



Tesina de Grado Licenciatura en Bioquímica

***Evaluación de Receptores de Progesterona
mediante el uso de Inmunosensores
Electroquímicos***

Natalia Gesto Giannattasio

Tutora: Dra. María Fernanda Cerdá

Prof. Adj. Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias.

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

2015

Resumen

En este trabajo se desarrolló un inmunosensor electroquímico capaz de detectar la presencia de receptores de progesterona, los cuales se presentan sobreexpresados en tejidos tumorales y por lo tanto pueden usarse como marcadores. Para obtener el biosensor se utilizó la estrategia de ensamblado *layer by layer* (LbL). Un electrodo de cobre se modificó con el tiol ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), seguidamente se agregó una capa del anticuerpo monoclonal anti-progesterona (anti-Pr) y una capa de progesterona (Pr), obteniendo de esta manera un electrodo Cu/TBA/anti-Pr/Pr. El inmunosensor fue probado en un extracto de tejido tumoral uterino. El seguimiento de las diferentes etapas del ensamblado se realizó por voltamperometría cíclica (VC).

Se elige como soporte el cobre por su bajo costo y excelentes propiedades conductoras y se utiliza la estrategia de inmovilización mediante la formación de monocapas de tioles autoensamblados (SAMs), debido a que es una estrategia eficaz para inmovilizar proteínas sobre metales. En este caso la monocapa del tiol utilizado, el TBA, mantiene las características conductoras del electrodo de cobre y además lo protege, minimizando tanto la oxidación como la disolución del metal.

Los receptores de hormonas son proteínas que reciben las señales hormonales que ordenan a las células multiplicarse, actuando como un interruptor que activa o desactiva una función particular en la célula. Es importante saber si las células cancerígenas presentan receptores de hormonas o no mediante el análisis de detección de dichos receptores, lo cual permite determinar si es probable que el cáncer responda a la hormonoterapia.

Finalmente, y debido a la posibilidad de formación de especies de Cu-TBA sobre la superficie del electrodo, se procedió a la síntesis de dicho complejo. La caracterización se realizó por espectroscopía visible y por espectroscopía infrarroja (FTIR), la cual indicó que la unión del TBA al Cu podría ser a través de los grupos OH del ligando, con una estequiometría de 2 átomos de Cu por cada molécula de TBA.

Agradecimientos

Agradezco muy especialmente a mi Tutora, la Dra. María Fernanda Cerdá, y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación ya que hicieron posible este trabajo. Una especial mención a mi amiga Lic. Laura Luzuriaga por la orientación y los consejos brindados. Al Dr. Gonzalo Obal del Instituto Pasteur de Montevideo y a los integrantes del Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Ciencias; Dr. Eduardo Méndez y Lic. Santiago Botasini.

Índice

<i>Resumen</i>	2
<i>Objetivo general</i>	6
<i>Objetivos específicos</i>	6
<i>Capítulo I. Introducción</i>	7
I.1- Sensor	7
I.2 -Biosensor	9
I.3 - Receptores Biológicos.....	12
I.4 -Fundamentos para Detección Electroquímica	16
I.4.1 - Transferencia electrónica directa de proteína	17
I.4.2 - Transductores Electroquímicos	18
I.5 - Métodos de Inmovilización.....	21
I.5.1 - Métodos de Inmovilización para Proteínas	21
I.5.2 - Métodos de Inmovilización para Anticuerpos.....	23
I.6 - Inmunoensayos.....	26
I.7 - Inmunosensores	29
I.7.1 - Inmunosensores Ópticos	30
I.7.2 - Inmunosensores Microgravimétricos	30
I.7.3 - Inmunosensores Electroquímicos.....	31
<i>Capítulo II. Técnicas</i>	34
II.1 - Voltamperometría Cíclica	36
II.2 - Espectroscopia Infrarroja.....	42
II.3 - Espectroscopia UV-Visible	45
<i>Capítulo III. Sistema de estudio</i>	47
III.1 - Materiales y métodos.....	50

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

<i>Capítulo IV. Resultados y discusión</i>	54
IV.1 - Voltamperometría cíclica	54
IV.2 - Espectroscopía infrarroja	64
IV.3 - Espectroscopía visible	72
<i>Capítulo V. Conclusión</i>	74
<i>Bibliografía</i>	75

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de un electrodo de cobre que contenga anticuerpos monoclonales anti-progesterona y progesterona, capaz de detectar la presencia de receptores para la misma en tejidos uterinos tumorales.

Objetivos específicos

1. Preparación de un electrodo Cu/TBA (TBA = ácido 2 tiobarbitúrico).
2. Obtención de un electrodo Cu/TBA/anti-Pr (Pr = progesterona).
3. Obtención de un electrodo Cu/TBA/anti-Pr/Pr.
4. Captación de receptores de progesterona en tejido tumoral uterino.
5. Síntesis y caracterización del complejo Cu-TBA.

Capítulo I. Introducción

El desarrollo de sensores químicos y biológicos es uno de los grandes objetivos en la investigación analítica. Los sensores son dispositivos pequeños que incorporan el reconocimiento de un elemento con un transductor de la señal, y pueden ser utilizados para la medición directa del analito en la matriz de la muestra. Entre ellos, los sensores electroquímicos representan una importante subclase de sensores químicos. Tienen una amplia gama de aplicaciones en el campo clínico, ambiental e industrial [1]. Utilizando este tipo de dispositivos es posible diagnosticar una enfermedad a través de la detección de biomarcadores conocidos en los fluidos corporales [2,3] como por ejemplo, anticuerpos generados en presencia de un determinado antígeno [4,5].

El uso de esta tecnología en la detección de marcadores tumorales ha sido reportado previamente. Los marcadores tumorales son sustancias que se detectan en la sangre, orina o tejidos corporales en cantidades superiores a lo normal en los sujetos con algunos tipos de cáncer y que pueden ser sintetizados por el mismo tumor, o puede ser una respuesta del organismo ante la presencia del cáncer. Un ejemplo es el caso del cáncer de útero hormono-dependiente; los receptores se encuentran presentes en cantidades más altas de lo normal o sobreexpresados en el tejido uterino, el ensayo empleado para determinar si un cáncer de útero es positivo a los receptores de progesterona presentes en útero facilita la elección del tratamiento [6,7].

Lo que se plantea en la presente propuesta es el desarrollo de un electrodo de cobre que contenga anticuerpos monoclonales anti-progesterona y progesterona, capaz de detectar la presencia de receptores para la misma en una muestra tejidos uterinos tumorales.

A continuación se desarrollan varios conceptos centrales en este estudio.

I.1- Sensor

Un sensor es un dispositivo que transforma la información física o química en una señal útil que pueda ser procesada y, por tanto, facilita información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos [8].

La clasificación de los sensores y biosensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios. Generalmente se clasifican según el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor usado [9].

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

De acuerdo al tipo de receptor presente, existen tres tipos de sensores [9]:

- *Físicos*: cuando no hay reacciones químicas involucradas en la detección. Un ejemplo son los materiales piezoeléctricos utilizados para detectar cambios de masa.
- *Químicos*: la señal proviene de una reacción química, por ejemplo agentes quelatantes, ionóforos, etc.
- *Biológicos*: cuando el material receptor tiene una procedencia biológica. Por ejemplo, enzimas, anticuerpos, ADN, células, etc. En este caso, los sensores químicos son denominados biosensores.

Los sensores químicos y biológicos constan de dos componentes básicos: un sistema de reconocimiento o receptor y un transductor, sobre el que se encuentra conectado el primero. El receptor reconoce selectivamente la información química o estructural presente en la muestra, y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor. Éste la transforma, a su vez, de una señal primaria a una señal secundaria fácilmente procesable, generalmente eléctrica u óptica. De acuerdo al tipo de señal generada, los sensores químicos y biológicos pueden clasificarse de la forma mostrada en la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación de sensores químicos y biosensores según el transductor utilizado.

<i>Tipos de transductores</i>	<i>Descripción</i>
Ópticos	Transforman los cambios producidos en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor.
Electroquímicos	La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo. Una subclase consiste en los sensores impedimétricos donde la señal es electroquímica, pero no necesariamente implica una reacción redox.
Piezoeléctricos	Dispositivos que transforman un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales con propiedades piezoelectrónicas.
Térmicos	Dispositivos capaces de medir cambio de calor sobre la superficie del electrodo.

1.2- Biosensor

Un biosensor es un dispositivo que contiene un componente biológico (como por ejemplo una enzima, una célula entera o un anticuerpo) y un componente electrónico. Este dispositivo genera una señal medible (en general, eléctrica) cuando se produce la unión entre el componente biológico y su blanco [10,11].

El desarrollo de biosensores químicos y biológicos, es actualmente una de las áreas más activas de la investigación analítica. Tales dispositivos se pueden utilizar para la medición directa del analito en la matriz de la muestra. Como se dijo anteriormente, existe una gran variedad de combinaciones de elementos de reconocimiento y transductores de señales [1,12-14], la siguiente figura muestra el esquema genérico de un biosensor.

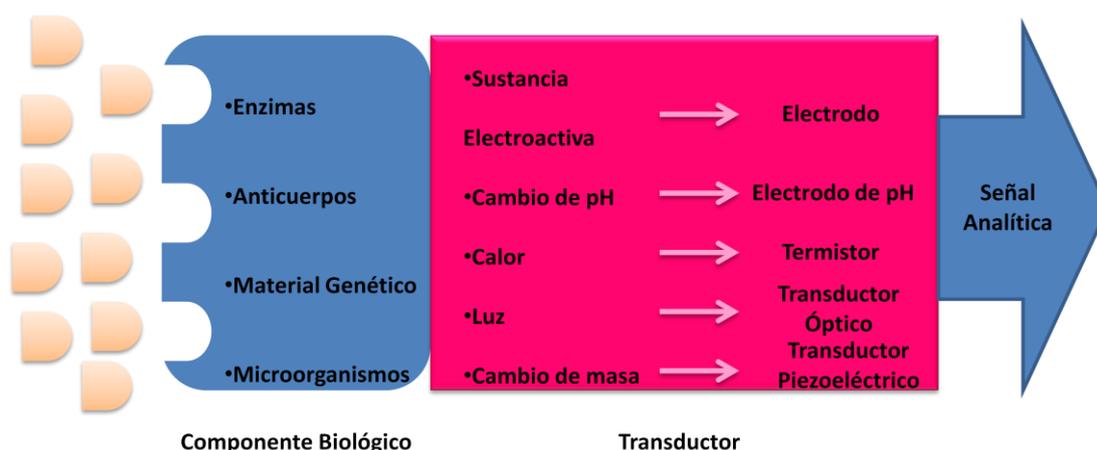


Figura I.2.1. Esquema genérico de un biosensor [14].

A continuación se citarán algunos ejemplos de diferentes sensores y biosensores:

- **Sensores de óxido nítrico (NO)**

El óxido nítrico (NO) es un radical libre hidrofóbico muy lábil, que se produce por catálisis biológica en los sistemas de reducción de L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) para formar L-citrulina. Está relacionado con el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) producido y liberado por el endotelio para promover relajación del músculo liso en el endotelio. También se lo relaciona con procesos como la vasodilatación, los mensajes moleculares, inhibición de la agregación

plaquetaria, regulación de la presión de la sangre y entre otras funciones biológicas necesarias en el organismo [1].

Debido a la importancia biológica de esta sustancia y también a que la detección del NO es difícil debido a su corta vida media (5 s), el uso de sensores para este analito presenta varias ventajas como ser lo suficientemente sensible como para detectar concentraciones relevantes de NO en tiempo real e *in vivo*, y donde la interferencia de otras especies relacionadas con el NO es mínima. Además estos sensores pueden ser elaborados en la micro y nano escala, lo que beneficia aun más la medida de concentraciones de NO en sistemas vivos sin ningún efecto significativo en la célula por la inserción del electrodo [1].

La técnica más popular para la medida de NO es la detección amperométrica. Esta técnica consiste en aplicar un potencial fijo al electrodo de trabajo respecto al electrodo de referencia, monitoreando al mismo tiempo la corriente redox producida por la oxidación del NO. Esta técnica ha sido aprobada por ser muy útil para la detección de NO debido a su rápido tiempo de respuesta y su alta sensibilidad (rango en nM). Tienen como desventaja la sensibilidad a los cambios en temperatura y pH por lo cual se debe tener consideraciones al respecto con estas dos variables [1,5].

La creciente aceptación de este tipo de sensores y su diversidad de uso en muchas aplicaciones con NO ayudará a seguir entendiendo el interesante rol de esta molécula [1].

- **Biosensores para pesticidas.**

Los pesticidas son productos químicos sintéticos o naturales que se pueden utilizar para el control de los insectos, hongos, bacterias, malas hierbas y otras plagas. Los residuos de pesticida sin degradar pueden penetrar en las cadenas alimenticias a través del aire, agua y aceite, causando severas problemáticas a nivel de la salud en los ecosistemas de aves, otros animales y en los humanos. Los pesticidas pueden ser carcinógenos o citogénicos. Pueden producir enfermedades en los huesos y medulares, infertilidad, desórdenes nerviosos y enfermedades respiratorias e inmunológicas. El nivel más alto permitido de pesticidas en agua para consumo humano se encuentra entre 0.3 y 400 µg/L [1,15].

Los biosensores para pesticidas son ampliamente utilizados en la agricultura, en la industria alimenticia y también en medicina. En la importación o exportación de materiales alimenticios, los biosensores portables o los kits con respuesta inmediata son muy convenientes por su rápida detección. También es importante destacar que si el biosensor tiene la capacidad de detectar selectivamente la presencia de

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

pesticida/tóxico en muestras clínicas, presenta una ventaja muy importante para su utilización en el diagnóstico en el sector de la medicina [16].

Se han estudiado Inmunosensores para pesticidas con los diferentes métodos y técnicas electroquímicas tanto como piezoeléctricos [17].

- **Biosensores electroquímicos de la glucosa**

La diabetes mellitus es un problema de salud pública mundial, siendo una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo. Este trastorno metabólico es el resultado de la deficiencia de la insulina y de la hiperglucemia. El diagnóstico y el tratamiento de la diabetes mellitus requieren un estrecho seguimiento de los niveles de glucosa en la sangre. Millones de diabéticos deben por lo tanto medir sus niveles de glucosa en la sangre todos los días haciendo que la glucosa sea un analito comúnmente analizado. El reto de proporcionar un control glucémico fiable y ajustado sigue siendo objeto de una considerable cantidad de estudios, siendo en particular los dispositivos amperométricos que usan electrodos modificados con glucosa oxidasa (GOx) de gran relevancia. A pesar del gran progreso alcanzado en el área, todavía hay muchos desafíos relacionados con el logro del monitoreo estrecho de la glicemia, en forma estable y fiable. Por lo tanto, el desarrollo de biosensores de glucosa nuevos y mejorados sigue siendo el foco principal de muchos investigadores. Luego de 40 años de estudio, aun resta encontrar mejoras relacionadas con el contacto eléctrico entre el centro redox de GOx y las superficies de los electrodos. Esto se lograría con el desarrollo de nuevos receptores artificiales para la glucosa que permitan hacer seguimientos *in vivo* de forma indolora, así como un sistema de administración de insulina compacto, logrando nuevos enfoques innovadores para la monitorización no invasiva, e implantes en miniatura a largo plazo. Estos, y otros desarrollos similares, permitirán mejorar considerablemente el control y manejo de la diabetes [1,18,19].

