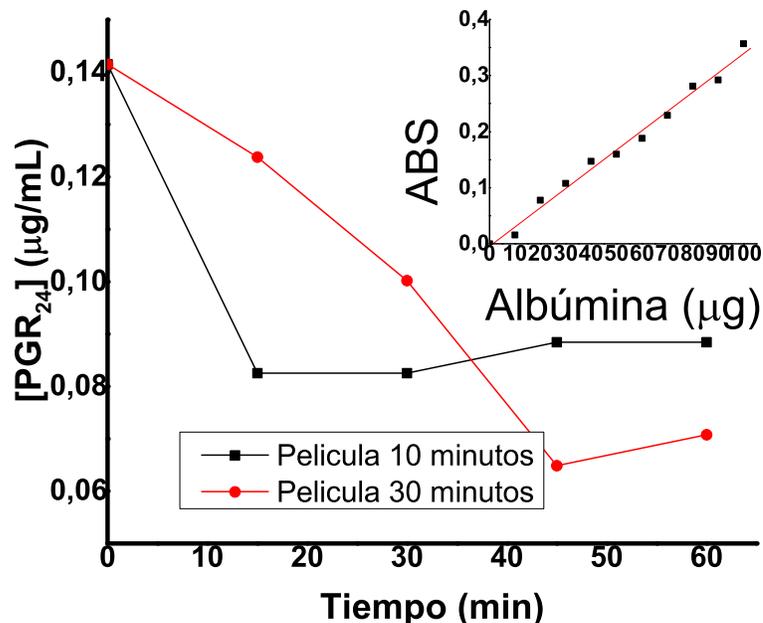


Figura 5.1: Curvas de adsorción del antígeno sobre electrodos modificados con películas de quitosano depositadas por 10 y 30 minutos, determinadas mediante el método de Lowry

depositadas por 10, 20 y 30 minutos y se observan las mismas tendencias de adsorción que las descritas para las pruebas preliminares; las películas de 20 minutos tienen una capacidad de adsorción intermedia a la de 10 y la de 30 minutos lo que refuerza la noción de que las películas son de distintos espesores. Al finalizar la curva de adsorción, los electrodos fueron suspendidos en buffer ELISA pH 7,4 para evaluar la desorción del antígeno en este medio pero las señales obtenidas para el sobrenadante se encontraban dentro del error del blanco ($0 \mu\text{g}$ de proteínas) empleado en la curva de calibración, lo que sugiere que el antígeno queda retenido de forma estable sobre las películas de quitosano.

Al evaluar la variación en el tiempo de las concentraciones de proteína en el sobrenadante de solución, es posible determinar la masa del antígeno retenida sobre las películas para cada intervalo de tiempo, como descrito en la figura 5.3a. De allí se puede concluir que las masas retenidas sobre los electrodos difiere según el tiempo de deposición de película, ya que las barras negras (10 min) son menores que las rojas (20 min) que a su vez es ligeramente menor a la azul (30 min) lo que implica que las películas tienen distintas cantidades de sitios activos, lo que se podría explicar debido a los distintos grosores de las películas, de forma análoga a las respuestas voltamétricas del ferrocianuro del capítulo anterior. Al evaluar la saturación de cada película en el tiempo se puede concluir que exposiciones de los electrodos modificados con quitosano al antígeno superiores a los 30 min no deberían aumentar las señales del inmunosensor ya que, por encima de este tiempo, todas las películas de quitosano se encontraron saturadas al menos en un 90% (fig. 5.3b) razón por la cual se empleó este tiempo de incubación en la construcción de los inmunosensores.

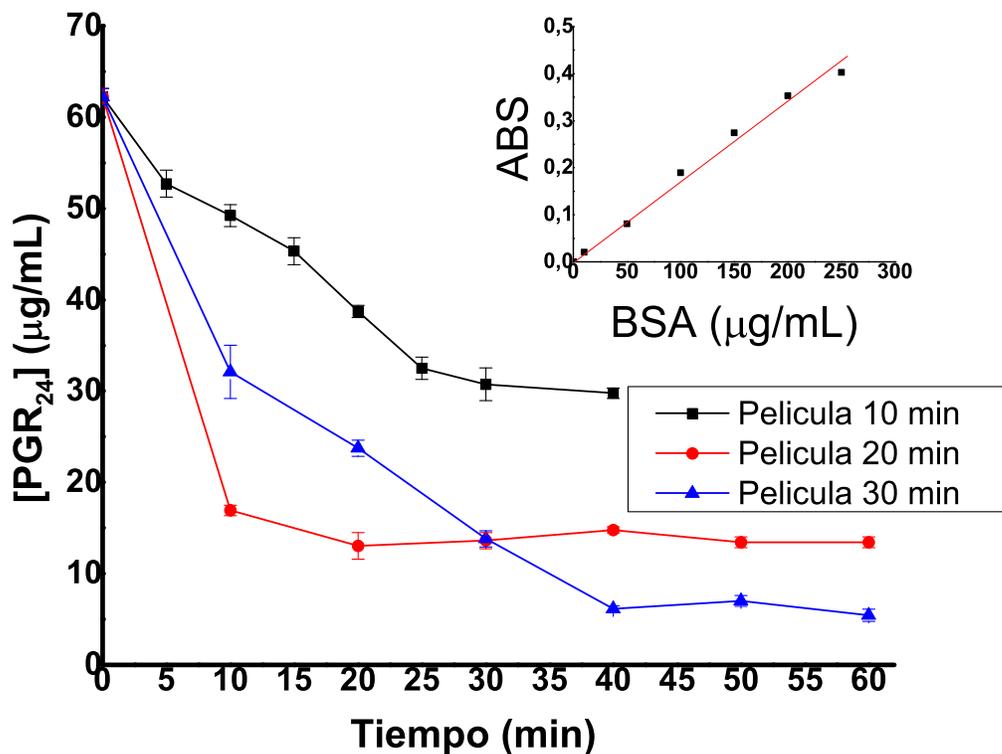


Figura 5.2: Curvas de adsorción del antígeno sobre electrodos modificados con películas de quitosano depositadas por 10, 20 y 30 minutos, determinadas mediante método de Bradford

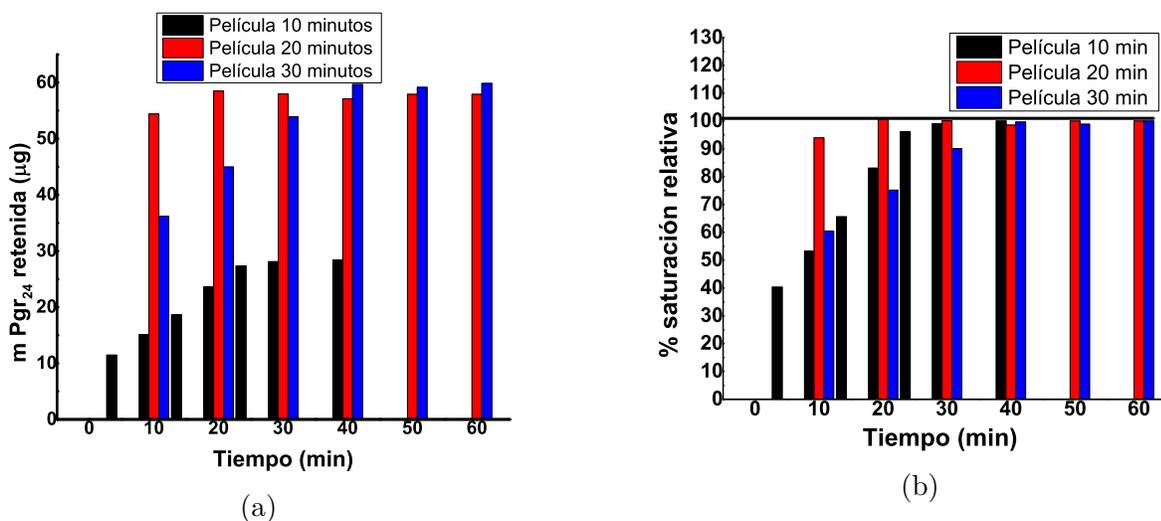


Figura 5.3: Retención del antígeno sobre electrodos modificados con películas de quitosano. 5.3a masa del antígeno retenida para cada electrodo modificado en el tiempo, 5.3b % de saturación relativa para cada electrodo modificado en el tiempo

5.2. Inmunoensayo ELISA con detección voltamétrica empleando hidroquinona como mediador

Al determinar los límites químicos del ensayo enzimático se ensamblaron los inmunosensores descritos en 2.6.13 empleando los tiempos de adsorción del antígeno y proteína de bloqueo donde se saturaron las películas depositadas (30 min), en la figura 5.4 se esquematiza la etapa de adsorción del antígeno junto con su respuesta voltamétrica, de la respuesta se podría evaluar la entrada del antígeno a la película mediante el desplazamiento del pico de oxidación del radical quinónico. Cabe destacar que aunque también se evaluó la respuesta de la película con hidroquinona no se observaron diferencias significativas respecto a los electrodos desnudos.

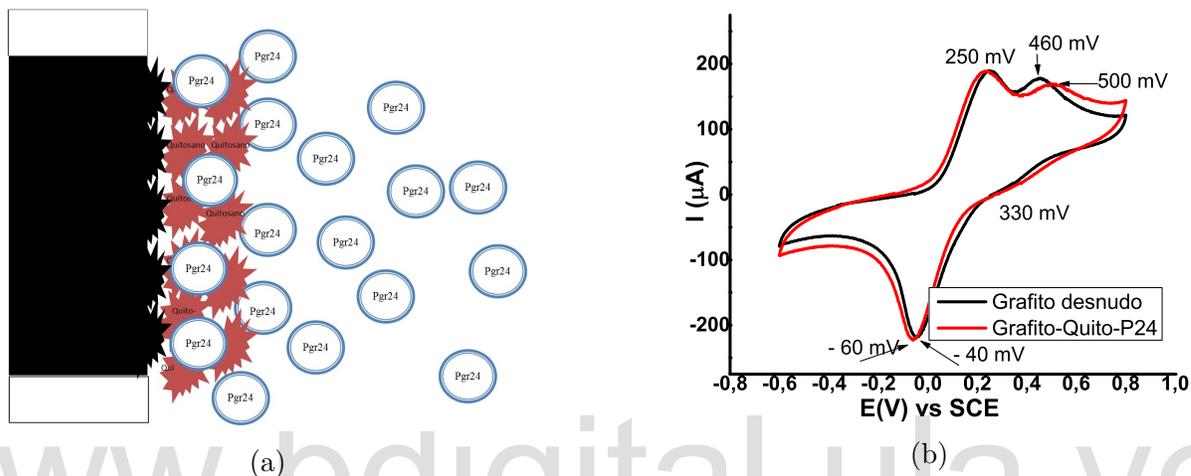


Figura 5.4: Inmunoensayo: adsorción del antígeno. (5.4a) Esquema inmovilización del antígeno, (5.4b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, Pgr₂₄ y caseína

En las etapas de bloqueo y reconocimiento de los anticuerpos (fig 5.5) vuelve a ser útil la voltametría cíclica ya que se observa una disminución de las corrientes de pico al agregar la proteína de bloqueo (caseína) a la película, esto sugiere que la totalidad de sitios libres no fueron ocupados por el antígeno. En la figura 5.5b se puede apreciar que la respuesta de los electrodos modificados con los anticuerpos primarios no difiere de los electrodos bloqueados con caseína ya que se superponen (traza roja y azul), esto implica que no es posible evaluar el acoplamiento directo del antígeno por el anticuerpo primario mediante voltametría cíclica.

