

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA**



**Desarrollo y evaluación de un biosensor quimioluminiscente
para su aplicación en análisis clínicos.**

Trabajo especial de grado presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la Br. Karina Benavides Ferreira, para optar al título de Licenciado en Química. Tutores: Dr. Jimmy Castillo y Dr. Freddy González.

Caracas, Mayo de 2010.

Yo Profesor Jimmy Castillo, Investigador del Laboratorio de espectroscopia láser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y el profesor Freddy González, Investigador del centro de medicina experimental de la Escuela de medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“Desarrollo y evaluación de un biosensor quimioluminiscente para su aplicación en análisis clínicos”.

Que presenta la Br. Karina Benavides Ferreira, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de espectroscopia láser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante el año 2009-2010, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 28 de Abril de 2010

Dr. Jimmy Castillo.
(Director)

Dr. Freddy González.
(Director)

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo especial de grado titulado: "Desarrollo y evaluación de un biosensor quimioluminiscente para su aplicación en análisis clínicos", presentado por la Br. Karina Benavides Ferreira, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra magna casa de estudios para optar al título de Licenciado en Química.

Dr. Jimmy Castillo.
(Director)

Dr. Freddy González.
(Director)

Dr. Alberto Fernández.
(Jurado)

Dr. Pedro Rodríguez.
(Jurado)

Agradecimientos.

Quisiera agradecer a todos aquellos que de diversas maneras han hecho posible la realización de este trabajo y por todos los logros, dichas, alegrías, tropiezos y tristezas en mi carrera, muy especialmente:

A Dios, por darme mucha salud para lograr lo que me he propuesto en la vida y por darme la fortaleza que necesito en los momentos difíciles.

A mi madre, quien con mucho esfuerzo me ha sacado adelante en la vida y me ha enseñado que para alcanzar un sueño hay que luchar. Por darme amor y apoyo en todo momento, por recordarme siempre lo importante que soy para ella y ser siempre mí ejemplo a seguir, por ser incondicional y por siempre ser mí mejor amiga. A mi hermano, por su colaboración durante mi carrera.

A la Universidad Central de Venezuela, nuestra magna casa de estudio, por recibirme y brindarme una formación académica y humana, por permitirme conocer y compartir con personas únicas e inolvidables.

A todos los profesores que me formaron como Licenciada, gracias a sus enseñanzas hoy me siento segura de mi Título profesional.

Al profesor Jimmy Castillo, mi tutor, por brindarme la oportunidad de desarrollar el TEG en su laboratorio, por su paciencia y el tiempo dedicado.

A mi tutor, profesor Freddy González, por su paciencia, su dedicación en el desarrollo de este trabajo, su colaboración y sus útiles consejos.

Al profesor Alberto Fernández, quien tuvo la labor de ser jurado de mi trabajo, a quien admiro y respeto por la dedicación a su trabajo. Agradezco infinitamente su colaboración, sus sabios consejos y la confianza que deposito en mí en todo momento.

Al profesor Pedro Rodríguez, mi jurado, por sus observaciones y sugerencias, y por compartir sus conocimientos en el área de biología que contribuyeron de manera significativa en la elaboración de este proyecto.

A los profesores José Chirinos y Yosmery Vitta, por brindarme su apoyo siempre que lo necesitaba para hacer un trabajo de calidad.

Al profesor Héctor Gutiérrez, por el tiempo dedicado para elaborar el software para el procesamiento de la data.

A todos los profesores integrantes de “la familia de planta baja”, Lola De Lima, Ma. A. Ranaudo, Ma. Rodríguez, M. Caetano, Alberto F., Héctor G., Yosmery V., Mauro Martínez, Vincent P., José Chirinos y Jimmy C., porque en cierta forma han llegado a ser una parte importante de mi vida. Por darle alegría al trabajo de todos los días.

A Sacha Oropeza, mi compañera durante la carrera, por ayudarme en muchas oportunidades y por tantos momentos de estudio que compartimos. A Luis Castillo, Andreina Ron y Cristian Gouveia por ser mis compañeros de estudio.

A Mauro Martínez, por acompañarme, darme su apoyo incondicional y compartir conmigo tantos momentos difíciles durante la elaboración de este trabajo.

A Rohany Flores (Roha), Alvaro Peña (Alvarito), Daniel Arismendi (ami), Patricia Guevara (Paty-Paty), Gabriella Díaz (Gaby) y Emmely Pérez (Emy), mis amigos de siempre, por su valiosa amistad, por brindarme su apoyo incondicional y darme ánimo cuando más lo he necesitado. Por las rumbas, los cuentos y por todos los momentos inolvidables que compartimos y que seguiremos compartiendo.

A todos y cada uno de ustedes muchas gracias...

Abreviaturas.

QL	Quimioluminiscencia.
GO	Glucosa Oxidasa.
CO	Colesterol Oxidasa.
M ⁿ⁺	Metal de transición.
CCD	Dispositivo de carga acoplada.
TMOS	Tetrametoxisilano.
TEOS	Tetraetoxisilano.
LOD	Límite de detección.
HRP	Peroxidasa de Rábano.
AuNPs	Nanopartículas de Oro.
4-AAP	4-Aminoantipirina.
ANOVA	Análisis de varianza.
CV	Coficiente de Varianza.
gl	Grados de libertad
ppb	Partes por billón.

Resumen.

En este trabajo se exploró la viabilidad de elaborar un biosensor para la determinación de Glucosa en sangre por quimioluminiscencia usando como receptáculo de la muestra una placa ELISA. El método se basa en las diferencias en la intensidad de quimioluminiscencia del luminol debido a las diferentes cantidades de peróxido de hidrógeno producido por la reacción enzimática de glucosa catalizada por la enzima glucosa oxidasa. Para la adquisición y el procesamiento de los datos experimentales se utilizó una cámara CCD y un software diseñado en Matlab R2006a. Con el fin de obtener las condiciones experimentales óptimas, fueron investigados una serie de parámetros y dos sistemas de medida. En uno glucosa oxidasa (GO) es encapsulada en un sol gel y en otro GO es utilizada directamente en solución. Dentro de los parámetros estudiados están, el efecto del área de observación y la reproducibilidad del sistema con la enzima tanto en la matriz sólida como en solución. En el primer caso se encontraron problemas en la velocidad de difusión de las especies a través de los poros del gel, lo cual impidió que se realizaran medidas con este. Para las medidas en solución se evaluaron dos software, uno cuya señal emitida es igual a la mediana de los píxeles ubicados en el área de observación seleccionada y otro en el cual esta es igual a la suma de todos los píxeles. El segundo software usando un tiempo de integración de la señal entre 0,1 y 1,0 seg. presentó mejor reproducibilidad y por lo tanto fue el empleado para el resto de los análisis. La curva de calibración obtenida con las condiciones óptimas del sistema fue lineal en el rango de 500 a 2000 mg/l con un coeficiente de correlación de 0,9457. El método propuesto fue aplicado en la determinación de glucosa en plasma sanguíneo de ratas encontrando que existen interferencias por parte de la matriz de la muestra en el procedimiento de medida lo que impidió validar el método propuesto.

INDICE

1.- Introducción.	7
2.- Revisión Bibliográfica.	9
2.1.- Análisis clínicos.	9
2.2.- Generalidades de la Glucosa.	10
2.2.1.- <i>La glucosa.</i>	10
2.2.2.- <i>Importancia de la determinación de glucosa en los seres humanos.</i>	11
2.2.3.- <i>Métodos empleados en la determinación de Glucosa.</i>	12
2.3.- Generalidades del Colesterol.	14
2.3.1.- <i>El colesterol.</i>	14
2.3.2.- <i>Importancia de la determinación de colesterol en los seres humanos.</i>	15
2.3.3.- <i>Métodos empleados en la determinación de Colesterol.</i>	16
2.4.- Generalidades del Ácido Úrico.	17
2.4.1.- <i>El ácido úrico.</i>	17
2.4.2.- <i>Importancia de la determinación de ácido úrico en los seres humanos.</i>	19
2.4.3.- <i>Métodos empleados en la determinación de ácido úrico.</i>	20
2.5.- Instrumentos analíticos empleados en análisis clínicos.....	20
2.6.- La Luminiscencia.	25
2.6.1.- Quimioluminiscencia (QL).....	27
2.6.1.1.- <i>Medida de la quimioluminiscencia.</i>	29
2.6.1.2.- <i>Aplicaciones de la quimioluminiscencia.</i>	30
2.6.1.3.- <i>Reactivos quimioluminiscentes.</i>	31
2.6.1.4.- <i>Luminol.</i>	32
2.7.- Nuevas tendencias en instrumentos empleados en análisis clínicos.....	36
2.7.1.- <i>Métodos enzimáticos.</i>	40
2.7.2.- <i>Biosensores.</i>	42
2.7.2.1.- <i>Construcción de un biosensor.</i>	43
2.7.2.2.- <i>Características de un biosensor.</i>	43

2.7.3.- <i>Sol-gel</i>	46
3.- Antecedentes.....	50
3.1.- Estudios realizados sobre la inmovilización de enzimas.	50
4.- Justificación.....	53
5.- Objetivos.....	55
5.1.- Objetivo General.....	55
5.2.- Objetivos específicos.....	55
6.- Metodología Experimental.....	56
6.1.- Reactivos y soluciones.	56
6.2.- Instrumentación.	56
6.2.1.- <i>Sistema para detección de Quimioluminiscencia</i>	56
6.2.1.1.- <i>Descripción del equipo empleado</i>	57
6.2.1.2.- <i>Funcionamiento del sistema quimioluminiscente</i>	57
6.2.2.- <i>Sistema para detección colorimétrica</i>	61
6.3.- Análisis en matriz sólida (sol-gel).	61
6.3.1.- <i>Preparación del sol-gel</i>	61
6.3.1.- <i>Medidas en matriz sólida</i>	62
6.4.- Análisis en solución.	63
6.5.- Optimización del sistema quimioluminiscente.	63
6.6.- Obtención y preparación de las muestras.	64
6.7.- Aplicación y validación del sistema quimioluminiscente.	65
6.8.- Determinación de Glucosa.	65
6.8.1.- <i>Sistema quimioluminiscente</i>	65
6.8.2.- <i>Método colorimétrico de glucosa oxidasa</i>	66
7.- Resultados y discusiones.....	69
7.1.- Optimización del sistema quimioluminiscente.	69
7.1.1.- <i>Análisis en matriz sólida</i>	72
7.1.1.1.- <i>Optimización de la metodología de preparación del Sol-gel</i>	72

7.1.1.2.- Estudio del efecto del tamaño del área de observación y de la reproducibilidad en matriz sólida.....	74
7.1.1.3.- Calibración en matriz sólida.....	77
7.1.2.- Análisis en solución.....	80
7.1.2.1.- Estudio del efecto del tamaño del área de observación y de la reproducibilidad en solución.....	80
7.1.2.2.- Calibración en solución.....	84
7.2.- Aplicación y validación del sistema quimioluminiscente.....	85
8.- Conclusiones.....	88
9.- Recomendaciones.....	89
10.- Bibliografía.....	90

Índice de Figuras.

Figura 1. Estructura de la Glucosa.	10
Figura 2. Estructura del Colesterol.	15
Figura 3. Estructura del Ácido Úrico.	17
Figura 4. Placas de 96 pozos para análisis ELISA.	22
Figura 5. Representación esquemática del método general ELISA. El análisis consta de tres etapas: (a) incubación de la muestra con el primer anticuerpo, (b) incubación con el segundo anticuerpo y (c) desarrollo del color mediante una reacción enzimática.	23
Figura 6. Synergy TM HT lector de micro-platos multidetección.	24
Figura 7. Clasificación de los fenómenos de luminiscencia.	26
Figura 8. Mecanismo de reacción en QL. (P: producto; F: sustancia fluorescente).	28
Figura 9. Estructura química de algunos compuestos quimioluminiscentes.	32
Figura 10. Estructura del luminol.	33
Figura 11. Propuesta mecanística de Albertin y colaboradores para la reacción quimioluminiscente del luminol en medio alcalino, en presencia de un ión de metal de transición (M^{n+}), utilizando H_2O_2 como agente oxidante.	35
Figura 12. Esquema del equipo experimental para medidas de absorbancia en celdas multi-platos usando LEDs como fuente de luz y una WebCam como detector.	38
Figura 13. Métodos de inmovilización de enzimas. a) Oclusión en gel, b) Adsorción, c) enlaces covalentes, d) enlaces covalentes cruzados.	44
Figura 14. Representación esquemática del proceso de producción de sol-gel ^[33]	49
Figura 15. Esquema del biosensor de flujo para la determinación de Colesterol: a) Muestra, b) H_2O , c) NaOH 0,1M, P ₁) Bomba 1, P ₂) Bomba 2, (A) Columna de intercambio aniónico, (E) Columna con enzima inmovilizada, V) Vácula, F) Celda de Flujo, (W) Desecho, (D) Detector, R) Grabador.	50
Figura 16. Principio del biosensor de glucosa basado en electroquimioluminiscencia de luminol catalizada por GO soportada sobre AuNPs	52
Figura 17. Esquema del Equipo a emplear.	57

Figura 18. Espectros de los canales de filtros de la cámara CCD.....	58
Figura 19. Software 1. a) Secuencia de imágenes, b) Modo de selección de la data y condiciones, c) Detección manual al seleccionar los bordes de la placa ELISA y d) Datos obtenidos.	59
Figura 20. Intensidad de emisión de QL en función del tiempo.....	59
Figura 21. Selección de parámetros en el software de matlab.....	60
Figura 22. Espectrofotómetro UV/Vis.....	61
Figura 23. Espectro de emisión del luminol.....	69
Figura 24. Efecto producido al emplear placas transparentes en QL.....	70
Figura 25. Esquema simplificado del mecanismo de reacción del luminol.....	71
Figura 26. Placa ELISA con el sol-gel obtenido en la primera metodología.....	72
Figura 27. Placa ELISA con el sol-gel obtenido en la segunda metodología.....	73
Figura 28. Reproducibilidad con una solución de 1250 ppm de glucosa.....	74
Figura 29. Diagrama de puntos de los resultados de la tabla 8 a los 0,5 Seg. con cada diámetro.....	76
Figura 30. Calibración. a) Gráfico de intensidad en función del tiempo. b) Ampliación entre 0 y 4 Seg.....	78
Figura 31. Curva de Calibración usando matriz sólida.....	79
Figura 32. Reproducibilidad con una solución de 1250 ppm de glucosa.....	80
Figura 33. Diagrama de puntos para las réplicas con las condiciones de mayor reproducibilidad.....	83
Figura 34. Curva de calibración de glucosa obtenida por el método quimioluminiscente usando.....	85
Figura 35. Curva de Liberación de Glucosa a la sangre estimulada por adrenalina. Los valores representan el promedio \pm S. de dos réplicas usando dos animales.....	86

Índice de Tablas.

Tabla 1. Métodos para el análisis de Glucosa.	13
Tabla 2. Intervalos de referencia para Glucosa	14
Tabla 3. Métodos para análisis de Colesterol	18
Tabla 4. Intervalos de referencia de Colesterol.....	19
Tabla 5. Métodos para análisis de Colesterol.	21
Tabla 6. Intervalos de referencia para el Ácido Úrico	22
Tabla 7. Especificaciones de los componentes del reactivo GO colorimétrico.	67
Tabla 8. Especificaciones de las mezclas a utilizar.	67
Tabla 9. Datos de reproducibilidad en matriz sólida con solución de 1250 ppm de Glucosa. Replica 1.	75
Tabla 10. Datos de reproducibilidad en matriz sólida con solución de 1250 ppm de Glucosa. Replica 2.	76
Tabla 11. Resultados del análisis ANOVA para la réplica 1.	77
Tabla 12. Datos de reproducibilidad con solución de 1250 ppm de Glucosa. Replica 1.	81
Tabla 13. Datos de reproducibilidad con solución de 1250 ppm de Glucosa. Replica 2.	81
Tabla 14. Resultados del análisis ANOVA para la réplica 1.	82
Tabla 15. Datos de reproducibilidad con solución de 1250 ppm de Glucosa.....	82

1.- Introducción.

Una de las principales actividades de la química clínica es la realización de exámenes de rutina para la cuantificación de especies de interés en fluidos biológicos cuyos valores deben ser monitoreados para detectar así una serie de desórdenes metabólicos que originen tarde o temprano alguna enfermedad de suma importancia. Dichos exámenes incluyen la determinación de componentes presentes en la sangre o en la orina, tales como: ácido úrico, glucosa, enzimas, hormonas, lípidos (grasas), proteínas y otras sustancias metabólicas. Para su determinación suelen emplearse ciertos procedimientos analíticos, tales como reacciones colorimétricas, en la cual la sustancia de interés presente en la muestra biológica reacciona con sustancias específicas produciendo especies coloreadas, que posteriormente son cuantificadas por espectroscopia de absorción molecular. Sin embargo, estos métodos clásicos de análisis presentan una variedad de interferencias que los hacen poco específicos.

Otra desventaja es que muchos procedimientos analíticos empleados en el área clínica requieren de una instrumentación compleja, personal altamente especializado y condiciones ambientales controladas para llevarse a cabo. En tal sentido, debido a la creciente necesidad de la identificación y cuantificación de especies de interés en exámenes clínicos de rutina, de forma rápida, simple, económica, específica y en cantidades de muestras muy pequeñas (fluidos biológicos), ha ocurrido en los últimos años el desarrollo de sistemas que se adapten a estas necesidades, tales como los equipos portátiles para análisis médico, por ejemplo: equipos de medición de glucosa en sangre, pruebas de embarazo, control de tensión, entre otros. Algunos de estos dispositivos han sido diseñados de forma tal que pueden ser utilizados para procesar un gran número de muestras, tal es el caso de las celdas donde se llevan a cabo ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), que consisten de 96 a 384 micro-pozos.

Adicionalmente en estos dispositivos están adaptándose nuevas técnicas, por ejemplo, las técnicas luminiscentes, especialmente el fenómeno de emisión de luz visible por una reacción química, conocido como quimioluminiscencia, que ha atraído el interés de biólogos y químicos, ya que representa una alternativa simple, económica y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos en pequeños volúmenes de muestra y por esta razón, es un fenómeno cuyo uso analítico está experimentando un creciente interés. Además, se puede acoplar al uso de enzimas que permitan una mayor especificidad y para detectar la radiación emitida suelen utilizarse espectrofotómetros sencillos y actualmente se están acoplando a cámaras CCD, para lograr así la evolución de equipos costosos, que requieren de largos tiempos de análisis, hacia equipos de medición simultánea por detección de imágenes, que suelen ser de bajo costo y permiten analizar un gran número de muestras en corto tiempo.

Recientemente, las investigaciones se están centrando especialmente en el desarrollo de productos quimioluminiscentes para aplicaciones de diagnóstico clínico. Son usados en la realización de inmunoensayos, ensayos de ADN, detección de ácidos nucleicos, como detectores de peróxido y en la elaboración de biosensores para la determinación de parámetros biológicos. Estos últimos han sido logrados por el acoplamiento de la QL a muchas reacciones catalizadas por enzimas, tales como oxidasas, peroxidasas o deshidrogenasas. El uso de la quimioluminiscencia como un sistema de detección para el desarrollo de los biosensores, que se refiere estrictamente a los dispositivos de análisis en el que el sistema de reconocimiento biológico está en contacto con el dispositivo de transducción, es limitado al uso de enzimas inmovilizadas en diferentes sustratos que al reaccionar con el analito de interés generan peróxido de hidrógeno que es requerido para la emisión de luz. En este sentido, este trabajo plantea el desarrollo de un biosensor, basado en sistemas de detección simultáneo de imágenes, para la adquisición de señales luminiscentes obtenidas desde un método enzimático que sea específico, utilizando como porta-muestra una celda ELISA.

2.- Revisión Bibliográfica.

2.1.- Análisis clínicos.

La química clínica constituye una rama de las ciencias de la salud, que a su vez incluyen la bioquímica, la inmunología, la microbiología, las parasitologías clínicas y la hematología de laboratorio. El objetivo de las ciencias de laboratorio clínico es el estudio in vitro de aquellas propiedades biológicas cuyo valor es útil para el diagnóstico, pronóstico y control del tratamiento de enfermedades. Estas ciencias, que para alcanzar su objetivo hacen uso de las técnicas de la química y la biología, también proporcionan información útil para profundizar en el conocimiento de las enfermedades y de aquellos estados patológicos de interés ^[1]. Su estudio está enfocado en la realización de exámenes de rutina para la cuantificación de especies de interés, glucosa, electrolitos, enzimas, hormonas, lípidos (grasas), proteínas, ácido úrico, ensayos de ADN, análisis de drogas y otras sustancias metabólicas, en fluidos biológicos, sangre y orina, e incorporan técnicas modernas como reacción en cadena de polimerasa (PCR), inmunoensayos y electroferéisis.

Dentro de esta gran cantidad de componentes químicos que son estudiados en análisis clínicos, existen tres que en especial revisten gran importancia: Glucosa, Colesterol y Ácido Úrico. Esto debido a que el monitoreo de los niveles de dichas especies en sangre, permite detectar la presencia de enfermedades importantes, tales como: diabetes, enfermedades renales, cardíacas, de las articulaciones, entre otras; que afectan seriamente la salud de las personas. Por esta razón, dichos análisis constituyen exámenes de rutina, altamente solicitados en los laboratorios clínicos.

2.2.- Generalidades de la Glucosa.

2.2.1.- La glucosa.

La glucosa es un compuesto químico de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, cuya estructura se presenta en la figura 1; es una hexosa, es decir, que contiene seis átomos de carbono. Pertenece al grupo de compuestos bioquímicos denominados glúcidos, también llamados azúcares, sacáridos, carbohidratos e hidratos de carbono y en particular la glucosa es un glúcido monosacárido ^[2]. Es la principal fuente de energía para el metabolismo celular.

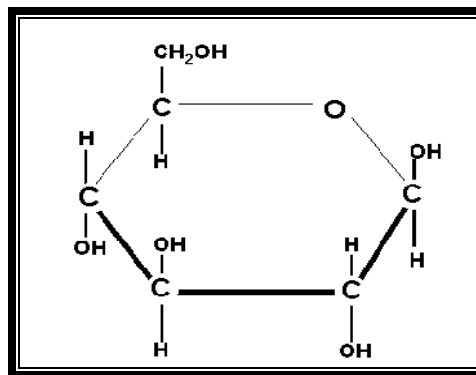


Figura 1. Estructura de la Glucosa.

Es un azúcar utilizado por los tejidos como forma de energía al combinarla con el oxígeno de la respiración. Cuando nos alimentamos, el azúcar en la sangre se eleva, lo que se consume desaparece de la sangre, para ello hay una hormona reguladora que es la insulina producida por el páncreas (islotos pancreáticos). Esta hormona hace que la glucosa de la sangre entre en los tejidos y sea utilizada al ser transformada en energía, principalmente bajo la forma de ATP. También puede ser almacenada en forma de glucógeno, o transformada en aminoácidos y ácidos grasos. Cuando la glucosa en sangre está muy baja, en condiciones normales por el ayuno, se secreta

otra hormona llamada glucagón que hace lo contrario y mantiene los niveles de glucosa en sangre.

2.2.2.- Importancia de la determinación de glucosa en los seres humanos.

La concentración de glucosa en la sangre, denominada como el nivel de azúcar en la sangre, es vital para el buen funcionamiento del cuerpo humano ya que en general, los glúcidos intervienen en las principales funciones biológicas desde el punto de vista nutricional/energético de los seres vivos y son fuente inmediata de energía para la inmensa mayoría de las células del cuerpo ^[3]. En circunstancias normales, el nivel de azúcar en la sangre permanece notablemente constante alrededor de 80 mg por cada 100 ml de sangre. Sin embargo, la concentración normal de glucosa puede ir desde 70-110 mg/ 100ml. La condición resultante de una concentración de glucosa inferior a la normal es la hipoglucemia y el resultado de una concentración superior a la normal es la hiperglucemia ^[4].

De esta manera, determinar los niveles de glucosa en sangre, o lo que conocemos como glucemia, es importante ya que cuando la insulina para regularla es insuficiente, esta se acumula y si esta situación se mantiene da lugar a una serie de complicaciones en distintos órganos. Entre ellos, el tejido más sensible a los cambios de la glucemia es el cerebro, en concentraciones muy bajas o muy altas aparecen síntomas de confusión mental e inconsciencia. No obstante, a pesar de que la falta de insulina es la razón principal por la que se produce aumento de glucosa en sangre, hay otras enfermedades y alteraciones que también la provocan, estrés por enfermedades agudas (infarto cerebral, cardiaco, anestesia general), los tratamientos con sueros en vena, ya que contienen dextrosa (azúcar), el embarazo y algunos medicamentos (antidepresivos, antihipertensivos, hormonas femeninas, entre otros). Además el alcohol y analgésicos pueden disminuirla. Por lo tanto, la determinación de glucosa en sangre (glucemia) es uno de los parámetros más medidos en bioquímica clínica y de los más

importantes, ya que es útil para el diagnóstico de numerosas enfermedades metabólicas.

2.2.3.- Métodos empleados en la determinación de Glucosa.