- **Electrodos Selectivos de Iones (ISE)**

La historia de los electrodos selectivos de iones (ISE) comenzó con el descubrimiento de membranas de vidrio delgado capaces de medir pH. Los ISE detectan iones fisiológicos en fluidos sanguíneos.

El desarrollo de estos electrodos se ha centrado en la identificación y síntesis de ionóforos para mejorar la selectividad y la integración de los electrodos selectivos de iones en los analizadores clínicos y de los instrumentos portátiles. Esto ha permitido nuevos principios de detección basados en el uso de miles de receptores químicos. Si bien los electrodos selectivos de iones han sido históricamente dispositivos de detección pasiva donde el control no era posible, la mayor parte de los estudios de la

investigación actual lidian con principios de respuesta no-clásica, donde la polarización de concentración se lleva a cabo en la interfaz de la muestra de la membrana. El control galvanostático y la voltamperometría de iones de membranas selectivas ofrecen un camino hacia nuevos enfoques basados en la detección por extracción y/o complejación [1].

El ámbito principal de aplicación ISE sigue siendo el de la Química clínica, teniendo particular importancia la determinación de electrolitos biológicamente relevantes en los fluidos fisiológicos [1].

A diferencia de otros métodos analíticos, los basados en el uso de electrodos selectivos de iones responden a la actividad de los mismos y no a su concentración, lo cual los hace especialmente atractivos para aplicaciones clínicas como trastornos de la salud que suelen estar correlacionados con la actividad de iones. Aunque la mayoría de las ISE son utilizados *in vitro*, la posibilidad de realizar mediciones *in vivo* y de forma continúa con sensores implantados podría transformarse en una herramienta de diagnóstico muy valiosa. La detección *in vivo* sigue siendo un reto, donde los sensores deben cumplir con dos requisitos estrictos: primero, perturbar mínimamente el ambiente, lo que podría ser problemático debido a las lesiones y la inflamación a menudo creadas por un sensor implantado y también debido a la lixiviación de los sensores materiales; en segundo lugar, el sensor no debe ser susceptible a este entorno y a los efectos de la adsorción de proteínas, la adhesión celular y la extracción de especies lipofílicas que afectarían la respuesta del sensor [1].

El análisis de productos farmacéuticos es otra área importante de aplicación de los ISE. Existe un gran número de fármacos detectables por este método en formulaciones farmacéuticas y en sus procesos de fabricación. La concentración de los fármacos y sus metabolitos pueden ser medidos en fluidos biológicos reales [1,20].

1.3- Receptores biológicos

Una de las principales características del material biológico empleado para la fabricación de biosensores es su alta selectividad, permitiendo incluso diferenciar en algunos casos, isómeros de una misma molécula. Esta particularidad hace que estos componentes sean de gran interés en su aplicación como receptores en la fabricación de biosensores [21].

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

Existen diferentes tipos de bioreceptores que se pueden inmovilizar sobre transductores electroquímicos:

- Anticuerpos
- Ácidos nucleicos
- Microorganismos
- Tejidos orgánicos
- Enzimas

Seguidamente se describen los diferentes receptores, haciendo especial énfasis en los anticuerpos, ya que son los utilizados en el presente trabajo.

Ácidos nucleicos

La alta especificidad de los pares de bases (adenina/timina y citosina/guanina) distribuidas a lo largo de la doble hélice que forma la cadena de ADN, hace este material de gran interés en la fabricación de biosensores. Las cadenas cortas de ADN (sADN) pueden ser inmovilizadas sobre superficies en forma de electrodos, chips o cristales según el tipo de transductor utilizado. La hibridación de esta molécula inmovilizada con su polinucleótido complementario en solución, es detectada por el transductor [21].

Microorganismos

Los microorganismos tienen una gran importancia en diferentes procesos biotecnológicos, en la industria vitivinícola, en procesos de síntesis de fármacos, o en tratamientos de agua.

Muchos biosensores basados en células han sido desarrollados para el control de dichos procesos [21]. Los microorganismos pueden asimilar compuestos orgánicos y generar un cambio que es detectado por el transductor.

Tejidos orgánicos o celulares

Los tejidos orgánicos pueden ser utilizados como elemento de reconocimiento prácticamente sin preparación. Generalmente, tienen una gran variedad de enzimas inmovilizados, y por tanto, no son tan selectivos como otros materiales biológicos. Por el contrario, están en su medio natural y es más difícil su degradación, lo que aumenta el tiempo de vida del biosensor [21].

Enzimas

Los enzimas son proteínas capaces de catalizar una reacción química. Reaccionan de manera selectiva con un analito o familia de analitos, acelerando la reacción química, y sin consumirse en el proceso.

Una de las grandes ventajas de la utilización de enzimas, además de su alta selectividad, es su menor tiempo de respuesta en relación con los otros tipos de biosensores. Como inconvenientes, se debe tener en cuenta que pierden actividad al ser inmovilizadas sobre la superficie del electrodo y tienen un tiempo de vida relativamente corto [21].

Anticuerpos e Interacción Antígeno-Anticuerpo

Los anticuerpos son una familia de glicoproteínas conocidas como inmunoglobulinas (Ig). Existen cinco clases distintas de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgD e IgE), de las cuales la IgG es la más abundante (70%) y se utiliza con mayor frecuencia en las técnicas de inmunoanálisis. La IgG es una molécula en forma de "Y" basada en dos tipos distintos de cadenas de polipéptidos. Se compone por dos cadenas livianas y dos pesadas unidas por enlaces disulfuro. A su vez, cadenas pesadas y ligeras se dividen en dominios constantes (C) y variables (V), debido a la variabilidad en la secuencia de aminoácidos. Las cadenas livianas tienen un único dominio variable (V_L) y un único dominio constante (C_L). En cambio, una cadena pesada consta de un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). El peso molecular de la cadena más liviana es de aproximadamente 25 kDa, mientras que la más pesada de las cadenas es de aproximadamente 50 kDa. En general, la molécula de anticuerpo puede ser dividida en dos fragmentos principales, el fragmento no-unión del antígeno (Fc) y el fragmento de unión al antígeno (Fab), como se indica en la figura I.3.1 [1,22].

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

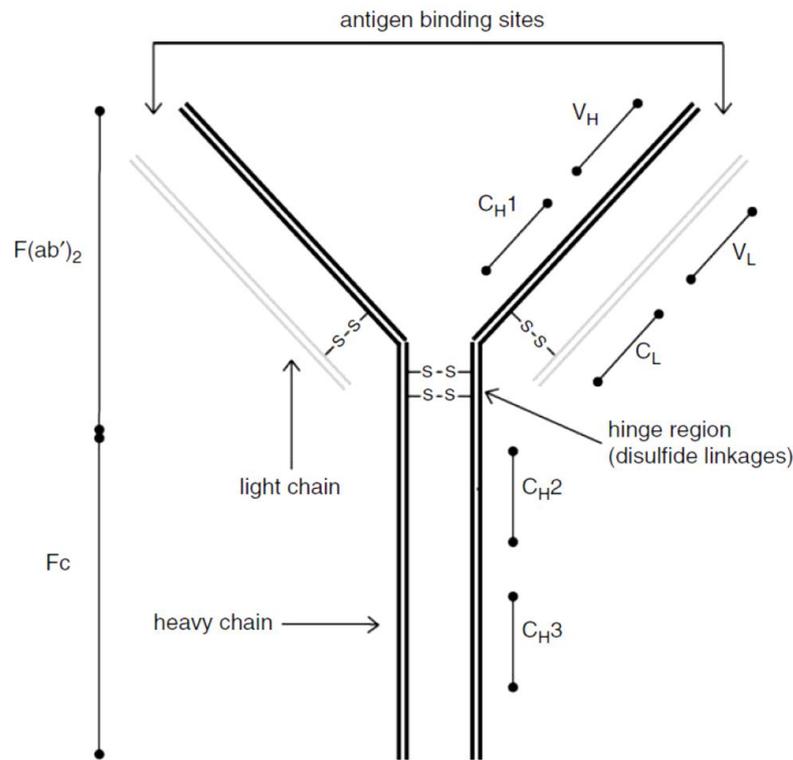


Figura I.3.1. Esquema ilustrativo de la forma en "Y" de los anticuerpos. La región entre la cadena pesada y la cadena liviana es donde se localiza la unión del antígeno [1].

Los dominios variables en ambos tipos de cadenas son las regiones más importantes en lo que respecta a la interacción antígeno-anticuerpo. La especificidad de un anticuerpo en el sitio de unión (o epítipo) por su antígeno está en función de su secuencia de aminoácidos. Dentro de los dominios V_L y V_H hay tres diferentes subregiones de alta variabilidad de la secuencia, conocidas como regiones hipervariables. Hay tres de ellas en cada cadena liviana y tres en cada cadena pesada, formando seis bucles conocidos como regiones hipervariables determinantes de la complementariedad, que constituyen el sitio de unión al antígeno. Es la diversidad de esta región que permite producir anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno. Se estima que unos 108 anticuerpos con distintas especificaciones pueden ser producidos a partir de esta estructura molecular básica. Un anticuerpo específico por lo general reconoce un solo antígeno, aunque con posibles reactividades cruzadas [23].

La afinidad de unión entre un anticuerpo (Ab) y su antígeno (Ag) puede ser generalmente descrita por una expresión de equilibrio:

$$K = \frac{[Ab - Ag]}{[Ab][Ag]} \quad (I.3.1)$$

Donde K es la constante de equilibrio de la interacción y $Ab - Ag$ es el inmunocomplejo formado entre Ab y su antígeno específico Ag . El rango de valores típico para K está entre 10^6 y 10^{12} (para concentraciones en mol por litro). En general, solamente aquellos anticuerpos con un alto valor de K , mayor a 10^8 , no exhibirán una reactividad cruzada [24].

Estas características hacen que muchos anticuerpos sean componentes ideales para el reconocimiento biológico en inmunoensayos y biosensores. Sumado a esto se puede decir también que los anticuerpos monoclonales son particularmente mucho mejores para los inmunoensayos. Esto se debe a que se producen mediante el clonado de una línea celular, por lo cual tienen el mismo epítoto específico y la misma afinidad. Esta población homogénea se puede sintetizar en gran cantidad. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales ofrecen una especificidad y homogeneidad mayor comparada con los anticuerpos policlonales, reduciendo así la necesidad de realizar trabajosas purificaciones en la muestra de análisis [24].

1.4- Fundamentos para detección electroquímica

Las técnicas electroquímicas han sido muy utilizadas para detección en la tecnología de los biosensores. Estas técnicas tienen grandes atributos como son la alta sensibilidad de los transductores electroquímicos, su compatibilidad con las tecnologías de miniaturización/microfabricación, sus necesidades de energía mínimas, bajo costo, y posibilidad de realizar el análisis aún en presencia de turbidez o color en la muestra [1].

La señal electroquímica producida se utiliza para relacionar cuantitativamente la cantidad de analito presente en una solución de la muestra. Potenciometría, amperometría, voltamperometría, y más recientemente, medidas obtenidas mediante el uso de espectroscopía de impedancia electroquímica, son algunas de las técnicas de detección electroquímica de uso frecuente en los sistemas de biosensores [25].

En inmunosensores, la mayoría de los anticuerpos y antígenos son incapaces de actuar como pares redox, es por ello que para promover la reacción electroquímica y poder detectar el analito, es frecuente la conjugación de un marcador apropiado a algún componente particular del inmunocomplejo [26].

Los biosensores electroquímicos son artefactos analíticos en el que un dispositivo electroquímico sirve como elemento de transducción. Son de particular interés debido a las ventajas prácticas, como la simplicidad de operación, los bajos gastos de fabricación, y la idoneidad de detección en tiempo real. Se han logrado importantes

avances en este campo con fines analíticos utilizando enzimas como componente biológico, debido a su especificidad frente al sustrato. La velocidad de transferencia de electrones entre grandes proteínas redox y la superficie del electrodo es generalmente demasiado lenta, lo que por lo general es la principal dificultad que presenta el diseño del sistema electroquímico. La forma de lograr una comunicación eléctrica eficiente entre la proteína redox y electrodos ha sido uno de los objetos de estudio más difíciles en el campo de la bioelectroquímica y por lo general se trabaja con alguna de las siguientes dos estrategias. Una se basa en la utilizar mediadores electroquímicos; moléculas que se agregan al sistema electroquímico y cuya función es actuar como intermediario en la transferencia electrónica desde el centro redox hasta la superficie del electrodo. Se han empleado con este fin sustratos de enzimas y productos naturales, mediadores redox artificiales y polímeros conductores. El otro enfoque se basa en la transferencia directa de electrones de la proteína [1].

I.4.1- Transferencia electrónica directa de proteína

En los biosensores basados en la transferencia directa de electrones desde la proteína al electrodo, la ausencia de mediador es la principal ventaja, porque deben operar en una ventana de potencial cercana al potencial redox de la enzima y por tanto son menos propensos a tener interferencias. Asimismo, la falta de otro intermediario en la secuencia de reacción, simplifica el sistema de reacción. Otro de los atractivos que presenta este enfoque, es la posibilidad de modular las propiedades deseadas de un dispositivo de análisis utilizando modificaciones en la proteína, empleando técnicas de ingeniería genética o química [1].

Existen varios factores que afectan la transferencia directa de electrones entre los electrodos y las proteínas. Estos factores incluyen: (i) grupos prostéticos electroactivos ubicados en lo profundo de la estructura de la proteína, (ii) la desnaturalización de las proteínas en su adsorción sobre electrodos, y (iii) las orientaciones desfavorables con respecto al acceso al centro redox o a la zona de reconocimiento de las proteínas en los electrodos. Ciertas modificaciones especiales de los electrodos son los últimos avances para lograr el intercambio de electrones directo entre los electrodos y las proteínas. Por ejemplo un método emplea una solución altamente purificada de proteína y se complementa con una limpieza especial de los electrodos. Otro método cubre el electrodo con moléculas promotoras, lo que facilita la transferencia de electrones mediante el bloqueo de la desnaturalización durante el proceso de adsorción y/o favoreciendo la orientación de la proteína inmovilizada [1,27].