Se evaluaron los IgG humanos en la película usando los anticuerpos acoplados a HRP, esto se realizó contrastando la respuesta voltamétrica de los electrodos con el complejo antígeno-anticuerpo y el complejo de revelado (sec. 1.2.2) en un sistema de hidroquinona (fig. 5.5b) de donde se puede concluir que hubo interacción del anticuerpo secundario por el primario, ya que se eliminó totalmente el segundo pico de oxidación junto con el hombro de reducción, por lo que la respuesta aparenta una TE electrónica simple y reversible. Este cambio en la señal confirma la formación del inmunocomplejo de revelado ya que debe ocurrir un cambio en la interfaz o en la superficie electródica para que haya un cambio en la señal. Sin embargo, al agregar 0,1 mM de peróxido de hidrógeno no se observaron cambios en la señal del inmunosensor, esto sugiere que no hubo actividad enzimática en la película lo que se podría deber a las bajas concentraciones de peróxido.

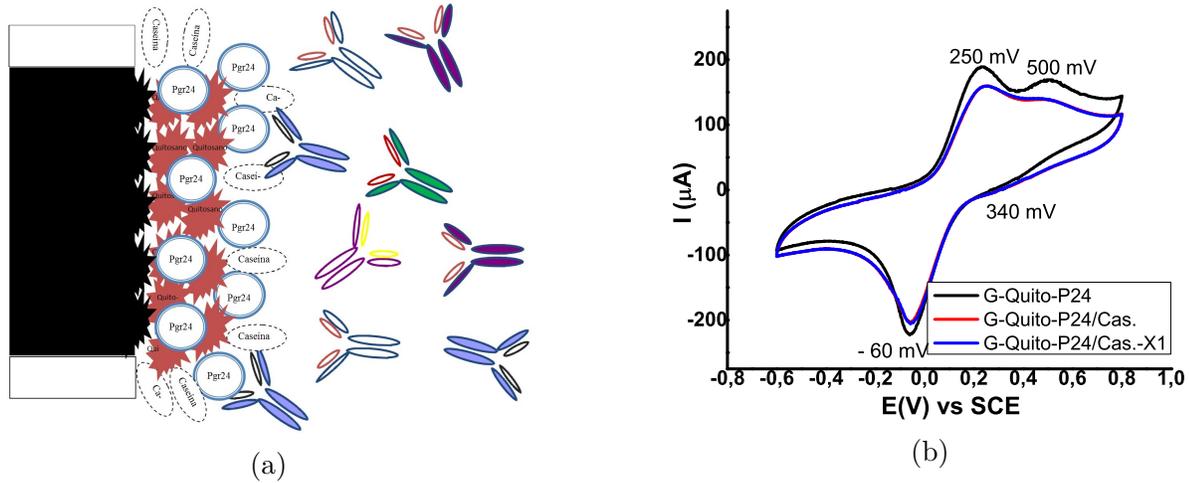


Figura 5.5: Inmunoensayo: etapas de bloqueo y reconocimiento de anticuerpos. (5.5a) Esquema reconocimiento de anticuerpos chagásicos, (5.5b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroxiquinona 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo (suero:X1,X2)

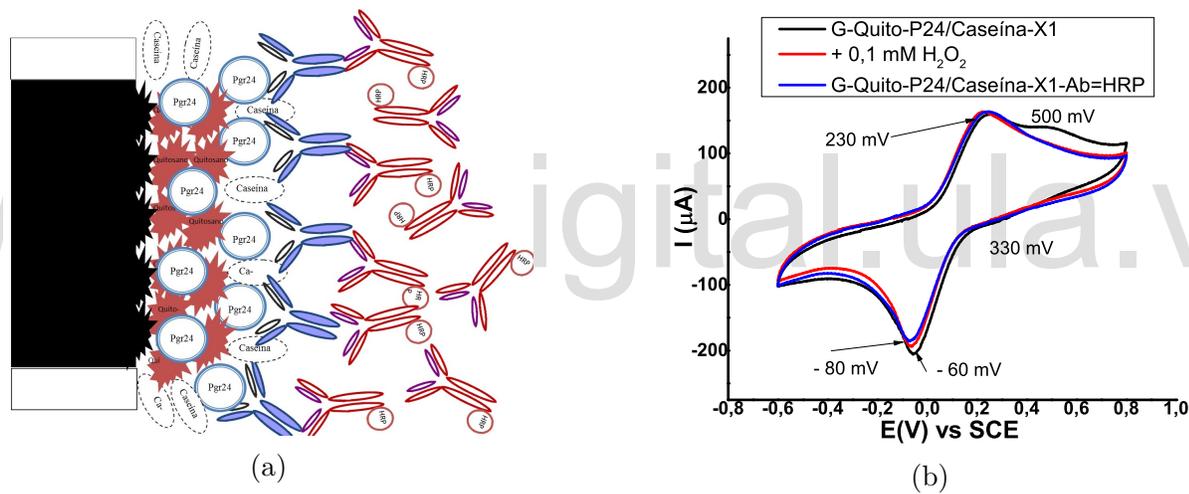


Figura 5.6: Inmunoensayo: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.6b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroxiquinona 5 mM en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:X1,X2), (5.6a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.

En vista de que no se observó actividad enzimática a esas concentraciones se evaluaron concentraciones de H_2O_2 en distintos órdenes de magnitud sobre los inmunosensores que se aprecian en la figura 5.7b, cabe destacar que a ningún valor de concentración se observaron los resultados esperados donde debería ocurrir un cambio en la simetría de los picos de la hidroxiquinona (fig. 5.7a), que es indicativo de la actividad enzimática de la HRP ya que modifica el perfil de concentraciones del mediador. Este comportamiento podría ser atribuido en primer lugar a que no ocurre interacción del anticuerpo primario y los conjugados a HRP, a la desnaturalización de la enzima al entrar a la película, a que el mediador no alcanza al sitio activo de la HRP o que a estas condiciones de pH la enzima no reconoce al mediador electroquímico lo cual fué verificado en los siguientes experimentos.

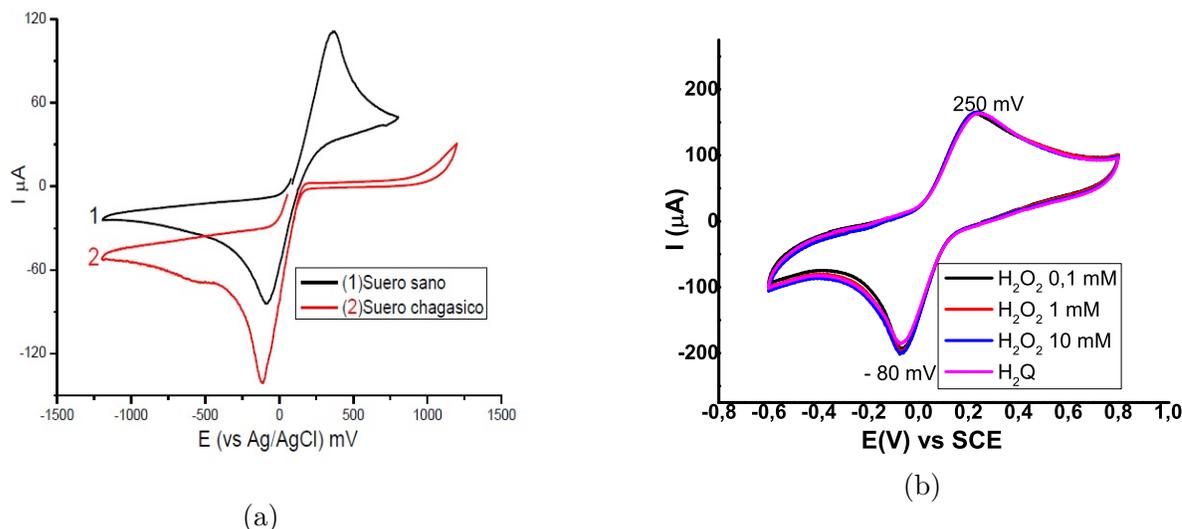


Figura 5.7: Inmunoensayo: revelado enzimático. (5.7a) Inmunosensor para Chagas sobre carbón vítreo tomado del TEG de Maiz, (5.7b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM en PBS ELISA pH 7,4 suplementada con H_2O_2 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado.

Estos resultados demuestran que es posible verificar el avance de la formación del inmunocomplejo de revelado mediante la voltametría cíclica de la hidroquinona mediante el efecto sobre la diferencia de potenciales para cada proceso según la construcción del electrodo (fig. 5.8), sin embargo no se logró evaluar la actividad enzimática de la HRP sobre la superficie del sensor por lo que este sistema de transducción biológica no podría ser empleado en sueros problema bajo las condiciones operacionales empleadas.

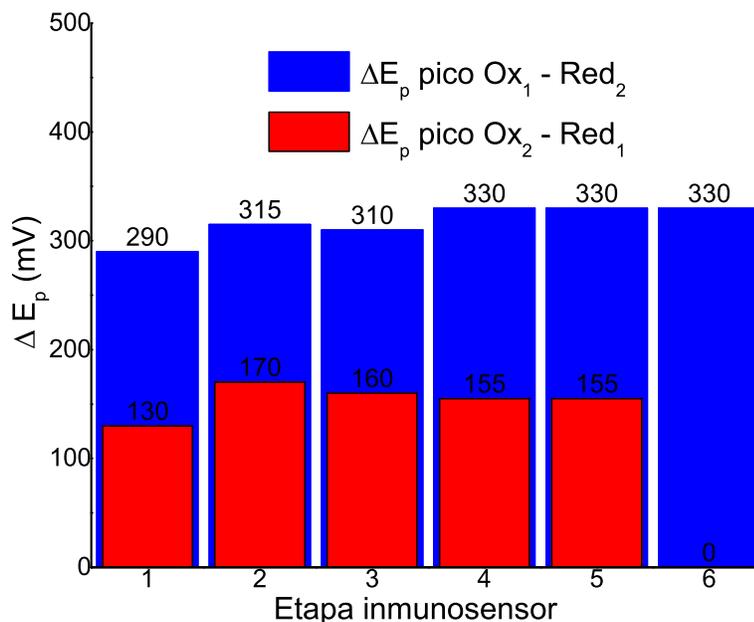


Figura 5.8: Representación de la diferencia de potenciales para los dos procesos redox que sufre la hidroquinona en medio PBS ELISA pH 7,4. La etapa 1 corresponde al electrodo desnudo (G), la 2 al electrodo con quitosano (G-Quit), la 3 al electrodo G-Quit-P24, la 4 al G-Quit-P24-Caseína, la 5 al G-Quit-P24/cas-X1 y la 6 al G-Quit-P24/cas-X1-Ab-HRP

5.3. Determinación de la actividad enzimática de la HRP : Controles positivos

En vista de que una de las razones por la cuales no se observó la actividad enzimática de la HRP, pudo radicar en que no hubo interacción entre los anticuerpos primarios y los secundarios debido a bajos títulos, se contruyeron inmunosensores con sueros anti-Pgr₂₄ cuyas respuestas se pueden apreciar en la fig. 5.9b y se puede destacar que a pesar de las claras diferencias en las respuestas de estos electrodos respecto a los construidos en la sección anterior, la simetría de la señal, que es el criterio con el cual se determina la actividad enzimática, no se ve afectada al agregar el peróxido de hidrógeno requerido para el ensayo con lo cual se puede concluir que la ausencia de actividad enzimática no se debe a que no hubo interacción entre el suero X1 o X2 y los anticuerpos conjugados a peroxidasa sino a problemas en el reconocimiento de la enzima por el mediador o a la desnaturalización de la misma.

En vista a la ausencia de actividad con el inmunocomplejo, se inmovilizaron diluciones de los anticuerpos conjugados a peroxidasa sobre electrodos modificados con películas de quitosano de 10 y 30 min de deposición, ya que existen numerosos reportes [74, 93, 111] que indican TE directa de la HRP sobre electrodos, también TE de esta enzima sobre películas de quitosano empleando hidroquinona como mediador pero esos resultados no pudieron ser reproducidos sobre nuestras superficies de grafito. En la figura 5.10b se aprecia la respuesta de los electrodos modificados con películas de 10 min, mientras que en la figura 5.11b se aprecia la de los electrodos modificados con películas de 30 min; Cabe destacar que, aunque existe un efecto termodinámico evidente para cada construcción del sensor, no ocurre el cambio de simetría esperado en la señal con lo que se podría concluir que no hay interacción entre la HRP y el mediador ni entre la HRP y el electrodo, razón por la cual se evaluaron las respuestas de otros mediadores empleados en la literatura.