Los métodos más usados en la determinación de glucosa se basan en la reacción entre esta y algún compuesto, para dar una especie molecular coloreada que absorbe radiación electromagnética a una longitud de onda particular, es decir, se basan en métodos colorimétricos o en espectroscopia de absorción molecular. Esta absorción puede dar entonces información cualitativa o cuantitativa de la muestra obedeciendo la ley de Beer. De acuerdo con esta, la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración (c) de la especie absorbente, con la longitud de la trayectoria de la radiación (b) en el medio absorbente y con una constante de proporcionalidad llamada absorptividad (ϵ); y se expresa mediante la siguiente ecuación [5].

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

Sin embargo, pocos laboratorios usan actualmente estos métodos debido a su poca especificidad y solo muestran un interés histórico. Actualmente los procedimientos más usados para el análisis de glucosa emplean enzimas como reactivos para aumentar la especificidad analítica. Estas son las reacciones con glucosa oxidasa y con hexoquinasa; ambos procedimientos han sido automatizados obteniéndose una especificidad y precisión elevada. Estos métodos son actualmente considerados métodos de referencia ya que reducen las interferencias por proteínas y otros componentes séricos [6]. Algunos de los métodos empleados para el análisis de glucosa se resumen en la tabla 1, con detalles de sus aplicaciones, el tipo de análisis, el principio y sus usos. Adicionalmente se muestran en la tabla 2, los intervalos de referencia para los métodos individuales que pueden variar significativamente y deben ser evaluados por cada laboratorio.

Tabla 1. Métodos para el análisis de Glucosa (Anexos).

Tabla 2. Intervalos de referencia para Glucosa ^[6].

Método	Glucosa sérica, adultos, mg/ L (mmol/ L)
1. Glucosa oxidasa, 4-aminofenazona, punto final (Technicon)	700 a 1050 (3,89 a 5,83)
2. Glucosa oxidasa, 4-aminofenazona, reacción cinética (IL919)	600 a 950 (3,33 a 5,27)
3. Oxígeno-glucosa oxidasa (Beckman ASTRA)	650 a 1100 (3,61 a 6,11)
4. Hexoquinasa, punto final (du pont aca)	700 a 1100 (3,89 a 6,11)

2.3.- Generalidades del Colesterol.

2.3.1.- El colesterol.

El colesterol es el más conocido y abundante esteroide en el cuerpo y tiene una alta incidencia en el cerebro y el tejido nervioso. Es un componente fundamental en todas las membranas biológicas permitiendo la fluidez de la membrana y evitando su rigidez. También, es el principal componente de los cálculos biliares a partir de la cual puede ser aislado como un sólido cristalino blanco. Su nombre se deriva del griego, chole (bilis), stereos (sólido) y el sufijo -ol para un alcohol ^[7]. De fórmula molecular $C_{27}H_{46}O$, con una estructura formada por una cadena lateral de ocho carbonos en el carbono 17 y un grupo hidroxilo (OH^-) en el carbono 3, ver figura 2. Es insoluble en agua y, consecuentemente, insoluble en la sangre. Para ser transportado a través del torrente sanguíneo se liga a diversos tipos de lipoproteínas, partículas esféricas que tienen su superficie exterior compuesta principalmente por proteínas hidrosolubles.

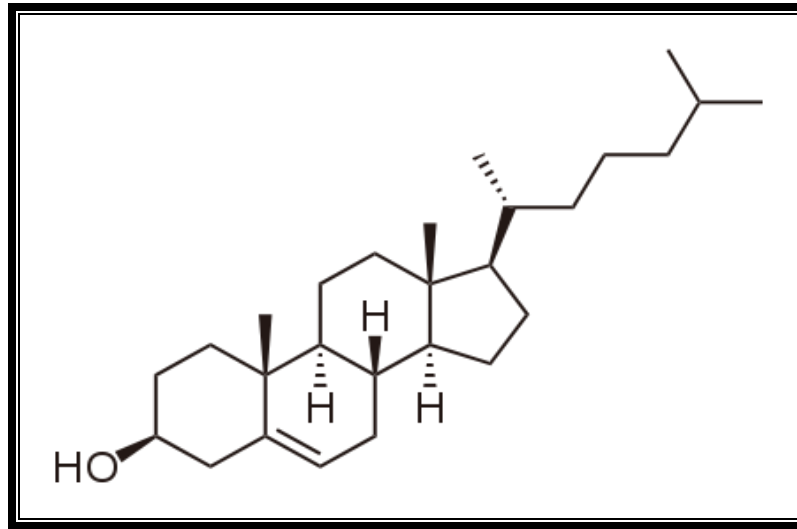


Figura 2. Estructura del Colesterol.

Nuestro hígado es capaz de producir el colesterol, pero no en la cantidad necesaria, por lo cual debemos ingerirlo a través de la alimentación. Sin embargo, en muchas ocasiones, es perjudicial para la salud. El origen de su aumento en sangre viene derivado, principalmente, del incremento de las grasas insaturadas en la dieta, procedentes de alimentos con materia grasa.

2.3.2.- Importancia de la determinación de colesterol en los seres humanos.

El colesterol ha recibido mucha atención últimamente debido a la sospecha de correlación entre el nivel de colesterol en la sangre y ciertos tipos de enfermedades del corazón (aterosclerosis) ^[7]. Además, este cumple muchas funciones fisiológicas importantes, incluyendo la síntesis de ácidos biliares, hormonas esteroideas, membranas celulares, ayuda a la fabricación de la bilis (que es almacenada en la vesícula biliar y ayuda a digerir grasas), y también es importante para el metabolismo de las vitaminas liposolubles, incluyendo las vitaminas A, D, E y K. Es el principal precursor para la síntesis de vitamina D y de varias hormonas esteroideas (que incluyen el cortisol y la aldosterona en las glándulas suprarrenales, la hormona sexual

progesterona, diversos estrógenos, testosterona y derivados). En consecuencia, la medición de colesterol es probablemente una de las pruebas de laboratorio más comunes en la actualidad ^[8].

La condición resultante de una concentración de colesterol inferior a la normal es la hipocolesterolemia y el resultado de una concentración superior a la normal es la hipercolesterolemia. En consecuencia, ya que el cuerpo necesita del colesterol para funcionar adecuadamente, pero demasiado colesterol puede taponar las arterias y llevar a cardiopatía, o algunas otras enfermedades, es importante mantener un control de los niveles de este en el cuerpo.

2.3.3.- Métodos empleados en la determinación de Colesterol.

La determinación de colesterol total incluye la medición de las formas libres y esterificadas del esteroide. En el suero o en el plasma, dos tercios del colesterol total se encuentran como éster y el resto en forma libre. Debido a que la forma libre y la esterificada no muestran las mismas características frente a la reacción empleada para su determinación, es de suma importancia el conocimiento de la química de los diversos métodos para colesterol y el reconocimiento de sus limitaciones en la elección del método que se empleará en el laboratorio ^[8]. En general, se realiza también por métodos colorimétricos al igual que la glucosa y los métodos se clasifican de acuerdo a la cantidad de etapas que involucran. Así, podemos entonces encontrar métodos en una, dos, tres y hasta cuatro etapas. Aunque se han publicado, literalmente, cientos de métodos para la determinación de colesterol, usualmente no son más que modificaciones de los métodos que se resumen en la tabla 3.

Recientemente se han desarrollado análisis directos más rápidos del suero o sangre total (método 5, tabla 3). El pre-tratamiento de las muestras aumenta la posibilidad de error y prolonga el tiempo de análisis. Además, existe una demanda

creciente de la medición de colesterol, incluyendo la sugerencia de determinaciones discriminatorias en niños. Esto ha llevado a la introducción de las técnicas enzimáticas que constituyen el desarrollo más importante para la determinación de colesterol [8]. Estas compiten actualmente con la reacción clásica de Libermann-Burchard (método 1, tabla 3) y son las más usadas para el análisis del colesterol. Los intervalos normales de colesterol total en suero son mostrados en la tabla 4.

2.4.- Generalidades del Ácido Úrico.

2.4.1.- El ácido úrico.

Es un producto tóxico de desecho que proviene del metabolismo de nitrógeno en el cuerpo humano (el producto principal es úrea). Por tanto, el ácido úrico es un químico que resulta de la degradación de las purinas (adenina y guanina), que se produce de forma natural en el organismo. La mayor parte del ácido úrico se disuelve en la sangre y viaja a los riñones, donde sale a través de la orina. Su fórmula molecular es $C_5H_4N_4O_3$ y su estructura es mostrada en la figura 3.

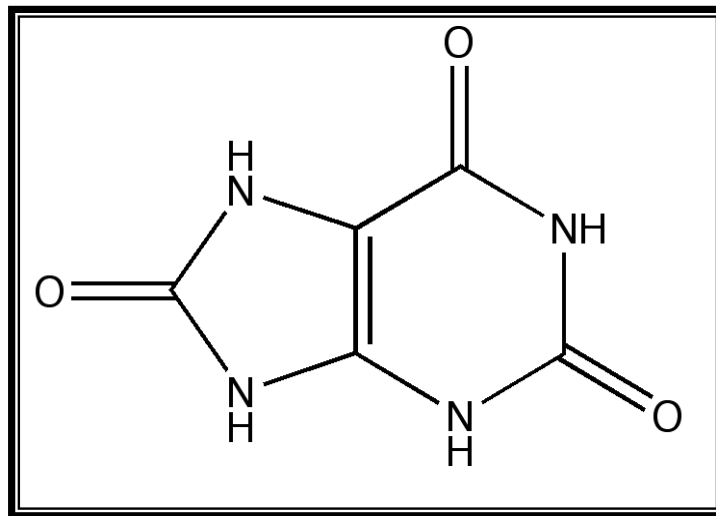


Figura 3. Estructura del Ácido Úrico.

Tabla 3. Métodos para análisis de Colesterol ^[8] (Anexos).

Tabla 4. Intervalos de referencia de Colesterol [8].

Edad (años)	Límites normales sugeridos mg/ L (mmol/ L)
0-19	1200 - 2300 (3,10 - 5,95)
20-29	1200 - 2400 (3,10 - 6,21)
30-39	1400 - 2700 (3,62 - 6,98)
40-49	1500 - 3100 (3,88 - 8,02)
50-59	1600 - 3300 (4,14 - 8,53)

2.4.2.- Importancia de la determinación de ácido úrico en los seres humanos.

Contrario a otras patologías comunes, como azúcar en sangre elevada (diabetes), colesterol alto, triglicéridos altos, entre otros, poco se conoce y se habla sobre qué exactamente significa tener el ácido úrico alto. Hasta hace poco se consideraba prácticamente inofensivo mantener el ácido úrico alto, solamente se le ponía atención cuando el paciente desarrollaba “gota”. La gota ocurre cuando los niveles de ácido úrico son tan elevados que se llegan a depositar en forma de cristales en las articulaciones, causando dolor, inflamación, e inmovilidad de la articulación. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que es un riesgo independiente de enfermedades del corazón, al que se le debe poner igual o más atención, que colesterol alto o azúcar en sangre elevada.

El problema, es que la hiperuricemia (ácido úrico elevado), provoca una disminución del óxido nítrico. Este compuesto es esencial para dos cosas en el organismo:

1.- Actúa sobre el endotelio, el tejido de los vasos sanguíneos. El óxido nítrico es lo que les permite contraerse y relajarse, por lo que al disminuirse se favorece la hipertensión, y se facilita también la formación de placa de colesterol sobre los vasos sanguíneos (aterosclerosis).

2.- Es necesario para facilitar la absorción de la glucosa a través de la insulina, una disminución de este lleva a resistencia de la insulina, principal causa del síndrome metabólico.

Sin embargo, cuanto mayor es el aumento de ácido úrico en sangre, mayores son las posibilidades de padecer no solo de hiperuricemia, de gota, resistencia a insulina y enfermedades del corazón, sino también afecciones renales, artríticas, entre otras.

2.4.3.- Métodos empleados en la determinación de ácido úrico.

Al igual que el colesterol y la glucosa, el ácido úrico se determina mediante la reacción de este y algún compuesto, para generar un complejo coloreado capaz de absorber en el UV/ Visible, es decir, mediante el uso de la espectroscopia de absorción molecular. De igual forma se han empleado métodos enzimáticos para aumentar la especificidad del ensayo para el ácido úrico (método 2, Tabla 5). Estos métodos se basan en la especificidad de la oxidación del ácido úrico a alantoína y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), catalizada por la Uricasa. Sin embargo, a lo largo de los años se han propuesto diversos métodos para la determinación de ácido úrico en suero y orina como método estándar, de elección o de referencia ^[9] y los más importantes se resumen en la tabla 5. Del mismo modo, en la tabla 6 se muestran los valores de referencia para el ácido úrico.

2.5.- Instrumentos analíticos empleados en análisis clínicos.

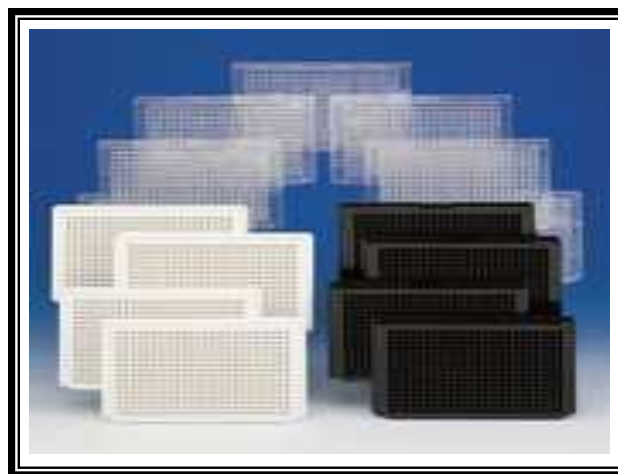
Los instrumentos empleados en la realización de análisis clínicos, son equipos de laboratorio diseñados para detectar eventos biológicos, químicos y físicos en un gran número de muestras. Estos instrumentos presentan los mismos componentes que los

Tabla 5. Métodos para análisis de Colesterol ^[8] (Anexos).

Tabla 6. Intervalos de referencia para el Ácido Úrico ^[9].

	Límites normales sugeridos mg/ L (μmol/ L)
Hombres	36 - 77 (224 - 458)
Mujeres	25 - 68 (149 - 405)

equipos espectrofotométricos convencionales diferenciándose únicamente en el contenedor de la muestra, que consiste de una celda ELISA (Ensayo por Inmuno-adsorción ligado a enzimas) que puede contener desde 96 hasta 384 micro-pozos (figura 4), que permite la determinación de un gran número de muestras simultáneamente (actualmente los diseños de los equipos están siendo enfocados al análisis multi-muestras), por lo que son los más extensivamente usados como una herramienta analítica, en análisis farmacéuticos, análisis toxicológicos, bioanálisis, química clínica y análisis ambientales y se denominan lectores ELISA. Estos dispositivos utilizan técnicas ópticas para evaluar el contenido en cada micro-pozo. Por ejemplo, un lector ELISA es usado para medir la intensidad del color de cada pozo, al realizarse un ensayo colorimétrico en el mismo o para medir la intensidad de la luz producida en una reacción luminiscente.

**Figura 4.** Placas de 96 pozos para análisis ELISA.

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son la que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados. Estos lectores emplean técnicas biológicas que se basan en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente (Figura 5). Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, barato y simple en su realización.

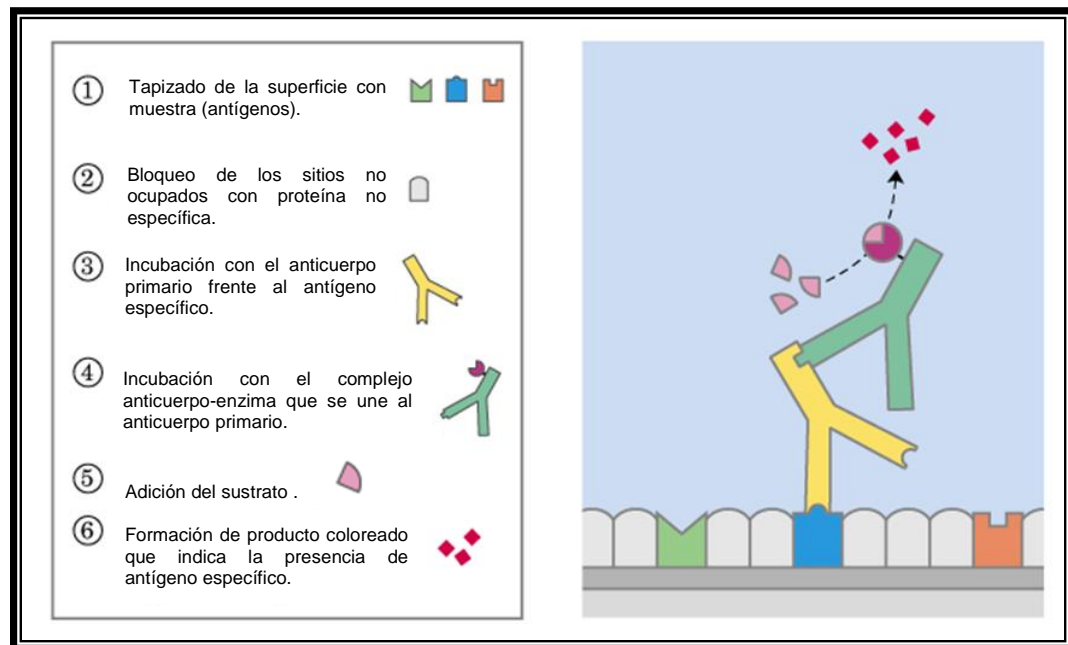


Figura 5. Representación esquemática del método general ELISA. El análisis consta de tres etapas: (a) incubación de la muestra con el primer anticuerpo, (b) incubación con el segundo anticuerpo y (c) desarrollo del color mediante una reacción enzimática.

Un ejemplo comercial de estos dispositivos es el modelo Synergy™ HT ^[10], ver figura 6, que puede medir absorbancia y fluorescencia, y es capaz de leer cualquier formato de placa de hasta 384 pozos. Este contiene un micro-plato para la detección múltiple que utiliza dos series ópticas independientes y su diseño es compacto. Para sus medidas de absorbancia presenta un sistema de un solo canal que tiene la capacidad de medir la absorbancia desde el UV hasta el IR cercano, tiene una lámpara de xenón con un monocromador que permite seleccionar la longitud de onda que va desde 200 a 999 nm, no requiere de filtros y emplea un fotodiodo para la detección. Además, permite realizar medidas de fluorescencia utilizando una lámpara de tungsteno-halógeno con filtros de interferencias (excitación y emisión) y un fotomultiplicador (PMT) para la detección. Con los dos juegos completos de óptica, no hay compromisos en términos de rendimiento al cambiar de absorbancia a fluorescencia.



Figura 6. Synergy™ HT lector de micro-platos multidetección.

Los sistemas de detección de radiación de estos equipos, varían según el selector de longitud de onda utilizado. Por ejemplo, el equipo descrito anteriormente utiliza para la detección un espectrofotómetro. Estos son dispositivos que utilizan un sistema de monocromación para la obtención de espectros y permiten realizar la detección secuencial de varios componentes. No obstante también pueden utilizarse

fotómetros en la realización de análisis clínicos de rutina. Estos últimos presentan como ventaja su sencillez, resistencia y bajo costo. Tanto los fotómetros como los espectrofotómetros pueden ser de haz sencillo o de doble haz. Además, en la actualidad existen instrumentos de canales múltiples, con los cuales se puede obtener un espectro completo y una detección simultánea.

Los nuevos instrumentos que han venido diseñándose para análisis clínicos, emplean medidas de luminiscencia para la cuantificación de las especies de interés y por lo tanto requieren del conocimiento sobre esta, de sus tipos y de un estudio profundo acerca de cómo ocurre y cómo podemos relacionarla con el analito de interés para conocer su concentración en la muestra a analizar. Por ello, trataremos este tema antes de hablar profundamente sobre los nuevos instrumentos empleados en análisis clínico.

2.6.- La Luminiscencia.

La luminiscencia fue definida por primera vez en 1888 por el físico alemán Eilhardt Wiedemann para distinguir los fenómenos producidos por la luz “fría” de la incandescencia (donde la energía de emisión de luz surge de movimientos moleculares producidos por calor) ^[11]. Aunque existe una amplia variedad de circunstancias en que se observa luminiscencia, en todas ellas existe un aspecto común propio del fenómeno. Cuando un átomo o molécula luminiscente emite un fotón se produce un cambio en su estructura electrónica, es decir, un cambio en el ordenamiento de los electrones en los orbitales moleculares. Cuando una molécula absorbe energía de una fuente externa los electrones ocupan los orbitales de mayor energía y esto se traduce en la formación de estados excitados. El modo en que los electrones son excitados depende de la energía impartida por la fuente externa, siempre que esta energía pueda ser absorbida por la

molécula. Por lo tanto, la excitación representa el movimiento de un electrón a un orbital molecular de mayor energía que el que normalmente ocupa ^[12].

Así, podemos entonces definir la luminiscencia como el término usado para describir la emisión de la luz, que ocurre cuando una molécula en un estado excitado se relaja a su estado fundamental. Los varios tipos de luminiscencia difieren de la fuente de energía empleada para obtener el estado excitado. Esta energía puede ser suministrada por radiación electromagnética, por calor, por impacto de electrones, entre otros ^[13]. De acuerdo a la fuente de energía para la emisión de la luz Wiedemann llamo a los varios tipos de luminiscencia colocándoles un prefijo ^[11]. De esta manera, podemos entonces encontrar diferentes tipos, los cuales se resumen en la figura 7.

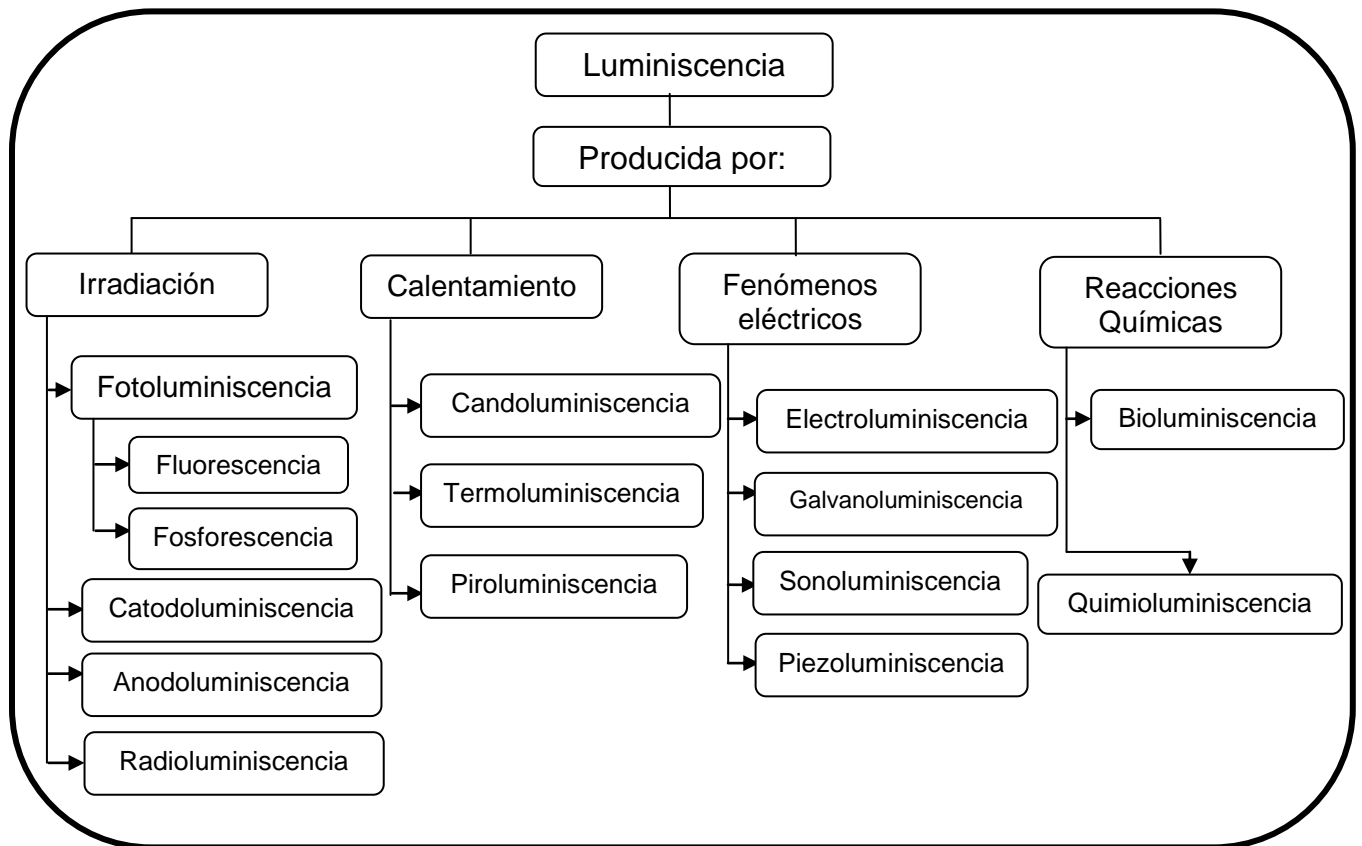


Figura 7. Clasificación de los fenómenos de luminiscencia.

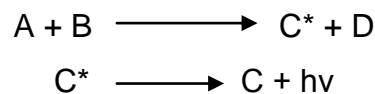
Uno de los aspectos más atractivos de la luminiscencia es su elevada sensibilidad analítica, con límites de detección que suelen ser de uno a tres órdenes de magnitud inferiores a los encontrados en la espectroscopia de absorción. Los límites de detección característicos son del orden de partes por billón. Otra ventaja de los métodos luminiscentes radica en sus amplios intervalos de linealidad, que también suelen ser significativamente mayores a los encontrados en los métodos de absorción.