El desarrollo de métodos y materiales utilizados en la inmovilización de proteínas tiene como objetivo mejorar la velocidad de transferencia electrónica directa y proveer de un

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

microambiente adecuado para estabilizar la estructura tridimensional de las macromoléculas, para que por ejemplo, las enzimas mantengan su actividad catalítica. Estos tipo de biosensores se utilizan ampliamente en la industria y el monitoreo del medio ambiente. Se han reportado biosensores para la detección de peróxido de hidrógeno, glucosa, óxido nítrico, ácido úrico, xantina, hipoxantina, entre otros [1].

La dificultad que presenta esta estrategia de modificación, sin el componente mediador electroquímico, es que solo algunas proteínas pueden alcanzar la transferencia electrónica directa. Tampoco existe un método común de inmovilización que asegure el éxito, por lo que para cada sistema de estudio deberá determinarse cuál es el método que conlleva a los mejores resultados [1].

I.4.2- Transductores electroquímicos

Los biosensores miden la señal causada por el cambio en la concentración de un co-reactivo que reacciona con el analito o un co-producto que se produce con el analito de una reacción biológica (reacción enzimática, por ejemplo). Cuando un electrodo es usado como un transductor en un biosensor, el electrodo convierte el cambio en la concentración de un producto o un reactivo de una reacción biológica en una señal eléctrica. A continuación se definirán los diferentes y más ampliamente utilizados transductores electroquímicos.

Transductores conductimétricos

Este tipo de transductores se basan en la medida de cambios de conductividad (o alguna propiedad asociada a ésta) provocados por el analito, ya sea en la solución de medida o en la membrana selectiva. En algunos casos, se pueden llegar a medir incluso cambios de conductividad del propio analito [28].

La conductividad es proporcional a la concentración de iones según la ecuación:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C} \quad (I.4.2.1)$$

siendo κ la conductividad específica ($S\text{ cm}^{-1}$), y C la concentración de iones (mol cm^{-3}).

Las medidas de resistividad en corriente continua son las más comunes para el funcionamiento de estos biosensores, aunque para registrar medidas de impedancia se utiliza corriente alterna. Estas medidas de impedancia se suelen utilizar para caracterizar algunos líquidos y/o superficies de electrodos modificadas [29,30].

Estos dispositivos tienen una configuración muy simple, consistente en dos electrodos que pueden ser de diferentes materiales. Generalmente, son de algún metal noble sin

modificar, tal como oro, que puede detectar cambios de concentración del ácido sulfhídrico; o como platino, paladio o rutenio, que pueden ser utilizados para la detección de hidrógeno [31].

También se han desarrollado diferentes biosensores conductimétricos mediante la modificación de electrodos con material biológico atrapado en polímeros conductores [32,33].

Transductores potenciométricos

Las medidas potenciométricas consisten en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia.

La diferencia de potencial medida entre los electrodos se relaciona con la concentración del analito de acuerdo con la ecuación de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(a_i + \sum_{i,j} k_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{\frac{Z_i}{Z_j}} \right) \quad (I.4.2.2)$$

donde a_i es la actividad del ion principal, a_j la actividad del ion interfase, Z_i y Z_j son las cargas de los iones principales e interfase, $k_{i,j}^{pot}$ es el coeficiente de selectividad, R es la constante de los gases, T es la temperatura, F es la constante de Faraday y n el número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica [34].

Dentro de los transductores potenciométricos podemos diferenciar también los voltamperométricos, en los cuales las curvas intensidad-potencial obtenidas proporcionan analíticamente más información que las curvas de potencial de equilibrio obtenidas bajo condiciones potenciométricas. En adición, el potencial reversible puede calcularse a partir de datos generados bajo condiciones dinámicas. Requiere preparar un electrodo por ion a determinar y se basa en ecuaciones tipo Nernst, adaptadas por Bond y col. [35,36] que establecen una relación directa entre el potencial reversible (I.4.2.5) y el logaritmo de la concentración del ion en el electrolito (I.4.2.3 y I.4.2.4). Las ecuaciones adaptadas de Bond y col. para sensores voltamétricos son:

$$\text{para cationes: } E_R = E^{0'} + S \log[M^+] \quad (I.4.2.3)$$

$$\text{para aniones: } E_R = E^{0'} - S \log[X^-] \quad (I.4.2.4)$$

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

donde $[M^+]$ y $[X^-]$ son las concentraciones de cationes y aniones, respectivamente. S es la pendiente obtenida a partir de las curvas de calibración, y E^0 la ordenada en el origen. El potencial reversible E_R se define como:

$$E_R = \frac{E_p^{red} + E_p^{ox}}{2} \quad (I.4.2.5)$$

siendo E_p^{red} el potencial del pico de reducción y E_p^{ox} el potencial de pico de oxidación.

Transductores amperométricos

Este tipo de dispositivos se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar o contraelectrodo, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica [37]. También es posible realizar análisis basados en técnicas voltamperométricas, variando el potencial de trabajo de forma controlada a una determinada velocidad.

Los transductores amperométricos se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado [37]. Esta relación intensidad concentración se comporta según el siguiente modelo que proviene de la Ley de Fick:

$$I = nFAD_0 \frac{\delta(C_0(0, t))}{\delta x} \quad (I.4.2.6)$$

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D_0 y C_0 son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente, y x representa la distancia de la doble capa electroquímica.

En el caso de que la solución esté agitada constantemente, se puede considerar que x se mantiene constante y se corresponde con el tamaño de la capa de difusión (δ). Así, la ecuación anterior puede simplificarse obteniéndose una relación lineal entre la intensidad medida y la concentración del analito [37], según la expresión:

$$I = \frac{nFAD_0}{\delta} C_0 \quad (I.4.2.7)$$

1.5- Métodos de Inmovilización

Como ya se expuso anteriormente, un biosensor es un dispositivo de análisis biológico compuesto por un elemento de detección (enzimas, anticuerpos, DNA) en íntimo contacto con un transductor físico (óptico, de masa o electroquímico), que en conjunto se relaciona la concentración de un analito en una señal eléctrica medible. La estabilidad de las biomoléculas y la transferencia de señal a la superficie del transductor son factores cruciales en la estabilidad y la sensibilidad de los biosensores. En soluciones acuosas, las enzimas pierden su actividad catalítica con bastante rapidez, ya que las enzimas pueden sufrir reacciones de oxidación, o su estructura terciaria puede ser destruida en la interfase aire-agua, de ahí que el uso de enzimas como reactivos sea costoso y complejo. Este problema puede ser resuelto por la inmovilización de las biomoléculas. Las moléculas bioactivas pueden ser retenidas en un soporte inerte, manteniendo la actividad catalítica y, por tanto alargando su vida útil. En vista de lo anterior, una variedad de técnicas han sido desarrolladas para inmovilizar biomoléculas [1,38].

En general, el método de inmovilización debe tener las siguientes características: debe ser simple y rápido, inerte y biocompatible, tener alta capacidad de retención, controlar la porosidad y la capa de biomoléculas debe ser estable en diferentes condiciones ambientales y experimentales tales como el pH y la temperatura para el desarrollo de biosensores. Por ejemplo, las películas de sol-gel tienen la mayoría de las propiedades antes mencionadas, por lo que han sido ampliamente utilizados en el diseño de biosensores en los últimos años [1].

1.5.1- Métodos de Inmovilización para Proteínas

Adsorción de la Proteína

La adsorción física de las proteínas directamente sobre la superficie de un electrodo es un método simple de inmovilización. La adsorción se obtiene por volatilización del buffer en el que se encuentra disuelta la proteína. La adsorción física no necesita de reactivos químicos, rara vez es necesario realizar procedimientos de activación y enjuague, que se utilizan para mejorar la bioactividad de las proteínas. Sin embargo, las proteínas inmovilizadas son fáciles de desnaturar desde el electrodo, lo que restringe la amplia gama de aplicaciones de este método [1,27].

Monocapas Autoensambladas (SAMs)

Las monocapas autoensambladas (SAMs) es un atractivo método de inmovilización.

La formación de SAMs es una alternativa especialmente atractiva para el desarrollo de biosensores, por varias razones. La primera es la facilidad de miniaturización que ofrecen dispositivos basados en esta alternativa, debido a la baja cantidad de recursos que son necesarios (una monocapa comprende unas 10^{13} moléculas/cm²). En segundo lugar, el alto grado de empaquetamiento y ordenamiento de estas películas las hacen atractivas para la captación e inmovilización de biomoléculas como anticuerpos y enzimas. Otra ventaja radica en la facilidad con que se forman las SAMs y la compatibilidad con distintos sustratos metálicos (Au, Ag, Cu) adecuados para métodos electroquímicos basados en medidas de corriente o potencial. Por último, la monocapa de tioles posee una alta estabilidad química incluso luego de la inmovilización posterior de biomoléculas.

El método se basa en la adsorción química espontánea de tioles a metales de forma de generar monocapas muy ordenadas. Los electrodos de oro son los más usados debido a su estabilidad frente a la formación de óxidos en condiciones ambientales. El primer paso en la formación de una SAM de un tiol es la quimisorción del grupo sulfhidrilo del tiol a la superficie del oro a través de la formación de un enlace de oro con el azufre. Un metal limpio, sin óxidos en la superficie, ofrece condiciones óptimas para formación del enlace metal-azufre [1,39,40]. Esta etapa es muy rápida, lo cual genera una superficie muy desordenada y que contiene multicapas del tiol que cubren defectuosamente la superficie del metal. A continuación tiene lugar una segunda etapa, donde se ordena y compacta la capa de tioles adsorbida al metal, generando en este caso una monocapa ordenada de los mismos [40].

En general, la adsorción de la proteína no se hace en forma directa sobre el electrodo sino que tiene lugar a través de una capa de tiol o de algún polímero. Usando monocapas de tioles es posible además generar una unión covalente y muy estable de la proteína con SAMs, usando tioles que poseen grupos carboxilo capaces de reaccionar covalentemente con los grupos amino de las proteínas. Es importante señalar que las SAMs presentan versatilidad porque se puede elegir tioles que tengan grupos carboxilo, amino, alcoholes y así funcionalizar la superficie de acuerdo a la forma de unión con la proteína deseada.

Unión Covalente de la Proteína

La proteína es inmovilizada por la combinación con la superficie del electrodo a través de la formación de un enlace covalente. El proceso requiere del trabajo a baja temperatura (0 °C), la baja concentración de iones, y condiciones de pH fisiológico. La formación de un enlace covalente con la superficie de un electrodo es un proceso más

difícil que la simple adsorción, pero puede proporcionar un dispositivo que contiene una proteína inmovilizada más estable [1,41].

Embebidos proteicos en polímeros sol-gel

Un método interesante para inmovilizar proteínas es aquel basado en el uso de una proteína embebida en una película polimérica al estado sol-gel. Por lo general, este embebido integra e inmoviliza la proteína en una estructura en forma de red tridimensional de macromoléculas poliméricas. Esta tecnología tiene algunas características tales como las condiciones de trabajo leves (lo que permite mantener la estructura funcional de la proteína), múltiples capas sol-gel, y la posibilidad de controlar la apertura de la membrana. Tiene la capacidad de retener la bioactividad de la proteína, pero presenta como desventaja dificultades en el control del proceso de agregación [42].

Embebido de la proteína en surfactante

Un surfactante tiene una estructura anfóterica, lo que hace posible la formación de una membrana estable (similar a una membrana lipídica) y puede ser utilizado para integrar las proteínas reteniendo su bioactividad. El proceso de preparación de un electrodo surfactante/proteína modificada es simple y viable. Generalmente hay dos métodos para incorporar las proteínas en las membranas. En el primero, una solución de surfactante en cloroformo se extiende sobre la superficie del electrodo, y el disolvente se evapora. El electrodo recubierto se coloca en una celda electroquímica que contiene una solución de proteínas. El segundo método permite controlar la cantidad de proteína que se deposita. Para ello se realiza una dispersión acuosa de vesículas de surfactante y luego se mezcla con una solución que contenga proteínas. Un volumen preciso de esta mezcla se extiende sobre un electrodo y luego es secado. Las vesículas se aplanan cuando se secan, lo que resulta en múltiples pilas de bicapas modificando la superficie del electrodo. El bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) es un tipo de surfactante, que puede formar una película estable. La película de DDAB es laminar y formada por cristales líquidos a temperatura ambiente, este estado líquido facilita un buen transporte de masa y carga, necesario para aplicaciones catalíticas [1].

I.5.2- Métodos de Inmovilización para Anticuerpos

Una característica deseable en el método de inmovilización elegido es que el anticuerpo de captura quede inmovilizado con una orientación con mínimo impedimento estérico para interactuar favorablemente con el antígeno en cuestión. Es igualmente importante que el anticuerpo quede inmovilizado sin cambios significativos en su habilidad de unión con el antígeno [43,44].

Interacción biotin – (estrepto) avidina

Las interacciones específicas para la inmovilización de los anticuerpos han sido ampliamente utilizadas en los sistemas de inmunoensayos en los últimos años. La interacción de la (estrepto) avidina – biotina es un ejemplo de ello. Esta técnica puede ser utilizada para inmovilizar varios tipos de biomoléculas, como ácidos nucleicos, polisacáridos y proteínas incluyendo a los anticuerpos de captura en los inmunoensayos/inmosensores. Esta técnica usualmente incluye la etapa de modificación por biotina del anticuerpo de captura y una cubierta de la fase sólida con avidina o estrepto avidita [45,46].