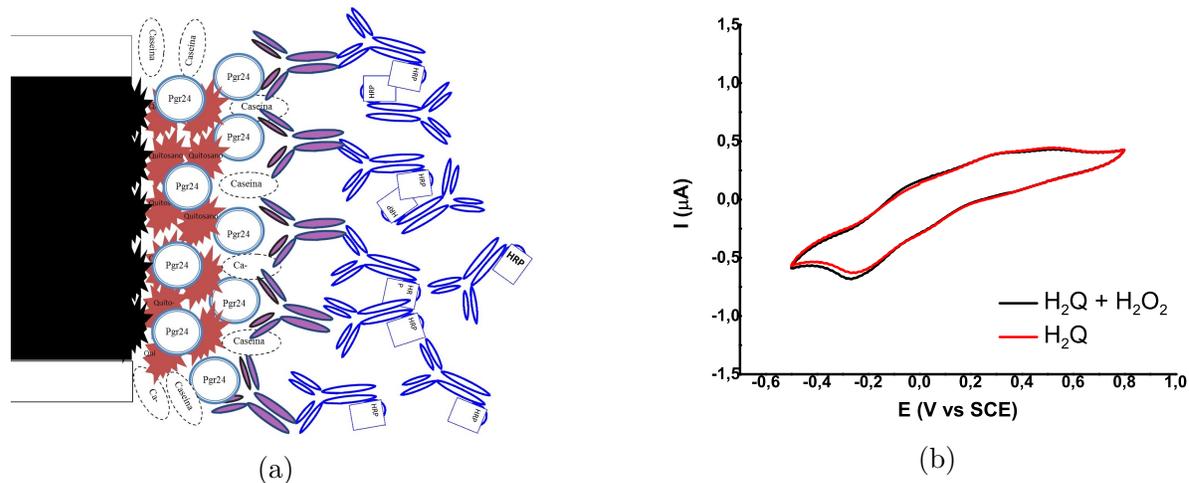


Figura 5.9: Control Positivo: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.9b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:anti-Pgr₂₄), (5.9a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.

Para las construcciones de electrodos antes descritas, también se evaluó la respuesta de los anticuerpos conjugados a HRP empleando como mediadores ioduro de potasio (fig. 5.12b) [44], ferroceno (fig. 5.14b) [13] y catecol (fig. 5.13b) [45] cuyas respuestas se pueden apreciar a continuación. De la fig. 5.13b, al igual que de la 5.14b y de la 5.12b se puede apreciar que las respuestas de los sistemas suplementados con H_2O_2 se superponen a los del respectivo mediador en el buffer ELISA pH 7,4 lo que indica, de forma análoga a los resultados con hidroquinona, que no hubo actividad enzimática de la HRP para estos sistemas en estas condiciones.

Estos resultados se podrían explicar debido a problemas en la interacción del sitio activo de la enzima con los mediadores empleados, que se podrían dar debido a la baja concentración de protones, que son requeridos para participar en el ciclo catalítico de la enzima sin embargo el pH del sistema no se puede disminuir debido a que compromete la integridad de la película de quitosano, cuyo pKa se encuentra un valor de pH por debajo del sistema buffer empleado (pKa 6,3), lo que requeriría del uso de entrecruzadores químicos para mantener la integridad física de la película.

Por último, otra posibilidad de la ausencia de señal se podría deber a las bajas concentraciones de enzima en las películas debido al formato de inmovilización, al inmovilizar los anticuerpos directamente sobre las películas no se obtiene la amplificación de la señal biológica del inmunoensayo ya que, debido a la estequiometría de las reacciones inmunológicas, por cada antígeno anclado hay más de un anticuerpo conjugado a peroxidasa sobre la superficie, mientras que al acoplarlos directamente se obtienen menor cantidad de HRP inmovilizada ya que esta cantidad depende de la disposición de sitios activos dentro de la película.

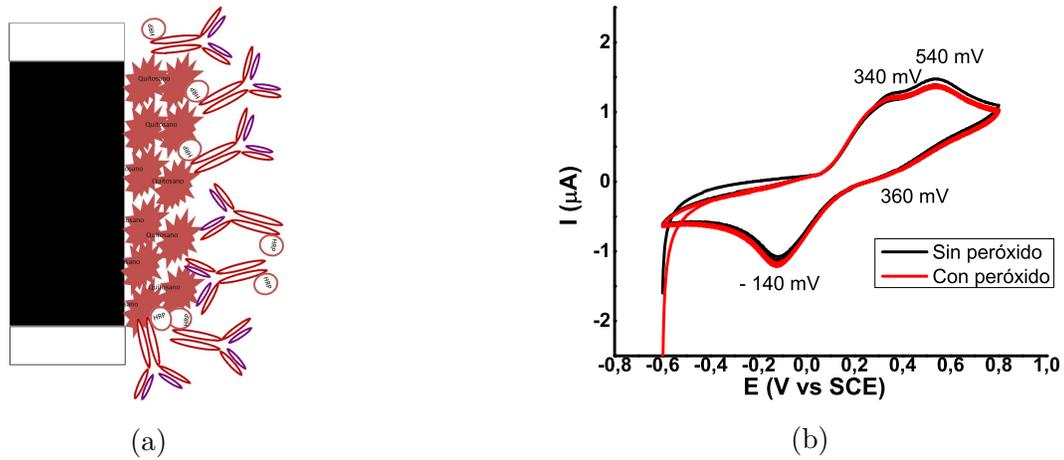


Figura 5.10: Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.10b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (10 min deposición) y anti IgG conjugados a HRP , (5.10a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (10 min deposición).

www.bdigital.ula.ve

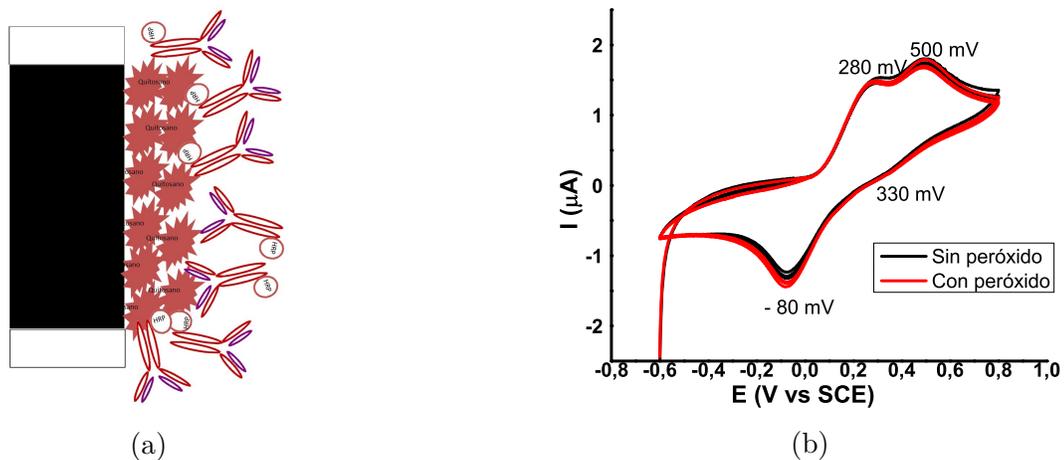


Figura 5.11: Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.11b) Respuesta voltamperométrica de una solución de hidroquinona 5 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (30 min deposición) y anti IgG conjugadas a HRP , (5.11a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (30 min deposición).

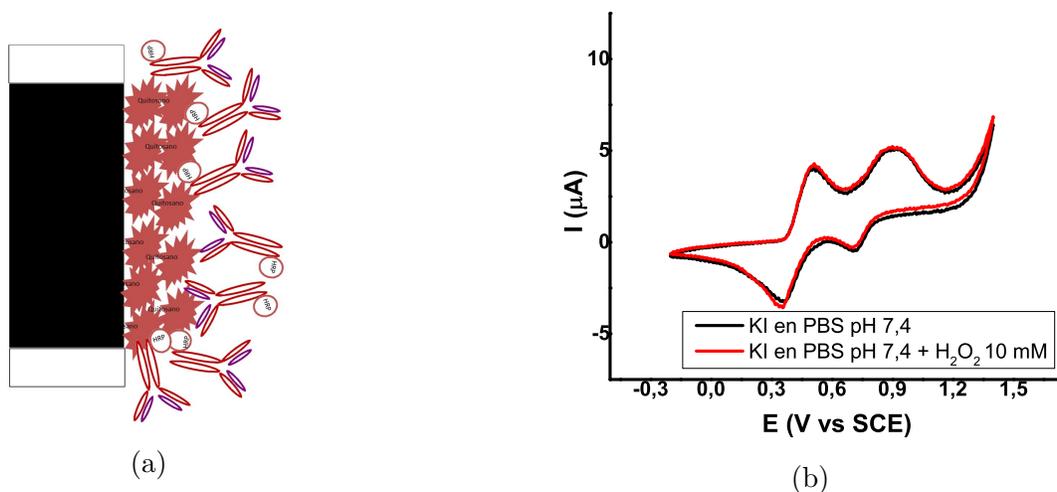


Figura 5.12: Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.12b) Respuesta voltamperométrica de una solución de ioduro de potasio 5 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (30 min deposición) y anti IgG conjugadas a HRP , (5.12a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (30 min deposición).

www.bdigital.ula.ve

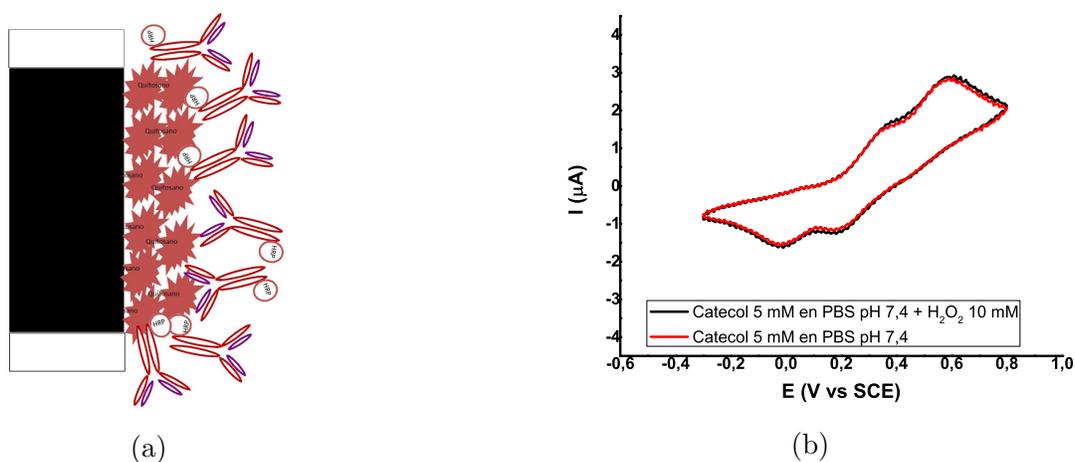


Figura 5.13: Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.13b) Respuesta voltamperométrica de una solución de catecol 5 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (30 min deposición) y anti IgG conjugadas a HRP , (5.13a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (30 min deposición).