En general, los métodos luminiscentes se aplican menos que los métodos de absorción en los análisis cuantitativos debido a que el número de especies que absorben radiación ultravioleta/visible es mucho mayor que el de especies que presentan luminiscencia ^[14]. Sin embargo, a pesar de esto en los últimos años se ha presentado un gran interés por parte de los investigadores en la explotación de estos fenómenos luminiscentes como una herramienta analítica y aunque se distinguen muchos tipos se discutirá con mayor detenimiento la quimioluminiscencia, ya que es la que presenta mayor interés en el área de estudio, la química clínica.

2.6.1.- Quimioluminiscencia (QL).

La quimioluminiscencia es la producción de radiación electromagnética [Ultravioleta (UV), Visible (Vis) o infrarroja (IR)] observada cuando una reacción química produce un intermediario o un producto electrónicamente excitado que o bien emite radiación (Quimioluminiscencia directa) o dona esta energía a otra molécula que entonces emite (Quimioluminiscencia indirecta o sensibilizada) ^[15].

La manera más sencilla para representar la reacción quimioluminiscente se puede formular como:



Donde C^* representa a la especie C en el estado excitado. Aquí, el espectro de luminiscencia es del producto de reacción C. Sin embargo, la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes son considerablemente más complicadas de lo que sugieren las reacciones anteriores.

En general, una reacción de QL puede generarse mediante dos mecanismos básicos (figura 8). En una reacción directa, dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante en presencia de algunos cofactores, reaccionan para formar un producto o un intermediario de la reacción, algunas veces en presencia de un catalizador. Después, parte del producto o intermedio pasa al estado electrónicamente excitado, que puede a continuación relajarse hasta el estado fundamental con emisión de un fotón. El sustrato es el precursor de la QL, que se convierte en la molécula excitada electrónicamente, responsable de la emisión de luz, o bien actúa para transferir la energía en la QL indirecta. El catalizador, enzima o ión metálico, reduce la energía de activación y proporciona el ambiente adecuado para la producción de una alta eficiencia de QL durante el proceso. Los cofactores son necesarios en ocasiones para convertir

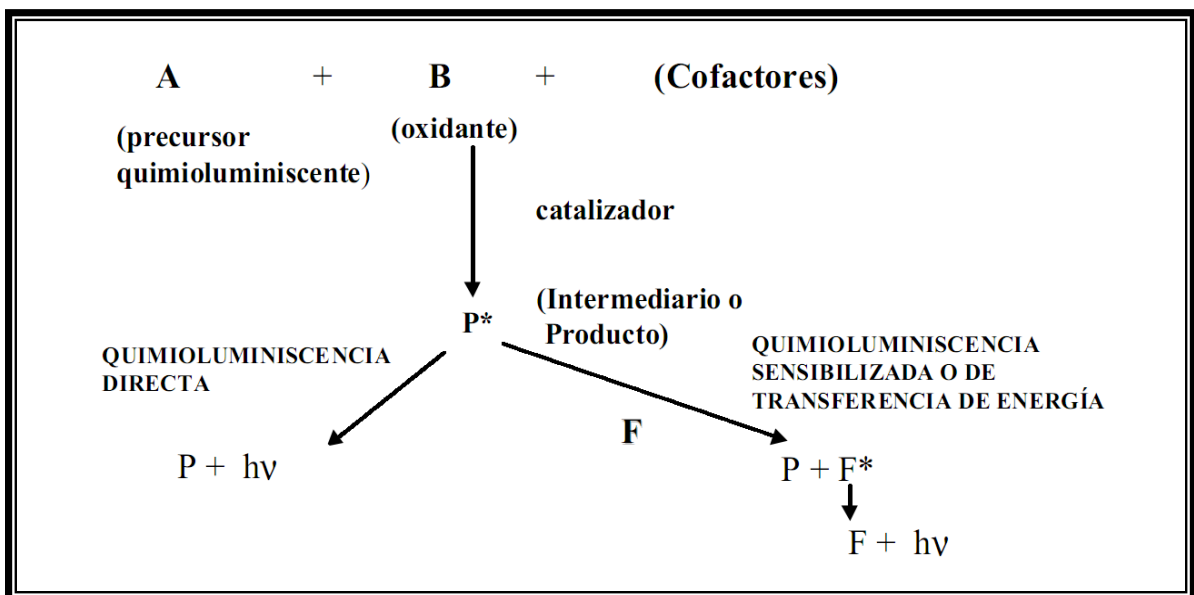


Figura 8. Mecanismo de reacción en QL. (P: producto; F: sustancia fluorescente).

uno o más de los substratos en una forma capaz de reaccionar e interaccionar con el catalizador, o para proporcionar un grupo “saliente” eficaz cuando se requiere un marcador para producir el emisor excitado ^[16].

Por el contrario, la QL indirecta o sensibilizada, se basa en un proceso de transferencia de energía de la especie excitada a un fluoróforo. En el caso de moléculas que no pueden emitir directamente QL, este proceso permite transferir su exceso de energía a un fluoróforo que a su vez es excitado, volviendo a su estado fundamental con la emisión de un fotón ^[16].

2.6.1.1.- Medida de la quimioluminiscencia.

Una ventaja de las técnicas de QL es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. La QL se describe a menudo como una técnica de “campo oscuro”: la ausencia de niveles altos de luz de fondo, que sí ocurren en espectrofotometría y fluorimetría, reduce el ruido y permite mejorar los límites de detección. La instrumentación para medidas de QL varía desde sistemas muy simples hasta instrumentación más compleja, pudiéndose usar un fluorímetro simplemente con la fuente de excitación apagada ^[16] o puede consistir tan sólo de un recipiente de reacción adecuado y un detector de la radiación, como por ejemplo un fotomultiplicador o un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD). Estos últimos pueden detectar bajas intensidades de luz generadas por la producción de reacciones bio-específicas que ocurren en la superficie de una muestra y permiten el análisis simultáneo de grandes cantidades de muestra.

El hecho de que el proceso de QL es, por definición, su propia fuente de luz significa que los métodos de ensayo y los instrumentos usados para llevarla a cabo necesitan proveer solo una forma de detectar la luz y una forma de recoger los

resultados. Debido a que no requiere fuente, se evita la inestabilidad producida por esta. Además, se evita la atenuación de la radiación que tiene lugar cuando esta atraviesa un filtro o un monocromador. Estas características de que pueda detectarse fácilmente hacen de esta técnica una herramienta analítica muy atractiva.

2.6.1.2.- Aplicaciones de la quimioluminiscencia.

El uso analítico de la quimioluminiscencia (QL) está experimentando un creciente interés, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos. Aunque el fenómeno de la QL se conoce desde 300 años a.C., el desarrollo de aplicaciones analíticas es relativamente reciente. Debido a su alta sensibilidad, selectividad y como la intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción de QL, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos.

Las reacciones de QL son actualmente explotadas principalmente en medidas de concentración de cualquier analito, para inmunoanálisis o detección de ácidos nucleicos. En el último caso, un compuesto envuelto en la reacción de emisión de luz es usado como etiqueta para inmunoensayos o para pruebas de ácidos nucleicos. En el primer caso, el analito de interés directamente participa en una reacción de QL o sufre una reacción química o una transformación enzimática de tal manera que uno de los productos de reacción es un coreactante de una reacción de QL. Respecto a esto, los sistemas de QL que requieren H_2O_2 para la emisión de la luz son de particular interés en análisis bioquímicos. Peróxido de hidrógeno es de hecho un producto de varias reacciones enzimáticas, las cuales pueden ser entonces acopladas a la detección por QL ^[17].

La unión de estos ensayos enzimáticos a la sensibilidad, los bajos límites de detección y el bajo costo de la instrumentación de QL han hecho de esta un método de

uso común en laboratorios clínicos en los últimos años. Hoy en día, son comúnmente usados para análisis de analitos clínicamente importantes en fluidos y tejidos del cuerpo y se refiere estrictamente a los dispositivos de análisis en el que el sistema de reconocimiento biológico está en contacto con el dispositivo de transducción, es limitado al uso de enzimas inmovilizadas en diferentes sustratos ^[18], que al reaccionar con el analito de interés generan peróxido de hidrógeno que es requerido para la emisión de luz. Se ha aplicado también este método para análisis de contaminantes atmosféricos, gases como ozono, óxidos de nitrógeno y compuestos azufrados. También se ha desarrollado un ensayo relativamente simple basado en QL para determinación de antioxidantes como vitamina C y E, y proteínas. No obstante deben considerarse algunas limitaciones en el análisis por QL, como su dependencia a varios factores ambientales que deben ser controlados, la falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito, y finalmente, como ocurre en otros sistemas, la emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo (el haz de luz está compuesto de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después cae hasta la línea base), y este perfil de emisión frente al tiempo puede variar ampliamente en diferentes sistemas quimioluminiscentes, por lo que hay que extremar el cuidado para detectar la señal, midiendo en períodos de tiempo bien definidos ^[15].

2.6.1.3.- Reactivos quimioluminiscentes.

Dentro de los reactivos que pueden ser empleados como reactivos quimioluminiscentes se encuentran: El luminol y sus derivados, éster de acridinio y sus derivados, lucigenina y esteres de oxalato como el bis-(2,4,6-triclorofenil)oxalato (Ver figura 9). Algunos fenoles polihídricos, como el pirogalol o el ácido gálico, también presentan características quimioluminiscentes. A pesar de esto, es sin duda el luminol una de las moléculas más estudiadas ^[12].

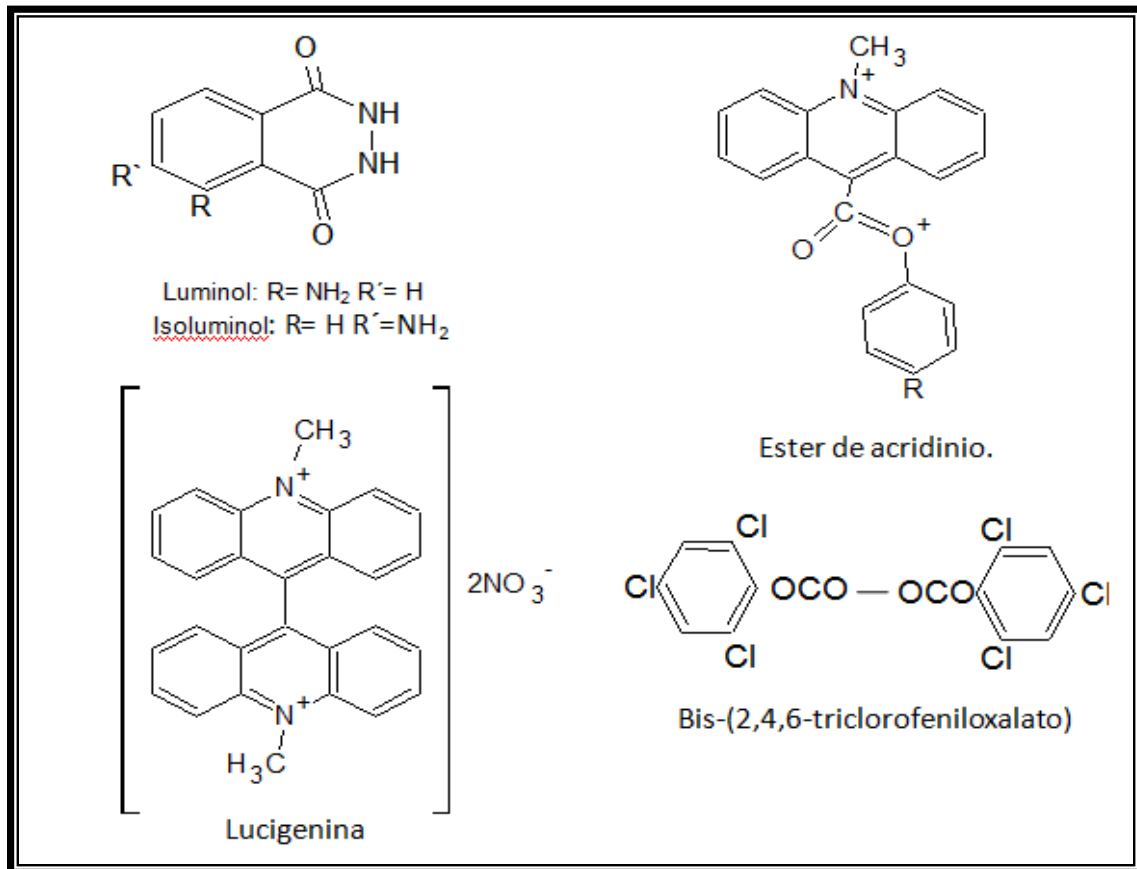


Figura 9. Estructura química de algunos compuestos quimioluminiscentes.

2.6.1.4.- Luminol.

El 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona, o más conocido como luminol, es un compuesto químico de fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$, cuya estructura se muestra en la figura 10. Es un derivado del ácido ftálico. Se trata de un sólido blanco o ligeramente amarillo que es soluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos. Su mayor importancia reside en la reacción de QL que produce en presencia de oxidantes fuertes, como peróxido de hidrógeno, y de algún catalizador, como Fe, Co o Cu, exhibiendo un color azul con un máximo de intensidad en 425nm en medio básico.

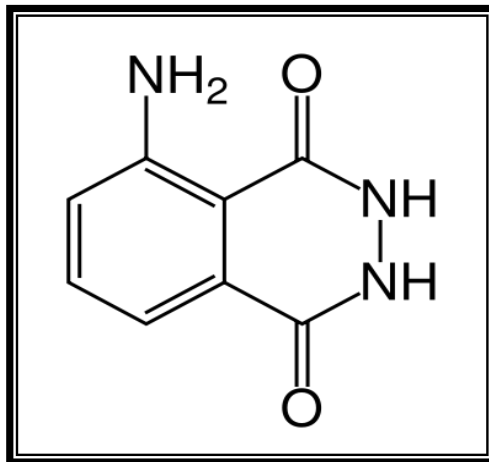


Figura 10. Estructura del luminol.

Las propiedades quimioluminiscentes del luminol fueron primero reportadas en 1928 por Albrecht. Desde entonces, la alta sensibilidad y conveniencia de los métodos de QL del luminol han dado lugar a una amplia utilización de este reactivo y sus derivados en muchos campos ^[19].

Las soluciones de Luminol son sensibles a la luz y a los cationes metálicos, son estables en períodos de 8-12 horas, y son térmicamente inestables. Su preparación debe realizarse una vez se decida aplicar, a cuanto menor tiempo pase desde su preparación a su aplicación mejores resultados dará el producto ya que una vez hidratado el Luminol propiamente dicho (el Luminol es realmente la sustancia sin hidratar, pero también se le denomina con el mismo nombre a la disolución del verdadero Luminol con el agua destilada y la oxigenada al 15%), comenzara a degradarse hasta el punto de que sea inservible.

La reacción de QL que exhibe el luminol requiere de algunos factores para llevarse a cabo y estos factores dependen fuertemente del medio en el cual se esté trabajando. En medio aprótico, la oxidación quimioluminiscente del luminol requiere solo

de oxígeno y una base fuerte. En solventes próticos (ejemplo, agua), un sistema de oxidación y un catalizador oxidativo son requeridos además de condiciones alcalinas (pH 10-13). Peróxido de Hidrógeno es el agente oxidativo más frecuentemente usado. Cationes de los metales de transición (Cr^{3+} , Mn^{4+} , Fe^{2+} , Fe^{+3} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+}), libres o complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos, catalizan la oxidación de QL del luminol ^[17].

A pesar del gran número de estudios mecanísticos que se han hecho, el mecanismo de reacción del luminol todavía no ha sido completamente esclarecido. Se sabe que es más eficiente en medio básico, que el mecanismo depende del tipo de solvente empleado, prótico o aprótico, y que la reacción de este con peróxido de hidrógeno en agua necesita de un catalizador redox y pueden emplearse una gran variedad de metales de transición.

Una interesante propuesta mecanística fue presentada por Albertin R. y colaboradores ^[20], Ver figura 11, y establece que el catalizador oxida la base correspondiente del luminol (1) en dos pasos para formar una diazoquinona (2), la cual sufre un ataque por el anión del peróxido de hidrógeno (3) generado por la descomposición de este en medio básico, formando un endo-peróxido (4). Este último pierde nitrógeno (Una molécula muy estable) y forma el dianión del ácido 3-aminoftálico (3-aminoftalato) en su estado excitado (5), el cual decae a su estado fundamental, acompañado por la emisión de luz.

El luminol ha sido efectivamente empleado durante más de 40 años para la detección de presuntas manchas de sangre que están ocultas a simple vista en la escena de un crimen y, por esta razón, la emisión de luz observada cuando una solución que contiene luminol y peróxido de hidrógeno es rociado en manchas de sangre seca ha sido considerado como uno de los más importantes y más conocidos

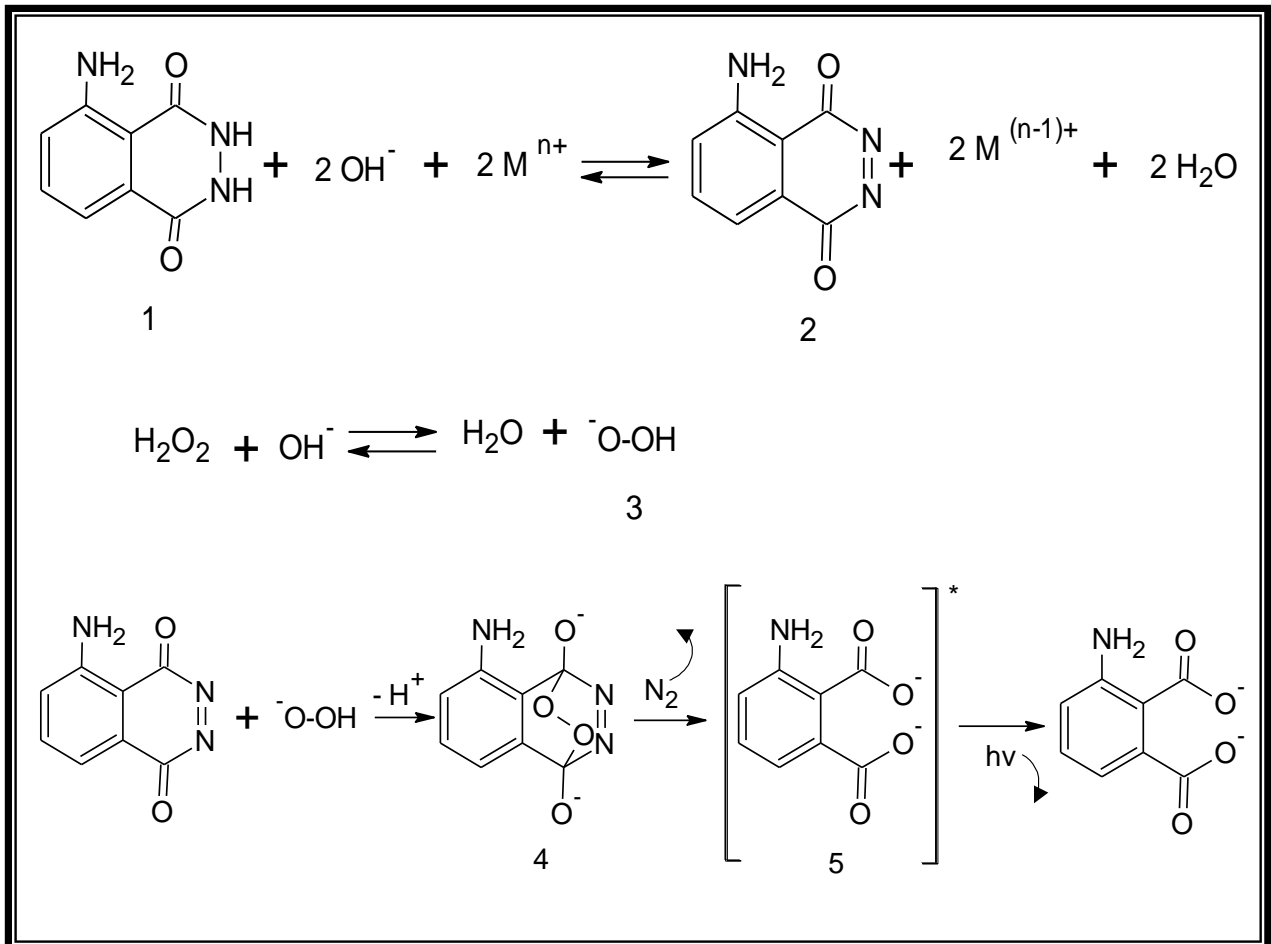


Figura 11. Propuesta mecánica de Albertin y colaboradores para la reacción quimioluminiscente del luminol en medio alcalino, en presencia de un ión de metal de transición (M^{n+}), utilizando H_2O_2 como agente oxidante.

ensayos en el campo de las ciencias forenses. Este ensayo puede detectar manchas de sangre diluidas hasta un nivel de $1:10^6$ ($1\mu\text{l}$ de sangre por litro de solución) permitiendo revelar el patrón de distribución de la mancha, lo que permite a los investigadores reconstruir alguno de los eventos de un delito mediante la visualización de estos patrones. El hierro presente en la hemoglobina de la sangre es quien cataliza la reacción y debido a la posible presencia de sustancias que pueden intensificar o generar una emisión quimioluminiscente, incluso si no hay sangre presente, la prueba

del luminol no debe ser considerada suficientemente precisa como para permitir una identificación inequívoca de la sangre. Esto se debe a que existen muchas interferencias que pueden dar lugar a interpretaciones erróneas, por lo tanto se debe tener precaución cuando se realiza esta prueba. Los productos químicos industriales como los agentes de limpieza, ejemplo lejía comercial (hipoclorito de sodio), comúnmente interfieren. Sin embargo, se diferencia la reacción positiva de luminol-sangre con la reacción con limpiadores caseros por el tiempo de aparición, el cual es mayor. De este modo, un profesional experimentado puede distinguir la verdadera reacción quimioluminiscente producida por la sangre de la producida por otras sustancias, mediante la evaluación de los parámetros observables a simple vista, como la intensidad de emisión, la duración y distribución espacial ^[21].

A pesar de ser este muy empleado en el área de criminalística, el principal interés de la quimioluminiscencia del luminol en el área analítica y específicamente en análisis clínicos es la posibilidad de acoplar esta reacción de emisión de luz con reacciones catalizadas por enzimas que generan peróxido de hidrógeno. Simples reacciones auxiliares que generan peróxido de hidrógeno, así como múltiples sistemas enzimáticos que conducen a la producción de este, pueden ser utilizadas para la detección quimioluminiscente de diferentes metabolitos.

2.7.- Nuevas tendencias en instrumentos empleados en análisis clínicos.

Los instrumentos empleados en análisis clínicos que se han diseñado en los últimos años, emplean componentes opto-electrónicos en la configuración de sistemas espectroscópicos clásicos, que hacen del mismo un equipo portátil, robusto y de fácil traslado a campo. Se ha reportado el uso de diodos de emisión de luz (LEDs) o pantallas de computadoras como fuente de excitación para elaboración de lectores de

absorbancia y actualmente la utilización de cámaras CCD como detectores de la radiación en diferentes técnicas espectroscópicas.

El uso de estas cámaras, basadas en dispositivos de acoplamiento de carga (CCD), como detectores analíticos, permiten generar una gran cantidad de información por imagen que contienen información analítica de un alto número de muestras, la adquisición de los datos de calibración, predicción y muestras reales, tomando una simple imagen, lo cual disminuye el tiempo de análisis comparado con el uso de espectrofotómetros convencionales. Los CCDs son detectores de imagen con remarcable sensibilidad y rango dinámico lineal. CCDs típicamente contienen 10^6 o más píxeles. Cada píxel actúa como un detector acumulativo donde la carga acumulada es proporcional a la luz total expuesta. La carga de cada píxel puede leerse en el momento deseado, para obtener una imagen en dos dimensiones ^[22].

Ya que estas proveen suficiente sensibilidad para detectar pequeños cambios de color de diferentes sustancias o pequeñas radiaciones de emisión de luz, están siendo explotadas actualmente por muchos investigadores con la finalidad de evaluar la aplicación de la fotografía digital y el procesamiento computarizado de imágenes en la construcción de nuevos diseños de espectrofotómetros. De esta manera, diferentes autores ^[23-27] han reportado el uso de estas cámaras como detectores espectroscópicos y el uso de pantallas de computadoras como fuente de luz, técnica denominada “computer screen photo-assisted technique (CSPT)”, que les permitieron determinar en plasma sanguíneo la droga formoterol, melanóforos, Al (III) e Fe (III) en aleaciones, detectar las hebras de ADN complementario, entre otros, obteniendo resultados satisfactorios, lo cual ha hecho muy llamativa la explotación de dicha técnica.