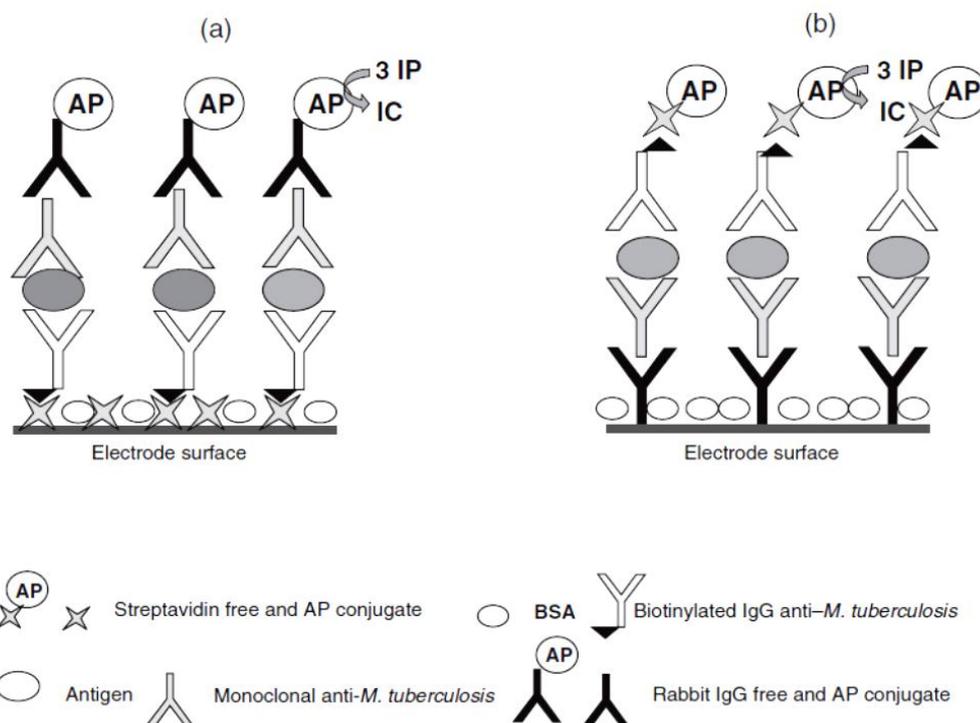


Figura I.5.2.1. Representación esquemática de dos dispositivos para inmosensores: (a) inmosensores basados en la interacción de la biotina-estreptoavidina (b) inmosensores basados en IgG (conejo) – modificado SPCEs [1] (página 123).

Proteínas de unión a anticuerpos

Otra de las técnicas de inmovilización de anticuerpos incluye proteínas de bacterias que se unen a anticuerpos. Las dos proteínas más comúnmente utilizadas son Proteína A y Proteína G. Estas proteínas se unen específicamente a anticuerpos a través de sus

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

regiones no antigénicas (Fc), lo cual permite que los sitios de unión antigénicos del anticuerpo inmovilizado se orienten lejos de la fase sólida y puedan estar entonces disponibles para la unión del analito objetivo. Ya que estas proteínas interactúan directamente con la región Fc de los anticuerpos no se necesita biotinización del anticuerpo [1].

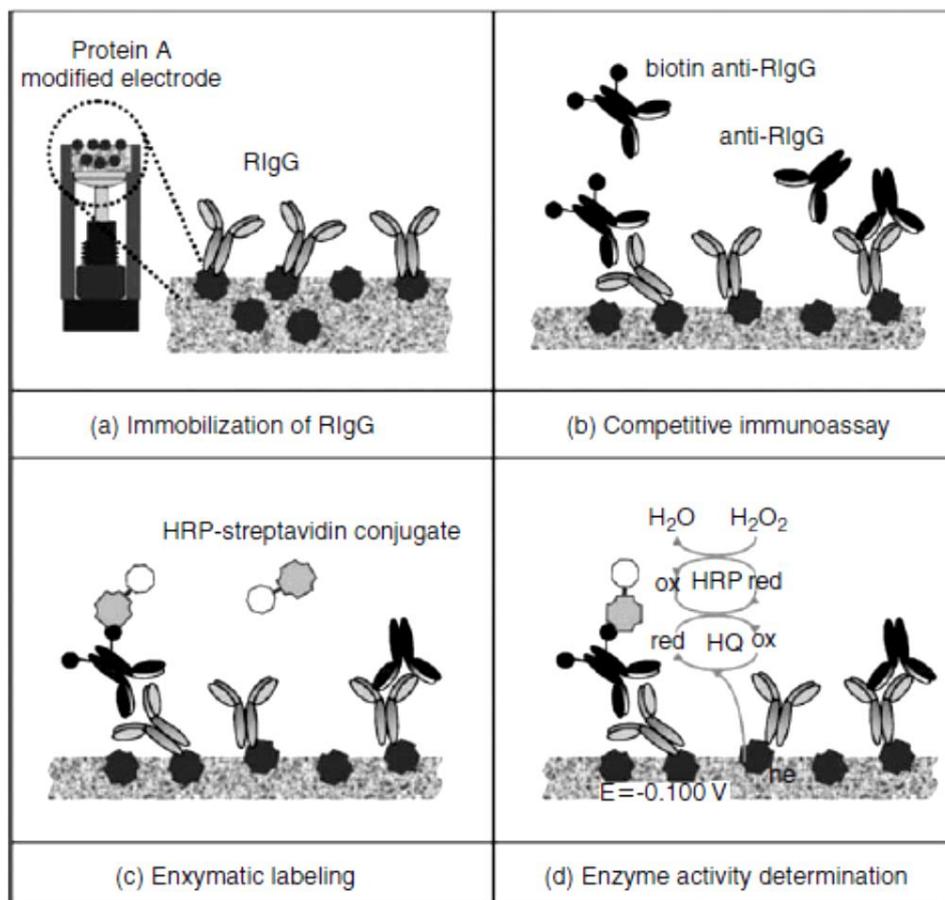


Figura 1.5.2.2. Representación esquemática de un inmunosensor basado en la proteína A-GEB biocompuesto como un transductor. (a) Inmovilización de RIgG en la superficie interactuando con la Proteína A, (b) inmunoensayo competitivo utilizando anti-RIgG y anti-RIgG biotinizado, (c) marcado enzimático utilizando HRP-estreptavidina, (d) determinación electroquímica de la actividad enzimática [1] (página 125).

Polímeros conductores

La aplicación de polímeros conductores como polianilina, polipirrol y politiofeno es ampliamente utilizada para la inmovilización de anticuerpos. Los polímeros

conductores pueden proporcionar una vía directa de transferencia de electrones entre una enzima y la superficie del electrodo y, en ese caso, no se necesitará de un mediador para la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo [1].

Fragmentos de anticuerpo

Una alternativa a la inmovilización de anticuerpos de captura en los sistemas de inmunoensayo es la inmovilización de fragmentos de anticuerpo (Fab). La fragmentación de un anticuerpo se logra en general enzimáticamente con enzimas proteolíticas como la quimotripsina, tripsina y papaína. Después de la digestión enzimática, los enlaces disulfuro mantienen juntos a los dos fragmentos de las dos cadenas de Fab, las que pueden ser reducidas con reactivos tales como ditioneitol o 2-mercapto etanolamina. Esto lleva a la formación de dos fragmentos Fab, cada uno con un grupo tiol terminal, que tienen una alta afinidad por una superficie de oro, en la que por lo tanto, pueden auto-ensamblarse sin necesidad de usar ningún reactivo adicional. Las capas resultantes tienen una disposición ordenada, de forma tal que el anticuerpo queda orientado de tal manera que sus regiones de unión son más accesibles al antígeno [1].

1.6- Inmunoensayos

Los inmunoensayos son sistemas de análisis que utilizan la notable especificidad proporcionada por el reconocimiento molecular de un antígeno por los anticuerpos y son ampliamente utilizados en la clínica. Su principal desventaja es la necesidad de un largo tiempo de incubación, lo que implica varias horas de recolección de muestras para generar resultados, dificultando el uso de esta técnica en estado de alarma o en control de procesos. Por su parte, los inmunosensores son considerados como dispositivos capaces de sortear parcialmente estos inconvenientes. Estos constan de una superficie bioactiva (generalmente un anticuerpo inmovilizado sobre una superficie de detección) y un sistema de transductores capaces de generar una señal física cuando la reacción inmunoquímica se lleva a cabo [1].

Dos enfoques competitivos se han seguido con respecto a ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) en el desarrollo de inmunosensores: la inmovilización de un anticuerpo o la de un antígeno/hapteno [47].

El primero es el enfoque más común. Las principales ventajas de esta opción radican en el ahorro que implica no utilizar anticuerpos caros y en la reducción de los pasos del ensayo. Por el contrario, la técnica de inmovilización del antígeno o hapteno, aunque

menos empleada, tiene la ventaja de que el proceso de regeneración se puede realizar sin pérdida de actividad del reactivo inmovilizado [48].

Con respecto al tipo de anticuerpos, usando anticuerpos monoclonales se observa una mayor estabilidad que usando anticuerpos policlonales en disolventes orgánicos.

Los anticuerpos no son catalíticamente activos y la detección directa de la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) no proporciona la suficiente sensibilidad. Mediante marcado del antígeno o el anticuerpo, la sensibilidad de los inmunoensayos/inmunosensores se puede mejorar. Los marcadores más comúnmente utilizados son enzimas, compuestos fluorescentes o electroquímicamente activos. Los marcadores enzimáticos utilizados en inmunosensores suelen ser óxido reductasas como la peroxidasa de rábano (HRP), glucosa oxidasa o enzimas hidrolíticas tales como la fosfatasa alcalina. El marcado de la enzima evita el uso de radioisótopos empleados en los radioinmunoensayos (RIA). Entre los inmunoensayos enzimáticos (EIA), aquellos basados en condiciones heterogéneas son los más empleados y se los conoce como ELISAs. Para los ELISAs, el anticuerpo o el antígeno es inmovilizado sobre una fase sólida para facilitar la separación de las fracciones libre y unida. A su vez, los ELISAs se pueden agrupar en tres categorías: ELISA por competencia directa, ELISA indirecto competitivo y ELISA sándwich [1,49].

En resumen los inmunoensayos son los métodos cuantitativos de análisis donde los anticuerpos son los principales agentes de unión para el antígeno (que suele ser el analito) de interés. Cabe destacar que el valor de K en la ecuación (1.3.1) determina el equilibrio y la unión entre un anticuerpo y su antígeno, en un sistema en particular como se menciono anteriormente. Un inmunoensayo suele consistir en la investigación de la unión de un anticuerpo y su antígeno y la diferenciación entre el antígeno unido y sin unir. En otras palabras, todos los inmunoensayos implican la medición de la fracción de ocupación de los sitios de reconocimiento. Sin embargo, esta medida puede depender tanto de la evaluación de los lugares ocupados como, indirectamente, de la medición de los sitios desocupados. Esto conduce al desarrollo de un inmunoensayo ya sea "competitivo" o "no competitivo" [50,51].

Sistemas de inmunoensayos competitivos

En un inmunoensayo competitivo, el analito de la muestra se mezcla con el analito marcado, compitiendo ambos por un número limitado de sitios de unión del anticuerpo. En inmunoensayos electroquímicos, se usan comúnmente los marcados enzimáticos o los electroactivos. El análisis cuantitativo se puede lograr mediante la determinación de la cantidad de analito marcado que interactúa en los sitios de unión.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

Por lo tanto, con un número fijo de sitios del anticuerpo, se espera una señal más pequeña cuando la relación con la cantidad de muestra de analito marcado es grande. Por el contrario, una señal más grande se obtiene cuando hay una relación de pequeña cantidad. Por lo tanto, la señal producida por el analito marcado suele ser inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra [40,52].

Sistemas de inmunoensayos no competitivos

En un inmunoensayo no competitivo (también conocido como inmunoensayo de dos sitios o "sándwich"), el analito de la muestra es capturado por un exceso de un anticuerpo de captura, que lo separa de la muestra global. El analito capturado se expone luego a un exceso de anticuerpos de segunda señal, que sólo se unirán al existente complejo de captura anticuerpo-analito. En este sistema, el anticuerpo señal es conjugado a menudo, ya sea a un marcador enzimático o a un marcador electroactivo que produce una señal proporcional a la cantidad de analito unido. En un inmunoensayo no competitivo ideal, no se producirá señal en ausencia de analito ya que no existen sitios apropiados disponibles para la unión del anticuerpo señal. Sin embargo, en la práctica, este no es el caso debido a interacciones no específicas entre el anticuerpo señal y los demás componentes del inmunoensayo. Por lo tanto, siempre es conveniente utilizar un reactivo de bloqueo para reducir las interacciones no específicas. La adsorción no específica también debe ser considerada cuando se desea determinar la cantidad del anticuerpo señal para el uso en un sistema. Aunque este formato de inmunoensayo ofrece una especificidad superior sólo puede ser utilizado en la cuantificación de analitos con dos determinantes antigénicos que pueden ser reconocidos simultáneamente [53,54].

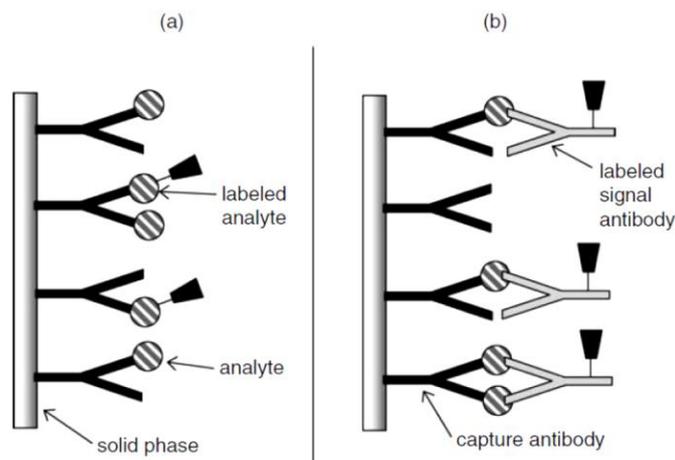


Figura I.6.1. Representación esquemática de un inmunoensayo competitivo (a) y de un inmunoensayo no competitivo (b) [1].

1.7- Inmunosensores

Los inmunosensores son dispositivos basados en la afinidad por el ligando que involucran el acoplamiento de las reacciones inmunoquímicas con transductores apropiados. El principio general de trabajo de los inmunosensores se basa en el hecho del reconocimiento específico inmunoquímico de anticuerpos (antígenos) inmovilizados en un transductor de antígenos (anticuerpos), con la capacidad de producir señales que varían con las concentraciones de los analitos de interés. La reacción altamente específica entre las regiones de un anticuerpo y los epítopes de un antígeno involucra diferentes tipos de unión: interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, fuerzas de van der Waals y enlace por puente de hidrógeno. La reacción antígeno-anticuerpo es reversible y, debido a la relativa debilidad de las fuerzas que mantienen los anticuerpos y antígenos en conjunto, el complejo formado se disocia dependiendo de las condiciones del medio de reacción (por ejemplo, pH y fuerza iónica). La fuerza de la unión de un anticuerpo a un antígeno puede ser caracterizada por su constante de afinidad (K), que varía entre 5×10^4 y $1 \times 10^{12} \text{ L mol}^{-1}$. La gran afinidad y especificidad de esta reacción antígeno-anticuerpo define las características únicas del inmunosensor [1].