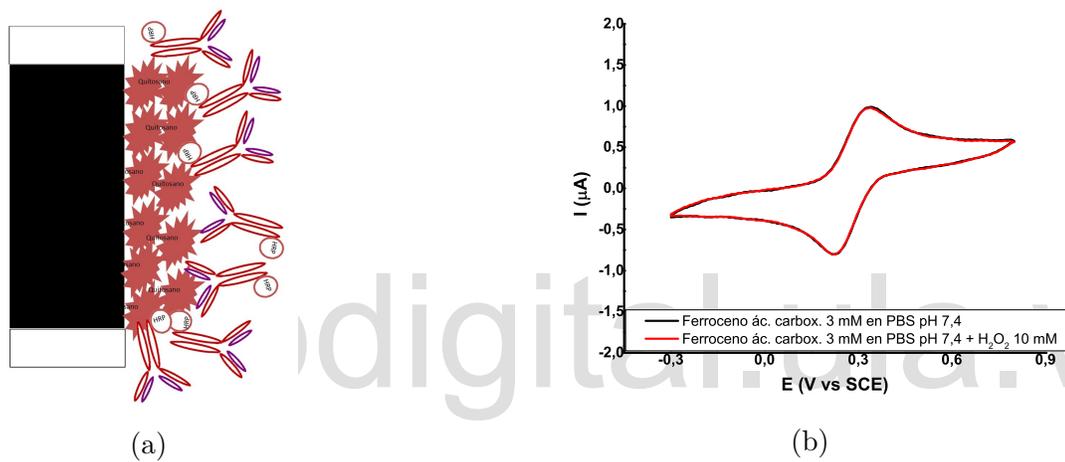


Figura 5.14: Inmovilización HRP : determinación de la actividad del sistema reportero (Ab-HRP). (5.14b) Respuesta voltamperométrica de una solución de ácido ferroceno carboxílico 3 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano (30 min deposición) y anti IgG conjugadas a HRP , (5.14a) Esquema de inmovilización de anti IgG humanos conjugados a HRP sobre electrodos de grafito modificados con películas de quitosano (30 min deposición).

5.4. Determinación de la actividad enzimática de la HRP : Evaluación de distintos mediadores

Finalmente, para determinar la actividad enzimática de la HRP se evaluó la actividad enzimática para los inmunosensores construidos en la sección 2.6.13 incubados con los sueros X1 ya que los resultados de las técnicas clásicas del LEP (datos del laboratorio) demostraron que estos dispusieron de buenos títulos de anticuerpos además de que fueron confirmados chagásicos mediante ELISA. En la fig. 5.15b se puede apreciar la respuesta del inmunosensor empleando ioduro de po-

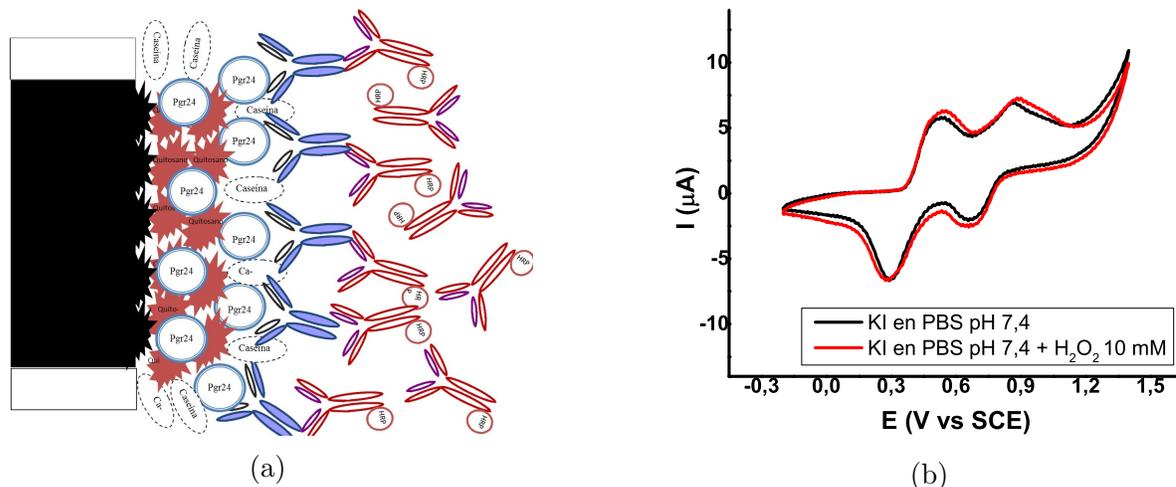


Figura 5.15: Inmunosensor: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.15b) Respuesta voltamperométrica de una solución de ioduro de potasio 5 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:X1), (5.15a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.

tasio (5 mM) como mediador en medio de PBS pH 7,4 suplementado con peróxido de hidrógeno, se puede observar que la respuesta es similar a la determinada en superficies de grafito desnudas ya que se destacan los mismos procesos redox sobre la superficie del electrodo, con los potenciales desplazados. Al comparar las respuestas para los sistemas suplementados con peróxido a los que están en ausencia no se observan diferencias significativas en las corrientes de cada pico ni un desplazamiento en sus potenciales, las ligeras variaciones se pueden asociar a la interacción química entre el mediador y el peróxido ya que, como demostrado en el capítulo 3, pueden ocurrir interacciones entre estos componentes al influir en las corrientes registradas para los procesos redox. En la fig. 5.16b se puede apreciar la respuesta del inmunosensor empleando ácido ferroceno carboxílico (5 mM) como mediador en medio de PBS pH 7,4 suplementado con peróxido de hidrógeno, se puede observar que la respuesta es similar a la determinada ejemplos anteriores para este mismo sistema donde se determinaron respuestas con características reversibles como las del capítulo 3. Al desarrollar los ensayos enzimáticos se obtuvieron resultados similares para los sistemas suplementados con peróxido que los sistemas sin peróxido ya que las trazas se sobreponen en el voltamperograma, lo que es indicativo de que no hubo TE hacia el mediador. Al evaluar la respuesta del isomero de la hidroquinona (catecol) en el mismo medio PBS ELISA, para los inmunosensores se obtuvo una respuesta similar a la descrita para el mismo sistema sobre electrodos desnudos (cap. 3) y sobre los electrodos modificados con películas de quitosano y anticuerpos conjugados a peroxidasa, donde se observaron dos procesos redox donde se transfieren, en dos etapas, electrones desde el catecol hacia su derivado diquinónico. A diferencia de los otros mediadores descritos, el inmunosensor responde al sistema de catecol suplementado con peróxido de hidrógeno ya que hay una ligera diferencia en

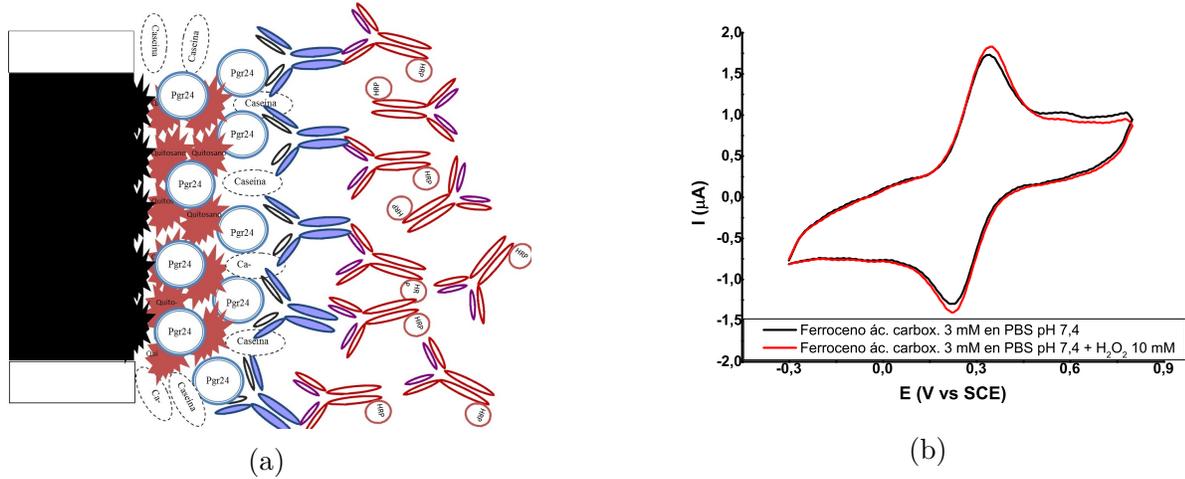


Figura 5.16: Inmunosensor: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.16b) Respuesta voltamperométrica de una solución de ácido ferroceno carboxílico 3 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:X1), (5.16a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.

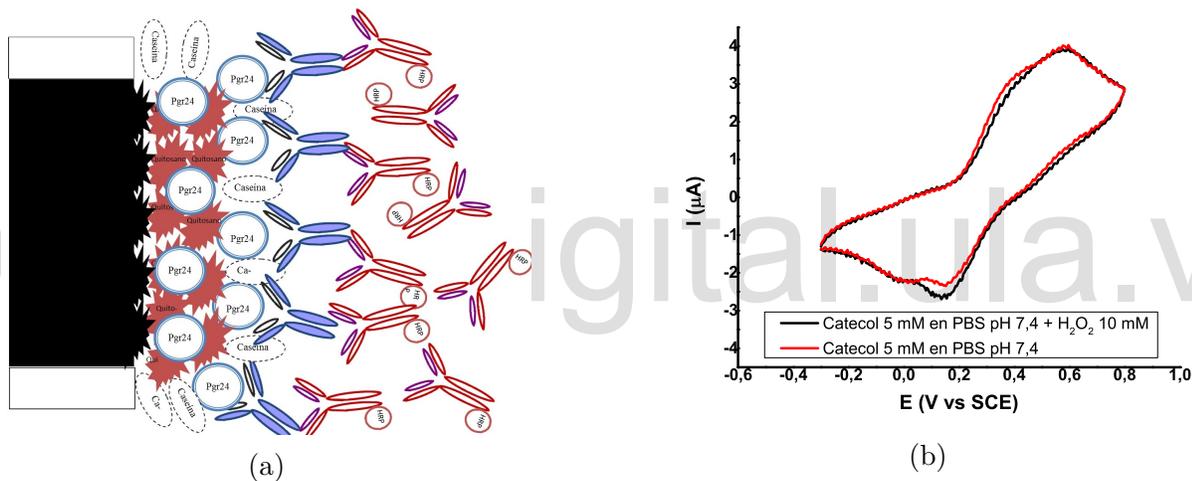


Figura 5.17: Inmunosensor: formación del inmunocomplejo de revelado. (5.17b) Respuesta voltamperométrica de una solución de catecol 5 mM y 10 mM H_2O_2 en PBS pH 7,4 para electrodos modificados con quitosano, caseína y el inmunocomplejo de revelado (suero:X1), (5.17a) Esquema reconocimiento anti IgG humano sobre el inmunosensor.

la simetría de la señal, que se manifiesta como una disminución en la corriente de oxidación del primer proceso redox, aproximadamente a 350 mV y un aumento en la corriente de reducción del proceso aproximadamente a 150 mV. A pesar de este cambio en la simetría de la respuesta, no es posible concluir que hubo actividad enzimática para este sistema por lo que se debe continuar a evaluar el catecol, en futuras investigaciones, como mediador electroquímico para determinar su factibilidad para transferir electrones desde el centro redox hasta la superficie electródica.

Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusiones

1. La transferencia electrónica de las superficies de grafito son menos eficientes que las de carbón vítreo u otras empleadas en inmunosensores reportados en la literatura
2. Se logró caracterizar el quitosano empleado en este TEG, arrojando altos valores de GDA ($\simeq 82\%$) lo cual permitió su utilización para modificar las superficies electrónicas.
3. La electrodeposición es una técnica viable para generar películas homogéneas y reproducibles de quitosano, que permite un control del grosor de la misma
4. Estas películas de quitosano permiten un control de la cantidad de antígeno retenida sobre cada electrodo
5. Las películas de quitosano tienen excelentes capacidades de retención del antígeno, en las condiciones experimentales no se observó desorción del mismo y la cinética de retención de la Pgr₂₄ sobre las mismas permite un control de la cantidad de antígeno adsorbido sobre el inmunosensor.
6. Se logró adaptar el inmunoensayo ELISA sobre los electrodos de grafito modificados con películas de quitosano y se verificó el avance del inmunoensayo sobre la superficie del sensor mediante la voltametría cíclica de la hidroquinona.
7. La peroxidasa conjugada a los anticuerpos no mostró actividad para los sistemas de hidroquinona, ioduro de potasio y ácido ferroceno carboxílico suplementados con peróxido de hidrógeno ni al estar inmovilizada directamente sobre las películas de quitosano, ni al estar acoplada a los anticuerpos primarios de los sueros empleados.