Dentro de los trabajos más recientes que emplean estos componentes tenemos: En el 2007, J. Castillo y colaboradores ^[28], desarrollaron y evaluaron un lector de

absorbancia de multi-celdas para análisis clínicos usando una cámara Web, Figura 12, y un software para recoger las imágenes y procesarlas mediante el programa Matlab 7.2.0.232 (R2006a) que fue diseñado en su laboratorio ^[29]. Evaluaron el sistema usando soluciones de rojo neutro, anaranjado de metilo y complejo amoniacal de Cobre (II). Los resultados obtenidos muestran que es posible medir unos pocos microlitros de solución con una adecuada exactitud y precisión de menos del 3%. Como una posible aplicación en química clínica determinaron Fe usando Complejos de Tiocianato de Hierro (III), método usualmente aplicado en análisis de suero en sangre. El instrumento propuesto permite el análisis de hierro en el intervalo de los valores de referencia (0,75-1,5 mg/ ml) en humanos, con un coeficiente de correlación de 0,9946. En las cuatro muestras ensayadas encontraron que no existen diferencias significativas al 95% entre los resultados obtenidos y los valores reales, lo que les permitió concluir que la configuración instrumental propuesta puede ser exitosamente aplicada para el análisis de hierro usando complejos con tiocianato. De esta manera, el sistema construido

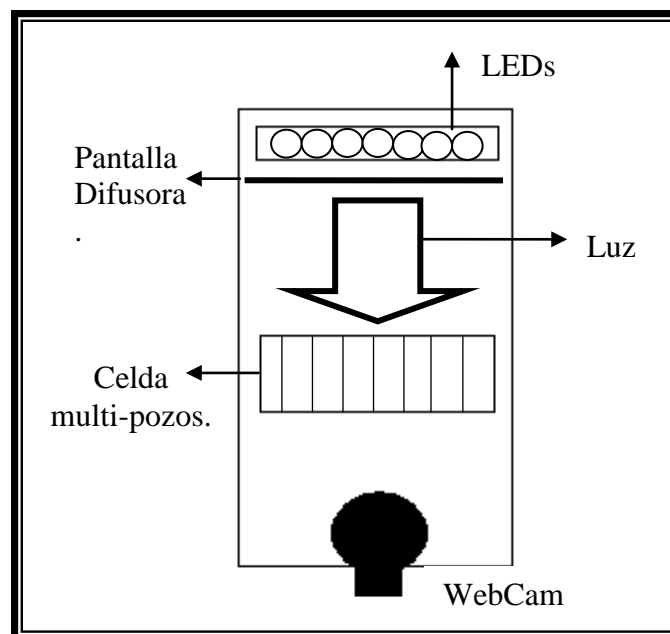


Figura 12. Esquema del equipo experimental para medidas de absorbancia en celdas multi-platos usando LEDs como fuente de luz y una WebCam como detector.

puede ser considerado como una herramienta analítica prometedora y es una alternativa económicamente viable para análisis clínicos.

En el 2009, Briceño A. y colaboradores ^[30], evaluaron la eficiencia de un analizador colorimétrico, basado en la detección con Webcam, usando para ello celdas ELISA. Emplearon el instrumento fabricado en 2007 por Castillo y colaboradores y un software diseñado ^[29] para tomar las imágenes de la placa ELISA. Evaluaron la aplicación del analizador, en la determinación de las concentraciones de glucosa, mediante el método enzimático de glucosa oxidasa, en plasma sanguíneo de ratas. Las mediciones fueron realizadas tanto con el dispositivo propuesto como con un espectrofotómetro convencional. Los resultados que obtuvieron están entre 700-1700 mg/L de Glucosa con una precisión del 2-9%. Obtuvieron que no existen diferencias significativas al 95% entre los valores obtenidos por el analizador y el sistema convencional, lo que indico una alta exactitud del sistema. Los valores obtenidos les permitieron concluir que los animales presentaban ausencia de diabetes.

El método empleado por Briceño y colaboradores para la determinación de glucosa es uno de los métodos que actualmente se está explotando en la química clínica, adaptándolo a los nuevos instrumentos que se están diseñado para la determinación de ciertos componentes químicos de interés en fluidos biológicos, como por ejemplo los biosensores. Estos son métodos indirectos de análisis que se denominan métodos enzimáticos, que se pueden acoplar a reacciones colorimétricas o reacciones luminiscentes. Estas últimas son actualmente las más estudiadas y se han adaptado a los nuevos instrumentos gracias a su sencillez, sensibilidad y bajos límites de detección.

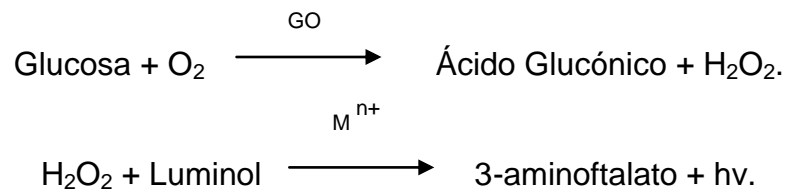
2.7.1.- Métodos enzimáticos.

Ahora nos centraremos en las proteínas más notables y altamente especializadas, las enzimas. Son los catalizadores de las reacciones de los sistemas biológicos. Tienen un extraordinario poder catalítico, a menudo muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, aceleran tremendamente reacciones químicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. La efectividad de una enzima como catalizador se llama actividad enzimática. La actividad guarda una estrecha relación con la forma tridimensional de la proteína, particularmente de su sitio activo. En general, el sitio activo es la parte de la proteína que se une al sustrato. La especificidad de la enzima depende en gran parte de la estructura de la región del sitio activo.

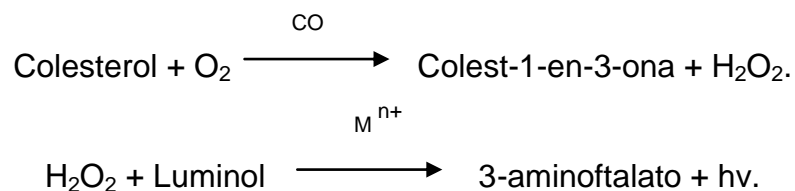
Las reacciones catalizadas, en particular aquellas en las que las enzimas actúan como catalizadores, son muy usadas en la determinación de diversas especies biológicas y bioquímicas y como hemos venido mencionando a lo largo de nuestra revisión bibliográfica, los métodos enzimáticos son hoy en día los más empleados y han desplazado a otros métodos ya que estos son más específicos y reducen gran cantidad de interferencias. Pero, ¿qué son y en qué se basan estos métodos. Pues bien, estos no son más que un método en el cual se llevan a cabo dos reacciones enzimáticas acopladas. En una primera reacción, el analito de interés reacciona con oxígeno para generar, en presencia de una enzima como catalizador que permite reducir la energía de activación, un producto que posteriormente en una segunda reacción, que también requiere de un catalizador, forma algún complejo que o bien es coloreado y absorbe radiación para ser medido por colorimetría, o bien produce radiación que puede ser detectada y cuya intensidad es proporcional a la concentración del analito de interés. De este modo, la primera reacción es específica y la segunda es inespecífica.

En general, este método puede aplicarse en la determinación de varios componentes biológicos, sin embargo, nos enfocaremos en el análisis de los tres analitos que revisten mayor importancia, Glucosa, Colesterol y Ácido Úrico. En estos casos las enzimas catalizadoras de la primera reacción son, Glucosa Oxidasa (GO), Colesterol Oxidasa (CO) y Uricasa, respectivamente. Estas catalizan la oxidación de los analitos, la cual genera peróxido de hidrógeno y este es quien en una segunda reacción colorimétrica o quimioluminiscente, genera un producto que puede ser cuantificado. En el caso de la reacción quimioluminiscente el catalizador de la segunda reacción puede ser algún metal de transición (M^{n+}), ejemplo el Fe contenido en la sangre. Las reacciones que se llevan a cabo con glucosa, colesterol y ácido úrico, son:

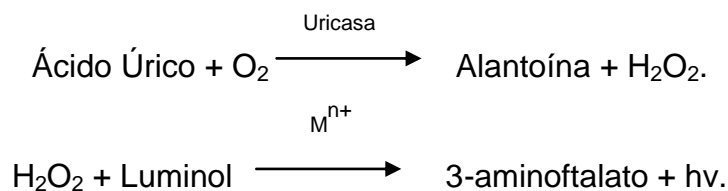
- Método de Glucosa Oxidasa (GO), acoplado a una reacción de QL:



- Método de Colesterol Oxidasa (CO), acoplado a una reacción de QL:



- Método de Uricasa, acoplado a una reacción de QL:



De estas reacciones, la de la glucosa es a la que le prestaremos mayor atención ya que esta será la que se lleve a cabo en el biosensor que se desea diseñar.

2.7.2.- Biosensores.

En general, puede decirse que un sensor es un dispositivo que aprovecha una de sus propiedades con el fin de adaptar la señal que mide para que la pueda interpretar otro dispositivo, un transductor. Existen numerosos tipos de sensores y se clasifican de acuerdo con el tipo de energía que detectan, siendo de especial interés los sensores químicos, los cuales son dispositivos pequeños, robustos, portátiles, de fácil manipulación y no necesitan de adición continua de reactivos para su operación pudiendo proporcionar información confiable continuamente. Por tanto, los sensores químicos son un elemento clave en la instrumentación analítica que, en muchos casos, sustituyen aparatos complejos y evitan el empleo de una enorme infraestructura de soporte.

Un tipo de sensor químico que se basa en reconocer componentes biológicamente activos, lo que significa que un proceso bioquímico es la fuente de la señal analítica y una de sus características es su selectividad hacia un cierto analito se denomina biosensor ^[31]. Los biosensores se han desarrollado con el objetivo de combinar la selectividad de las reacciones enzimáticas, con la alta sensibilidad de las reacciones quimioluminiscentes, cuyas medidas consisten en monitorear la velocidad de producción de fotones y entonces, la intensidad de la luz depende de la velocidad de la reacción quimioluminiscente. En consecuencia, la intensidad de la luz es directamente proporcional a la concentración del reactivo límite envuelto en la reacción luminiscente. Con moderna instrumentación, la luz puede ser medida a muy bajos niveles, y esto permite el desarrollo de métodos analíticos muy sensibles basados sobre estas reacciones de emisión de luz ^[17].

2.7.2.1.- Construcción de un biosensor.

La construcción de un biosensor se basa en la unión de dos partes: un componente biológico activo (un reconocedor) y un transductor. La primera fase es el reconocimiento de una determinada sustancia por medio de una reacción bioquímica específica, generando una variación en la concentración de protones, una variación de masa, una variación en el estado de oxidación del analito, entre otros; y la segunda, convierte la energía de estos eventos en una forma medible, como una variación de la corriente, potencial, temperatura u otros. Así, diferentes componentes biológicos pueden ser usados en la construcción de biosensores, tales como organismos, tejidos, células, membranas, enzimas, receptores, anticuerpos, ácidos nucleicos y macromoléculas orgánicas. Sin embargo, a pesar de sus limitaciones en términos de su susceptibilidad al pH, la fuerza iónica, a inhibidores y su baja estabilidad, las enzimas son las más ampliamente usadas en la construcción de biosensores ^[31], porque ellas actúan con una alta actividad y alta selectividad catalítica. El material biológico es inmovilizado en una membrana adecuada, que se acopla junto a la superficie del transductor, el cual monitoreara la desaparición de algún reactivo o la aparición de algún producto de la reacción entre el material biológico y el sustrato de interés ^[33].

2.7.2.2.- Características de un biosensor.

Un biosensor para poder ser empleado en análisis químicos, deberá necesariamente poseer algunas propiedades, a saber: excelente estabilidad y tiempo de respuesta, bajos límites de detección y buena selectividad y exactitud. Por lo que, diversos parámetros del biosensor deben ser investigados: pH de operación, concentración del material biológico inmovilizado, espesor y tipo de sustrato para la inmovilización del componente biológico, temperatura, efecto de activadores, inhibidores e interferentes ^[32]. La selectividad, sensibilidad y el tiempo de vida de los biosensores de QL dependen fuertemente de los siguientes puntos: 1) La cuidadosa

selección de los reactivos quimioluminiscentes que respondan para la especie definida, 2) La forma de inmovilizar los reactivos, y 3) los sustratos seleccionados para la inmovilización ^[33]. La inmovilización puede hacerse en diferentes sustratos y esto juega un papel importante en el desarrollo de biosensores basados en QL de alta calidad. Entre ellos, los métodos más utilizados para la inmovilización son aquellos que envuelven o se basan en la oclusión en gel o membranas, adsorción, enlaces covalentes y enlaces covalentes cruzado, ver figura 13.

En años recientes, un número de nuevos métodos han sido reportados para hacer uso de enzimas inmovilizadas. La clave de esto se encuentra en el hecho de si la inmovilización puede alterar la actividad catalítica intrínseca de las enzimas o incluso inhibirla. Dentro de los métodos estudiados también se ubican las nanopartículas ya que la amplia disponibilidad de estas ha atraído la atención generalizada, debido a su

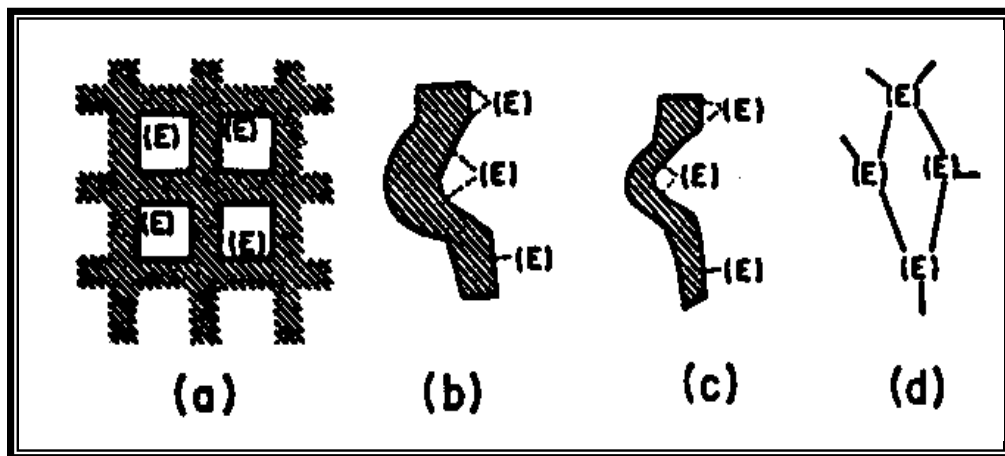


Figura 13. Métodos de inmovilización de enzimas. a) Oclusión en gel, b) Adsorción, c) enlaces covalentes, d) enlaces covalentes cruzados.

alta área de superficie, alta actividad y buena selectividad. Se han realizado estudios empleando estas como soporte para inmovilización de enzimas y ofrecen la ventaja de que no hay consumo de reactivo quimioluminiscente, y el tamaño de los sensores puede ser miniaturizado debido al pequeño tamaño de las nanopartículas.

Nanopartículas de oro son una plataforma ideal para biosensores, especialmente para aquellos con detección electroquímica, porque la superficie del oro es apta para la unión de biomoléculas.

A pesar de existir diferentes métodos para la inmovilización, cada uno de estos presenta una serie de ventajas y desventajas al usarlo como sustratos para inmovilizar reactivos. Así, el método de adsorción sobre materiales inorgánicos presenta la ventaja de su simplicidad de ejecución, pero tiene la desventaja de la reproducción de la forma de la enzima adsorbida, pues la enzima sólo puede mantener su actividad catalítica si sus centros activos se encuentran en una forma disponible sobre la superficie del material, para que la reacción con el analito específico pueda ocurrir y además, la debilidad de los vínculos entre la enzima y el sustrato hace que estos puedan romperse durante el uso del biosensor. El método de enlaces covalentes entre el sustrato y la enzima presenta mayor estabilidad del complejo enzima-sustrato, pero requiere un conocimiento previo de la estructura química de la enzima y la naturaleza del soporte, presentando la desventaja de perder la actividad enzimática debido a la reacción con grupos funcionales del centro activo de la enzima. La formación de enlaces cruzados entre los grupos amino del soporte, con los grupos amino de la enzima tienen como ventaja principal la simplicidad de ejecución y la fuerte interacción de la enzima con el soporte, lo que disminuye drásticamente la lixiviación.

El último de estos métodos de inmovilización es el de oclusión en gel o en membranas orgánicas, el cual corresponde al confinamiento del material biológico en una matriz polimérica o en una membrana semipermeable. Presenta la ventaja de poder usar cualquier tipo de enzima. No en tanto, exhibe una desventaja de lixiviación del material enzimático, debido a los diferentes tamaños de poros en los polímeros, como también problemas en el tiempo de respuesta, por la dificultad de difusión de especies envueltas a través de la membrana ^[31]. Dentro de este método el sol-gel es el que ha presentado mayor importancia en los últimos años y este se está empleando

ampliamente en la inmovilización y estabilización de materiales biológicos. Esto debido a numerosos factores, como la facilidad de fabricación, la flexibilidad del proceso de síntesis y la facilidad de que las enzimas ocluidas en la matriz de sol-gel de mantener su respectiva actividad catalítica, ya que no hay o hay poca alteración de la estructura de la especie encapsulada.

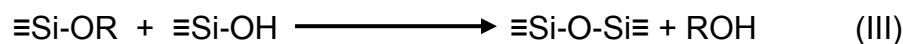
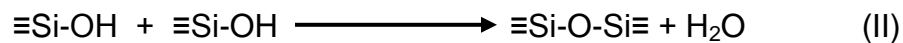
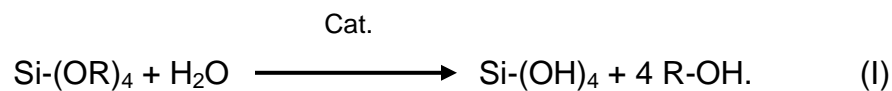
2.7.3.- Sol-gel.

El proceso sol-gel permite la formación de materiales cerámicos o vidriosos, a temperaturas mucho menores que las ofrecidas por las técnicas de fusión convencionales y los materiales derivados del sol-gel pueden proveer excelentes matrices para una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, es necesario el control de los parámetros físicos y químicos en el proceso de producción ya que dependiendo de estos las características como, fuerza mecánica, transparencia, tamaño y distribución de los poros en la red, pueden variar significativamente. Este proceso implica la transición de un sistema de un líquido “sol” que es generalmente coloidal, en un sólido “gel” consistente de al menos dos fases, con la fase líquida atrapada e inmovilizada por la fase sólida y en la cual se extraen luego los solventes. Los materiales usados en la preparación del “sol-gel” son generalmente sales inorgánicas de metal o compuestos orgánicos de metal, tales como: los alcoxisilanos, tetrametoxisilano (TMOS) y Tetraetoxisilano (TEOS).

El proceso de sol-gel implica dos pasos: En el primero, el precursor (TMOS o TEOS) es mezclado con agua y un catalizador por unas pocas horas. Este proceso permite la hidrólisis del enlace Si-O-R. La reacción de hidrólisis puede ser catalizada por ácidos (HCL, HF, entre otros) o bases (NH₄OH, NaOH, entre otros). Este proceso es sistemáticamente descrito por la ecuación (I). En el proceso real no todos los grupos –OR son accesibles a la hidrólisis hacia el grupo –OH. De hecho, lo largo de la hidrólisis se debe a la larga cantidad de grupos Si-OR que deben sufrir la hidrólisis a la forma Si-

OH. Entonces, la medida de la red tridimensional de sílica es un resultado directo del tiempo de hidrólisis. El proceso de hidrólisis es también influenciado por algunos factores como temperatura, tiempo y carácter del catalizador utilizado.

En el segundo paso, después de la hidrólisis, el pH obtenido es gradualmente llevado hasta aproximadamente 6, por ejemplo, con solución de amonio diluida, en caso de proceso de catálisis ácida. Esto resulta en una rápida (aprox. 1min) gelatinización y formación del llamado “gel mojado”. Subsecuentemente, el gel obtenido puede ser envejecido por unos pocos días en agua o solución de amonio. Este proceso reduce la fuerza mecánica durante el secado e impide, en cierta medida, el riesgo de quiebre de la muestra. Sin embargo, si la solución obtenida después de la hidrólisis ácida se mantiene a pH bajo (no adición de amonio), la gelatinización toma lugar mucho más lento (días). Generalmente, esto permite el mejoramiento de la estabilidad mecánica del sol-gel. El proceso de gelatinización ocurre luego de la hidrólisis de la solución del tetraalcoxisilano, el cual luego de formar un sol por la polimerización vía condensación, genera a continuación un gel. Esta transición es denominada transición sol-gel y es descrita por la ecuación (II) ó (III).



El proceso de sol-gel tiene un carácter dinámico. Entonces, es imposible separar las reacciones químicas responsables de la formación del producto final. Los procesos de hidrólisis, gelatinización y envejecimiento/secado ocurren simultáneamente. Durante el “envejecimiento” (después de la gelatinización y antes del secado) el material

derivado del sol-gel expulsa la fase líquida (agua, alcohol) de la muestra. Este proceso es llamado sinéresis y ejemplifica el equilibrio complicado envuelto en la formación de gel vía procedimiento de sol-gel.

La temperatura de secado no debe exceder los 100 °C permitidos para la formación del “gel seco”, llamado Xerogel. Ellos son relativamente fuertes, típicamente transparentes y porosos. El tamaño de los poros depende de muchos factores como el tiempo y la temperatura de hidrólisis, y el tipo de catalizador utilizado. El diámetro de los poros está directamente relacionado con la disminución del volumen del gel durante el proceso de secado (lo cual es la razón principal de agrietamiento). Adición de pequeñas cantidades de solventes orgánicos (ejemplo, dimetilformamida o dimetilsulfóxido), estabilizan el gel resultante incrementando así su fuerza mecánica y mejorando su transparencia.

La tecnología de la preparación de Xerogel ofrece, en comparación a materiales convencionales, algunas ventajas. El proceso en conjunto puede ser realizado a temperatura ambiente y segundo, es obtenido por un precursor líquido. Esto permite añadir al hidrolizado varias sustancias químicas (como una solución, suspensión o incluso una muestra sólida) y, después del paso de gelatinización, atrapar esta dentro del gel. Ya que el proceso entero (incluyendo el secado) puede ser conducido a temperatura ambiente, incluso moléculas relativamente inestables (ejemplo, proteínas) pueden ser atrapadas dentro de la matriz. Ya que los Xerogeles son porosos, las moléculas atrapadas pueden usualmente interaccionar con el ambiente a través de los canales y huecos de la red. Esto hace de este un material prometedor para sensores químicos y biológicos ^[33].

En general, podemos entonces decir que el proceso de sol-gel consta de dos pasos, un paso de hidrólisis y uno de polimerización, los cuales no ocurren de forma independiente y que las propiedades físicas del gel obtenido (esto es, área de

superficie específica, tamaño medio de poros y su distribución) dependen fuertemente de los parámetros utilizados en el proceso de sol-gel. La razón molar agua:silano, la naturaleza y la concentración del catalizador y el tipo de precursor alcóxido son parámetros específicos que afectan fuertemente las velocidades relativas de las reacciones de hidrólisis y condensación, las cuales a su vez, dictan las propiedades del material final ^[32]. Pudiéndose así obtener, un “alcogel”, una fase sólida y una líquida; un “xerogel”, al extraer la fase líquida por evaporación; un “aerogel”, al extraer la fase líquida bajo condiciones supercríticas o un vidrio. El proceso completo de formación de sol-gel es esquemáticamente representado en la figura 14.

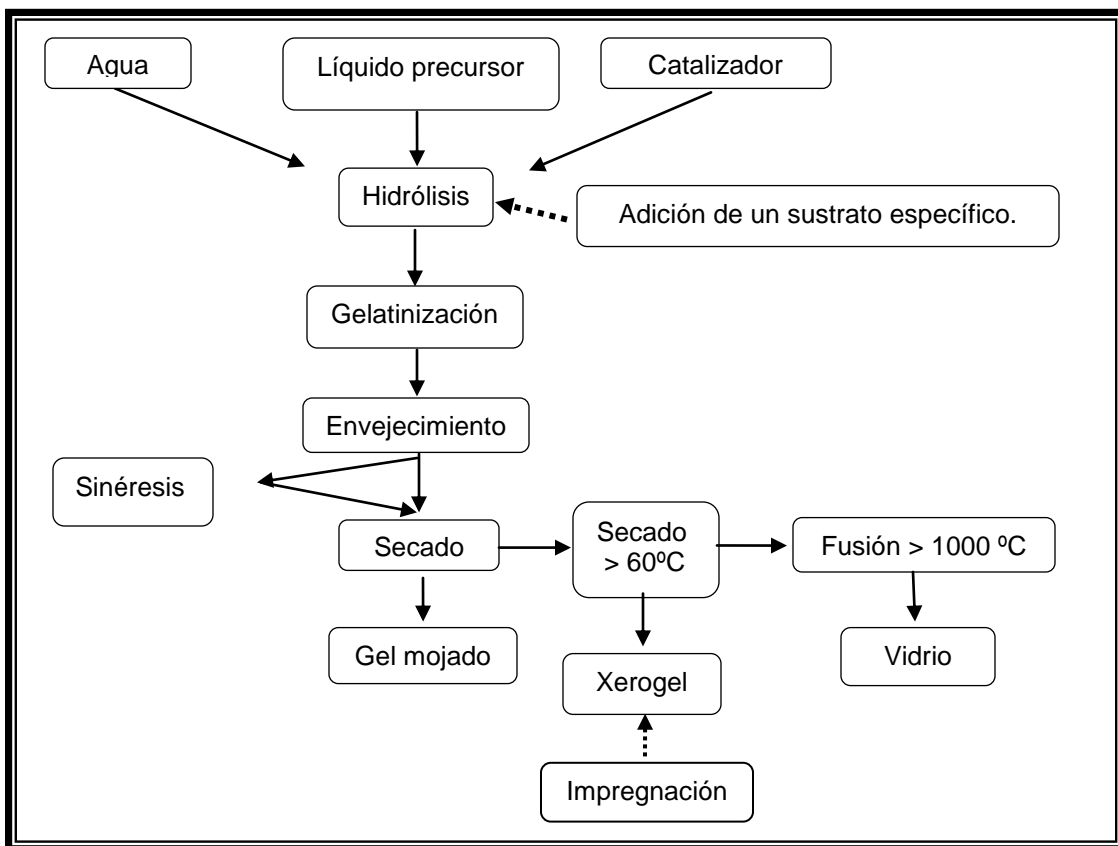


Figura 14. Representación esquemática del proceso de producción de sol-gel ^[33].