El diseño general del inmunosensor consta de tres partes individuales en estrecho contacto: un elemento de reconocimiento biológico, un transductor físico-químico, y una parte electrónica. Anticuerpos o derivados de anticuerpos (antígenos o haptenos) suelen servir como elementos de reconocimiento biológico, que están integrados dentro o íntimamente relacionados con un transductor físico-químico. Esta reacción define el reconocimiento de alta selectividad y la sensibilidad del dispositivo transductor. La parte electrónica se utiliza para amplificar y digitalizar la señal de salida físico-química de los dispositivos, como por ejemplo los transductores electroquímicos (potenciométricos, impedimétricos, amperométricos), ópticos (fluorescencia, luminiscencia, índice de refracción), y dispositivos de microgravimetría [1,55].

Los inmunosensores muestran una alta selectividad, sensibilidad, reversibilidad y el uso del reactivo eficiente. Al mismo tiempo, son generalmente fáciles de operar y de lograr automatización, digitalización y miniaturización. Debido a esto pueden evitar algunos problemas inherentes de los métodos tradicionales de análisis. Por lo tanto, los inmunosensores han sido objeto de amplio interés en los estudios de inmunoquímica con un enorme potencial en el diagnóstico clínico, análisis ambiental y monitoreo de procesos biológicos. En cuanto a los diagnósticos médicos de algunas enfermedades, esfuerzos considerables se han dedicado al desarrollo de inmunosensores precisos, rápidos, sensibles y selectivos por la medición de los marcadores o los microorganismos

patógenos responsables de las enfermedades, tales como proteínas, enzimas, virus, bacterias y hormonas [1,37].

Como se mencionó anteriormente existen diferentes formas de detección de la señal, lo cual genera distintos tipos de inmunosensores: electroquímicos, ópticos y sensores de microgravimetría.

Pero a su vez, los inmunosensores pueden operar ya sea como inmunosensores directos o como indirectos. Los inmunosensores directos son aquellos en que los transductores detectan directamente los efectos físicos o químicos resultantes de la formación de inmunocomplejos en las interfases, sin utilizar marcajes adicionales. Detectan los analitos en tiempo real. Para inmunosensores indirectos se utilizan comúnmente uno o varios marcados con reactivos biológicos en los procesos de detección, y los transductores deben detectar las señales del marcado. En comparación con los inmunosensores directos, los inmunosensores indirectos pueden tener una mayor sensibilidad y una mejor capacidad de defensa frente a la interferencia de adsorción no específica [1,56].

I.7.1- Inmunosensores ópticos

Dado que casi todos los fenómenos ópticos en las superficies de detección (por ejemplo absorbancia, fluorescencia, luminiscencia, dispersión o índice de refracción) pueden ser utilizados para la detección bioquímica de los dispositivos, los inmunosensores ópticos son considerados como una de las alternativas más prometedoras para los inmunoensayos tradicionales en el diagnóstico clínico y el análisis del medio ambiente. En los últimos años, ha habido una tendencia creciente en el uso de técnicas de transducción óptica en las tecnologías de inmunosensor debido a las ventajas de la aplicación de la radiación visible (modo de operación no destructivo), y la rápida generación de señal y lectura [1,57,58].

I.7.2- Inmunosensores microgravimétricos

Pueden incorporar una alta sensibilidad de respuesta piezoeléctrica y alta especificidad de la reacción inmunitaria del antígeno-anticuerpo. El principio de detección de estos dispositivos se basa en el reconocimiento del adsorbato donde la unión selectiva puede causar cambios en la masa y las propiedades de la interface (es decir, la rugosidad superficial y la viscoelasticidad), que se puede reconocer por un cambio correspondiente en la frecuencia de oscilación. El transductor microgravimétrico más conocido es la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) [1,59].

Gran parte de los inmunosensores microgravimétricos se basan en la aglutinación. La inmunorreacción de aglutinación del anticuerpo ocurre sobre polímeros, microesferas y nanopartículas, lo que inducirá un cambio en los parámetros de la solución (es decir, la densidad y viscosidad) y las propiedades interfaciales de los cristales controlados por el dispositivo de QCM [1,59].

I.7.3- Inmunosensores electroquímicos

- **Inmunosensores potenciométricos**

Para transductores potenciométricos, se establece un equilibrio local en la interfaz del transductor a flujo de corriente casi cero, donde un cambio en el electrodo o potencial de membrana es logarítmicamente proporcional a la actividad específica del ion. La relación de proporcionalidad logarítmica constituye el principio fundamental de todos los transductores potenciométricos como los electrodos selectivos de iones (ISE). Los grupos de inmunosensores se caracterizan por ser sencillos en la preparación, robustos en funcionamiento, y moderadamente selectivos en los resultados analíticos [1,60].

Los inmunosensores potenciométricos basan su detección en el cambio que se produce en el potencial medido entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia, como resultado de la interacción específica entre un anticuerpo y su antígeno. Sin embargo, son pocos los informes de inmunosensores que confían en la detección potenciométrica. Una de las principales desventajas de este tipo de detección es el cambio relativamente pequeño en el potencial que surge de la interacción entre un anticuerpo y su antígeno. Por otra parte, las interferencias de la matriz de la muestra se pueden prevenir ya que esta pequeña señal puede detectarse con éxito. En resumen, este tipo de sensores suelen tener una fiabilidad y sensibilidad comprometidas [1].

- **Inmunosensores amperométricos**

Los Inmunosensores amperométricos se basan en la medición de las corrientes resultantes de la oxidación electroquímica o reducción de las especies electroactivas a un potencial constante determinado. Este tipo de inmunosensor por lo general utiliza un sistema de tres electrodos. Como la mayoría de los anticuerpos y antígenos no son electroquímicamente activas, hay pocas aplicaciones disponibles para la detección directa amperométrica. Por lo tanto, la mayoría de los inmunosensores amperométricos son indirectos, que pueden detectar principalmente las corrientes redox asociadas a compuestos marcadores electroactivos o catalíticos [61].

En amperometría, la corriente producida por la oxidación o reducción de un analito electroactivo en la superficie del electrodo es monitoreada en condiciones controladas

de potencial. La magnitud de la corriente se relaciona con la cantidad de analito presente. Sin embargo, y al igual que en los inmunosensores potenciométricos ya descritos, debido a que ni los anticuerpos ni los antígenos son intrínsecamente electroactivos es necesario introducir un marcador adecuado en el inmunocomplejo para promover una reacción electroquímica en el sensor. En este sentido, los marcadores enzimáticos como la oxidorreductasa y la HRP (peroxidasa de rábano) se utilizan con frecuencia debido a su capacidad para producir un producto electroactivo después de la conversión catalítica de un sustrato. La magnitud de la corriente que resulta de la reacción redox del producto puede ser cuantitativamente relacionada con la cantidad de analito presente [1].

- **Inmunosensores voltamperométricos**

El desarrollo de inmunosensores electroquímicos implica la inmovilización de un inmunocomplejo en un solo electrodo, seguida de la detección a través del marcado de los inmunocomplejos en el mismo electrodo. Más recientemente, los arreglos de microelectrodos interdigitados (IDA) han ganado popularidad como una alternativa de tipo transductor electroquímico en los inmunoensayos. En general, un diseño simple de un IDA consiste en un par de "dedos" o microelectrodos interdigitados. Cuando un IDA se utiliza como un sensor en un experimento de voltamperometría, los dos electrodos interdigitados se suelen acoplar a diferentes potenciales para lograr un ciclo redox de las especies electroactivas para ser detectadas. Una ventaja importante de este ciclo redox es que mejora la relación señal-ruido mediante la mejora de la corriente de Faraday relativa a la corriente de fondo, lo que resulta en límites de detección más bajos y una mayor sensibilidad [1,62].

- **Inmunosensores impedimétricos**

Diversas estrategias se han descrito para la inmovilización de anticuerpos en una superficie del electrodo. En el reconocimiento molecular específico del antígeno por el anticuerpo inmovilizado, habrá cambios en la carga interfacial, la capacitancia, resistencia, masa y espesor en la superficie del inmunosensor. Hay, pues, un creciente interés en la explotación de las técnicas electroquímicas que siguen estos cambios interfaciales, lo que puede producir la determinación cuantitativa del analito objetivo. La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es un método eficaz para probar las características de la superficie de un electrodo modificado por inmunocomplejos. En un experimento EIS, una amplitud baja (5 a 10 mV pico a pico) de la señal de onda sinusoidal del potencial se superpone a un potencial DC fijo aplicado a un sistema electroquímico. Con base en la ley de Ohm, la impedancia se puede calcular

considerando el potencial sinusoidal aplicado y la corriente medida en consecuencia, utilizando un circuito adecuado para modelar el sistema experimental [1,63].

- **Sistemas de Inmunosensores electroquímicos basados en microesferas**

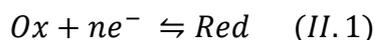
Los inmunosensores electroquímicos basados en microesferas son especialmente adecuados para el desarrollo de dispositivos de microfluidos. Este tipo de trabajo por lo general implica la unión a anticuerpos con biotina a microesferas recubiertas con estreptavidina de pocas micras de diámetro, para construir el inmunocomplejo necesario. Las microesferas son de poliestireno con partículas de hierro dispersas, dando lugar a su comportamiento paramagnético. Debido al pequeño tamaño de las microesferas, son muy móviles y fáciles de introducir en los circuitos de un dispositivo de microfluidos y su movimiento puede ser fácilmente controlado por un campo magnético. Por otra parte, la dispersión de las microesferas a través de una solución acorta distancias tanto en la difusión de reactivos y tiempos de ensayo. En inmunosensores con microesferas basados en la participación de marcadores enzimáticos, una consecuencia directa de los pequeños volúmenes utilizados es que la dilución del producto enzimático se puede evitar, lo que ayuda en la reducción de los límites de detección. En la mayoría de los inmunosensores con microesferas, después de la inmovilización de un inmunocomplejo enzima-conjugado con las microesferas, una muestra de la solución de las mismas se añade a la solución de sustrato de la enzima que ya está haciendo contacto con un electrodo (por ejemplo, un electrodo de disco rotatorio, un microelectrodo o un IDA) donde la detección se lleva a cabo. Al separar la inmuno reacción de los pasos de detección electroquímica, la superficie del electrodo de trabajo es más accesible para el producto de la enzima, ya que difunde a la superficie del electrodo desnudo [1,64].

Capítulo II. Técnicas

La electroquímica es la rama de la fisicoquímica que estudia la interrelación entre los fenómenos eléctricos y químicos. Las dos grandes áreas de estudio que cubre son la conversión de energía de las reacciones químicas en electricidad (fuentes de energía electroquímica) y las transformaciones de los compuestos químicos debido al pasaje de corriente eléctrica (electrolisis) [65].

Una definición más específica es la siguiente: La electroquímica es la ciencia de la estructura y los procesos en y a través de la interfase entre un conductor electrónico "electrodo" y un conductor iónico "electrolito" o entre dos conductores electrónicos [65].

En la interfase del electrodo, las especies electroactivas disueltas pueden cambiar su estado de oxidación intercambiando al menos un electrón de acuerdo con la siguiente ecuación general:



Donde la especie oxidada *Ox* se encuentra en equilibrio con la especie reducida *Red* y *n* es el número de electrones intercambiados en el proceso. En estas reacciones electroquímicas, ambas especies; la oxidada y la reducida permanecen en la solución, el electrodo es químicamente inerte y se utiliza solo como fuente o vertedero de electrones [66].

Las reacciones electroquímicas involucran especies cargadas cuya energía depende del potencial de la fase que contiene a esas especies, por lo que el paso inicial para las reacciones que tengan lugar en la celda será la transferencia de las especies cargadas (iones o electrones) a través de la interfase de las dos fases adyacentes. La velocidad de transferencia estará relacionada a la diferencia de potencial entre las fases [66].

Una reacción electródica es una reacción interfacial por lo que necesariamente involucra un paso de transferencia de carga. La velocidad de la reacción será determinada por el paso más lento de aquellos que constituyen la reacción y la velocidad total del proceso está relacionada al área de la interfase. Los procesos involucrados en la reacción electródica o de interfase son, reacción química, reorganización estructural, adsorción, además de la transferencia de carga [66].

Proceso de Electrodo

El proceso de electrodo abarca todos los cambios y procesos que ocurren sobre la superficie del electrodo o en su vecindad mientras la corriente fluye a través de la celda electroquímica, por lo que consiste en la reacción electródica y los procesos de transporte de masa [66].

En una reacción sobre la interfase de un electrodo existen al menos tres pasos o etapas:

- Transferencia de masa de los reactivos a la superficie del electrodo
- Transferencia de carga o de electrones
- Transferencia de masa de los productos hacia el seno de la solución

Estas etapas describen reacciones en las que no hay adsorción de reactivos y/o productos sobre la superficie del electrodo [67].

Los procesos de transporte de masa que pueden tener lugar son:

- difusión
- migración
- convección

La difusión siempre debe ser considerada debido a que constantemente el reactivo es consumido y el producto es formado en la superficie del electrodo. La generación de gradientes de concentración entre la vecindad del electrodo y el seno de la solución, induce el proceso de difusión; el reactivo difunde hacia la interfase del electrodo y el producto difunde desde la interfase hacia el seno de la solución [66].

La forma más simple de determinar la velocidad de reacción es medir la corriente que fluye en el circuito eléctrico ($I = dQ/dt$). Como la intensidad de corriente es proporcional al área del electrodo, en orden de caracterizar la velocidad de reacción se utiliza la magnitud densidad de corriente ($j = I/A$). La relación entre la densidad de corriente y la velocidad de reacción por unidad de área (v) es la siguiente:

$$j = nFv \quad (II.2)$$

A partir de esta ecuación es fácil deducir que el área del electrodo de trabajo debe ser muy pequeña para favorecer los procesos sobre el mismo.

Voltamperometría

La voltamperometría es una de las técnicas electroquímicas que estudia procesos en la interfase electródica mediante la aplicación de un potencial E controlado que permite investigar los mecanismos de transferencia electrónica. Consiste en el seguimiento de la intensidad de corriente (I) cuando se aplica a la celda un potencial dado E . El modo predominante de transporte de masa es la difusión, ya que no se agita la solución durante las medidas.

Según como sea la variación del potencial con el tiempo se pueden describir 3 grupos:

- Voltamperometría de barrido lineal
- Cronoamperometría
- Voltamperometría cíclica

Para los tres casos un potencial fijo o variable se aplica al electrodo de trabajo y la corriente que fluye es monitoreada [66].

Se profundizará en las bases de la voltamperometría cíclica ya que es la técnica electroquímica utilizada en el presente trabajo.