6.2. Recomendaciones

1. Realizar modificaciones a los métodos de preparación de pasta de carbono para evaluar su respuesta como inmunosensores.
2. Desarrollar protocolos para mejorar la respuesta electroquímica de los electrodos de grafito, sin ir en detrimento de la reproducibilidad de la deposición de las películas de quitosano.

3. Determinar el grosor de las películas de quitosano y evaluar la porosidad por técnicas de microscopía electrónica, para optimizar la morfología de la película y estandarizar el proceso de inmovilización del antígeno.
4. Evaluar la adsorción del antígeno sobre las películas de quitosano con distintas concentraciones en la solución de incubación, para aumentar los títulos de anticuerpos secundarios adsorbidos sobre los inmunosensores.
5. Incorporar nano partículas de oro sobre las películas de quitosano para evaluar si existen mejoras significativas en la respuesta electroquímica de los inmunosensores.
6. Evaluar la respuesta de otros mediadores electroquímicos que hayan sido empleados con la HRP.
7. Determinar la respuesta de otros sistemas reporteros y mediadores electroquímicos sobre las superficies de grafito, como lo son la fosfatasa alcalina o nanopartículas metálicas
8. Caracterizar la respuesta de los inmunosensores empleando catecol como mediador en medio de PBS pH 7,4.

www.bdigital.ula.ve

Caracterización Electroquímica de los Electrodos de Trabajo

Tabla A.1: Parámetros relacionados con la reversibilidad electroquímica del ferrocianuro de potasio sobre electrodos de carbón vítreo desnudos, reportados por Maiz, A.R.

ν	ΔE_p	I_{pa}/I_{pc}
mV/s	V	n/a
100	0,074	1,1
50	0,066	1,1
25	0,064	1,2
10	0,066	1,2

www.bdigital.ula.ve

Tabla A.2: Hoja de cálculos para la reversibilidad electroquímica del sistema ferrocianuro de potasio 5 mM en nitrato de potasio 0,5 M, voltametría cíclica con electrodos de grafito activados

ν	Epa	Ia	Iba	Ipa	Epc	Ic	Ibc	Ipc	ΔE_p	Ep/2	Ipa/Ipc	$\sqrt{\nu}$
mV/s	V	A	A	A	V	A	A	A	V	V	n/a	$\sqrt{mV/s}$
300	0,318	2,58E-04	-1,28E-05	2,71E-04	0,202	-1,70E-04	6,78E-05	-2,38E-04	0,116	0,26	1,13877	17,32051
250	0,326	2,30E-04	-1,23E-05	2,42E-04	0,208	-1,53E-04	6,27E-05	-2,16E-04	0,118	0,267	1,12332	15,81139
200	0,316	1,96E-04	-8,58E-06	2,05E-04	0,206	-1,31E-04	5,61E-05	-1,87E-04	0,11	0,261	1,09343	14,14214
150	0,314	1,72E-04	-7,73E-06	1,80E-04	0,206	-1,11E-04	4,92E-05	-1,60E-04	0,108	0,26	1,12191	12,24745
100	0,308	1,34E-04	-4,42E-06	1,38E-04	0,21	-9,06E-05	4,37E-05	-1,34E-04	0,098	0,259	1,03068	10
75	0,312	1,15E-04	-3,88E-06	1,19E-04	0,208	-7,75E-05	3,91E-05	-1,17E-04	0,104	0,26	1,01955	8,66025
50	0,31	9,45E-05	-2,22E-06	9,67E-05	0,204	-6,32E-05	3,30E-05	-9,62E-05	0,106	0,257	1,00541	7,07107
25	0,304	6,62E-05	-2,21E-06	6,84E-05	0,214	-4,48E-05	2,40E-05	-6,88E-05	0,09	0,259	0,99433	5
10	0,3	4,17E-05	-2,00E-06	4,37E-05	0,222	-2,87E-05	1,63E-05	-4,50E-05	0,078	0,261	0,97111	3,16228

Tabla A.4: Hoja de cálculos para la reversibilidad electroquímica del sistema hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M, voltametría cíclica con electrodos de grafito activados

ν	Epa	Ia	Iba	Ipa	Epc	Ic	Ibc	Ipc	ΔE_p	Ep/2	Ipa/Ipc	$\sqrt{\nu}$
mV/s	V	A	A	A	V	A	A	A	V	V	n/a	$\sqrt{mV/s}$
200	0,478	0,00161	1,07E-05	0,0016	0,386	-0,00112	2,73E-04	-0,00139	0,092	0,046	1,1481	14,14214
100	0,47	1,11E-03	-1,52E-05	1,13E-03	0,392	-7,85E-04	1,96E-04	-9,81E-04	0,078	0,039	1,14734	10
75	0,464	9,52E-04	1,61E-04	7,91E-04	0,398	-6,83E-04	1,61E-04	-8,44E-04	0,066	0,033	0,9372	8,66025
50	0,462	8,09E-04	-5,62E-06	8,15E-04	0,4	-5,79E-04	1,42E-04	-7,21E-04	0,062	0,031	1,12985	7,07107
25	0,466	5,54E-04	1,59E-05	5,38E-04	0,398	-3,83E-04	1,14E-04	-4,97E-04	0,068	0,034	1,08204	5
10	0,454	3,62E-04	2,87E-06	3,59E-04	0,408	-2,33E-04	9,66E-05	-3,30E-04	0,046	0,023	1,08959	3,16228
5	0,456	2,37E-04	-6,61E-07	2,38E-04	0,404	-1,53E-04	6,57E-05	-2,19E-04	0,052	0,026	1,0867	2,23607
1	0,45	1,03E-04	-1,83E-06	1,05E-04	0,406	-3,30E-05	7,56E-05	-1,09E-04	0,044	0,022	0,96529	1

Tabla A.6: Hoja de cálculos para la reversibilidad electroquímica del sistema hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M, voltametría cíclica con electrodos de grafito sin activar

ν	Epa	Ia	Iba	Ipa	Epc	Ic	Ibc	Ipc	ΔE_p	Ep/2	Ipa/Ipc	$\sqrt{\nu}$
mV/s	V	A	A	A	V	A	A	A	V	V	n/a	$\sqrt{mV/s}$
200	0,578	0,00126	2,33E-05	0,00124	0,254	-5,70E-04	-4,33E-04	-1,37E-04	0,324	0,162	9,02701	14,14214
100	0,57	8,70E-04	6,83E-06	8,63E-04	0,276	-4,26E-04	-1,34E-04	-2,92E-04	0,294	0,147	2,95471	10
75	0,558	7,68E-04	-1,20E-07	7,68E-04	0,276	-3,84E-04	-5,17E-05	-3,32E-04	0,282	0,141	2,31361	8,66025
50	0,546	6,14E-04	-3,14E-06	6,17E-04	0,288	-3,27E-04	-8,29E-05	-2,44E-04	0,258	0,129	2,52514	7,07107
25	0,544	4,38E-04	-9,24E-06	4,47E-04	0,294	-2,37E-04	-4,04E-05	-1,97E-04	0,25	0,125	2,27487	5
10	0,522	2,86E-04	2,62E-05	2,60E-04	0,314	-1,52E-04	1,95E-05	-1,72E-04	0,208	0,104	1,51487	3,16228
5	0,522	2,10E-04	1,26E-05	1,97E-04	0,33	-1,06E-04	2,35E-05	-1,30E-04	0,192	0,096	1,52432	2,23607
1	0,502	1,07E-04	1,26E-06	1,06E-04	0,38	-2,79E-05	6,89E-05	-9,68E-05	0,122	0,061	1,09236	1

Tabla A.8: Promedios relacionados con la reversibilidad electroquímica del ferrocianuro de potasio 5 mM en nitrato de potasio 0,5 M sobre electrodos de grafito desmudos y activados

ν	$\sqrt{\nu}$	(Epa-Epc)1	(Epa-Epc)2	(Epa-Epc)3	Mean	StD	Ipa/Ipc1	Ipa/Ipc2	Ipa/Ipc3	Mean	StD
mV/s	$\sqrt{mV/s}$	V	V	V	V	V	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
100	10	0,098	0,07	0,076	0,08133	0,01111	1,03068	1,02193	1,04671	1,0331	0,01257
75	8,66025	0,104	0,078	0,076	0,086	0,012	1,01955	1,01832	1,03788	1,02525	0,01095
50	7,07107	0,106	0,074	0,072	0,084	0,01467	1,00541	1,00597	1,02837	1,01325	0,0131
25	5	0,09	0,072	0,072	0,078	0,008	0,99433	0,98867	0,98117	0,98806	0,0066
10	3,16228	0,078	0,066	0,076	0,07333	0,00489	0,97111	0,9161	0,95891	0,94871	0,02889

Tabla A.10: Promedios relacionados con la reversibilidad electroquímica del ferrocianuro de potasio sobre electrodos de grafito desnudos sin activar

ν	$\sqrt{\nu}$	(Epa-Epc)1	(Epa-Epc)2	(Epa-Epc)3	Mean	StD	Ipa/Ipc1	Ipa/Ipc2	Ipa/Ipc3	Mean	StD
mV/s	$\sqrt{mV/s}$	V	V	V	V	V	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
100	10	0,108	0,08	0,078	0,08867	0,01289	1,00637	1,05847	1,11281	1,05922	0,05322
75	8,66025	0,108	0,086	0,078	0,09067	0,01156	1,02927	1,05014	1,11423	1,06455	0,04427
50	7,07107	0,1	0,08	0,072	0,084	0,01067	0,99933	0,99154	1,07251	1,02112	0,04467
25	5	0,092	0,08	0,08	0,084	0,00533	1,01393	1,00458	1,12731	1,04861	0,06832
10	3,16228	0,09	0,068	0,068	0,07533	0,00978	1,04217	0,96855	1,17102	1,06058	0,10248

Tabla A.12: Promedios relacionados con la reversibilidad electroquímica de la hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M sobre electrodos de grafito desnudos y activados

ν	$\sqrt{\nu}$	(Epa-Epc)1	(Epa-Epc)2	(Epa-Epc)3	Mean	StD	Ipa/Ipc1	Ipa/Ipc2	Ipa/Ipc3	Mean	StD
mV/s	$\sqrt{mV/s}$	V	V	V	V	V	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
100	10	0,07	0,084	0,078	0,07733	0,00702	1,16654	1,13537	1,14734	1,14975	0,01572
75	8,66025	0,064	0,078	0,066	0,06933	0,00757	1,09541	1,13646	1,1372	1,12303	0,02392
50	7,07107	0,074	6,60E-02	0,062	0,06733	6,11E-03	1,12E+00	1,16E+00	1,12985	1,13744	0,02175
25	5	6,40E-02	5,40E-02	6,80E-02	0,062	7,21E-03	1,09E+00	1,12E+00	1,08204	1,09666	0,01784
10	3,16228	4,80E-02	4,60E-02	4,60E-02	0,04667	1,15E-03	1,12E+00	1,09E+00	1,08959	1,1006	0,01906
5	2,23607	4,20E-02	5,00E-02	5,20E-02	0,048	5,29E-03	1,05E+00	1,06E+00	1,0867	1,0657	0,01932
1	1	3,80E-02	5,40E-02	4,40E-02	0,04533	8,08E-03	1,05E+00	1,01E+00	1,003	1,01923	0,02304

Tabla A.14: Promedios relacionados con la reversibilidad electroquímica de la hidroquinona 10 mM en ácido sulfúrico 0,5 M sobre electrodos de grafito desnudos sin activar