3.- Antecedentes.

3.1.- Estudios realizados sobre la inmovilización de enzimas.

En 1999, Yuming H. y colaboradores. ^[34], desarrollaron un biosensor de QL para determinación de colesterol combinado con un análisis de flujo de inyección, basado en la oxidación del Colesterol por Colesterol Oxidasa en presencia de Oxígeno disuelto, para producir H_2O_2 . Para ello, inmovilizaron Colesterol Oxidasa sobre sílica gel amino-modificada vía activación por glutaraldehído y la empacaron en una columna de vidrio. Los reactivos analíticos, incluyendo luminol y Ferricianuro, fueron electrostáticamente co-inmovilizados sobre una columna de intercambio aniónico. La muestra se hace pasar a través de la columna que contiene la enzima y el Peróxido generado es enviado a la segunda columna de intercambio aniónico donde reacciona con el luminol y el ferrocianuro eluido de esta, figura 15. Analizaron el efecto del pH en la actividad enzimática encontrando que el pH óptimo de trabajo es de 7. El método propuesto ofrece la ventaja de ser simple y rápido, y fue exitosamente aplicado en la determinación de colesterol en muestras de sangre humana, con un límite de detección de $5 \cdot 10^{-6}$ g/ mL.

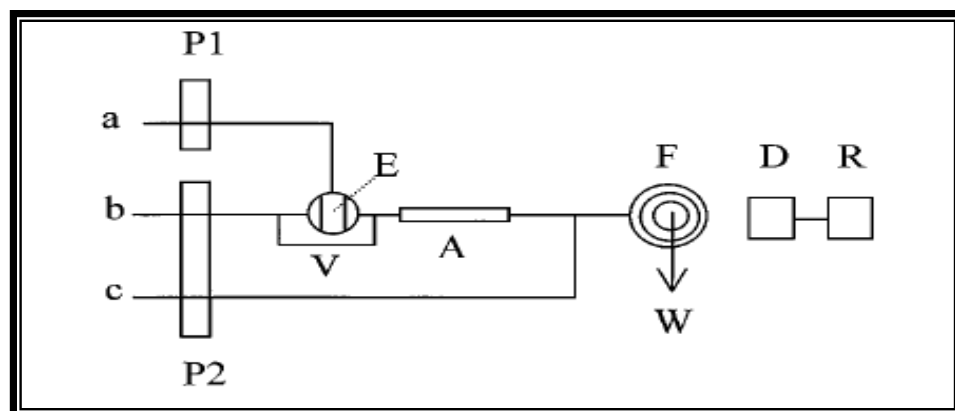


Figura 15. Esquema del biosensor de flujo para la determinación de Colesterol: a) Muestra, b) H_2O , c) $NaOH$ 0,1M, P₁) Bomba 1, P₂) Bomba 2, (A) Columna de intercambio aniónico, (E) Columna con enzima inmovilizada, (V) Válvula, (F) Celda de Flujo, (W) Desecho, (D) Detector, (R) Grabador.

En el 2001, Hanoaka y colaboradores ^[35], estudiaron la quimioluminiscencia del luminol en una solución no tamponada o débilmente ácida, utilizando un catalizador heterogéneo, complejo de Co(II)-etanolamina, inmovilizado sobre resina Dowex-50, en presencia de H₂O₂. Encontraron que la longitud de absorción máxima del luminol era de 448 nm, es decir, 23 nm mayor a la mostrada en solución básica (pH 10,5). Compararon las medidas de QL empleando tres diferentes ligandos, mono, di y trietanolamina y seis iones de metales de transición Co(II), Cu(II), Ni(II), Mn(II), Fe(II) e Fe(III). Observaron que la intensidad de QL disminuía en el orden de mono > di > trietanolamina y Co(II) > Cu(II) > Ni(II) > Fe(III) > Mn(II) > Fe(II). Este sistema de QL heterogéneo fue desarrollado como un sensor de flujo continuo para determinación de H₂O₂ en agua de lluvia sin ningún pre-tratamiento previo de la muestra. Ellos consideran que el mecanismo para la emisión de QL en solución no tamponada se basa en la formación de un ion radical superóxido durante la descomposición de H₂O₂ catalizado por el complejo de Co(II)-etanolamina inmovilizado en la resina. Entonces el ion radical superóxido actúa sobre el luminol y la QL es emitida. Esta propuesta fue apoyada firmemente por los resultados obtenidos, como un mecanismo de reacción del luminol en medio neutro o ligeramente ácido y les permitió concluir que no solo es posible generar la reacción de QL del sistema luminol-H₂O₂ en medio básico, sino también es posible llevarla a cabo en un medio neutro o ligeramente ácido. El límite de detección de H₂O₂ empleando resina Dowex-50 y Co-monoetanolamina como catalizador fue de 1.10⁻⁷M y el coeficiente de correlación fue de 0,9990.

En el 2008, Shuang y col. ^[36], desarrollaron un biosensor para determinación de glucosa basado en la electroquimioluminiscencia del luminol, empleando glucosa oxidasa (GO), como catalizador, soportada sobre nanopartículas de Oro (AuNPs), ver figura 16. Emplearon un electrodo de oro en el que las AuNPs fueron ensambladas en una red tridimensional de sol-gel y, a continuación, la glucosa oxidasa las absorbieron sobre estas AuNPs, con la finalidad de obtener un electrodo GO/AuNPs/sol-gel/Au. La intensidad de electroquimioluminiscencia del biosensor depende de la concentración del

luminol y del tamaño de las nanopartículas de Oro. El biosensor mostró reproducibilidad, estabilidad y selectividad satisfactoria en la determinación de glucosa, con un límite de detección (LOD) de $0,2 \mu\text{M}$ de glucosa.

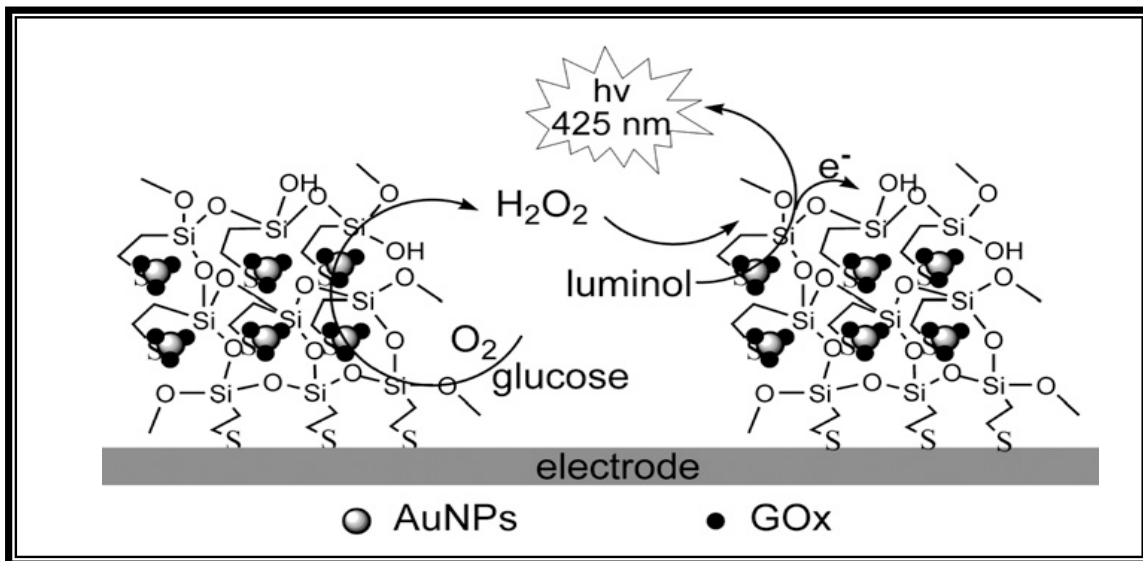


Figura 16. Principio del biosensor de glucosa basado en electroquimioluminiscencia del luminol catalizada por GO soportada sobre AuNPs.

También en el 2008, Zhang y col. ^[37], propusieron un biosensor de flujo de QL, en el cual Glucosa Oxidasa (GO), Peroxidasa de Rábano (HRP) y nanopartículas de Oro fueron inmovilizadas con el método de sol-gel sobre la superficie interior de la célula de flujo. Encontraron que las Nanopartículas de Oro podían mejorar considerablemente la respuesta quimioluminiscente del biosensor de glucosa. La mejora fue estrechamente relacionada con el tamaño de las AuNPs, y observaron que los tamaños más pequeños, 8 nm , eran los que mejor respuesta quimioluminiscente presentaban. El biosensor expuso corto tiempo de respuesta, fácil manejo, bajo costo, simple montaje y se aplicó con éxito en la determinación de Glucosa en suero humano con un LOD de $5 \mu\text{M}$. Además concluyen que el sistema puede ser fácilmente adaptado a el análisis de otros analitos (por ejemplo, ácido úrico) variando las enzimas.

4.- Justificación.

En la revisión bibliográfica realizada se observa que los equipos actualmente empleados en análisis clínicos suelen ser sofisticados, costosos, de difícil manipulación, requieren de una infraestructura física adecuada y consumen largos tiempos de análisis. En tal sentido, el desarrollo tecnológico actual y la necesidad de contar con equipos de fácil manejo, de dimensiones físicas pequeñas, que puedan ser utilizados en el área de la química clínica, ha fomentado la fabricación de dispositivos robustos, portátiles y de bajo costo, que puedan ser utilizados en la determinación de compuestos químicos y biológicos importantes en concentraciones muy bajas. En este ámbito los biosensores han presentado el mayor desarrollo en los últimos años. Asimismo, la simplicidad de las medidas de QL, su elevada sensibilidad y sus bajos límites de detección y el uso de simples cámaras CCD como detectores, están siendo actualmente una herramienta bastante aplicada. Sin embargo, en análisis clínicos no han sido suficientemente explotadas y por lo tanto, resulta de gran interés la validación de estos en el área médica.

Adicionalmente, dado que la encapsulación o inmovilización es una tecnología versátil para controlar la liberación de los fármacos y en la actualidad el proceso de sol-gel ha emergido como una plataforma prometedora para la inmovilización, estabilización y el encapsulamiento de moléculas biológicas, es de suma importancia establecer las condiciones adecuadas para lograr este objetivo, el cual evitaría la adición constante de reactivos para su operación y los métodos que se llevan a cabo con esta inmovilización, métodos enzimáticos, son más específicos que otros que presentan grandes interferencias, lo que dificulta la realización de las medidas y en muchos casos hace necesario de un tratamiento previo para eliminar estas, lo que aumenta la cantidad de errores. Por lo que, si el potencial completo de QL fuera

explotado, muchas sustancias podrían ser medidas en pequeños volúmenes de muestra por dispositivos relativamente de bajo costo.

En tal sentido y dado que hasta ahora, análisis basados en luminiscencia son todavía poco utilizados como una herramienta de diagnóstico y en la actualidad es necesario desarrollar equipos portátiles y de bajo costo que permitan ser trasladados para realizar análisis clínicos en lugares remotos, el presente trabajo desea desarrollar y evaluar un biosensor quimioluminiscente para su aplicación en análisis clínicos, basado en ensayos inmunoenzimáticos, empleando el proceso de sol-gel para la inmovilización de enzimas y utilizando como detector una cámara CCD de forma de adquirir la señal analítica mediante las imágenes que se produzcan sobre la placa ELISA. Para el procesamiento de las imágenes se utilizará un software diseñado en el laboratorio.

5.- Objetivos.

5.1.- Objetivo General.

Desarrollar y evaluar un biosensor quimioluminiscente para su aplicación en análisis clínicos.

5.2.- Objetivos específicos.

- 1.- Optimizar el sistema quimioluminiscente.
- 2.- Preparar y optimizar el sol-gel para la encapsulación de las enzimas.
- 2.- Aplicar el biosensor en la determinación de componentes químicos contenidos en fluidos biológicos tales como sangre u orina.
- 3.- Validar los resultados obtenidos entre el biosensor diseñado y el método de referencia.

6.- Metodología Experimental.

6.1.- Reactivos y soluciones.

Solución de luminol (2000 mg/L) (sigma Aldrich al 97%) e hidróxido de potasio (8000 mg/L), preparada disolviendo 0,0500 g de luminol y 0,2000 g de KOH en 25 ml de agua destilada. Solución de ferricianuro de potasio (3600 mg/L) preparada disolviendo 0,0900 g de la sal en 25 ml de agua destilada. Solución madre de glucosa (Sigma Aldrich) de 2500 mg/L, preparada disolviendo, en 25 ml de agua, 0,0625 g de la misma. Las soluciones de calibración se prepararon haciendo las diluciones adecuadas de la solución madre. Otros reactivos empleados fueron etanol, agua destilada, agua desionizada, kit para la aplicación del método de glucosa oxidasa colorimétrico (Merck), ácido clorhídrico, peróxido de hidrógeno al 35% (Sigma Aldrich) y glucosa oxidasa (GO) (Sigma Aldrich). Esta última fue disuelta según indicaciones del fabricante y fue conservada en una botella ámbar refrigerada.

6.2.- Instrumentación.

6.2.1.- Sistema para detección de Quimioluminiscencia.

Inicialmente se intentó adaptar el sistema empleado por Briceño A. y colaboradores ^[30], a la detección de glucosa por quimioluminiscencia. Para ello, el arreglo de LEDs fue apagado, se emplearon placas ELISA transparentes dado que la configuración del equipo requiere detectar la señal por el fondo de la placa y una cámara web como detector. Sin embargo, en este caso el detector no logró registrar ninguna señal por lo que se procedió a diseñar y emplear una configuración diferente.

6.2.1.1.- Descripción del equipo empleado.

El sistema empleado en este trabajo se muestra en la figura 17. Este dispositivo es usado en un cuarto completamente oscuro y consta de una placa para análisis ELISA de color negro, constituida por 96 micro-pozos, cada uno de los cuales posee una capacidad de 350 μ L y que sirven como receptáculo de la muestra. El sistema de detección de la señal quimioluminiscente consiste en una cámara digital (Kodax Easy share V1073), con un detector CCD de 640x480 pixeles de resolución, que graba la imagen de la celda a 30 cuadros/Seg. La cámara se encuentra conectada a una computadora portátil que se encarga de recolectar la información y que contiene un software diseñado en el laboratorio que permitirá procesar los datos obtenidos.

6.2.1.2.- Funcionamiento del sistema quimioluminiscente.

El proceso de medición de la QL en el dispositivo utilizado, se lleva a cabo de la siguiente manera: la luz emitida por cada micro-pozo durante el tiempo de reacción, es capturada por la cámara digital. El resultado es un video digital que se descompone en

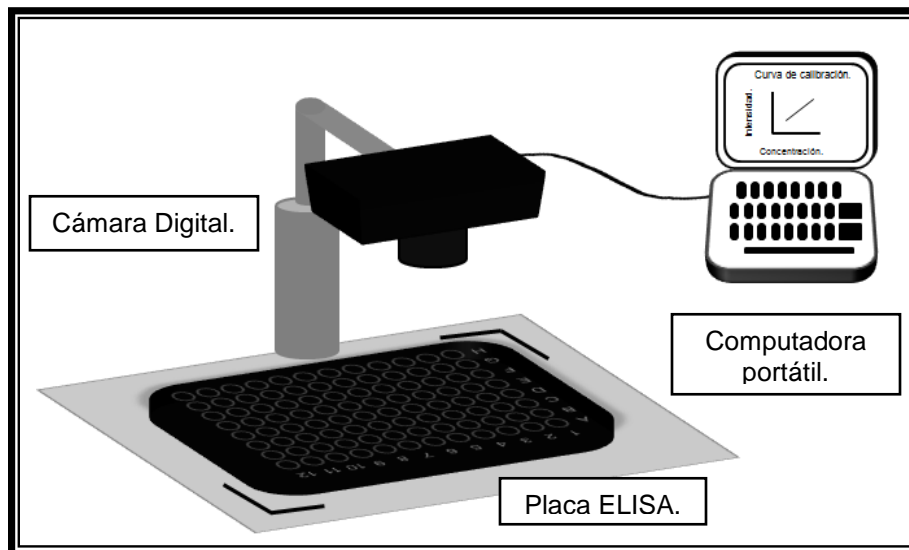


Figura 17. Esquema del Equipo a emplear.

tres canales que corresponden a los canales primarios rojo, verde y azul (RGB). El espectro de absorción de cada filtro se presenta en la figura 18, el canal azul tiene un máximo de absorción de 470 nm., mientras que los canales verde y rojo tienen un máximo de 540 y 630 nm., respectivamente. La película es descompuesta en una secuencia de 10 imágenes por segundos empleando el programa Quicktime Player (Figura 19a). Posteriormente la secuencia de fotos es procesada en un software generado en Matlab R2006a, en el cual de forma manual se selecciona inicialmente el área (filas y columnas) que se desee medir en la placa y el tamaño del diámetro de observación (Figura 19b). Luego se toma una imagen de referencia en la cual se seleccionan las esquinas de la placa ELISA en donde se ubican los pozos cuya intensidad se desea conocer (Figura 19c). Seguidamente las imágenes a leer son seleccionadas para conocer las intensidades en los diferentes tiempos y de esta manera, las imágenes capturadas se transforman en superficies de respuesta de intensidades (Figura 19d). El software con estos datos y considerando que el video fue descompuesto en 10 cuadros/s le asigna un tiempo (t) a cada foto para generar una gráfica de intensidad en función de dicho tiempo (Figura 20) de la cual se pueden extraer los valores de intensidad en un t determinado de la reacción. El software permite almacenar los datos y estos pueden ser leídos en el momento que se desee.

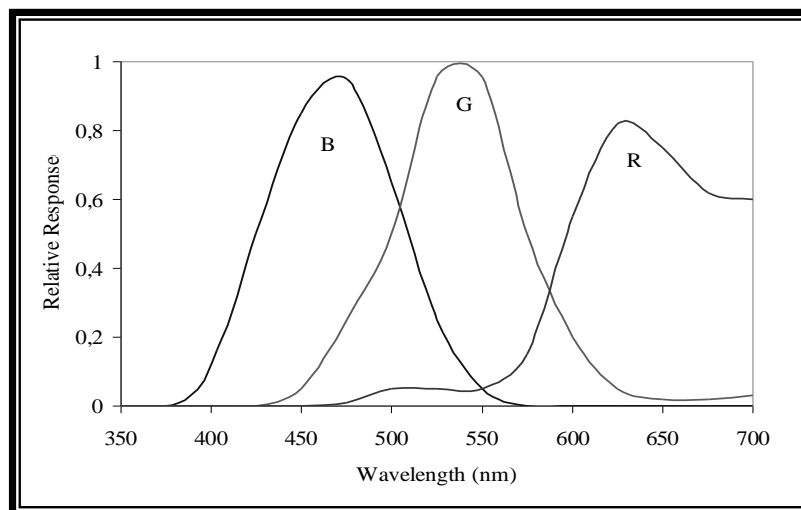


Figura 18. Espectros de los canales de filtros de la cámara CCD.

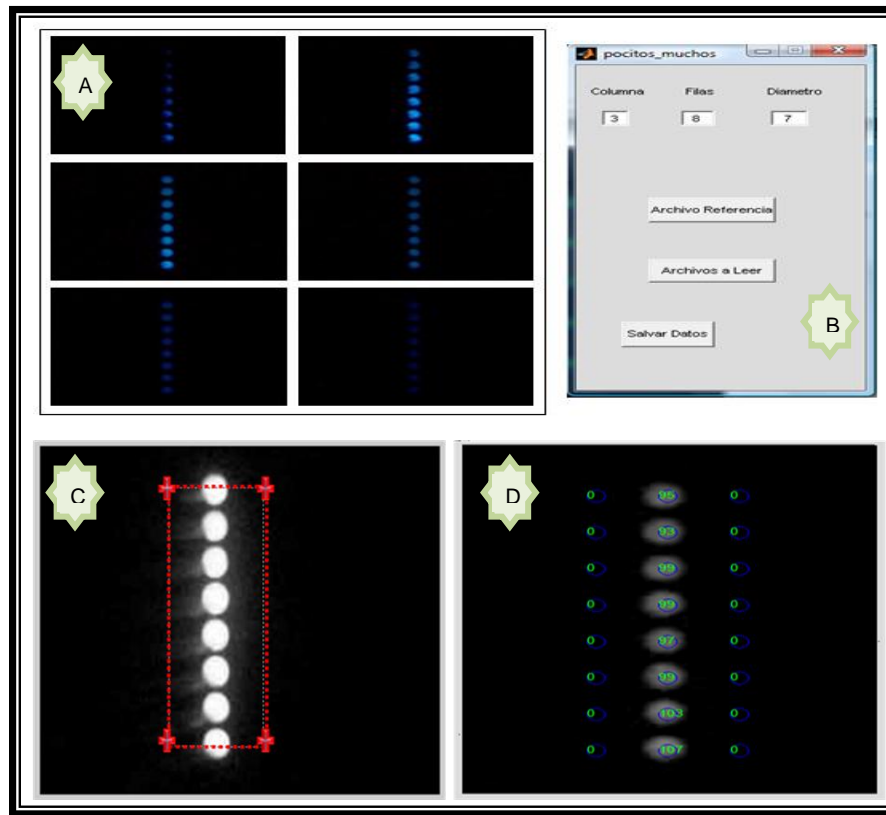


Figura 19. Software 1. a) Secuencia de imágenes, b) Modo de selección de la data y condiciones, c) Detección manual al seleccionar los bordes de la placa ELISA y d) Datos obtenidos.

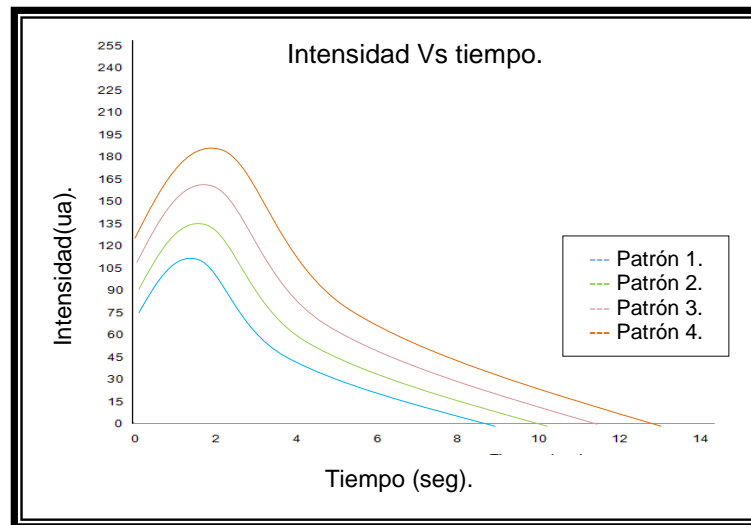


Figura 20. Intensidad de emisión de QL en función del tiempo.

Se elaboró y evaluó un segundo software, igualmente desarrollado en Matlab R2006, en el cual se cargan todas las fotos simultáneamente y este selecciona como referencia la foto ubicada en la parte central y automáticamente introduce un cuadro de referencia para identificar las regiones de interés. Si el área no se encuentra bien definida, se puede desplazar manualmente a través de todas las fotos y volver a correr, en el botón ROI, para que este nuevamente seleccione la región de interés, pero ahora empleando como referencia la foto que selecciona el operador. A diferencia del primer software que toma el valor de la mediana de los píxeles que se ubican en el área seleccionada, este lee el valor de cada pixel y suma dichos valores. Manualmente se introduce el valor de cuadros/Seg. en el cual se descompuso el video, se selecciona el canal de la cámara a emplear como filtro y se genera la curva de intensidad en función del tiempo. Luego se introducen los valores de la concentración de los patrones de cada pozo y se seleccionan dos tiempos (t_1 y t_2) (Figura 21), entre los cuales se desea integrar el área bajo la curva de Intensidad Vs tiempo. La señal emitida, que es proporcional a la energía captada por la cámara en ese tiempo, es almacenada y transferida a Excel para analizarla mediante el algoritmo de mínimos cuadrados.