II.1- Voltamperometría cíclica

Este tipo de técnica voltamperométrica se caracteriza por la aplicación al electrodo de trabajo, cuyas condiciones son estacionarias y sin agitación de la disolución, de una señal de potencial triangular (figura II.1.1). El potencial aplicado va desde un potencial inicial (E_0) hasta un potencial final (E_f), en el cual se produce una inversión en el sentido del barrido, volviendo a su valor original de E_0 . Este ciclo suele darse varias veces, y los potenciales en los que se da esta inversión de la dirección reciben el nombre de potenciales de inversión.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

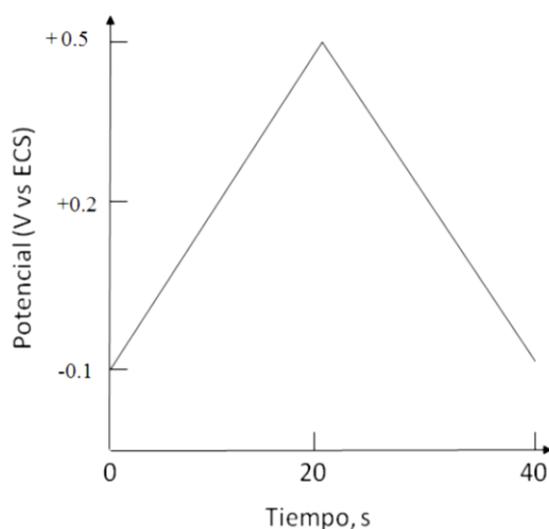


Figura II.1.1. Variación del potencial frente al tiempo en una voltamperometría cíclica [66].

La ventana de trabajo impuesta en cada experimento es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o varios analitos, y la dirección en la que se produce el barrido va a depender de la composición que presente la muestra.

La voltamperometría cíclica es una técnica electroquímica que consiste en imponer al electrodo de trabajo un potencial E variable en el tiempo según una onda triangular y registrar la intensidad de corriente variable ocasionada. Es una técnica de uso frecuente en electroquímica porque ofrece información experimental valiosa que permite comprender los detalles cinéticos y termodinámicos de muchos sistemas químicos [66].

Las aplicaciones de la voltamperometría cíclica son extensas, incluyendo el análisis de sólidos, así como de soluciones, medidas con y sin la adición de electrolito soporte, emulsiones y suspensiones, soluciones congeladas, polímeros, membranas y sistemas líquido/líquido, sistemas biológicos como enzimas, proteínas, ácidos nucleicos y cultivos celulares [66].

La información estructural que se obtiene por voltamperometría cíclica es escasa, por eso se suele acompañar la técnica con diferentes tipos de espectroscopía, balanza de cristal de cuarzo o experimentos basados en la resonancia de plasmón, que proveen de detallada información estructural y de los cambios químicos que acompañan al proceso de transferencia electrónica. Consecuentemente, es necesario complementar la técnica con medidas independientes que concuerden con las conclusiones obtenidas a partir de la voltamperometría para comprender la termodinámica o la cinética del proceso [66].

La forma de las voltamperometrías cíclicas

La voltamperometría cíclica constituye una extensión de la voltamperometría de barrido lineal, en el cual se invierte el sentido del barrido de potencial. El electrodo de trabajo es afectado por una señal de excitación triangular, en la que el potencial se barre linealmente desde un valor inicial E_i , hasta un valor de E_{switch} (potencial de inversión) en el cual se invierte la dirección de barrido hasta un potencial final E_f (figura II.1.1). Cuando se llega al potencial E_f se ha realizado el primer ciclo, que puede continuarse efectuando varios ciclos sucesivos. La onda triangular es simétrica si se utiliza la misma velocidad de barrido en ambos tramos [66].

Durante el curso inicial de un experimento de voltamperometría cíclica, la capa de difusión (δ) se mueve hacia el seno de la solución, se produce un cambio en la concentración generada luego de que cambia la dirección de barrido. El espesor de la capa de difusión para un proceso electroquímico reversible en el momento en que ocurre el pico de intensidad en un punto de referencia útil que está dado aproximadamente por la siguiente ecuación [66]:

$$\delta_{peak} = constante \sqrt{\frac{RTD}{nFv}} \quad (II. 1.1)$$

Donde la *constante* = $0,446^{-1}$, T la temperatura en K, $R = 8,134 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ la constante de los gases, D el coeficiente de difusión de la especie en m^2s^{-1} , n el número de electrones transferidos por cada molécula que difunde hasta el electrodo, $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$ la constante de Faraday, y v la velocidad de barrido en Vs^{-1} [66].

En la figura II.1.2. se muestra el perfil típico de un voltamperograma cuando se evalúa una cupla redox. Los parámetros principales que permiten la identificación del analito son: el potencial de pico anódico (E_{pa}), el potencial de pico catódico (E_{pc}), la corriente de pico anódica (I_{pa}) y la corriente de pico catódica (I_{pc}). El aumento de corriente anódica se debe a la oxidación de la especie electroactiva y en la rama catódica también se observa un aumento de la corriente que es el resultado de la reducción de la especie electroactiva, cuya forma oxidada se ha ido acumulando en las cercanías de la superficie en el transcurso del barrido directo. Para determinar la corriente de pico se traza una línea de base correspondiente a intensidad de corriente nula, que en la figura se muestra como una línea punteada en la base del pico anódico (E_{pa}). Como este proceso de elección de línea de base puede ser dificultoso, se propone utilizar la intensidad en el punto en que se cambia la dirección de barrido. El mismo tratamiento debe realizarse para el pico catódico (E_{pc}) [66]. Este criterio es el que se utiliza en este trabajo. Los valores de E_{pa} y E_{pc} , se utilizan para determinar el potencial medio de pico

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

$E_{1/2}$, para la cupla redox en cuestión, que se calcula $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$ y el $\Delta E_p = \Delta E_{pa} - \Delta E_{pc}$, necesario para establecer si existe reversibilidad [66].

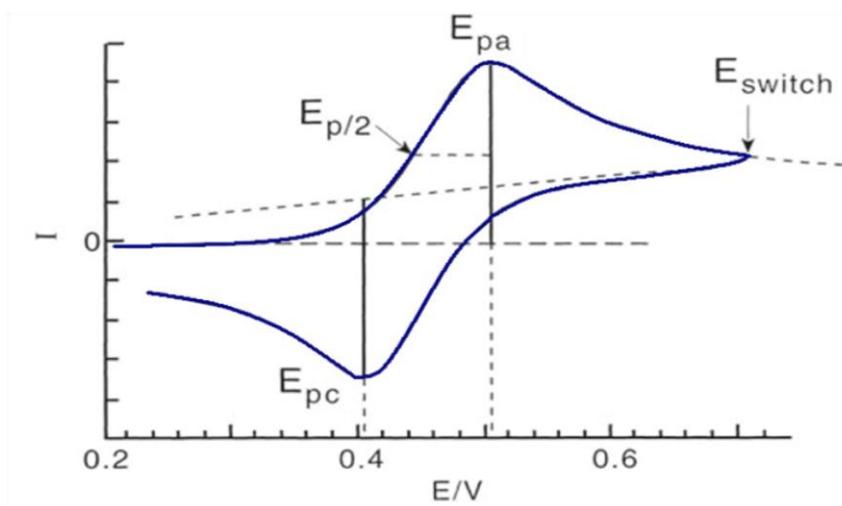


Figura II.1.2. Voltamperograma hipotético de una especie electroactiva, donde se observan los parámetros claves que permiten obtener información sobre la cupla redox [66].

Para una especie electroactiva que presente un voltamperograma como el de la figura II.1.2. (que hace referencia a una cupla reversible) el $E_{1/2}$ a menudo coincide con el potencial al cual la corriente alcanza la mitad del máximo de corriente del pico [66].

El potencial medio de pico se relaciona con el potencial formal definido termodinámicamente $E^{\circ'}$ mediante la siguiente ecuación:

$$E_{1/2} = E^{\circ'} + \frac{RT}{2nF} \ln \left(\frac{D_{\text{red}}}{D_{\text{ox}}} \right) \quad (\text{II. 1.2.})$$

donde D_{red} y D_{ox} son los coeficientes de difusión para la forma reducida y oxidada respectivamente de la especie electroactiva. $E_{1/2}$ y $E^{\circ'}$ usualmente presentan valores cercanos si los coeficientes de difusión son similares. También es posible definir el potencial formal a partir de las concentraciones de las especies oxidada y reducida:

$$E_{1/2} = E^{\circ'} + \frac{RT}{2nF} \ln \left(\frac{\text{Conc}_{\text{ox}}}{\text{Conc}_{\text{red}}} \right) \quad (\text{II. 1.3.})$$

Otro parámetro importante es la relación de las corrientes de pico, que se calcula I_{pa} / I_{pc} . El ratio debe ser 1 para una respuesta voltamperométrica reversible [66].

Se ha observado que los voltamperogramas cíclicos realizados a baja velocidad de barrido tienen una separación de los picos anódico y catódico cercano al valor teórico

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

esperado para un proceso reversible $\Delta E_p = 2.218 \times RT/F = 57 \text{ mV}$ a 298 K, y la corriente de pico aumenta proporcionalmente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido empleada en el registro [66].

Bajo estas condiciones, el proceso es controlado por difusión y en la jerga electroquímica se le llama proceso “reversible” o “Nernstiano” en la escala de tiempo aplicada en el experimento bajo consideración [66].

Mediante medidas de potenciales e intensidades de pico en función de la velocidad de barrido de los picos que señalan transferencia de carga, se puede caracterizar el proceso químico que da lugar a la transferencia de carga [66].

Las principales ecuaciones empleadas en el análisis de datos son las siguientes:

- Para sistemas reversibles:

$$\frac{I_{pc}}{I_{pa}} = 1 \quad (\text{II. 1.4})$$

$$I = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{II. 1.5})$$

Ecuación de Randles – Sevcik

siendo n el número de electrones intercambiado en la reacción, A el área del electrodo (cm^2), C la concentración de reactivo en el seno de la disolución (mol cm^{-3}), y D el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) de las especies oxidada y reducida (supuestos iguales).

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad (\text{II. 1.6})$$

En estos sistemas, E_p es independiente de la velocidad de barrido, mientras que I_p es proporcional a $v^{1/2}$.

- Para sistemas cuasi reversibles:

$$I_p = 0,4463K(\Lambda, \alpha)nFAC_A^0 D^{1/2} v^{1/2} \left(\frac{nF}{RT}\right)^{1/2} \quad (\text{II. 1.7})$$

En estos sistemas, I_p aumenta con $v^{1/2}$ pero no es proporcional a ella. Además, el valor de ΔE_p se aproxima a $60/n$ (mV) a bajas velocidades de barrido, pero se incrementa al aumentar la velocidad de barrido.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

- Para sistemas irreversibles:

$$I_p = (2,99 \cdot 10^5) n(\alpha n_a)^{\frac{1}{2}} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{II. 1.8})$$

Configuración experimental

La configuración experimental normal para realizar medidas de voltamperometría cíclica consiste en una celda electroquímica que contiene tres electrodos, el electrodo auxiliar o contra electrodo, el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, todos inmersos en la celda con la solución de trabajo y conectados a un potenciostato. Éste último permite que la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo pueda ser controlado con una mínima interferencia de caída óhmica, que se controla agregando un electrolito soporte inerte a la solución de trabajo. En esta configuración la corriente que fluye a través del electrodo de referencia también puede ser minimizada evitando la polarización del electrodo de referencia, posibilitando que se mantenga estable el potencial aplicado entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia [66].

El electrodo cuyos procesos son el objeto de estudio, es el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia tiene un potencial prácticamente constante y es utilizado para comparar potenciales de electrodos, por ejemplo para definir el valor del potencial del electrodo en la escala basada en el electrodo normal de hidrógeno (ENH). El electrodo auxiliar mantiene la corriente en el circuito formado con el electrodo de trabajo en experimentos de voltamperometría con celdas de tres electrodos. Su área debe ser mayor a la del electrodo de trabajo [65].

El posicionamiento del electrodo de referencia cercano al electrodo de trabajo ayuda a minimizar la caída óhmica entre los electrodos de referencia y de trabajo debido a la resistencia de la solución.

También puede incorporar a la celda un termómetro para monitorear la temperatura y una entrada de gas argón o nitrógeno para desplazar el oxígeno disuelto en solución.

El funcionamiento del potenciostato se fundamenta en el hecho de que la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia es comparada con un voltaje prefijado. Esta diferencia se amplifica y permite modificar la diferencia de potencial entre el contraelectrodo y electrodo de trabajo ajustando la corriente que circula entre ambos.

Los elementos esenciales para las medidas son, los electrodos, el solvente, el cual usualmente tiene una constante dieléctrica alta (como agua o el acetonitrilo), capaz de

disolver a la especie electroactiva y ayudar al pasaje de corriente, un electrolito soporte que debe ser una sal electroquímicamente inerte, como el perclorato de sodio (NaClO_4), cloruro de sodio (NaCl), tetrabutilamonio, que usualmente es agregado en alta concentración (0,1 M) y permite el pasaje de corriente en la solución, y por último la especie de estudio que típicamente se utiliza en baja concentración, en el orden de 10^{-3} M [66].

Electrodo

En voltamperometría los electrodos son usualmente de metales inertes o de carbono. La superficie del conductor puede ser cubierta con una capa de un conductor secundario como mercurio, óxidos o polímeros, o con una monocapa de moléculas como tioles, e incluso biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas. Estos conductores se llaman electrodos modificados [66].

La preparación química del electrodo puede ser realizada previamente a la medida, en un procedimiento independiente, o *in situ*, como parte integral del protocolo experimental [66].

Salvo algunas excepciones, se requiere que el electrodo no reaccione con el solvente o con el electrolito soporte. Esta cualidad está presente en los metales nobles, el carbono vítreo y el carbono grafito [66].

II.2- Espectroscopía infrarroja

La radiación electromagnética puede describirse en función de la frecuencia ν o de la longitud de onda λ . Ambos parámetros se relacionan entre sí a través de la velocidad de la luz según la ecuación:

$$c = \lambda\nu \quad (\text{II. 2.1})$$

La relación frecuencia-longitud de onda conduce al espectro electromagnético.

El espectro se divide en regiones según sus aplicaciones en espectroscopía. De la expresión:

$$E = h\nu = h \left(\frac{c}{\lambda} \right) \quad (\text{II. 2.2})$$

se puede ver que la energía de una radiación aumenta al incrementar la frecuencia y disminuye al aumentar la longitud de onda.

La luz visible es la pequeña fracción del espectro electromagnético con longitudes de onda entre 400 y 800 nm. Por debajo de la región de longitud de onda visible se encuentra la radiación ultravioleta (UV) de mayor energía. La radiación infrarroja (IR) está situada en regiones de longitud de onda mayor (menor energía) que la luz visible.