ν	$\sqrt{\nu}$	(Epa-Epc)1	(Epa-Epc)2	(Epa-Epc)3	Mean	StD	Ipa/Ipc1	Ipa/Ipc2	Ipa/Ipc3	Mean	StD
mV/s	$\sqrt{mV/s}$	V	V	V	V	V	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
200	14,14214	0,282	0,282	0,324	0,296	0,01867	3,15256	5,7021	9,02701	5,96056	2,94574
100	10	0,244	0,252	0,294	0,26333	0,02044	1,97049	2,44	2,95471	2,45507	0,49228
75	8,66025	0,238	2,38E-01	0,282	0,25267	1,96E-02	2,02E+00	2,02E+00	2,31361	2,11592	0,1712
50	7,07107	2,10E-01	2,34E-01	2,58E-01	0,234	1,60E-02	1,80E+00	1,77E+00	2,52514	2,0313	0,42788
25	5	1,82E-01	2,04E-01	2,50E-01	0,212	2,53E-02	1,52E+00	1,75E+00	2,27487	1,84703	0,38715
10	3,16228	1,60E-01	1,70E-01	2,08E-01	0,17933	1,91E-02	1,31E+00	1,44E+00	1,51487	1,42151	0,10668
5	2,23607	1,30E-01	1,48E-01	1,92E-01	0,15667	2,36E-02	1,28E+00	1,40E+00	1,52432	1,40092	0,12209

Caracterización del Quitosano

Tabla B.1: Parámetros empleados en el cálculo del GDA por los métodos de Brugnerotto ($GDA = 100 - 31,92 \frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 12,20$) y Baxter ($GDA = 100 - \frac{A_{1655}}{A_{3450}} * 115$)

Bandas	Abs max	Linea Base	Abs min	Abs Banda
cm^{-1}		cm^{-1}		
3444	1,3178	3444	0,1485	1,1693
1658	0,6665	1658	0,5036	0,1629
1419	0,7259	1419	0,6245	0,1014
1317	0,6992	1317	0,5789	0,1203

Tabla B.2: Estandarización del NaOH empleado en la titulación del quitosano

VNaOH	pH1	pH2	pH3	Mean	StD	Deriv pH
mL	pH	pH	pH	pH		
0,00	4,43	4,10	4,36	4,30	0,17	-0,06
0,50	4,40	4,42	4,51	4,44	0,06	0,28
1,00	4,71	4,71	4,74	4,72	0,02	0,58
1,50	4,98	4,98	4,98	4,98	0,00	0,51
2,00	5,22	5,18	5,26	5,22	0,04	0,54
2,50	5,52	5,45	5,47	5,48	0,04	0,52
3,00	5,74	5,71	5,77	5,74	0,03	1,08
3,50	6,60	6,56	6,55	6,57	0,03	5,05
4,00	10,79	10,63	10,75	10,72	0,08	4,42
4,50	11,02	11,03	11,12	11,06	0,06	0,62
5,00	11,41	11,20	11,39	11,33	0,12	0,58
5,50	11,60	11,47	11,53	11,53	0,07	0,24
6,00	11,65	11,56	11,65	11,62	0,05	0,10

Tabla B.3: Titulación conductimétrica del quitosano mediante NaOH 0,02 N

VNaOH	Conduc1	Conduc 2	Mean	StD
mL	mS-cm	mS-cm	mS-cm	
0,00	6,38	6,36	6,37	0,0141
0,50	5,83	5,81	5,82	0,0141
1,00	5,31	5,31	5,31	0,0000
1,50	4,83	4,85	4,84	0,0141
2,00	4,39	4,44	4,42	0,0354
2,50	3,99	4,05	4,02	0,0424
3,00	3,62	3,67	3,65	0,0354
3,50	3,27	3,32	3,30	0,0354
4,00	2,94	3,00	2,97	0,0424
4,50	2,65	2,70	2,68	0,0354
5,00	2,37	2,41	2,39	0,0283
5,50	2,10	2,15	2,13	0,0354
6,00	1,86	1,95	1,91	0,0658
6,50	1,62	1,67	1,65	0,0297
7,00	1,41	1,45	1,43	0,0283
7,20	1,33	1,36	1,35	0,0262
7,40	1,25	1,29	1,27	0,0276
7,60	1,22	1,25	1,24	0,0184
7,80	1,22	1,23	1,23	0,0092
8,00	1,22	1,23	1,22	0,0064
8,20	1,22	1,23	1,23	0,0050
8,40	1,22	1,23	1,23	0,0064
8,60	1,22	1,23	1,23	0,0071
8,80	1,22	1,23	1,23	0,0078
9,00	1,22	1,23	1,23	0,0071
9,20	1,22	1,23	1,23	0,0064
9,40	1,22	1,23	1,23	0,0057
9,60	1,22	1,23	1,23	0,0050
9,80	1,23	1,23	1,23	0,0007
10,00	1,24	1,23	1,24	0,0085
10,20	1,25	1,25	1,25	0,0014
10,40	1,28	1,28	1,28	0,0035
10,60	1,30	1,31	1,31	0,0028
10,80	1,33	1,34	1,33	0,0064
11,00	1,36	1,37	1,36	0,0106
11,50	1,42	1,45	1,44	0,0184
12,00	1,49	1,52	1,51	0,0212
12,50	1,56	1,59	1,57	0,0219
13,00	1,62	1,65	1,64	0,0255
13,50	1,68	1,72	1,70	0,0276
14,00	1,73	1,78	1,76	0,0332
14,50	1,79	1,84	1,81	0,0318
15,00	1,84	1,89	1,87	0,0311

Desarrollo del inmunosensor

Tabla C.1: Cálculo de la cantidad de antígeno retenida sobre electrodos modificados con películas de quitosano de 10 min

Tiempo	V Sol	Concentración	mPgr24 ret	% rel de sat
min	mL	$\mu\text{g}/\text{mL}$	μg	
0	1,20	62,25716	0,0000	0,0000
5	1,05	52,72403	11,4398	40,2878
10	0,90	49,22207	15,1168	53,2374
15	0,75	45,33100	18,6188	65,5704
20	0,60	38,71617	23,5799	83,0422
25	0,45	32,49046	27,3153	96,1973
30	0,30	30,73947	28,1033	98,9723
40	0,15	29,76671	28,3951	100,0000

Tabla C.2: Cálculo de la cantidad de antígeno retenida sobre electrodos modificados con películas de quitosano de 20 min

Tiempo	V Sol	Concentración	mPgr24 ret	% rel de sat
min	mL	$\mu\text{g}/\text{mL}$	μg	
0	1,20	62,25716	0,0000	0,0000
10	1,05	16,92617	54,3972	93,9516
20	0,90	13,03509	58,4828	101,0081
30	0,75	13,61875	57,9575	100,1008
40	0,60	14,78608	57,0820	98,5887
50	0,45	13,42420	57,8992	100,0000
60	0,30	13,42420	57,8992	100,0000

Tabla C.3: Cálculo de la cantidad de antígeno retenida sobre electrodos modificados con películas de quitosano de 30 min

Tiempo	V Sol	Concentración	mPgr24 ret	% rel de sat
min	mL	$\mu\text{g/mL}$	μg	
0	1,20	62,25716	0,0000	0,0000
10	1,05	32,10135	36,1870	60,4760
20	0,90	23,73554	44,9711	75,1561
30	0,75	13,81331	53,9011	90,0800
40	0,60	6,14789	59,6501	99,6879
50	0,45	7,00393	59,1365	98,8295
60	0,30	5,44750	59,8369	100,0000

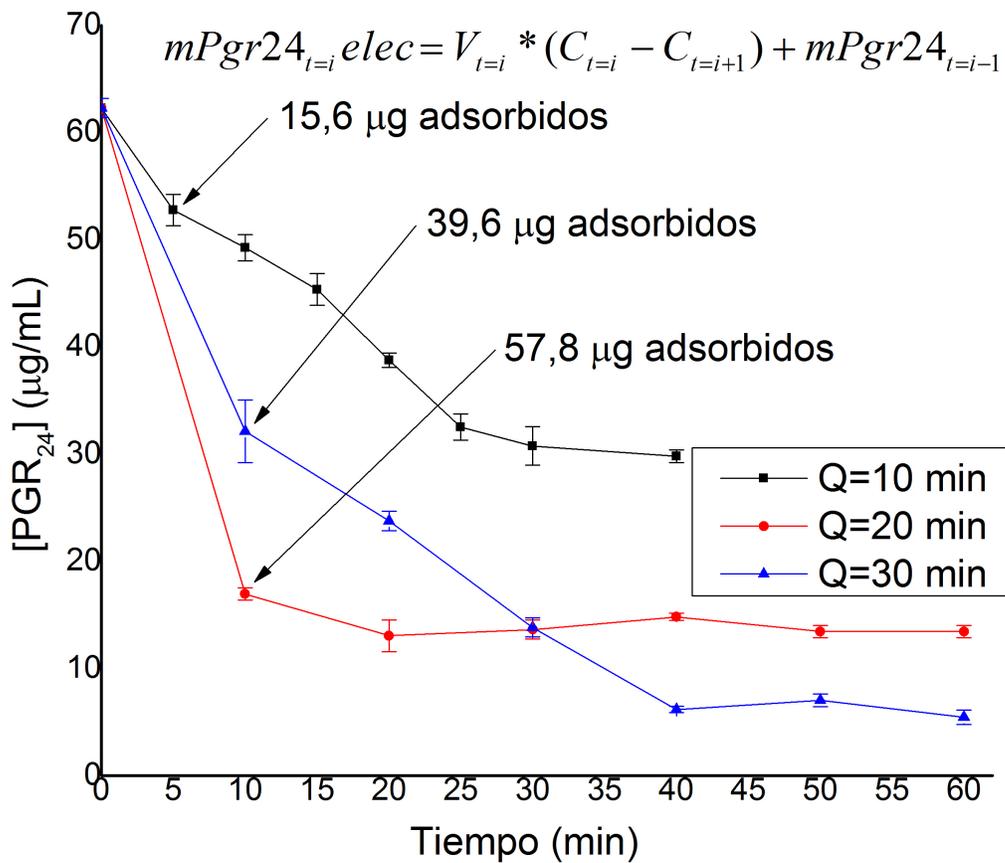


Figura C.1: Representación de los cálculos de la adsorción del antígeno sobre electrodos de grafito modificado con películas de quitosano

Tabla C.4: Potenciales de pico para la hidroquinona en PBS pH 7,4

Epo1	Epr2	DEp12	Epo2	Epr1	DEp12	etapa
mV	mV	mV	mV	mV	mV	
250	-40	290	460	330	130	1
255	-60	315	500	330	170	2
250	-60	310	500	340	160	3
270	-60	330	500	345	155	4
270	-60	330	500	345	155	5
250	-80	330	0	0	0	6

Bibliografía

- [1] Carlos Chagas. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia eo ciclo evolutivo do schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2):159–218, 1909.
- [2] H. Earl and Fife Jr. Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi. *Academic Press*, 1:135–173, 1977.
- [3] World Health Organization expert committee. Control of chagas disease. Informe Técnico 811, World Health Organization, 1991.
- [4] R. Briceño. *La casa enferma. Sociología de la Enfermedad de Chagas*. Consorcio de Ediciones Capriles C.A., Caracas, Venezuela, 1 edition, 1990.
- [5] Paulo Roberto Benchimol Barbosa. The oral transmission of chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International Journal of Cardiology*, 112:132–133, 2006.
- [6] Iván S. Marcipar and Claudia M. Lagier. *Current Topics in Tropical Medicine*. ISBN 978-953-51-0274-8, 2012. doi: 10.5772/28100.
- [7] The Center for Food Security & Public Health. American trypanosomiasis. Technical report, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, September 2009.
- [8] J.A. Urbina and R. Docampo. Specific chemotherapy of chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, 19:495–501, 2003.
- [9] J.A. Urbina. Chemotherapy of chagas' disease: the how and the why. *Journal of Molecular Medicine*, 77:332–338, 1999.
- [10] Jose Rodrigues Coura and Pedro Albajar Viñas. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465(7301):S6–S7, June 2010. doi: 10.1038/nature0922. URL http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301_supp/full/nature09221.html.
- [11] S. Wendel and A Gonzaga. Chagas disease and blood transfusion: A new problem? *Vox Sang*, 64:1–12, 1993.
- [12] Fernando Monteiro, Toby Barrett, Sinead Fitzpatrick, Celia Cordon-Rosales, Dora Feliciangeli, and Charles Beard. Molecular phylogeography of the amazonian chagas disease vectors rhodnius prolixus and r. robustus. *Molecular Ecology*, 12:997–1006, 2003.