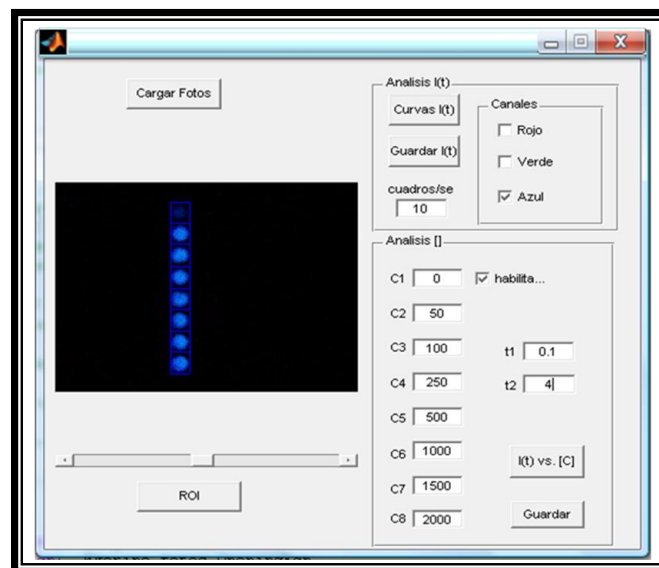


Figura 21. Selección de parámetros en el software de matlab.

6.2.2.- Sistema para detección colorimétrica.

Para las medidas colorimétricas se empleó un espectrofotómetro convencional modelo Pharmacia LKB Novaspec II UV/Vis que se muestra en la figura 22. Este emplea una cubeta de 1 cm de paso óptico.



Figura 22. Espectrofotómetro UV/Vis.

6.3.- Análisis en matriz sólida (sol-gel).

6.3.1.- Preparación del sol-gel.

Para la preparación del sol-gel se aplicaron dos metodologías. Inicialmente el procedimiento de preparación de la solución del gel fue similar a la propuesta por W. Cao y colaboradores ^[38], con algunas modificaciones. En este procedimiento, 9 mL del precursor TEOS, se mezclaron con 11 mL de etanol en un beacker y fueron agitados magnéticamente por 20 minutos. A la solución obtenida se le añadieron 2 mL de agua destilada previamente acidificada a pH=1 con HCl (0,1M) y 2 mL de la enzima, Glucosa Oxidasa. Esta solución se agitó durante 1 hora. De esta forma, se realizó la hidrólisis que da lugar a la formación de los grupos silanol (Si-OH). La cinética de la reacción anterior por su lentitud a temperatura ambiente es poco práctica, a menudo necesita

varios días para llevarla a cabo totalmente, es por ello que para acortar el proceso se añaden catalizadores ácidos o básicos a la mezcla. En este caso se empleo un catalizador ácido como el HCL. Seguidamente, 100 µl de esta solución fueron añadidos en cada uno de los micropozos de la placa ELISA.

Fue empleado un segundo procedimiento para formar el gel similar al de Kumaran y colaboradores en 1994 ^[39], con las modificaciones pertinentes. En este, 4,5 mL de TEOS, 1,4 mL de agua y 100 µl de ácido clorhídrico (0,1M) fueron mezclados en un beacker. La mezcla fue tapada y agitada magnéticamente por 3 horas. Para la encapsulación, 50 µl de la solución del gel y 60 µl de la enzima fueron colocados en cada uno de los micropozos de la placa ELISA. Así se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente manteniendo la placa tapada y la medida se llevo a cabo una vez finalizado el tiempo de secado del gel.

6.3.1.- Medidas en matriz sólida.

La medida en el gel se hace de la siguiente manera: se selecciona una columna de la placa que contenga el gel y con ayuda de una micropipeta automática se llenan los pozos con 50 µl de las soluciones de interés, bien sea patrones o muestras, y se deja reaccionar, la glucosa con la enzima, por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añade simultáneamente en los pozos, empleando una micropipeta de ocho puntas, 80 µl de la solución de luminol y se coloca la placa cuidadosamente sobre el equipo para realizar la detección. La cámara se enciende, se desactiva el flash, se coloca en modo video y se activa de forma manual. Por último, empleando la micropipeta de ocho puntas, se añade en los pozos 80 µl del catalizador de hierro y se detiene la toma de video en el momento que la reacción finalice.

6.4.- Análisis en solución.

En este caso y del mismo modo que con el gel con ayuda de una micropipeta automática se llenan los pozos con 50 μl las soluciones de interés, bien sea patrones o muestras. Luego empleando una micropipeta de ocho puntas, que dispensa simultáneamente la solución en todos los pozos, se añaden 100 μl de la enzima y se deja reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se sigue exactamente el mismo procedimiento que en el caso de matriz sólida.

6.5.- Optimización del sistema quimioluminiscente.

De forma de optimizar el sistema de detección y el software diseñado para el procesamiento de los datos, fueron evaluados una serie de parámetros. Inicialmente con la finalidad de conocer cual canal de la cámara, de acuerdo a su intervalo espectral, debía usarse para realizar las medidas de forma tal que se trabajara en el máximo de emisión y poder con esto elaborar el software e introducir en el mismo el filtro que se usaría, se adquirió el espectro de emisión del Luminol empleando un espectrofotómetro convencional Ocean Optics, modelo USB 2000. Para ello, se toma la señal del fondo, la cual es restada a la señal emitida por la muestra, y se colocan en un beacker 50 μl de una solución de peróxido de hidrógeno de 250 ppm, 80 μl de la solución de luminol e KOH y 80 μl de la solución de ferricianuro de potasio. La adquisición del espectro se hace introduciendo la fibra óptica en la solución inmediatamente después de añadir el catalizador de hierro. Seguidamente, se estudio la reproducibilidad del sistema, en matriz sólida y en solución, empleando para ello una solución patrón de Glucosa de 1250 ppm, la cual fue colocada en siete de los pozos seleccionados, ya que el primero es usado como blanco y no contiene glucosa. Para ello, se realizaron las medidas por duplicado y se calculó en cada caso el coeficiente de varianza (CV), una medida de la dispersión de los datos respecto al valor promedio.

Los datos fueron introducidos en el primer software y con la idea de observar cuales parámetros proporcionaban una mejor reproducibilidad, se evaluaron diferentes combinaciones variando el tiempo en el cual se adquieren los datos de intensidad y el diámetro del círculo que ubica la zona específica de emisión a medir. Esta última variable denominada factor de reducción del diámetro, se fija por un número que puede ir desde 1 hasta 11 y su valor es inversamente proporcional al tamaño del círculo, es decir, a mayor valor de la variable diámetro menor será el tamaño del círculo que emplearemos para detectar la emisión. El valor de la señal de emisión es entonces la intensidad que corresponde a la mediana del conjunto de pixel que se encuentran en el área del círculo definido. Se define de esta forma ya que, a diferencia del promedio, la mediana es una medida de tendencia central de un conjunto de medidas que es menos sensible a la presencia de valores extremos.

Del mismo modo se realizó con el segundo software, pero esta vez variando los tiempos entre los cuales se integra la señal. En este software la señal de emisión es la intensidad que corresponde a la suma de todos los pixeles que se ubican en el área definida. Finalmente empleando soluciones patrones de Glucosa de 500, 700, 900, 1100, 1300, 1500, 1750 y 2000 ppm y usando los parámetros de mayor reproducibilidad, se evaluó la posibilidad de construir una curva de calibración.

6.6.- Obtención y preparación de las muestras.

Los animales para obtener las muestras reales de suero fueron suministrados por el laboratorio de Bioquímica Médica del Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Se emplearon dos ratas macho de la cepa Sprague-Dawley proveniente del bioterio del Instituto de Medicina Experimental, con un peso de 242 y 250 gramos, respectivamente, alimentadas ad libitum (libre acceso de un animal a agua o alimento,

es decir, las necesidades biológicas de éste son las que regulan el consumo). Estas fueron sometidas al siguiente tratamiento: Inicialmente se tomaron muestras de sangre de la cola, empleando capilares heparinizados. Posteriormente se le administró adrenalina, disuelta en NaCl al 9%, por vía interperitoneal en una proporción de 0,015 ml por cada 100 g de peso corporal ^[40]. A partir de este punto se tomaron muestras de sangre cada 30 minutos por hora y media. Una vez tomadas las muestras en los capilares, estos fueron centrifugados durante 5 minutos para separar el plasma con el cual se determinó la glucosa por el método de glucosa oxidasa enzimática-colorimétrico y el método quimioluminiscente. El plasma separado fue congelado hasta el día del análisis, ya que este puede guardarse en nevera por no más de 24 horas. Si se quieren guardar por períodos más largos hay que congelarlo.

6.7.- Aplicación y validación del sistema quimioluminiscente.

La aplicación del sistema quimioluminiscente se evaluó mediante la determinación de concentraciones de glucosa en muestras de plasma sanguíneo de ratas empleando el sistema quimioluminiscente diseñado. Para su validación se analizaron simultáneamente las muestras para la estimación de la glucosa por dicho sistema y por el método de referencia (colorimétrico).

6.8.- Determinación de Glucosa.

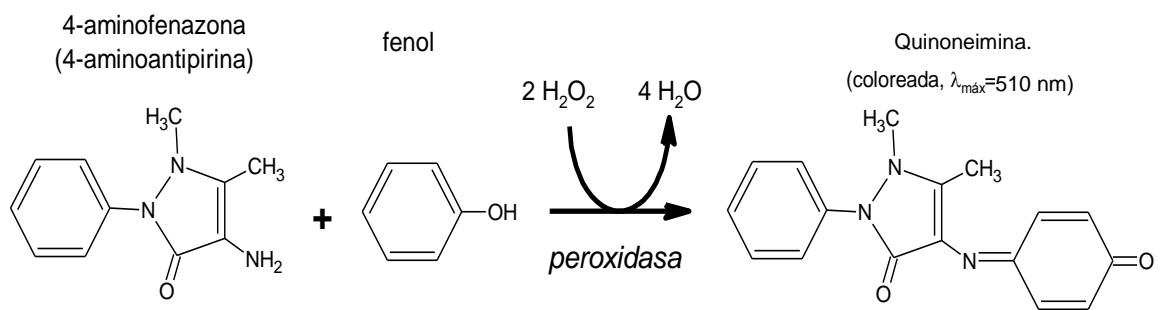
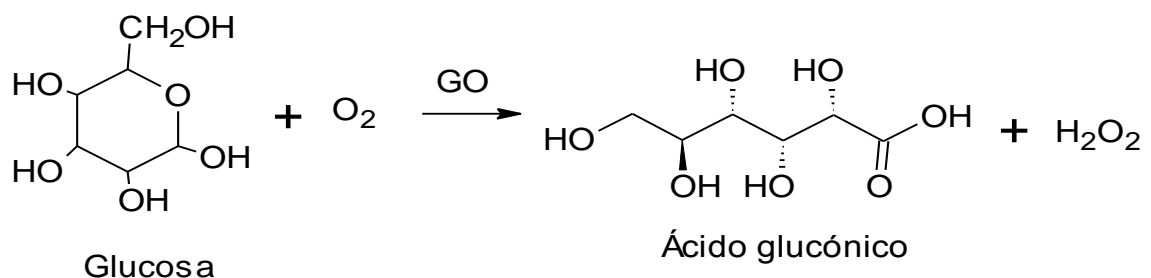
6.8.1.- Sistema quimioluminiscente.

Para la determinación cuantitativa de glucosa en plasma sanguíneo mediante el método quimioluminiscente se emplea glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico y una reacción luminiscente catalizada por ferricianuro de potasio. En presencia de hierro el peróxido de hidrógeno producido reacciona con el Luminol para generar el dianión del ácido 3-aminoftálico en

su estado excitado (Ver figura 11), el cual decae a su estado fundamental emitiendo luz. La intensidad de emisión generada en la reacción es proporcional a la concentración de glucosa en la sangre. Las reacciones que tienen lugar son mostradas en la sección 2.7.1.

6.8.2.- Método colorimétrico de glucosa oxidasa.

Para la determinación cuantitativa de glucosa en plasma sanguíneo, se utilizó el método glucosa oxidasa enzimática – colorimétrica. Este método emplea glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico [41] y una modificación de la reacción de color Trinder [42] catalizada por la enzima peroxidasa. En presencia de peroxidasa el peróxido producido hace una copulación oxidativa con la 4-aminoantipirina (4-AAP) y el fenol, para dar una coloración roja debido a la formación de quinoneimina, cuya longitud de onda de absorción máxima es de 510 nm. La intensidad de color del complejo generado en la reacción es proporcional a la concentración de glucosa en la sangre. Estas son las reacciones que tienen lugar:



Para realizar las medidas se siguió el siguiente procedimiento: El reactivo de glucosa enzimática en forma de polvo seco y cuyos componentes se presentan en la tabla 6, se disolvió lentamente y sin agitar en agua desionizada en un volumen según indicaciones del fabricante. Las muestras extraídas de la rata y el patrón de glucosa se trataron siguiendo las especificaciones indicadas en la tabla 7; luego estos se incubaron durante 10 minutos a 37 °C en un baño de agua y se midió la absorbancia de cada uno a una longitud de onda de 510 nm.

Tabla 7. Especificaciones de los componentes del reactivo GO colorimétrico.

Componentes	Concentración
Buffer fosfato	pH 7,5 ± 0,1
4-Aminoantipirina (4-AAP)	0,38 mM
fenol	10 mM
Glucosa oxidasa	≥ 15 u/ml.
Peroxidasa	≥ 1.2 u/ml.
Azida de sodio	0,10%

Tabla 8. Especificaciones de las mezclas a utilizar.

Sustancia	Cantidad
Muestra real	1,0 ml de reactivo + 10 µl de muestra
Patrón	1,0 ml de reactivo + 10,0 µl de patrón.
Blanco	1.0 ml de reactivo

La determinación de glucosa se llevo a cabo mediante la calibración de un solo punto, con la siguiente ecuación:

$$C_M = \left(\frac{A_M}{A_P} \right) \times C_P.$$

C_M : Concentración de la muestra.

A_M : Absorbancia de la muestra.

A_P : Absorbancia del patrón

C_P : Concentración del patrón.

De esta manera, se calcula la concentración de cada una de las muestras y con estos datos se elaboro finalmente la curva de liberación de glucosa a la sangre estimulada por la adrenalina.

7.- Resultados y discusiones.

7.1.- Optimización del sistema quimioluminiscente.

Dado que un cambio en los parámetros experimentales tales como, la forma de mezclar los reactivos, la temperatura del sistema, la concentración de especies reaccionantes o interferentes, el pH y hasta la polaridad del solvente, pueden modificar totalmente el color y la intensidad de emisión del luminol, pudiendo hasta extinguirla, fue necesario tomar el espectro de emisión bajo las condiciones de trabajo. En la figura 23 se muestra el espectro de emisión obtenido. El sistema RGB de la cámara fue usado como selector de la longitud de onda con el fin de evaluar el espectro a la longitud máxima de emisión. El pico máximo observado en el espectro es de 474 nm, que corresponde al máximo del intervalo espectral del canal azul. Es por ello, que el primer software se programó para realizar la detección empleando este filtro y en el segundo este se selecciona manualmente.

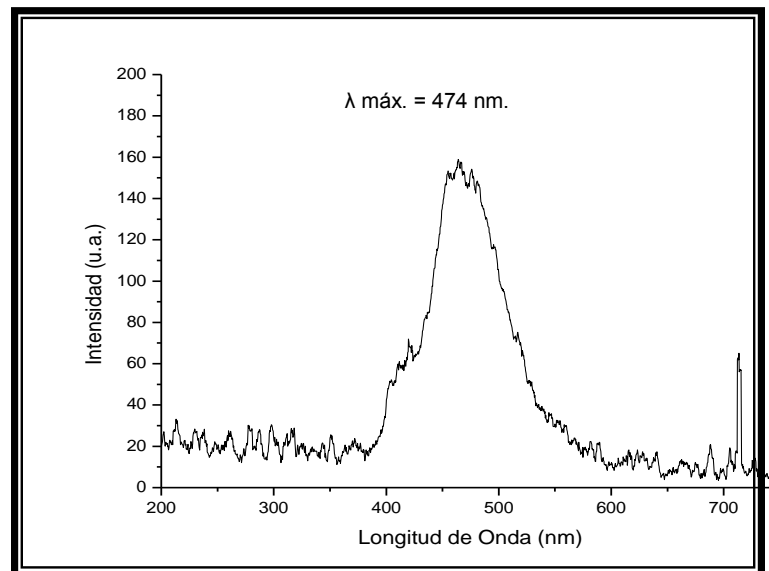


Figura 23. Espectro de emisión del luminol.

Otro parámetro importante es que dado que la luz emitida en reacciones quimioluminiscentes es emitida igualmente en todas las direcciones (Ver figura 24), el análisis se llevó a cabo en placas ELISA de color negro. Si el análisis es llevado a cabo en placas transparentes, la luz puede no sólo irradiar verticalmente, en la dirección del detector, sino también lateralmente en dirección de otros pozos. De esta manera, algunos pozos cuya intensidad es alta pueden introducir interferencias significativas en pozos adyacentes. Esta es una de las desventajas encontradas al emplear el sistema diseñado por Briceño y col. ^[30], en la detección por quimioluminiscencia. Además, otra desventaja es que el sistema que introduce la placa al equipo es muy lento y la reacción quimioluminiscente ocurre rápidamente, en alrededor de 10 a 20 segundos. Por esta razón, una vez que la placa se introduce al sistema, la reacción ya ha finalizado y dado que la intensidad de emisión es muy pequeña y la cámara web está muy alejada de la placa donde se lleva a cabo la reacción, el detector no logra ver ningún tipo de señal. Es por ello, que se modificó la configuración del equipo empleando ahora una cámara digital como detector, placas negras y realizando la medida por la parte superior y no por el fondo de la placa.

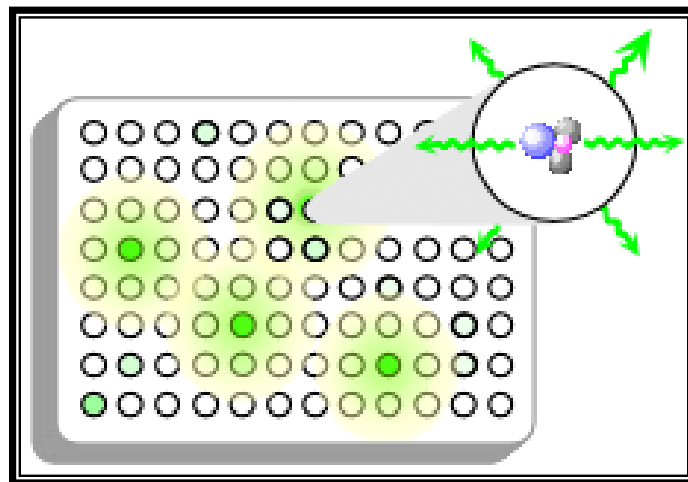


Figura 24. Efecto producido al emplear placas transparentes en QL.

Un estudio que se realizó durante la optimización del sistema se basó en el conocer la concentración de KOH que debía colocarse para lograr tanto la reacción de QL como su detección. Para ello, se inició colocando una concentración de KOH de 4000 mg/L. En este caso, la intensidad emitida era muy baja y el sistema no lo detectaba. La razón principal de esto es que uno de los intermediarios que se forma por la adición nucleofílica del ión del peróxido de hidrógeno al grupo carbonilo, antes de la formación del endo-peróxido, puede generar un equilibrio ácido-base. Si el producto que reacciona es el que se encuentra protonado, se produce la reacción sin emisión de radiación y si es el desprotonado se produce la emisión. Esto es ejemplificado en la figura 25. Como la concentración de OH^- no es elevada, el equilibrio se desplaza a la especie protonada y se produce mayormente la reacción sin emisión. Es por ello, que se observa una baja emisión que no se logra detectar.

Un exceso de OH^- en el medio desplaza el equilibrio a la especie desprotonada y asegura que no existan productos colaterales. Por esta razón, se empleó una concentración de KOH de 8000 mg/L. Además, fue posible la unión del luminol y el KOH en una misma solución disminuyendo así la cantidad de soluciones a preparar.

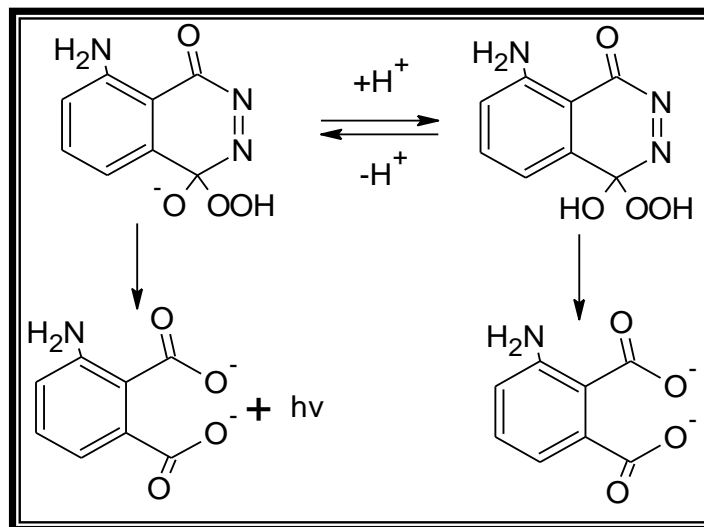


Figura 25. Esquema simplificado del mecanismo de reacción del luminol.

7.1.1.- Análisis en matriz sólida.

7.1.1.1.- Optimización de la metodología de preparación del Sol-gel.

Encapsular la enzima dentro de la matriz del gel se logra con un procedimiento simple y directo: después de haber iniciado las reacciones de hidrólisis y condensación del alcoxilano a través de una catálisis ácida, la mezcla de polialcosixilanos que resulta se combina, en este caso, con la enzima GO. La subida repentina del pH resulta en una rápida gelación y formación del gel húmedo. Este es el principio de los dos procedimientos efectuados. Sin embargo, en el gel preparado en la primera metodología cuando el “sol” se coloca en las placas, se forma un “gel mojado” y al cabo de 24 horas de envejecimiento (el contraerse) del gel, los componentes líquidos se evaporan, la red tridimensional progresa y el gel se transforma en un xerogel, es decir, un cristal claro, frágil y poroso de silicato, con grietas visibles. Además, no se adhiere al plástico sino que queda como una pastilla fácilmente extraíble de la placa (Figura 26). Por esta razón, y ya que el fin de la investigación es generar un gel que encapsule la enzima, esta metodología no fue adecuada para realizar medidas.



Figura 26. Placa ELISA con el sol-gel obtenido en la primera metodología.

Con la segunda metodología inicialmente se trabajo sin tapar la solución. Después de las tres horas de agitación, se obtuvo una solución madre de sol-gel, transparente y de pH 5.0, al cual se le adicionó la enzima y el pH de la solución resultante fue de 6. En este caso, al igual que en el primero, al cabo de 24 horas se obtenía un material vidrioso y agrietado. Sin embargo, se realizó una prueba tapando la solución mientras se agitaba y tapando la placa una vez que se le añade el gel, esto con el fin de prevenir que el gel formado se agriete por una rápida evaporación del solvente. De esta manera, se obtuvo un material ópticamente transparente con superficie no visiblemente craqueada, que se mantiene así por varios días y además se adhiere al plástico de la placa (Figura 27). Esto puede atribuirse a que en el proceso de secado y envejecimiento parte del etanol generado en la reacción de hidrólisis no se pierde por evaporación, sino que queda ocluido en la red de silicio que se forma, evitando que el material tenga una consistencia vidriosa y permitiendo que se mantenga como un gel húmedo durante más tiempo.

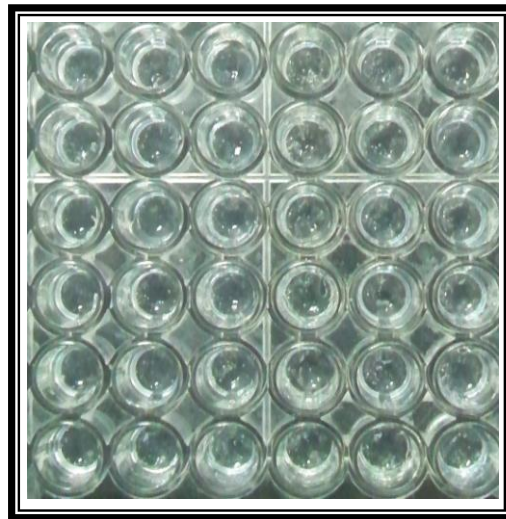


Figura 27. Placa ELISA con el sol-gel obtenido en la segunda metodología.

7.1.1.2.- Estudio del efecto del tamaño del área de observación y de la reproducibilidad en matriz sólida.

Con el último gel preparado se realizaron medidas para ver si la enzima ocluida en el mismo logra mantener su actividad catalítica y evaluar así la reproducibilidad. En la figura 28, se muestra la gráfica de intensidad en función del tiempo, y una ampliación de esta en los primeros 4 Seg. de la reacción, obtenida para la primera réplica con un diámetro de 7 píxel. En ella podemos ver que la reacción quimioluminiscente alcanza un máximo de intensidad (~0,5 Seg.) y luego decae exponencialmente durante un período de aproximadamente 20 segundos. Las gráficas tanto para la segunda réplica como para los diferentes diámetros empleados son muy similares a estas.