La absorción de energía electromagnética de diferentes longitudes de onda produce diferentes estados excitados en las moléculas. La radiación infrarroja corresponde a energías relacionadas con las vibraciones moleculares. Una muestra introducida en un espectrofotómetro infrarrojo y expuesta a longitudes de onda de radiación infrarroja continuamente cambiantes absorberá luz cuando la radiación incidente corresponda a la energía de una vibración molecular concreta.

Los espectrofotómetros de infrarrojo típicos cubren las regiones de tensión y de deformación molecular. La absorción de radiación se registra y se obtiene un espectro infrarrojo. Los instrumentos modernos registran la absorción de energía en función de las frecuencias decrecientes (energía decreciente) de izquierda a derecha. Una unidad relacionada con la frecuencia y denominada número de onda se utiliza habitualmente y se expresa en cm^{-1} [68].

Principios de la espectroscopia infrarroja

Los átomos de una molécula vibran de forma diversa pero siempre según niveles de energía cuantizados y específicos. Existen $3n - 6$ modos de vibración, los de interés para la espectroscopia infrarroja son las vibraciones de tensión (simétrica y anti simétrica), la flexión en el plano, la oscilación en el plano, el balanceo fuera del plano y la torsión fuera del plano.

Las energías de las vibraciones de tensión de las moléculas orgánicas corresponden a una radiación infrarroja con números de onda comprendidos entre 1200 y 4000 cm^{-1} . Esta parte del espectro infrarrojo es de particular utilidad para detectar la presencia de grupos funcionales en los compuestos orgánicos. De hecho a menudo se la denomina la región de los grupos funcionales ya que la mayoría de los grupos funcionales de interés presentan absorciones características y relativamente invariantes a dichas longitudes de onda [68].

La presencia de una señal de absorción en la región de los grupos funcionales de un espectro infrarrojo es casi siempre una indicación definida de que algún grupo funcional determinado se halla presente en la muestra. La ausencia de señal en la zona específica determinada de la región de grupos funcionales significa en general que el grupo que absorbe en dicha región no se halla presente.

La región del espectro infrarrojo de frecuencias inferiores a 1600 cm^{-1} muestra en general un número abundante de bandas. Además de algunas vibraciones de tensión características de algunos enlaces sencillos, existen numerosas bandas correspondientes a deformaciones moleculares así como algunos sobretonos y combinaciones. Existen demasiadas bandas presentes como para una interpretación completa pero sin embargo, el conjunto de señales es de gran utilidad para el análisis final de la muestra ya que las bandas son características de cada compuesto por lo que parte del espectro es denominada frecuentemente la región de la huella dactilar.

Los espectros infrarrojos pueden ser obtenidos de muestras sólidas, líquidas o gaseosas. Una característica interesante del método es que el vidrio no es transparente a la radiación infrarroja por lo que las muestras se introducen en pastillas generalmente fabricadas con cristales salinos [68].

Absorciones características en el infrarrojo

Los espectros infrarrojos de los compuestos orgánicos son por lo general demasiado complejos para utilizarlos de una forma tan completa como puede hacerse con un espectro RMN. Sin embargo se puede obtener una información útil examinando las frecuencias características de los grupos, es decir las bandas de absorción típicas de grupos funcionales específicos. La relación de frecuencias características de los grupos se ha elaborado a partir de espectros infrarrojos de un gran número de compuestos. Por ejemplo, se ha encontrado que existen frecuencias de tensión características para los siguientes enlaces [69]:

- 2800 a 3300 cm^{-1} para enlaces C—H.
- Bandas de absorción anchas entre 3200 a 3600 cm^{-1} para enlaces O—H. Un grupo hidroxilo libre da lugar a una banda aguda a unos 3600 cm^{-1} y la señal ancha normalmente observada es consecuencia de interacciones por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo.
- Cuando el hidroxilo forma parte de un grupo carboxilo se observa una banda muy ancha entre 2500 y 3600 cm^{-1} . Este hecho combinado con la absorción de tensión carbonílica hacia 1710 cm^{-1} es característico de los ácidos carboxílicos.
- La región entre 1900 y 2500 cm^{-1} suele estar relativamente libre de bandas de absorción. Las frecuencias de tensión de los triples enlaces de los alquinos y de los nitrilos a 2100 - 2200 cm^{-1} son las absorciones más comunes que aparecen en dicha región.

- La región de $1670-1620\text{ cm}^{-1}$ corresponde al grupo funcional SH, la región $1670-1620$ corresponde a los grupos carboxilato y la que va de $3650-3250$ a los grupos funcionales nitrogenados.

II.3- Espectroscopía UV-visible

Cuando las moléculas interactúan con la energía radiante en la región visible y ultravioleta del espectro electromagnético, la absorción de energía implica un desplazamiento de un electrón externo en la molécula. Los modos rotacionales y vibracionales se encuentran combinados con las transiciones electrónicas. Se podría decir que el espectro brinda información sobre la estructura total de la sustancia, más que sobre la presencia de enlaces específicos. Debido a que no se encuentra un espectro electrónico único; esta región es pobre para identificar productos con el método de "huella digital", por lo que la información obtenida de esta región del espectro debe ser combinada con otras evidencias para saber de qué compuesto se trata – por ejemplo, los antecedentes del compuesto, su síntesis, pruebas químicas auxiliares y otros métodos espectroscópicos.

En los compuestos covalentes saturados que contienen heteroátomos, como nitrógeno, oxígeno, azufre y halógenos, se encuentran presentes electrones p no enlazantes, además de los electrones σ . La energía absorbida se utiliza para la excitación de un electrón que se desplaza de un orbital p a un orbital antienlazante σ^* , es decir una transición del tipo $p \rightarrow \sigma^*$, como ocurre en éteres, aminas, sulfuros y halogenuros de alquilo. En compuestos insaturados la absorción resulta del desplazamiento de electrones π . Las moléculas que contienen solo un tipo de grupos de absorción, son llamados cromóforos [70].

Moléculas con dos o más cromóforos aislados absorben radiación de aproximadamente la misma longitud de onda que una molécula que contiene un solo cromóforo de un tipo particular, pero la intensidad de la absorción es proporcional al número de ese tipo de cromóforos en la molécula. Los cromóforos no interactúan a menos que estén ligados directamente; la interposición de solo un grupo metileno o de un orientador meta sobre un anillo aromático es suficiente para aislar casi completamente a los cromóforos de los demás. Sin embargo, ciertas combinaciones de grupos funcionales dan lugar a bandas de absorción características.

Una gran cantidad de información "negativa" puede deducirse observando las estructuras moleculares. Si un compuesto es altamente transparente en la región de 200 a 800 nm, no posee sistemas bencénicos, ni insaturados, ni grupos ceto, ni

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

aldehído, ni grupos nitro, ni bromo ni yodo. Si la información conocida sobre el compuesto indica la presencia de cromóforos, se obtienen las longitudes de onda de los máximos de absorción y se busca identificarlas con los cromóforos conocidos que se encuentran en tablas. Información adicional puede deducirse de la forma, la intensidad y la localización detallada de las bandas [70].

Capítulo III. Sistema de estudio

En este trabajo se propone la creación de un biosensor basado en el uso de cobre como soporte, material elegido por ser de bajo costo y por sus excelentes cualidades conductoras [71]. El cobre fue modificado con un tiol, el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), para posteriormente inmovilizar un anticuerpo (antiPr). Se obtuvo así un electrodo modificado Cu/TBA/antiPr, que contiene el anticuerpo capaz de captar selectivamente a la progesterona (hormona), para que luego el biosensor Cu/TBA/antiPr/Pr sea capaz de dar una respuesta positiva o negativa, a la presencia de receptores tumorales hormono dependientes de progesterona en una solución que contiene extracto de tejidos de útero (animal).

Una de las etapas cruciales es la inmovilización de la biomoléculas de interés, antiPr y Pr sobre la superficie del dispositivo metálico. En este estudio se utilizó el método de formación de monocapas de tioles autoensamblados (SAMs). Como se explicara anteriormente, la formación de la SAMs es inducida por la fuerte quimisorción entre el cobre metálico y el grupo S terminal del tiol. En este trabajo el metal se modificó mediante inmersión del Cu en una solución diluida del tiol a temperatura ambiente, con la finalidad de obtener una superficie organizada y bien definida del tiol sobre el metal.

Las SAMs pueden caracterizarse por una serie de métodos que incluyen medidas físicas como ángulo de contacto, medidas electroquímicas como voltamperometría cíclica (VC) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), métodos espectroscópicos como infrarrojo y XPS y microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), entre otros. De todos ellos, VC y EIS son especialmente rápidos y útiles para el monitoreo de la calidad de la película formada en un biosensor.

A continuación se describirán con mayor detalle los componentes del sistema de estudio de este trabajo.

- **Tiol:** Ácido 2-tiobarbiturico (TBA)

El primer paso de ensamblado del inmunosensor construido en este trabajo es la incubación del electrodo desnudo de cobre en una solución acuosa de TBA de forma de crear una monocapa de moléculas del mismo sobre la superficie del cobre. De esta forma la monocapa de tioles puede luego interactuar con el anticuerpo a través de fuerzas de van der Waals y/o establecimiento de interacciones electrostáticas en el segundo paso de bioensamblado.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

La elección del TBA en particular se debe a su composición, ya que una vez unido al metal posee grupos funcionales que puede utilizar para establecer interacciones con la biomolécula, y también por su tamaño, ya que una vez formada, la monocapa permite acortar el camino de los electrones permitiendo que se produzca la transferencia de carga a través de ella [72].

Se han reportado 10 posibles formas tautoméricas del TBA (figura III.1), lo cual permite observar la variedad de posibilidades de unión al metal y a una biomolécula, debido a la presencia de átomos electronegativos como el S, N y el O.

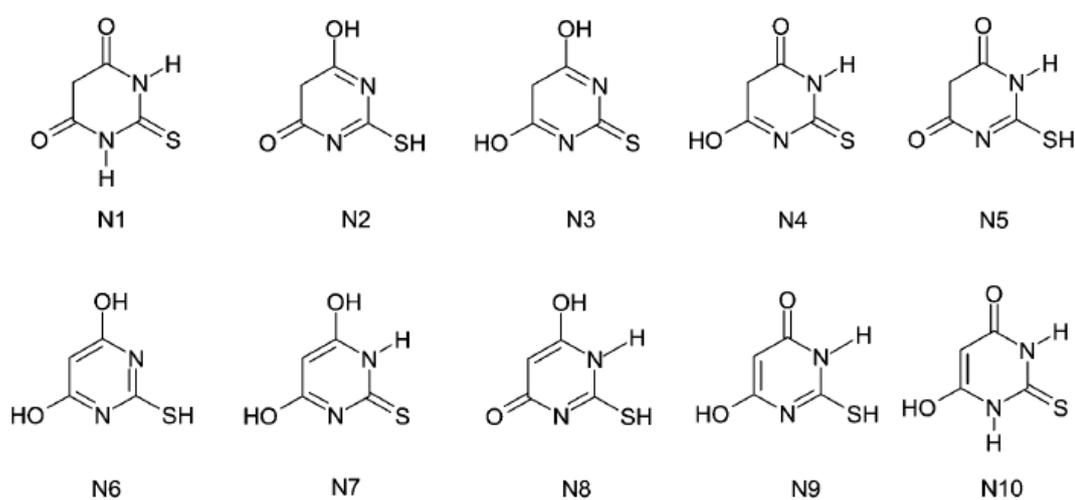


Figura III.1. Posibles formas tautoméricas del ácido 2-tiobarbitúrico [72].

- **Progesterona**

La progesterona, también conocida como P4 (pregn-4-en-3,20-diona), es una hormona esteroide C-21 involucrada en el ciclo menstrual femenino y embriogénesis de los humanos y otras especies (figura III.2). Pertenece a una clase de hormonas llamadas progestágenos, y es el principal progestágeno humano de origen natural. Su fuente principal es el ovario (cuerpo lúteo) y la placenta, si bien también puede sintetizarse en las glándulas adrenales y en el hígado.

La progesterona es una de las hormonas sexuales que se desarrollan en la pubertad y en la adolescencia en el sexo femenino, actúa principalmente durante la segunda parte del ciclo menstrual, deteniendo los cambios endometriales que inducen los estrógenos y estimulando los cambios madurativos, preparando así al endometrio para la implantación del embrión. Estos efectos también ocurren en las mamas. La

progesterona también se encarga de engrosar y mantener sujeto al endometrio en el útero: al bajar sus niveles, el endometrio se cae, produciendo la menstruación. Es la hormona responsable del desarrollo de caracteres sexuales secundarios en una mujer, y sirve para mantener el embarazo [73].

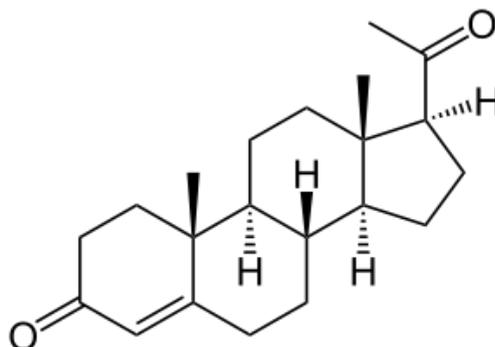


Figura III.2. Estructura de la hormona progesterona.

- **Receptores tumorales**

Los receptores de hormonas son proteínas, que entre otras funciones tienen la de recibir las señales hormonales que ordenan a las células multiplicarse. Se encuentran en el interior y sobre la superficie de ciertas células del cuerpo. Estas proteínas receptoras funcionan como si fueran los ojos y oídos de las células, ya que reciben mensajes de sustancias que circulan por el torrente sanguíneo y les indican qué hacer. En otras palabras, los receptores actúan como un interruptor que activa o desactiva una función particular en la célula. Si la sustancia adecuada se acopla al receptor, como una llave que encaja en una cerradura, el interruptor se activa e inicia una función específica de la célula.

En el caso de tumores mamarios o uterinos si poseen receptores de progesterona, se denomina receptor de progesterona positivo (RP+). Esto quiere decir que las células cancerígenas pueden recibir señales de la progesterona que estimulan su crecimiento.

El análisis para la detección de receptores de hormonas es importante ya que los resultados permiten determinar si es probable que el cáncer responda a la hormonoterapia. Si es así, para interrumpir la influencia de las hormonas en el crecimiento y el funcionamiento general de las células, se elimina o se bloquea la hormona, tal como lo hacen estos medicamentos de forma que las células cancerígenas tienen menos probabilidades de sobrevivir.

Si el cáncer es de tipo receptor de hormonas negativo (no hay receptores presentes), es probable que la hormonoterapia no funcione [74,75].