- [13] María E. Ribone, María S. Belluzo, Daniela Pagani, Iván S. Marcipar, and Claudia M. Lagier. Corrigendum to amperometric bioelectrode for specific human immunoglobulin g determination: Optimization of the method to diagnose american trypanosomiasis [anal. biochem. 350 (2006) 61-70]. *Analytical Biochemistry*, 433(1):1, 2013. ISSN 0003-2697. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.017>.
- [14] Asunción R. Maiz. Estudio electroquímico de una proteína antigénica recombinante de trypanosoma cruzi, relacionada con el diagnóstico de la enfermedad de chagas. Trabajo especial de grado, Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, 2012.
- [15] María Soledad Belluzo, María Élica Ribone, and Claudia Marina Lagier. Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. *Sensors*, 8:1366–1399, 2008.
- [16] Bertold Hock. Antibodies for immunosensors a review. *Analytica Chimica Acta*, 347:177–186, 1997.
- [17] Carmen Munoz, Alberto Nieto, antoni Gaya, Jorge Martinez, and Jordi Vives. New experimental criteria for optimization of solid-phase antigen concentration and stability in elisa. *Journal of Immunological Methods*, 94:137–144, 1986.
- [18] Flamarion B. Diniz, Roseli R. Ueta, Alziana M . da C. Pedrosa, Madalena da C. Areias, Valéria R.A. Pereira, Edimilson D. Silva, José Godinho da Silva, Jr, Antônio G.P. Ferreira, and Yara M. Gomes. Impedimetric evaluation for diagnosis of chagas' disease: antigen-antibody interactions on metallic eletrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(2):79 – 84, 2003. ISSN 0956-5663. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00213-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00213-6).
- [19] Mônica Campàsa, Beatriz Prieto-Simón, and Jean-Louis Martyd. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20:3–9, 2009. doi: 10.1016/j.s.
- [20] Francesco Ricci, Gianluca Adornetto, and Giuseppe Palleschi. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*, 84:74–83, Dec 2012. doi: 10.1016/j.electacta.2012.06.033.
- [21] Claire L. Morgan, David J. Newman, and Christopher p. Price. Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clinical Chemistry*, 42:193–209, 1996.
- [22] Norman H. L. Chiu and Theodore K. Christopoulos, editors. *Advances in immunoassay technology*. Elsevier, March 2012.
- [23] You Wang, Hui Xu, Jianming Zhang, and Guang Li. Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, 8(4):2043–2081, 2008.
- [24] Haesik Yang. Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(3-4):422–428, Aug 2012. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.03.015.
- [25] S. Ignatov, D. Shishniashvili, B. Ge, F.W. Scheller, and F. Lisdat. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode and for the detection of antioxidants. *Biosensors & Bioelectronics*, 17:191–199, 2002.
- [26] Elizabeth A. H. Hall, J. Justin Gooding, and Carl E. Hall. Redox enzyme linked electrochemical sensors, theory meets practice. *Mikrochimica Acta*, 121:119–145, 1995.

- [27] W. John Albery, Martyn G. Boutelle, Sally L. T. Durrant, Marianne Fillenz, Andrew R. Hopkins, Bernard P. Mangold, A. G. Fogg, and G. S. Wilson. Sensitive enzyme electrodes [and discussion]. *Physical Sciences and Engineering*, 333(1618):49–61, 2013.
- [28] Chi Hung Tzang, Ruo Yuan, and Mengsu Yang. Voltammetric biosensors for the determination of formate and glucose-6-phosphate based on the measurement of dehydrogenase-generated nadh and nadph. *Biosensor & Bioelectronics*, 16:211–219, 2001.
- [29] Dorothee Grieshaber, Robert MacKenzie, Janos Vörös, and Erik Reimhult. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. *Sensors*, 8:1400–1458, 2008.
- [30] C Fernandez-Sanchez and A Costa-Garcia. Adsorption of immunoglobulin g on carbon paste electrodes as a basis for the development of immunoelectrochemical devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(5):403–413, 1997.
- [31] Antonio Aparecido Pupim Ferreira, Cecilio Sadao Fugivara, Hideko Yamanaka, and Assis Vicente Benedetti. *Preparation and Characterization of Imunosensors for Disease Diagnosis, Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*. InTech, 2011. doi: ISBN: 978-953-307-443-6.
- [32] Antonio Aparecido Pupim Ferreira, Carolina Venturini Uliana, Michelle de Souza Castilho, Naira Canaverolo Pesquero, Marcos Vinicius Foguel, Glauco Pilon dos Santos, Cecilio Sadao Fugivara, Assis Vicente Benedetti, and Hideko Yamanaka. *Amperometric Biosensor for Diagnosis of Disease*. March 2013. ISBN 978-953-51-1035-4. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/53656>.
- [33] Miguel Peixoto de Almeida and Sonia AC Carabineiro. The role of nanogold in human tropical diseases: research, detection and therapy. *Gold Bulletin*, 46:1–15, 2013. doi: 10.1007/s13404-013-0086-9.
- [34] Gabriela Preda, Otilia Bizerea, and Beatrice Vlad-Oros. *Sol-gel technology in enzymatic electrochemical biosensors for clinical analysis*. InTech, July 2011.
- [35] Jianzhong Zhu, Ziqiang Zhu, Zongsheng Lai, Rong Wang, Xiaoming Guo, Xiaqin Wu, Guoxiong Zhang, Zongrang Zhang, Yiting Wang, and Zongyou Chen. Planar amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized by chitosan film on prussian blue layer. *Sensors*, 2(4):127–136, 2002. ISSN 1424-8220. doi: 10.3390/s20400127.
- [36] Silvia Sanllorrente-Méndez, Olga Domínguez-Renedo, and M. Julia Arcos-Martínez. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. application to the determination of arsenic(iii). *Sensors*, 10(3):2119–2128, Mar 2010. doi: 10.3390/s100302119.
- [37] Joseph Wang. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis*, 17(1):7–14, 2005.
- [38] Xi-Liang Luo, Jing-Juan Xu, Ying Du, and Hong-Yuan Chen. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*, 334(2):284–289, Nov 2004. doi: 10.1016/j.ab.2004.07.005.
- [39] Kagan Kerman, Masaaki Kobayashi, and Eiichi Tamiya. Recent trends in electrochemical dna biosensor technology. *Measurement Science and Technology*, 15(2):R1, 2004.

- [40] Chun Xu, Hong Cai, Qun Xu, Pingang He, and Yuzhi Fang. Characterization of single-stranded dna on chitosan-modified electrode and its application to the sequence-specific dna detection. *Fresenius J Anal Chem*, 369:428–432, 2001.
- [41] Cun-Xi Lei, Fu-Chun Gong, Guo-Li Shen, and Ru-Qin Yu. Amperometric immunosensor for *Schistosoma japonicum* antigen using antibodies loaded on a nano-au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 96(3):582–588, 2003.
- [42] Gordon Parkinson and Bobby Pejčić. Using biosensors to detect emerging infectious diseases. Technical report, Nanochemistry Research Institute, Curtin University of Technology, Perth, Western Australia, 2005.
- [43] Dmitri Ivnitski, Ihab Abdel-Hamid, Plamen Atanasov, and Ebtisam Wilkins. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(7):599–624, 1999.
- [44] Antonio Aparecido Pupim Ferreira, Walter Colli, Paulo Inácio da Costa, and Hideko Yamana. Immunosensor for the diagnosis of chagas’ disease. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(1):175 – 181, 2005. ISSN 0956-5663. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2004.08.001>.
- [45] Sirley V. Pereira, Franco A. Bertolino, Martin A. Fernandez-Baldo, German A. Messina, Eloy Salinas, Maria I. Sanz, and Julio Raba. A microfluidic device based on a screen-printed carbon electrode with electrodeposited gold nanoparticles for the detection of igg anti-antibodies. *Analyst*, 136:4745–4751, 2011. doi: 10.1039/c1an15569e.
- [46] Hongxia Zhang. *Dissertation abstract: New concepts in surface modification for biosensor application-poluaniline and bacteriophage surface modification*. PhD thesis, Graduate Faculty of Auburn University, Auburn, Alabama, December 2008.
- [47] Cun-Xi Lei, Jing Wu, Hua Wang, Guo-Li Shen, and Ru-Qin Yu. A new electrochemical immunoassay strategy for detection of transferrin based on electrostatic interaction of natural polymers. *Talanta*, 63(2):469–474, May 2004. doi: 10.1016/j.talanta.2003.11.017.
- [48] Xueqing Zhang, Qin Guo, and Daxiang Cui. recent advances in nanotechnology applied to biosensors. *Sensors*, 9:1033–1053, 2009. doi: 10.3390/s90201033.
- [49] M. Yakup Arıca, Meltem Yılmaz, Emine Yalçın, and Gulay Bayramoğlu. Surface properties of reactive yellow 2 immobilised pHEMA and hEMA/chitosan membranes: characterisation of their selectivity to different proteins. *Journal of Membrane Science*, 240(1-2):167–178, Sep 2004. doi: 10.1016/j.memsci.2004.05.005.
- [50] Yongjun Zhang, Shuguang Yang, Ying Guan, Xiaopeng Miao, Weixiao Cao, and Jian Xu. Novel alternating polymer adsorption/surface activation self-assembled film based on hydrogen bond. *Thin Solid Films*, 437(1-2):280–284, Aug 2003. doi: 10.1016/S0040-6090(03)00660-6.
- [51] Ana M. Azevedo, Veronica C. Martins, Duarte M.F. Prazeres, Vojislav Vojinovic, Joaquim M.S. Cabral, and Luis P. Fonseca. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. volume 9 of *Biotechnology Annual Review*, pages 199 – 247. Elsevier, 2003. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1387-2656\(03\)09003-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1387-2656(03)09003-3). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387265603090033>.