En las tablas 8 y 9, se muestran los valores de intensidad de QL obtenidos para las dos replicas realizadas, procesadas variando el tiempo de adquisición y el diámetro de observación de la señal. Las magnitudes del factor de reducción del diámetro empleadas fueron 7, 9 y 11, ya que valores altos de la variable diámetro, es decir, área de observación pequeña permite limitar los problemas que puedan presentarse al incluir

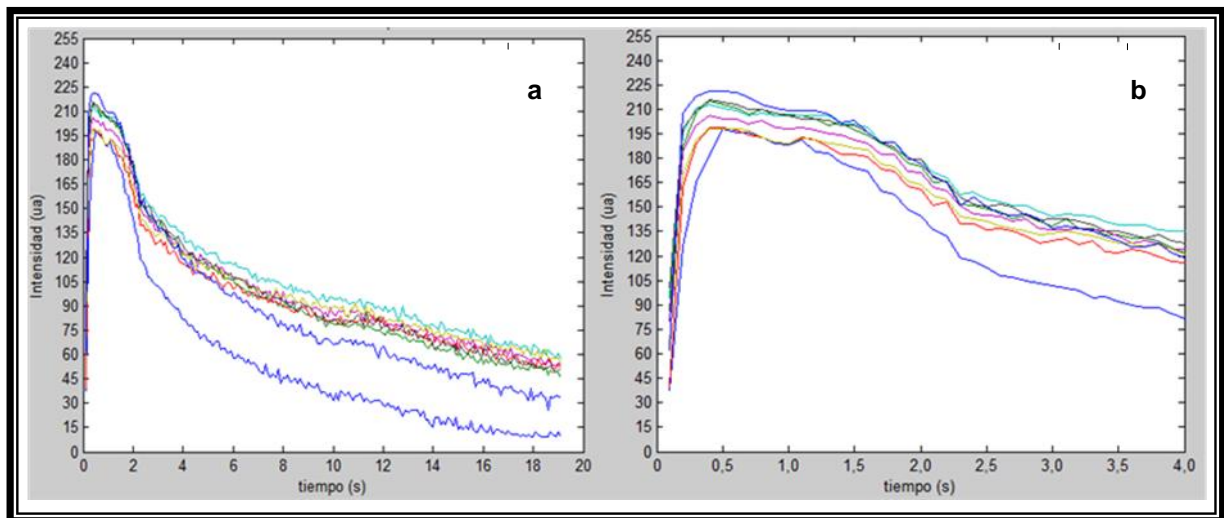


Figura 28. Reproducibilidad con una solución de 1250 ppm de glucosa.

a) Gráfico de intensidad en función del tiempo. b) Ampliación entre 0 y 4 Seg.

zonas de poca o baja señal (por ejemplo, las paredes de los pozos) y tomar diámetros pequeños ubicados en el centro de la imagen simula una superficie plana lo que minimiza el efecto de borde.

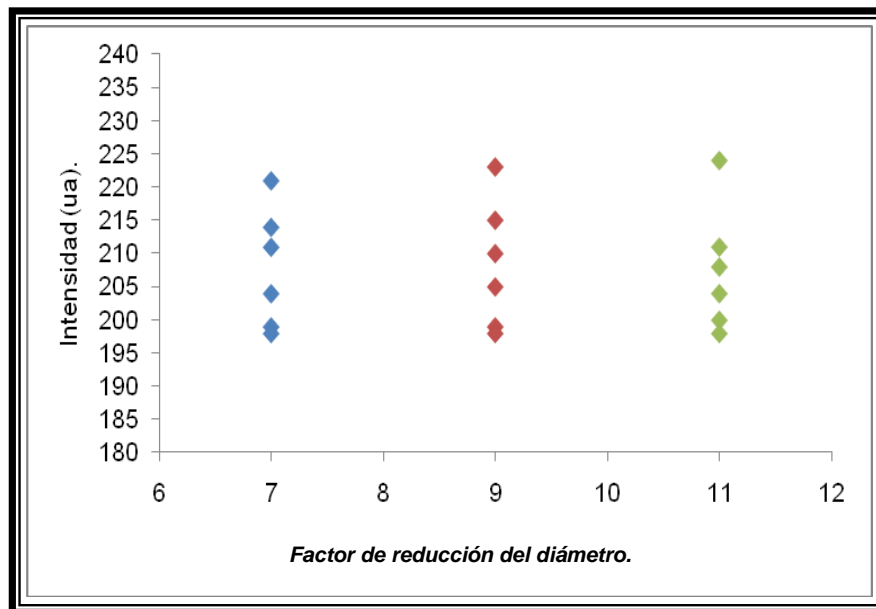
Con estos resultados se procedió a graficar, para cada réplica, el valor de intensidad en función del factor de reducción del diámetro, para un mismo tiempo. La figura 29 muestra la gráfica obtenida para la primera réplica empleando los valores a los 0,5 seg. Este diagrama de puntos y los valores de coeficiente de varianza mostrados en las tablas 8 y 9, sugieren que existe poca diferencia entre las señales obtenidas con un mismo diámetro en cada tiempo, es decir, que no existe mucha dispersión entre los datos. Sin embargo, esta se incrementa ligeramente a mayores valores del diámetro. Además, el diagrama sugiere que no hay diferencias entre los resultados obtenidos con los diferentes diámetros. Sin embargo, se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un factor, para evaluar si las diferencias entre las medias con diferentes diámetros son significativas. Para ello, se tomaron los valores de cada video en un mismo tiempo y con diámetros diferentes y se introdujeron en un programa llamado Statgraphics, el cual realiza los cálculos necesarios para esta prueba. Los resultados de

Tabla 9. Datos de reproducibilidad en matriz sólida con solución de 1250 ppm de Glucosa. Replica 1.

Factor de reducción del diámetro.	Tiempo (seg.)				Factor de reducción del diámetro.	Tiempo (seg.)				Factor de reducción del diámetro.	Tiempo (seg.)			
	0,5	del diámetro.	3,0	del diámetro.		0,5	1,5	3,0	4,0		0,5	1,5	3,0	4,0
7	213	197	138	122	9	213	197	138	121	11	214	198	137	121
	199	182	129	116		199	181	128	117		200	182	128	118
	211	201	144	125		210	199	143	135		208	201	144	136
	204	191	136	124		205	191	138	125		204	191	138	126
	198	186	134	121		198	187	134	121		198	187	134	122
	214	200	143	128		215	199	143	130		211	201	143	130
	221	203	137	119		223	204	138	120		224	204	137	121
	CV (%)	4,08	4,16	3,75		3,26		4,31	4,13		3,80	5,10		4,29

Tabla 10. Datos de reproducibilidad en matriz sólida con solución de 1250 ppm de Glucosa. Replica 2.

Factor de reducción del diámetro.	Tiempo (seg.)				Factor de reducción del diámetro.	Tiempo (seg.)				Factor de reducción del diámetro.	Tiempo (seg.)			
	0,5	1,5	3,0	4,0		0,5	1,5	3,0	4,0		0,5	1,5	3,0	4,0
7	233	202	158	131	9	233	202	157	129	11	232	202	158	129
	212	176	132	112		211	175	132	111		211	175	133	112
	220	201	160	135		219	199	159	133		220	201	159	134
	217	207	161	137		219	207	161	136		215	209	162	137
	225	210	166	142		226	211	166	143		226	209	166	144
	229	206	161	142		225	205	162	142		224	207	162	142
	232	203	157	159		233	205	158	160		231	207	160	161
CV (%)	3,55	5,65	7,13	10,33		3,58	5,93	7,15	10,98		3,53	6,00	6,98	10,94

**Figura 29.** Diagrama de puntos de los resultados de la tabla 8 a los 0,5 Seg. con cada diámetro.

este análisis para la réplica 1, en un tiempo de 0,5 Seg. son mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados del análisis ANOVA para la réplica 1.

Fuente	Suma de cuadrados.	gl	Media cuadrada	F	F crítico (P=0,05).
Entre grupos	1,2381	2	0,6190		
Dentro de grupos.	1399, 43	18	77,746	0,01	3,555
Total	1400,67	20			

En estos resultados podemos observar que el valor calculado de F que arroja el programa es menor que el valor crítico de F, usando un contraste de una cola. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y podemos decir que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias, con un nivel de confianza del 95%, usando diferentes diámetros de área de observación, es decir, las diferencias observadas para las señales de quimioluminiscencia a distintos valores del factor de reducción del diámetro, son atribuibles a errores aleatorios.

Los resultados obtenidos en los diferentes tiempos y en cada réplica fueron similares a este y por lo tanto, se demuestra que la configuración que se propone con la matriz sólida de sol-gel como soporte de la enzima presenta una respuesta adecuada sin importar los parámetros empleados, aunque a los 0,5 segundos y con un factor de reducción del diámetro de 7, la respuesta es más reproducible.

7.1.1.3.- Calibración en matriz sólida.

Dado que se apreció una reproducibilidad aceptable, considerando la simplicidad del sistema, se intentó elaborar una curva de calibración. La figura 30 muestra la gráfica de intensidad en función del tiempo obtenida empleando un diámetro de 7 pixel. En esta podemos observar que no parece haber diferencias significativas entre las curvas

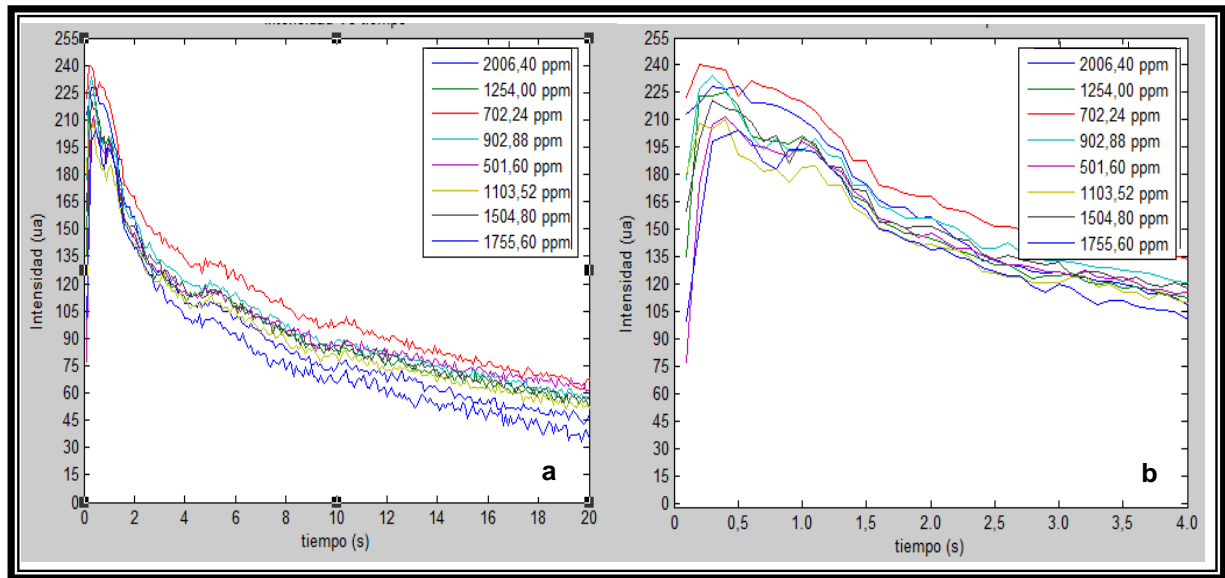


Figura 30. Calibración. a) Gráfico de intensidad en función del tiempo. b) Ampliación entre 0 y 4 Seg.

elaboradas con diferentes concentraciones de glucosa. Sin embargo, se graficó la curva de calibración, tomando los valores de intensidad a los 0,5 Seg., y esta es mostrada en la figura 31. En ella se puede observar que no hay una tendencia de incremento de señal en función de la concentración sino una tendencia a generar la misma señal independientemente de la concentración y lo mismo ocurre al graficar en tiempos superiores a 0,5 Seg. Este hecho se puede deber a que en los procesos enzimáticos la enzima debe ser siempre el reactivo en exceso de manera de completar la reacción con el analito de interés, pero en este caso la reacción está ocurriendo únicamente con la enzima que se encuentra en la superficie del sol-gel, en donde se encuentra una cantidad relativamente constante de la misma y dado que la solución patrón permea a través de los micro-poros del gel a una velocidad muy lenta, la enzima de la superficie se convierte en el reactivo límite de la reacción generando siempre la misma cantidad de peróxido de hidrógeno y obteniendo así una curva constante al graficar la intensidad en función de las diferentes concentraciones.

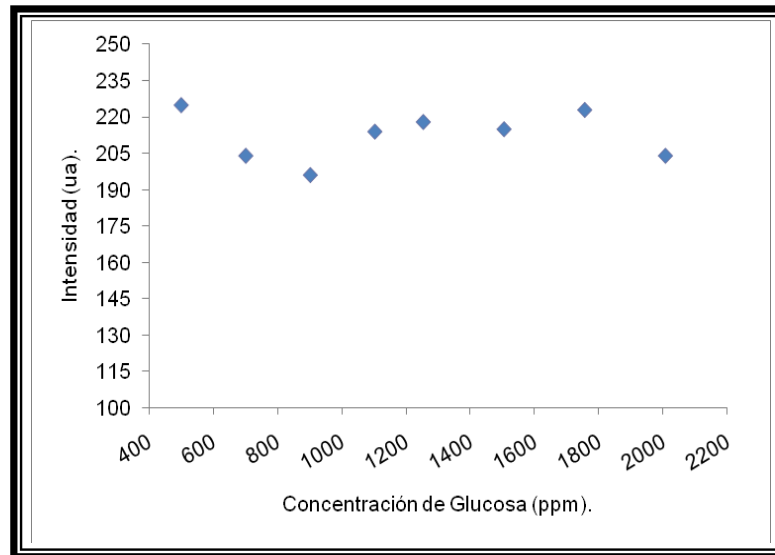


Figura 31. Curva de Calibración usando matriz sólida.

Por esta razón, se realizó nuevamente la calibración, pero esta vez empleando soluciones más diluidas, de 25 a 1000 ppm. La idea es que al disminuir la concentración de los patrones se puede saber cuál es la concentración de glucosa que satura la superficie del sol-gel dopada con la enzima. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron bastante similares a los anteriores. Por lo tanto, se tendría que continuar disminuyendo la concentración ya a niveles de ppb y esto es un compromiso con el sistema de detección ya que a bajas concentraciones puede ocurrir que el detector no tenga la sensibilidad adecuada para diferenciar las concentraciones o no logre detectar la señal emitida. Esto hizo que se descartara la inmovilización de la enzima en el sol-gel y se procediera a trabajar directamente en solución.

Por lo tanto, podemos decir que debido a los problemas de difusión de los reactivos a través de los micro-poros del gel no es posible emplear este en el biosensor que se desea diseñar aunque, en este se logre inmovilizar la enzima y esta no pierda su actividad catalítica.

7.1.2.- Análisis en solución.

7.1.2.1.- Estudio del efecto del tamaño del área de observación y de la reproducibilidad en solución.

Para el estudio en solución se evaluaron al igual que en matriz sólida, los parámetros de reproducibilidad y diámetro del área de observación con la finalidad de ver si estando ahora la enzima en solución sigue la misma tendencia del sistema que en el caso en el que se empleaba la enzima inmovilizada. Fueron realizadas dos réplicas y la figura 32 muestra la curva de intensidad en función del tiempo y una ampliación de los primeros 4 segundos, para la primera de ellas.

Las tablas 11 y 12 muestran los resultados obtenidos procesando estas réplicas empleando los diferentes diámetros de observación y tres valores de tiempo, en cada uno de los cuales es restada la emisión producida por el blanco. Para cada uno de estas se realizó un ANOVA con la finalidad de estudiar el efecto que tiene la variable diámetro sobre la media de la señal emitida. En la tabla 13 se muestran los resultados

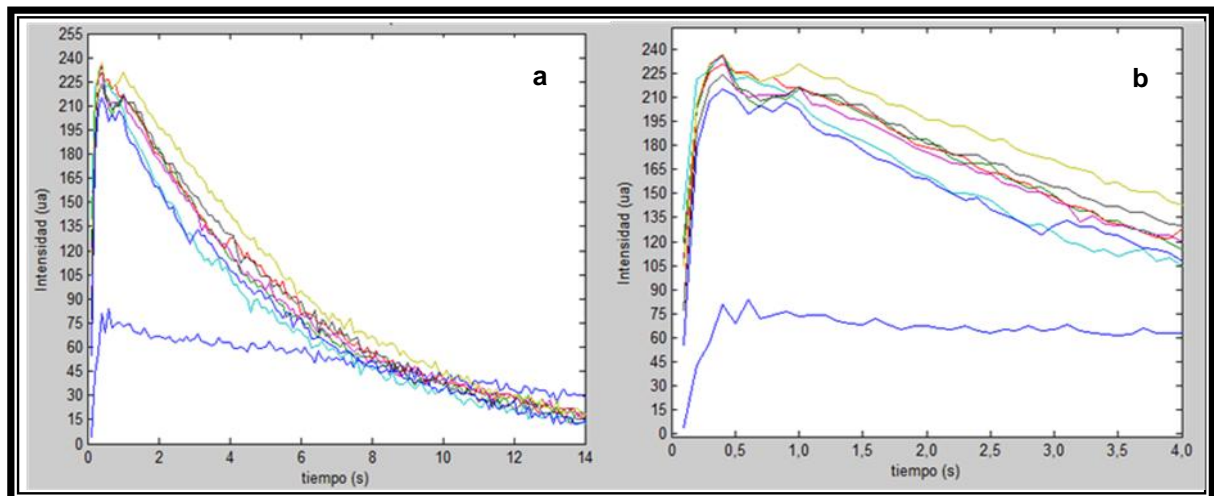


Figura 32. Reproducibilidad con una solución de 1250 ppm de glucosa.

a) Gráfico de intensidad en función del tiempo. b) Ampliación entre 0 y 4 Seg.

del ANOVA para la réplica 1 empleando el tiempo de 0,5 Seg. Sin embargo, en todos los casos la respuesta del sistema es similar y dado que el valor experimental de F es menor que el valor crítico, no hay diferencias significativas, es decir, no depende del tamaño del área de observación. Pudiendo ser atribuibles las diferencias observadas, a errores aleatorios.

Tabla 12. Datos de reproducibilidad con solución de 1250 ppm de Glucosa. Replica 1.

Factor de reducción. del diámetro.	Tiempo (seg.).			Factor de reducción. del diámetro.	Tiempo (seg.).			Factor de reducción. del diámetro.	Tiempo (seg.).		
	0,5	del diámetro	2,0		0,5	1,2	2,0		0,5	1,2	2,0
7	114	76	44	9	116	74	46	11	115	75	46
	117	81	50		116	80	49		116	82	48
	91	50	26		94	49	24		94	50	23
	85	45	20		88	42	22		87	42	21
	78	46	16		77	43	12		81	44	13
	95	58	29		88	53	25		90	55	24
	121	79	47		113	67	43		117	77	44
CV (%)	17,01	25,87	41,39		16,13	26,28	45,12		15,47	27,72	42,77

Tabla 13. Datos de reproducibilidad con solución de 1250 ppm de Glucosa. Replica 2.

Factor de reducción. del diámetro.	Tiempo (seg.).			Factor de reducción. del diámetro.	Tiempo (seg.).			Factor de reducción. del diámetro.	Tiempo (seg.).		
	0,5	1,2	2,0		0,5	1,2	2,0		0,5	1,2	2,0
7	113	61	41	9	115	66	42	11	116	63	42
	75	36	15		81	36	17		78	36	19
	88	46	20		89	46	19		92	46	20
	107	80	50		107	81	52		108	81	51
	94	62	38		94	63	37		95	64	39
	91	45	27		90	45	26		89	47	26
	80	54	25		80	55	24		81	58	27
CV (%)	15,35	26,34	40,54		13,88	27,24	41,89		14,61	26,30	37,93

Tabla 14. Resultados del análisis ANOVA para la réplica 1.

Fuente	Suma de cuadrados.	gl.	Media Cuadrada.	F.	F critico (P=0,05).
Entre grupos	5,4286	2	2,7143		
Dentro de grupos.	4465,71	18	248,1	0,01	3,555
Total	4471,14	20			

En cuanto a la reproducibilidad del sistema se puede ver que el CV aumenta considerablemente a medida que se aumenta el tiempo de la reacción en el cual se toman los datos, lo que indica que a los 0,5 seg. se obtiene una mayor reproducibilidad que en los otros tiempos y a diferencia de los resultados obtenidos en la matriz sólida, en este caso se observa que con el aumento del diámetro disminuye la dispersión de los datos.

Estos mismos videos fueron procesados con el segundo software, pero esta vez integrando las señales entre dos tiempos. Los resultados son mostrados en la tabla 14 y en esta se observa como el CV varía al tomar diferentes límites de integración. Encontrando que entre los tiempos de 0,1 a 1,0 Seg., para las dos réplicas realizadas,

Tabla 15. Datos de reproducibilidad con solución de 1250 ppm de Glucosa.

Procesados con el segundo software.

Tiempo (Seg).	Tiempo (Seg).			Tiempo (Seg).	Tiempo (Seg).		
	0,1 – 1,0	1,5 – 3,0	0,1 – 4,0		0,1 – 1,0	1,5 – 3,0	0,1 – 4,0
Réplica 1	14,88	11,53	38,87	Réplica 2	14,44	8,32	32,41
	16,13	12,92	42,96		12,01	5,61	24,42
	12,88	9,12	32,05		13,14	6,6	27,38
	12,39	8,42	30,18		15,69	10,93	37,95
	12,56	7,78	27,76		14,42	11,1	36,92
	13,78	10,08	34,68		14,12	9,14	32,94
	13,71	10,84	36,23		11,89	6,25	24,13
CV (%)	9,82	17,95	15,06	CV (%)	10,19	26,91	18,35

Todos los valores están multiplicados por 10^4 .

se encuentra el menor valor del CV (~10%), lo cual implica que es la condición de mayor reproducibilidad en el sistema para llevar a cabo la detección de la señal emitida.

Si realizamos ahora un diagrama de puntos con las dos réplicas y con las condiciones óptimas de cada software obtenemos las gráficas mostradas en la figura 33. Estas sugieren que la señal es más reproducible si tomamos la suma de todos los pixel e integramos la señal entre los tiempos 0,1 y 1,0 Seg. que si tomamos la altura en un tiempo específico. Esto también se puede ver en el CV ya que en el caso del primer software este es de aproximadamente 15% y disminuye en el segundo software aproximadamente al 10%. Esto se atribuye a que en el primer software la señal que se adquiere toma en cuenta tanto los pixeles con alta señal de emisión como los de baja señal, incluso hasta los que son cero. Por lo tanto, dependiendo de la homogeneidad de la solución, que es proporcional a la difusión de los reactivos en la misma, puede que en el tiempo seleccionado para tomar la señal, la media de un pozo se encuentre

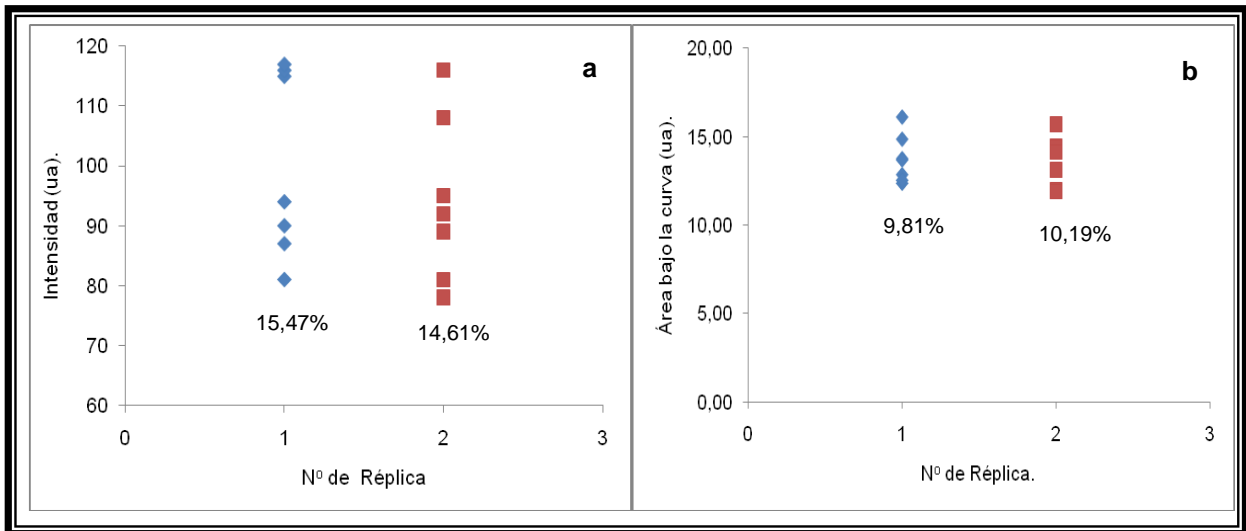


Figura 33. Diagrama de puntos para las réplicas con las condiciones de mayor reproducibilidad.

a) Con el software 1 y b) Con el software 2.

encuentre ubicada en una zona de baja intensidad, mientras que en los otros pozos esta relación puede variar de tal forma que ocurra el caso contrario.

Ahora bien, en el segundo software en el cual la señal es la suma de todos los pixeles ubicados en el área seleccionada, no encontramos estos problemas ya que los pixeles que no presentan intensidad, es decir, son cero, no afectan el valor final. Además, al tomar el área bajo la curva limitada por dos tiempos se contrarrestan las fluctuaciones observadas en la señal con el tiempo. Por esta razón, con este software se obtiene una mejor respuesta en cuanto a reproducibilidad que usando el primero.

Basados en esto, el segundo software con un tiempo de integración de 0,1-1,0 Seg. y realizando la reacción en medio acuoso fueron las condiciones óptimas utilizadas para determinar la concentración de glucosa.

7.1.2.2.- Calibración en solución.