- [52] Xi-Liang Luo, Jing-Juan Xu, Qing Zhang, Gong-Jun Yang, and Hong-Yuan Chen. Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(1):190–196, 2005.
- [53] A.A.P. Ferreira, W. Colli, M.J.M. Alves, D.R. Oliveira, P.I. Costa, A.G. Guell, F. Sanz, A.V. Benedetti, and H. Yamanaka. Investigation of the interaction between tc85-11 protein and antibody anti-by afm and amperometric measurements. *Electrochimica Acta*, 51:5046–5052, 2006.
- [54] Marcos Foguel, Glauco dos Santos, Antonio A.P. Ferreira, Hideko Yamanaka, and Assis Benedetti. Amperometric immunosensor for chagas disease using gold cd-r transducer. *Electroanalysis*, 23(11):2555–2561, 2011.
- [55] Maria Soledad Belluzo, Maria Elida Ribone, Cecilia Camussone, I. S. Marcipar, and Claudia M. Lagier. Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose chagas disease. *Analytical Biochemistry*, 408:86–94, 2011.
- [56] Liakatali Bodalbhai and Anna Brajter-Toth. Scanning electron microscopy in the analysis of the activity of graphite electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 231:191–201, 1990.
- [57] Joseph P. MORRIS and Jhon M. SCHEMPF. Voltammetric studies at the graphite electrode in quiet solutions. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 31(2):286–291, February 1959.
- [58] Mark Wightman, Mark Deakin, Paul Kovach, Werner Kuhr, and Kenneth Stutts. Methods to improve electrochemical reversibility at carbon electrodes. *J. Electrochem. Soc.*, 131(7):1578–1593, 1984. doi: 10.1149/1.2115913.
- [59] Robert Bowling, Richard Packard, and Richard McCreery. Mechanism of electrochemical activation of carbon electrodes: Role of graphite lattice defects. *Langmuir*, 5:683–688, 1989.
- [60] Mark T. McDermott and Richard L. McCreery. Scanning tunneling microscopy of ordered graphite and glassy carbon surfaces electronic control of quinone adsorption. *Langmuir*, 10:4307–4314, 1994.
- [61] R. J. Klinger and J. K. Kochi. Electron-transfer kinetics from cyclic voltammetry. quantitative description of electrochemical reversibility. *Journal of Physical Chemistry*, 85:1731–1741, 1981.
- [62] R. S. Nicholson. Semiempirical procedure for measuring with stationary electrode polarography rates of chemical reactions involving the product of electron transfer. *Analytical Chemistry*, 38(10):1406–1406, 1966. doi: 10.1021/ac60242a030.
- [63] Allen J. Bard and Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2000. ISBN 0471043729.
- [64] Janell E. Heffner, Jeffrey C. Raber, Owen A. Moe, and Wigal Carl T. Using cyclic and voltammetry and molecular modeling to determine and substituent effects and in the one-electron reduction of benzoquinones. *Journal of Chemical Education*, 75(3):365–368, March 1998.
- [65] Linhongjia Xiong, Christopher Batchelor-McAuley, Kristopher R. Ward, Clive Downing, Robert S. Hartshorne, Nathan S. Lawrence, and Richard G. Compton. Voltammetry at graphite electrodes: The oxidation of hexacyanoferrate (ii) (ferrocyanide) does not exhibit pure

- outer-sphere electron transfer kinetics and is sensitive to pre-exposure of the electrode to organic solvents. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 661(1):144–149, Oct 2011. doi: 10.1016/j.jelechem.2011.07.028.
- [66] Ya Zhang and Jian Bin Zheng. Comparative investigation on electrochemical behavior of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode, ionic liquid modified carbon paste electrode and carbon paste electrode. *Electrochimica Acta*, 52:7210–7216, 2007. doi: 10.1016/j.
- [67] Linjin Ma, Zhenhui Wang, and Quanmin Li. Study on electrochemical oxidation behaviors and the diffusion mechanism of hydroquinone at pre-anodized carbon paste electrode by cyclic voltammetry. *The Analyst*, 137(2):432, 2011. doi: 10.1039/c1an15865a.
- [68] Mohammad Rafiee and Davood Nematollahi. Voltammetry of electroinactive species using quinone/hydroquinone redox: A known redox system viewed in a new perspective. *Electroanalysis*, 19(13):1382–1386, Jul 2007. doi: 10.1002/elan.200703864.
- [69] Jun Wang, Huanshun Yin, Xiaomeng Meng, Jianying Zhu, and Shiyun Ai. Preparation of the mixture of graphene nanosheets and carbon nanospheres with high adsorptivity by electrolyzing graphite rod and its application in hydroquinone detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 662(2):317–321, Nov 2011. doi: 10.1016/j.jelechem.2011.08.019.
- [70] Michael Sharp. The determination of electron transfer rates for several quinoid compounds at platinum and gold electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 88:193–203, 1978.
- [71] ST Koev, PH Dykstra, X Luo, GW Rubloff, WE Bentley, GF Payne, and R Ghodssi. Chitosan: an integrative biomaterial for lab-on-a-chip devices. *Lab on a Chip*, 10(22):3026–3042, 2010.
- [72] Johan Benesch and Tengvall Pentti. Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*, 23:2561–2568, 2002.
- [73] Voravee P. Hoven, Varawut Tangpasuthadol, Yaowamand Angkitpaiboon, Napanporn Vallapa, and Suda Kiatkamjornwong. Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydrate Polymers*, 68:44–53, 2007. doi: doi:10.1016/j.carbpol.2006.07.008.
- [74] He Huang, Naifei Hu, Yonghuai Zeng, and Gu Zhou. Electrochemistry and electrocatalysis with heme proteins in chitosan biopolymer films. *Analytical Biochemistry*, 308:141–151, 2002.
- [75] Elson Santiago de Alvarenga, Cristiane Pereira de Oliveira, and Carlos Roberto Bellato. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 80(4):1155–1160, May 2010. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.01.037.
- [76] Luciana Simionatto Guinesi and Eder Tadeu Gomes Cavalheiro. The use of dsc curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta*, 444(2): 128–133, 2006.
- [77] R. Czechowska-Biskup, D. Jarosińska, B. Rokita, P. Ulański, and J. M. Rosiak. Determination of degree of deacetylation of chitosan - comparison of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its ...*, Volume, XVII:5–21, 2012.
- [78] CKS Pillai, Willi Paul, and Chandra P Sharma. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7):641–678, 2009.

- [79] Elson Santiago de Alvarenga. *Characterization and Properties of Chitosan, Biotechnology of Biopolymers*. InTech, 2011.
- [80] Marguerite Rinaudo, Michel Milas, and Pham Le Dung. Characterization of chitosan. influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15:281–285, October 1993.
- [81] Pierre Sorlier, Anne Denuzière, Christophe Viton, and Alain Domard. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 2:765–772, 2001.
- [82] Ricardo M. P. da Silva, João F. Mano, and Rui L. Reis. Straightforward determination of the degree of n-acetylation of chitosan by means of first-derivative UV spectrophotometry. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209(14):1463–1472, Jul 2008. doi: 10.1002/macp.200800191.
- [83] FM Goycoolea, NE El Gueddari, C Remunan-Lopez, A Coggiola, G Lollo, A Domard, and MJ Alonso. Effect of molecular weight and degree of acetylation on the physicochemical characteristics of chitosan nanoparticles. *fiemel S., Vårum KM fimumnu MM, Hžncal AA Advances in Chitin Science X, Alp Ofset, Ankara*, pages 542–547, 2007.
- [84] Zulay Marmol, Gisela Paez, Marisela Rincon, Karelen Araujo, Vaternyna Aiello, Cintia Chandler, and Edixon Gutierrez. Quitina y quitosano polimeros amigables. una revision de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientifica URU*, 1:53–58, 2011.
- [85] Alasdair Baxter, Michael Dillon, KD Anthony Taylor, and George AF Roberts. Improved method for ir determination of the degree of n-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14(3):166–169, 1992.
- [86] J. Brugnerotto, J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Arguelles-Monal, J. Desbrieres, and M. Rinaudo. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42:3569–3580, 2001.
- [87] Lina Altomare, Lorenza Draghi, Roberto Chiesa, and Luigi De Nardo. Morphology tuning of chitosan films via electrochemical deposition. *Materials Letters*, 78:18–21, Jul 2012. doi: 10.1016/j.matlet.2012.03.035.
- [88] Ruping Liang, Hongzhen Peng, and Jianding Qiu. Fabrication, characterization, and application of potentiometric immunosensor based on biocompatible and controllable three-dimensional porous chitosan membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 320:125–131, 2008. doi: 10.1016/j.jcis.2008.01.001.
- [89] Susan Lynn Buckhout-White. *CHARACTERIZATION OF ELECTRODEPOSITED CHITOSAN: AN INTERFACIAL LAYER FOR BIO-ASSEMBLY AND SENSING*. PhD thesis, Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, 2009.
- [90] Rebecca A. Zangmeister, Jung J. Park, Gary W. Rubloff, and Michael J. Tarlov. Electrochemical study of chitosan films deposited from solution at reducing potentials. *Electrochimica Acta*, 51(25):5324–5333, Jul 2006. doi: 10.1016/j.electacta.2006.02.003.
- [91] Rasa Pauliukaite, Mariana E. Ghica, Orlando Fatibello-Filho, and Christopher M.A. Brett. Electrochemical impedance studies of chitosan-modified electrodes for application in electrochemical sensors and biosensors. *Electrochimica Acta*, 55:6239–6247, 2010. doi: 10.1016/j.electacta.2009.09.055.

- [92] Yi Cheng, Kelsey M. Gray, Laurent David, Isabelle Royaud, Gregory F. Payne, and Gary W. Rubloff. Characterization of the cathodic electrodeposition of semicrystalline chitosan hydrogel. *Materials Letters*, 87:97–100, Nov 2012. doi: 10.1016/j.matlet.2012.07.075.
- [93] Annika Lindgren, Tautgirdas Ruzgas, Lo Gorton, Elisabeth Csoregi, Gerardo Bautista-Ardila, Ivan Sakharov, and Irina Gazaryan. Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer. *Biosensor & Bioelectronics*, 15:491–497, 2000.
- [94] T. Ruzgas, L. Gorton, J. Emneus, and G. Marko-Varga. Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 391:41–49, 1995.
- [95] Richard Nicholson. Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics. *Analytical Chemistry*, 37(11):1351–1355, 1965.
- [96] D. Golub, Y. Oren, and A. Soffer. The electrical double layer of carbon and graphite electrodes part iv. dependence of carbon electrode dimensions and electrical capacity on ph. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 227:41–53, 1987.
- [97] Karel Vytras, Ivan Svancara, and Radovan Metelka. Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(10):1021–1033, 2009. doi: 10.2298/JSC0910021V.
- [98] C Fernandez-Sanchez, MB Gonzalez-Garcia, and A Costa-Garcia. Ac voltammetric carbon paste-based enzyme immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(12):917–924, 2000.
- [99] Yiyi She, Yougen Tang, Hongtao Liu, and Ping He. Electrochemical determination of hydroquinone using hydrophobic ionic liquid-type carbon paste electrodes. *Chemistry Central Journal*, 4(1):17, 2010. ISSN 1752-153X. doi: 10.1186/1752-153X-4-17.
- [100] Christine Sapan, Roger Lundblad, and Nicholas Price. Review colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29:99–108, 1999.
- [101] Sachiko Tanimoto and Akio Ichimura. Discrimination of inner- and outer-sphere electrode reactions by cyclic voltammetry experiments. *Journal of Chemical Education*, 90(6):778–781, Jun 2013. doi: 10.1021/ed200604m.
- [102] David O. Wipf, Kenneth R. Wehmeyer, and R. Mark Wightman. Disproportionation of quinone radical anions in protic solvents at high ph. *Journal of Organic Chemistry*, 51:4760–4764, 1986.
- [103] Partha Sarathi Guin, Saurabh Das, and P. C. Mandal. Electrochemical reduction of quinones in different media: A review. *International Journal of Electrochemistry*, 2011:Article ID 816202, 2011.
- [104] W. Richard Turner and J. Philip Elving. Electrochemical behavior of the quinone/hydroquinone system in pyridine. *J. Electrochem. Soc.*, 112:1215–1217, 1965. doi: 10.1149/1.2423403.
- [105] Teodor Enache and Ana Oliveira-Brett. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 655:9–16, 2011. doi: doi:10.1016/j.jelechem.2011.02.022.

- [106] R. S. Nicholson and Irving. Shain. Theory of stationary electrode polarography. single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Analytical Chemistry*, 36(4):706–723, 1964. doi: 10.1021/ac60210a007.
- [107] H. N. Lei, A. Metrot, and M. Troyon. Scanning tunneling microscopy analysis of a glassy carbon heat treated at 2500 °C. *Carbon*, 32:79–84, 1994.
- [108] H. Tang, A. Kitani, and M. Shiotani. Cyclic voltammetry of ki at polyaniline-filmed pt electrodes part i: Formation of polyaniline-iodine charge transfer complexes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 26:36–44, 1996.
- [109] Barbara Krajewska. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35:126–19, 2004. doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- [110] Elmorsy Khaled, H.N.A. Hassan, I.H.I. Habib, and Radovan Metelka. Chitosan modified screen-printed carbon electrode for sensitive analysis of heavy metals. *Int. J. Electrochem. Sci*, 5:158–167, 2010.
- [111] Fraser A. Armstrong, H. Allen O. Hill, B. Nigel Oliver, and Nicholas J. Walton. Direct electrochemistry of redox proteins at pyrolytic graphite electrodes. *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 921–923, 1984.

www.bdigital.ula.ve