Se procedió a construir una curva de calibración empleando los parámetros de mayor reproducibilidad, para estudiar el intervalo en el cual el sistema genera una señal lineal con la concentración. La figura 34 muestra la gráfica de intensidad en función del tiempo obtenida. La curva de calibración encontrada con el ajuste de mínimos cuadrados, empleando las condiciones óptimas y soluciones de glucosa en un intervalo de 500 a 2000 mg/L se muestra en la figura 31. En ella se puede observar claramente que en el intervalo de concentración utilizado, que corresponde al intervalo de referencia para análisis médicos de glucosa, existe una clara tendencia lineal con un coeficiente de correlación de 0,9457. De esta curva se realizaron tres réplicas en las cuales se obtienen resultados muy similares a este.

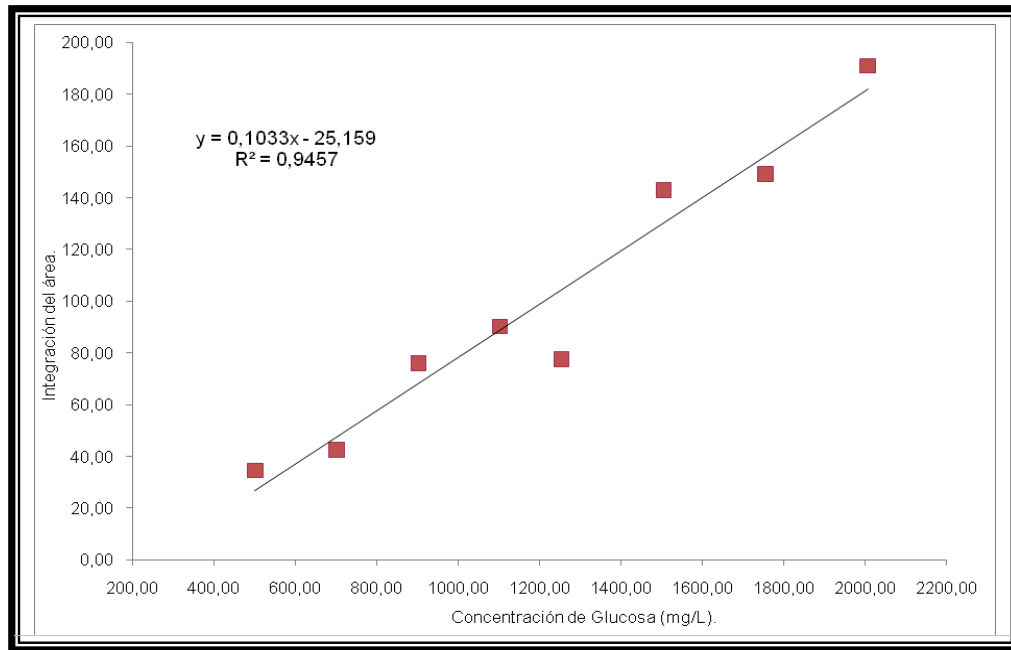


Figura 34. Curva de calibración de glucosa obtenida por el método quimioluminiscente usando el sistema propuesto.

7.2.- Aplicación y validación del sistema quimioluminiscente.

Como parte de la aplicación analítica se determinó la concentración de Glucosa en plasma sanguíneo de ratas. Para ello, las mediciones fueron realizadas tanto con el método de referencia como con el dispositivo propuesto.

En la figura 35 podemos ver, empleando el método de referencia, la curva de liberación de glucosa a la sangre obtenida, estimulada por la adrenalina que se le suministra al animal. Esta es una hormona secretada en situaciones de alerta por las glándulas suprarrenales, que se encarga de aumentar, a través de su acción en el hígado la concentración de glucosa en sangre. Esto se produce porque, al igual que el glucagón, la adrenalina moviliza las reservas de glucógeno hepático y, a diferencia del glucagón también las musculares. De este modo, el glucógeno, un polisacárido que

abunda en el hígado y en el músculo, se degrada nuevamente a glucosa, que queda disponible para el metabolismo energético. Este proceso es conocido con el nombre de glucogenólisis.

Podemos ver que la curva se inicia con una baja concentración del analito, que corresponde a la muestra sanguínea tomada antes de la inyección de adrenalina. Posteriormente, se observa un máximo en la concentración, originado por la acción de la adrenalina sobre el glucógeno. Finalmente se puede ver que disminuye porque como un mecanismo compensatorio de los niveles de glucosa, se estimula la producción de insulina que incrementa la entrada de glucosa a las células musculares y adiposas, lo que condiciona la disminución de glucosa en sangre luego de los 30 min.

En el método propuesto se obtuvo que la muestra emite una intensidad muy baja que la cámara CCD no logra detectar. Ahora bien, si consideramos los valores de concentración obtenidos por el método de referencia, estos están en el intervalo de 800

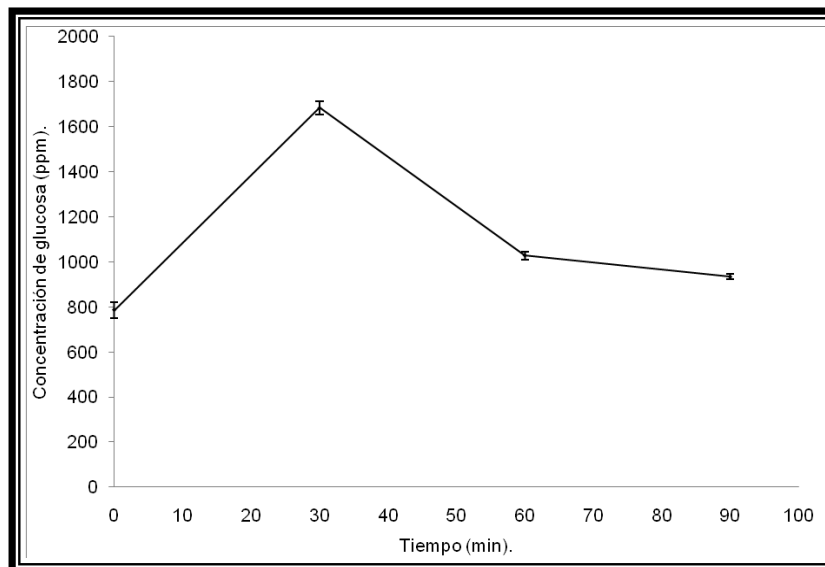


Figura 35. Curva de Liberación de Glucosa a la sangre estimulada por adrenalina. Los valores representan el promedio \pm S. de dos réplicas usando dos animales.

a 1800 mg/L, lo cual se corresponde con los valores usados en la curva de calibración que se realizó en conjunto con la medida de las muestra y que va de 500 a 2000 mg/L. Con estos patrones si se logró obtener una intensidad que es detectable por la CCD, lo cual indica que hay algún factor que está afectando a las muestras y no a los patrones.

La diferencia entre las muestras y los patrones es la matriz en la cual se encuentra cada uno. En el caso de los patrones estos son preparados en agua destilada y en el caso de la muestra sabemos que el suero o plasma sanguíneo está compuesto de 90% agua y 10% de otros componentes. Dentro de este 10% encontramos productos de desecho, proteínas plasmáticas y componentes inorgánicos. Dentro de estos existe la posibilidad que se encuentren metales que puedan estar actuando como catalizador de la reacción quimioluminiscente y generen la reacción antes de la adición de hierro. Además, otro posible causante de interferencias por la matriz de la muestra es que en el proceso de separación del plasma se hayan roto glóbulos rojos, liberando hemoglobina, que contiene hierro que cataliza la reacción. Por lo tanto, al adicionar el catalizador únicamente reacciona una pequeña parte que quizás quedo sin reaccionar previamente y por esta razón finalmente se genera una muy baja intensidad que no es la que se corresponde con la cantidad de glucosa presente en la muestra.

Esto se puede atribuir a este hecho, ya que en el trabajo realizado por Lee y colaboradores ^[43], en el cual determinan glucosa por el método quimioluminiscente en muestras de sangre humana con un sistema de inyección a flujo diseñado por ellos, añaden previo a la realización de la medida, una solución que contiene EDTA, un agente acomplejante de metales que en este caso sirve para enmascarar los metales contenidos en el suero. Este tratamiento impide entonces la reacción de los metales presentes en el plasma sanguíneo con el luminol. Por consiguiente, puede ser conveniente realizar a la muestra un tratamiento con un agente quelante, como el EDTA, para corroborar este hecho.

8.- Conclusiones.

- Se logró inmovilizar la enzima, glucosa oxidasa, en la matriz sólida de sol-gel, manteniendo esta su actividad catalítica. Sin embargo, problemas en la velocidad de difusión de los reactivos a través de los poros del gel impidieron realizar medidas sobre el mismo.
- Se llevaron a cabo análisis con la enzima en solución y para el procesamiento fueron diseñados y evaluados dos software en los cuales se encontró que la respuesta es más reproducible si se toma la señal emitida como la suma de todos los pixel ubicados en la región de interés y se integra el área bajo la curva limitada entre 0,1 y 1,0 Seg.
- Con la enzima en solución y las condiciones óptimas tanto para el sistema desarrollado como para el procesamiento de la data se encontró una respuesta lineal en un intervalo de 500 a 2000 mg/L con un coeficiente de correlación de 0,9457.
- Se desarrollo un sistema quimioluminiscente que emplea una cámara CCD como detector y un software de fácil manejo, que puede ser empleado en análisis clínicos ya que provee una solución de bajo costo y no requiere de personal especializado para su uso.
- El sistema fue aplicado en la determinación de glucosa en plasma sanguíneo encontrando que interferencias producidas por la matriz de la muestra impiden obtener resultados óptimos y por ende no se logro validar el método propuesto.

9.- Recomendaciones.

- Utilizar celdas ELISA de color blanco ya que estas son ideales para análisis luminiscentes porque en las placas negras puede existir una disminución significativa de la señal por absorción de la luz. Sin embargo, dado que todos los pozos se ven afectados en forma proporcional, independientemente de la intensidad, la cuantificación no está comprometida al emplear celdas negras. Sin embargo, es posible aumentar la señal con el uso de las placas blancas.

- Utilizar una micropipeta de 96 puntas que permita realizar simultáneamente la calibración y un mayor número de muestras, de modo de ahorrar tiempo en los análisis y asegurar que tanto la calibración como las muestras son tomadas bajo las mismas condiciones de trabajo.

- Adaptar el software generado en Matlab, para que este realice las curvas de calibración y determine los parámetros de coeficiente de correlación, errores de la pendiente, punto de corte y el error de la estimación. De esta manera, se evita transferir los datos a Excel y se disminuye el tiempo empleado en el procesamiento de la data.

- Realizar medidas con plasma sanguíneo empleando EDTA para acomplejar a los metales presentes y de esta forma asegurar que la reacción se dé con el hierro que se añade y no antes.

10.- Bibliografía.

- [1] Fuentes A.X, Lacambra C.M, Compañó Q.M., “Bioquímica Clínica y Patología Molecular”. Editorial Reverté. Segunda Edición, Volumen II.
- [2] Cristopher K., Van Holde E., “Enciclopedia Microsoft® Encarta®”, BIOQUIMICA 2^{da}. Edición, Mc Graw-Hill, 1998.
- [3] Lozano J.A., “Bioquímica para ciencias de la salud”. Segunda Edición, España, Editorial McGraw-Hill, 1996
- [4] Blum, Stuart J. “Introduction to organic acid to biological chemistry”. The Macmillan Company, Collier-Mcmillan limited, London, Pages 383 y 384..
- [5] Skoog A.D., “Química analítica” Editorial McGraw-Hill. Séptima edición. México, 2001. Página 577.
- [6] Lawrence A. Kaplan, “Química clínica métodos”. Editorial médica panamericana. Páginas 121-129.
- [7] Blum, Stuart J., “Introduction to organic acid to biological chemistry”. The Macmillan Company. Collier-Mcmillan Limited, London. Pages 265.
- [8] Lawrence A. Kaplan, “Química clínica métodos”. Editorial médica panamericana. Páginas 1164-1184.
- [9] Lawrence A. Kaplan, “Química clínica métodos”. Editorial médica panamericana. Páginas 46-53.
- [10] Held P., Buehrer L., “The Synergy™ HT A Unique Multi-Detection Microplate Reader for HTS and Drug Discovery. Bio–Tek Instruments.

- [11] Anthony K. Campbell. "Living Light: Chemiluminescence in the research and clinical laboratory" Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1986, pages 104-108.
- [12] Fuentes A., Castiñeiras M.J., Queralto J.M., "Bioquímica clínica y patología molecular". Editorial Reverté, Segunda Edición, Volumen I, Capítulo 16, Página 241.
- [13] C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune, "Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review." *Talanta* 51 (2000): pages 415-439.
- [14] Skoog, Douglas. Holler, James. Nieman, Timothy. "Principios de análisis instrumental". Quinta edición, Madrid-España, Editorial Mc Graw Hill, 2001, Capítulo 15, Pág. 381 y 382.
- [15] Gámiz L., Garcia A., Soto J., Huertas J., Gonzalez A.; "Analysis of pesticides by cheiluminescence detection in the liquid phase"; *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 24, N^o 11, 2005, pages 927-942.
- [16] García A., Baeyens WRG., Zhang X., Alés F., Gámiz L.; "Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo"; *Ars. Pharmaceutica*, 42:1, pages 81-107; 2001.
- [17] Blum and Marquette. "Chemiluminescence-based sensors" *Optical Chemical Sensors*, Netherlands, 2006. Pages 157-178.
- [18] Roda A., Michelini E. and Mirasoli M., "Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence". *Trend in biotechnology*, Vol. 22, No. 6, 2004.
- [19] Jin-Ming L., Xiaoquan S., Hanoaka S., Yamada M., "Luminol Chemiluminescence in unbuffered solutions with a Cobalt(II)-Ethanolamine Complex Immobilized on Resin as Catalyst and its application to analysis". *Anal. Chem.* 2001, 73, 5043-5051.

[20] Ferreira C. Ernesto e Vitorino A. Rossi. "A Quimioluminescência como ferramenta analítica: Do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise". *Quim. Nova*, Vol 25, No 6, 1003-10011, 2002.

[21] Barni F., Lewis S., Berti A., Miskelly G., Lago G. "Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection". *Talanta* 72 (2007), pages 896-913.

[22] Lakowicz R. Joseph. "Principles of Fluorescence Spectroscopy". Springer, Third edition, 2006.

[23] Filippini D., Svenso S., Lundstrom I., "Microplate based biosensing with a computer screen aided technique". *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2005), pages 35-41.

[24] Maleki N., Safavi A., Sedaghatpour F., "Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera". *Talanta* 64 (2004), pages 830-835.

[25] D. Filippini, G. Comina, I. Lundstron. "Computer screen photo – assisted reflectance fingerprinting". *Elsevier* 107, 580 – 586, (2005).

[26] D. Filippini, P. Asberg, P. Nilsson, O. Inganas, I. Lundstron. *Sensors and Actuators B*. "Computer screen photo-assisted detection of complementary DNA strands using luminescent zwitterionic polythiophene derivative" 113, 410-418 (2006).

[27] A. Alimelli, D. Filippini, R. Paolesse, S. Moretti, G. Ciolfi, A. D'Amico, I. Lundstrom, C. Di Natale. "Direct quantitative evaluation of complex substances using computer screen

photo-assisted technology: the case of red wine”. *Analytica Chimica Acta* 597,103-112 (2007).

[28] J. Castillo, H. Gutiérrez, Y. Vitta, M. Martínez y A. Fernández. “Development and testing of multi – well plates absorbance reader for clinical analysis using inexpensive web cam”. Laboratorio de Espectroscopia Laser, Escuela de Química Facultad de Ciencias. Caracas – Venezuela, 2007.

[29] M. Pérez, S. Rivas. “Software para el cálculo de la concentración en soluciones acuosas coloridas”. Universidad Central de Venezuela. Escuela de computación. 2008.

[30] Briceño A., Castillo J., Fernández A., González F. y Vitta Y. “Aplicaciones de un analizador colorimétrico de placas de ELISA basado en detección con Webcam a la determinación de glucosa en plasma sanguíneo”, *Bistua: Revista de la facultad de Ciencias básicas*, Vol. 7, Núm. 1, 2009, pp. 1-7, Universidad de Pamplona, Colombia.

[31] Kubota T.L., Alfaya A.S, “A utilização de materiais obtidos pelo proceso de sol-gel na construção de biossensores”. *Química Nova*, Vol. 25, No 5, 835-841, 2002.

[32] Filho F. Orlando e Capelato D. Milton. “Biossensores”. *Química Nova* 15(1), 1992.

[33] Podbielska H., Ulatowska-Jarza A., Muller G., Hans J., “Sol-Gels for Optical Sensors”. *Optical Chemical Sensors*, 353-385 (2006).

[34] Yuming H., Zhang C., Zhang Z. “Chemiluminescence flow biosensor system for Cholesterol with immobilized reagents” *Analytical Science*, Vol. 15, 1999, Page 867-870.

- [35] Hanoaka S., Lin J., Shan X. and Yamada M., "Luminol Chemiluminescence in Unbuffered solutions with a Cobalt(II)-Ethanolamine Complex immobilized on resin as catalyst and its applications to Analysis" *Anal. Chem.* 2001, 73, pages 5043-5051.
- [36] Liu X., Niu W., Li H., Shuang H., "Glucose biosensor on gold nanoparticle-catalyzed luminol electrochemiluminescence on a three dimensional sol-gel network". *Electrochemistry Communications* 10 (2008) 1250-1253.
- [37] Zhang Z., Li B., Lan D., "Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase" *Biosensor and Bioelectronics* 24 (2008) 934-938.
- [38] Wenqing Cao and Yixiang Duan, "Optical fiber evanescent wave sensor for oxygen deficiency detection", *sensor and actuators B: Chemical*, Volume 119, issue 2, pages 363-369 (2006).
- [39] Kumaran Ramanathan, N. Deepak Kumar, B. D. Malhotra, M. N. Kamalasanan, and Subhas Chandra. "Glucose Biosensor Based on a Sol-gel-Derived". *Anal. Chem.* 1994, 66, pages 3139-3144.
- [40] González F., Noma M., Peña C. y Tillett S. "Efectos del extracto acuoso de hojas de bauhinia megalandra sobre la glucogenólisis hepática en ratas". *Volumen 27, N0 2*, 2008, página 129
- [41] A.S. Keston. *Abstr.*, 129th Meeting Amer. Chemistry. Soc. P.31, 1956.
- [42] P. Trinder. *Ann. Clin. Biochemistry*, pages 6-24, 1969.
- [43] Shang L. and Choi S. "Determination of glucose in whole blood by chemiluminescence method". *J. of the Korean Chemical Soc.*, 2001, Vol. 45, N_o 3.

Anexos.

Tabla 1. Métodos para el análisis de glucosa [21].

Método	Tipo de análisis	Principio	Usos	Comentarios
<i>Reducción de cobre</i>				
1. Fosfomolibdato (Folin-Wu)	Cuantitativo	$\text{Cu}^{+2} + \text{Glucosa} \xrightarrow[\text{OH}^-]{\text{Calor}} \text{Cu}_2\text{O} \text{ (coloreado)}$	Reacciones 1 y 2 poco usadas; interés histórico	Gran tendencia positiva debido a interferencias químicas por otros azúcares, creatinina, ácido ascórbico y otros compuestos.
2. Arsenomolibdato (Somogyi-Nelson)	Cuantitativo	$\text{C}^+ + \text{Molibdato (Mo}^{2+}\text{) complejos de molibdeno azules}$		
<i>Otra reducción</i>				
3. Ferricianuro alcalino	Cuantitativo	$\text{Fe(CN)}_6^{3-} \xrightarrow[\text{Glucosa}]{\text{Calor. OH}^-} \text{Fe(CN)}_6^{4-}$ <p>(Ferricianuro amarillo) inoloro) (Ferricianuro)</p> <p>Disminuye la absorbancia a 420nm debido al consumo de ferricianuro.</p>	Poco usado, a veces se encuentra en los sistemas technicon; de interés histórico.	1 mg de creatinina = 1 mg de glucosa; 0,5 mg de ácido úrico = 1 mg de glucosa; muy poca especificidad.
<i>Enzimático</i>				
4. Hexoquinasa (HK)	Cuantitativo espectrofotométrico, C o PF.	$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightleftharpoons[\text{G6DP}]{\text{HK}} \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$ $\text{Glucosa-6-fosfato} + \text{NADP} \longrightarrow \text{6-Fosfogluconato} + \text{NADPH} + \text{H}^+$ <p>Aumenta la absorbancia a 340nm en relación con la concentración de Glucosa.</p>	Suero, LCR, orina; automatizado el método más usado.	Ha sido propuesto como base para método de referencia; muy buena exactitud y precisión.
5. Glucosa oxidasa, (GOD) reacción acoplada ("trinder")	Cuantitativo, usa varios tipos de colorantes como aceptor final; C o PF.	$\text{Glucosa} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{ácido glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Colorante reducido} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}/\text{PO}} \text{colorante oxidado (coloreado)}$	Suero, orina, LCR; adaptado fácil y usualmente al análisis automatizado.	Segunda reacción indicadora susceptible de interferencias positivas falsas por diversos compuestos; buena exactitud y precisión.
6. Glucosa oxidasa (GO); Consumo de O ₂	Cuantitativa; medición polarográfica con electrodos de O ₂ ; C	$\text{Glucosa} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{ácido glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ <p>H₂O₂ es consumido en reacciones secundarias. El consumo de O₂ se mide por polarigrafía con electrodo de O₂.</p>	Suero; LCR; semiautomatizado y automatizado.	Se correlaciona bien con el método de referencia; buena exactitud y precisión.

PF, Modo de análisis por punto final; GO, glucosa oxidasa; C, análisis cinético.

Tabla 3. Métodos para análisis de colesterol ^[25].

Método	Clasificación	Preparación	Uso	Comentarios
1. Libermann-Burchard (L-B)	De una, dos, tres o cuatro etapas. Cuantitativo	Extracción del colesterol que se hace reaccionar con un ácido fuerte (sulfúrico) y anhídrido acético formando ácido colestahehexan-sulfónico coloreado (Amáx, 410nm); El colesterol no esterificado es precipitado con digitonina y se mide el restante; El colesterol libre se calcula: Total - Esterificado = Libre	Muy común	La reacción de colesterol total sobreestima la concentración de colesterol esterificado. Color inestable.
2. Abell y col.	Tres etapas	Extracción de colesterol con zeolita, hidrólisis química de los esterres (saponificación) y medición del colesterol total por la reacción de Libermann-Burchard.	Considerado el método de referencia actualmente.	Laborioso
3. Sal de hierro-ácido	Dos etapas	Condiciones de reacción similares al método 2 Excepto que se agregan iones Fe+3 para obtener un catión tetraenílico (Amáx, 563nm)	No muy usado	Sensibilidad 7 veces mayor que la del método L-B. El colesterol libre y el esterificado dan el mismo color, Se requiere la hidrólisis de los esterres.
4. Ácido p-toluensulfónico (p-TSA)	Tres etapas	Similar al método 3, p-TSA reacciona con el derivado del colesterol formando un cromóforo (Amáx, 550nm)	Muy poco usado	El colesterol libre y el esterificado dan el mismo color. La bilirrubina causa un gran error positivo.
5. Enzimático de punto final.	Una etapa	<p style="text-align: center;">Colesterol estereasa.</p> <p>a. Esteres del colesterol \longrightarrow Colesterol + ácidos grasos</p> <p style="text-align: center;">Colesterol oxidasa</p> <p>b. * Colesterol + O₂ \longrightarrow Colest-4-en-ona + H₂O₂</p> <p style="text-align: center;">Peroxidasa.</p> <p>c. H₂O₂ + Aminofenazona \longrightarrow Colorante oxidado + H₂O₂ (u otro colorante) Coloreado (Amáx, 500nm)</p>	Muy usado	Exacto y fácilmente automatizado. Futuro método de referencia.

* Se puede medir la reacción siguiendo el consumo de O₂ con un electrodo de oxígeno.

Tabla 5. Métodos para análisis de ácido úrico ^[27].

Método	Tipo de análisis	Preparación	Uso	Comentarios	
1. Ácido fosfotúngstico	Espectrofotométrico	Oxidación de ácido úrico a alantoína y CO ₂ , reducción de ácido fosfotúngstico a azul de tungsteno (Amáx, 700nm)	Suero, orina	Inespecífico, pero ampliamente usado.	
2. Uricasa	Enzimático	Oxidación de ácido úrico a alantoína, CO ₂ y H ₂ O ₂	Suero, orina		
	a. Absorción diferencial	Ácido úrico absorbe a 290 a 293nm (a pH ≥ 7) y 283nm (pH < 7) del ultravioleta, pero no la alantoína.			Base para método de referencia propuesto, mayor especificidad.
	b. Colorimétrico	Cuantificación de H ₂ O ₂ producido, especialmente cuando se acopla a una reacción indicadora NAD/NADH.			Especificidad variable de uno a otro método; reacción de NADH ampliamente usada.
	c. Polarográfico	Velocidad de consumo de oxígeno			Poco usado; algunas interferencias.
	d. Coulométrico	Titulación con yodo		Instrumental, no fácilmente disponible.	
3. Cromatografía líquida de alta presión.	Cromatográfico	Cromatografía de fase inversa	Suero, orina	Mayor especificidad y sensibilidad.	
	a. Espectrofotométrico				
	b. Electroquímico.	Separación por intercambio iónico	Suero, orina	Propuesto como método de elección.	