Se ha evidenciado en varios estudios la presencia de receptores de hormona progesterona y también estrógeno en glándulas mamarias y endometrio (útero), por lo que es de suma importancia su detección ya que como se menciona anteriormente, las células cancerígenas pueden recibir señales de la progesterona que estimulan su crecimiento por lo tanto se tendría que diagnosticar hormonoterapia para poder combatir las [76-78].

III.1- Materiales y métodos

III.1.1. Reactivos utilizados

- Ácido 2-tiobartitúrico (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$)
- Anti-Progesterona (Sigma-Aldrich N° de catálogo P5289), antisuero monoclonal producido en conejo utilizando como inmunógeno progesterona-11 α -BSA.
- Cupla redox cloruro de hexaaminorutenio (III) ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, Sigma, $\geq 98.0\%$)
- Electrolito soporte perclorato de sodio (NaClO_4 , Sigma Aldrich, $\geq 98.0\%$)
- Progesterona Sigma ($\geq 99\%$)
- Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, fracción V, $\geq 98.0\%$), PM: 66500 Da
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck, $\geq 99\%$)
- Muestra de tejido animal uterino con receptores para progesterona.

Las soluciones se prepararon usando agua Milli-Q (18.2 M Ω .cm).

III.1.2 Metodología de estudio: ensamblado del biosensor

Los electrodos de cobre policristalino (Cu-pc) utilizados fueron construidos en nuestro laboratorio a partir de trozos cortados de una varilla del mencionado material (Goodfellow, pureza 99.99 %, diámetro 4.8 mm) y montados dentro de un tip de plástico, verificando la obtención de una superficie uniforme y espejada, con un área similar para los diferentes electrodos usados. Luego de comprobar la correcta construcción, los electrodos atravesaron una serie de etapas de modificación, cada una de ellas monitoreadas por medidas de voltamperometría cíclica [71].

Estas medidas fueron realizadas en presencia de una cupla redox, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}/[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$, en un rango de potenciales aplicados fijo ($E_i = -0,4$ a $E_f = -0,03$ V) a diferentes velocidades de barrido en el rango 0.002 a 0.050 V/s). Para obtener el electrodo modificado con tiol, el procedimiento consistió en sumergir el Cu recién

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

pulido en una solución acuosa 2 mM de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). El tiempo de incubación fue aproximadamente 30 minutos [79].

Luego el electrodo de Cu/TBA se enjuaga con abundante agua y se sumerge en una solución de anti-progesterona (antiPr) en buffer tris con NaCl 0.15 M a pH 8.0 por aproximadamente 13 días a 5 °C.

En el tercer paso se ensambló la progesterona (Pr), incubando el electrodo Cu/TBA/antiPr en una solución 0.1 mM de progesterona en buffer Tris a pH 7.5 y etanol absoluto en proporción 20/1, por aproximadamente 4 días a 5 °C. Finalmente el electrodo Cu/TBA/antiPr/Pr fue incubado por 7 días a 5 °C en una muestra de extracto de útero animal conteniendo receptores para progesterona [80,81]. Paralelamente se realizó un blanco del biosensor en el cual el electrodo Cu/TBA/antiPr/Pr fue incubado en una solución 0.5 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA).

Las figuras III.3 y III.4, que se muestran a continuación, esquematizan los pasos de modificación del electrodo de cobre y el biosensor obtenido luego del ensamblado de sus componentes.

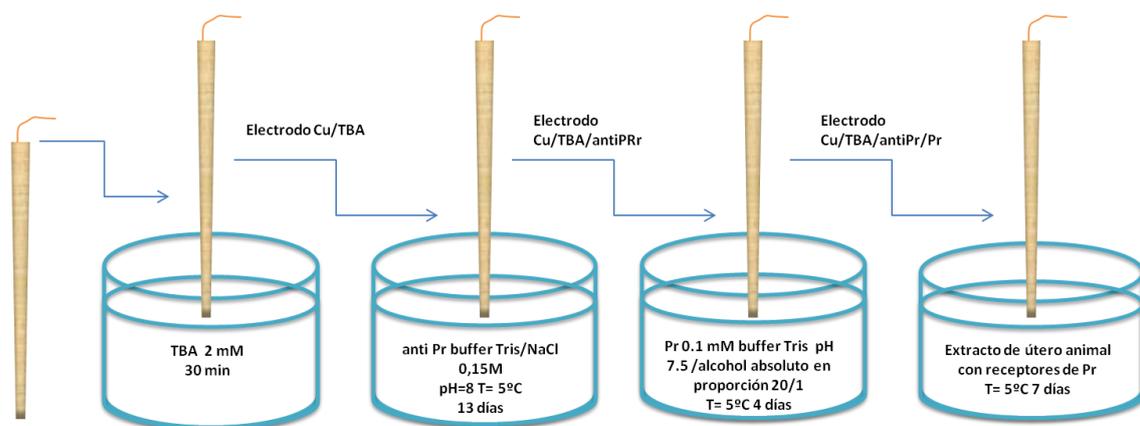


Figura III.3. Esquema de los pasos seguidos para el ensamblado del inmunosensor de estudio.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

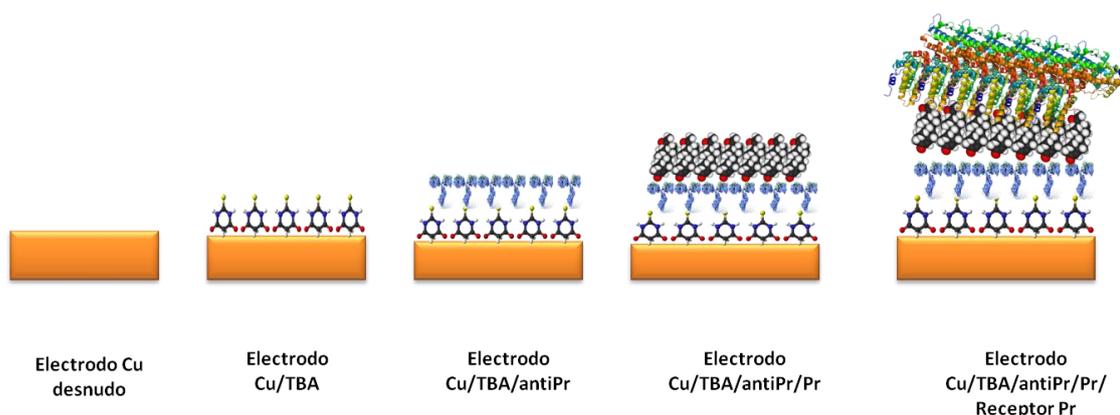


Figura III.4. Esquema ilustrativo de las etapas de ensamblado del inmunosensor electroquímico del presente trabajo visualizando la metodología *layer by layer*.

III.1.3 Evaluación por voltamperometría cíclica del ensamblado del biosensor

Las condiciones en las cuales se realizaron los perfiles voltamperométricos de los electrodos de trabajo fueron:

- Solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0,1 M
- Contraelectrodo de platino (Pt)
- Electrodo de Referencia Hg/Hg₂Cl₂ (SCE) ($E^0 = 0,248$ V vs. ENH)
- Rango de velocidades de barrido 0.05 V/s a 0.002 V/s
- Límites de barrido ($E_i = -0,4$ a $E_f = -0,03$ V)

III.1.4. Complejo Cu-TBA

Como estudio complementario, se realizó la síntesis y caracterización por espectroscopía visible y FTIR del complejo Cu-TBA, ya que es una de las especies que podría formarse sobre el electrodo y por ello presentar una contribución en el perfil voltamperométrico del sistema [79,82,83].

El complejo metálico fue preparado a partir del agregado gota a gota de una disolución saturada en el ligando TBA (8.01×10^{-4} mol en 10 ml de agua) a una disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (8.01×10^{-4} mol en 10 ml) en el mismo solvente (relación molar 1:1). En todo momento se monitoreó el valor del pH de la mezcla. El pH inicial de la disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fue de 4.14, disminuyendo con el agregado del ligando, hasta el punto en que la mezcla comenzaba a tornarse turbia. Alcanzado este punto se pasó a aumentar

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

el pH por agregado de una disolución diluida de NaOH, observando cambio de color de la solución, la cual pasó de celeste a azul marino muy oscuro. El pH final fue 5.23. La mezcla de reacción se centrifugó durante 10 min a 5000 rev/min. El precipitado resultante fue lavado con agua y centrifugado por otros 10 min a 5000 rev/min. Luego se realizaron 3 lavados con etanol y un último lavado con éter, siguiendo el mismo procedimiento. El precipitado obtenido, correspondiente al complejo Cu-TBA, es de color marrón.

La caracterización del complejo fue realizada por espectroscopía visible y por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Los espectros infrarrojos en el estado sólido de todos los compuestos fueron obtenidos en un espectrofotómetro FTIR Prestige Shimadzu 21 en pastillas de KBr al 1%. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente. Los espectros muestran la zona del infrarrojo medio: $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, 60 escaneos con resolución 4 cm^{-1} para el $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 2 cm^{-1} para el complejo Cu-TBA. La función de apodización en todos los casos fue *Happ-Genzel*.

Además del espectro FTIR se registró el espectro visible del complejo (región 550 a 800 nm). Debido al que el complejo es muy poco soluble se realizó una solución en etanol y luego de unos minutos se midió el espectro del sobrenadante. El espectrofotómetro utilizado fue UV-visible-NIR Shimadzu UV-1603, paso óptico de la celda 1.00 cm.

Capítulo IV. Resultados y discusión

IV.1- Voltamperometría Cíclica

En cada etapa de ensamblado del biosensor se observaron cambios en los perfiles de los voltamperogramas obtenidos en presencia de la cupla redox. A continuación se muestran dichos perfiles voltamperométricos en sus diferentes etapas de ensamblado de forma de poder discutir estos cambios.

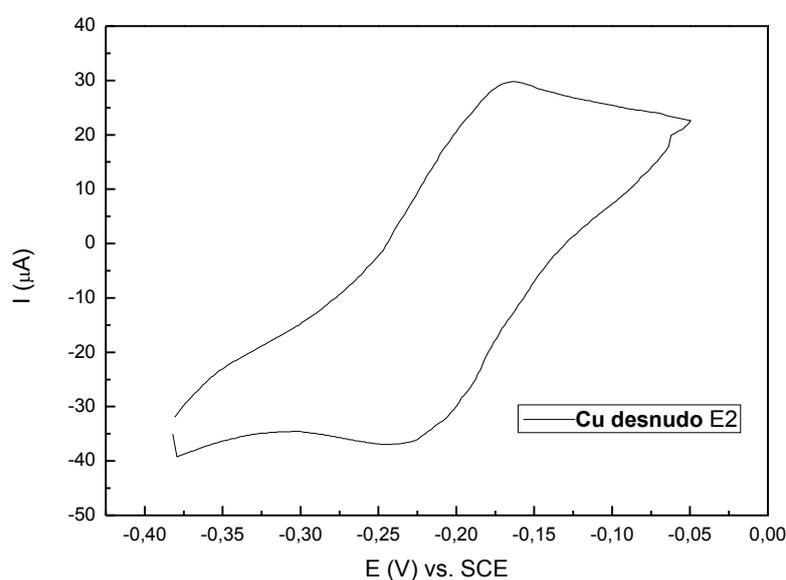


Figura IV.1.1. Perfil voltamperométrico del electrodo de trabajo de Cu-pc en solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0.1 M. Velocidad de barrido 0.05 V/s.

En la figura IV.1.1 se observa un pico anódico en $E_{pa} = -0.175$ V y un pico catódico en $E_{pc} = -0.225$ V, los cuales se atribuyen a la oxidación y reducción del Ru de la cupla redox.

La etapa de formación de la SAMs se muestra en la Figura IV.1.2, donde se pueden ver los cambios en el perfil voltamperométrico luego de incubar el electrodo de trabajo de Cu en una solución 2 mM de TBA durante 30 minutos.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

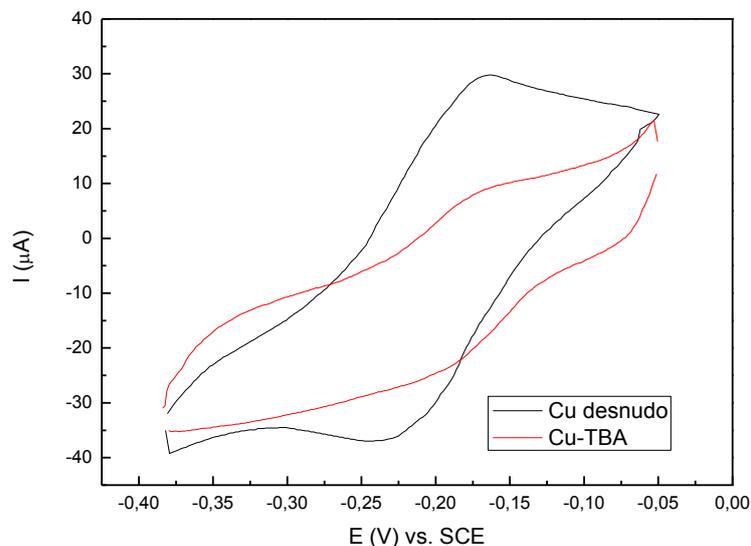


Figura IV.1.2. Perfil voltamperométrico del electrodo de trabajo de Cu-pc (negro) y su perfil luego de ser incubado con TBA (2 mM) durante 30 minutos (rojo), en solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0.1 M. Velocidad de barrido 0.05 V/s

En esta primera etapa del ensamblado se observa cómo el perfil voltamperométrico cambia al formarse el electrodo de Cu/TBA, donde la intensidad de corriente de los picos de la cupla redox bajó levemente, obteniéndose un perfil voltamperométrico repetitivo.

De esta forma podríamos afirmar que el TBA se adsorbió sobre la superficie de cobre produciendo un pequeño cambio en la intensidad de corriente de pico pero permitiendo la transferencia de carga hacia el soporte metálico de cobre, ya que en el perfil se siguen observando los picos de potencial característicos de la cupla redox. El otro cambio observado, atribuible en principio a la formación sobre la superficie del cobre de un complejo usando al TBA como ligando, se relaciona con el aumento de la intensidad de corriente en el rango -0.1/-0.05 V. Este incremento podría deberse a un proceso de oxidación relacionado con el centro metálico del mencionado complejo. Al alcanzar el valor de $E = -0.1$ V, se estaría alcanzando el potencial de disolución del metal. Al disolverse, el Cu^{2+} se encontraría con moléculas de TBA presentes en la solución, formando de esta manera el complejo mencionado.

A continuación, el electrodo Cu/TBA fue incubado en solución de antiPr en buffer tris con NaCl 0.15 M a pH 8.0 por aproximadamente 13 días a 5 °C. El resultado obtenido se muestra en la figura IV.1.3.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

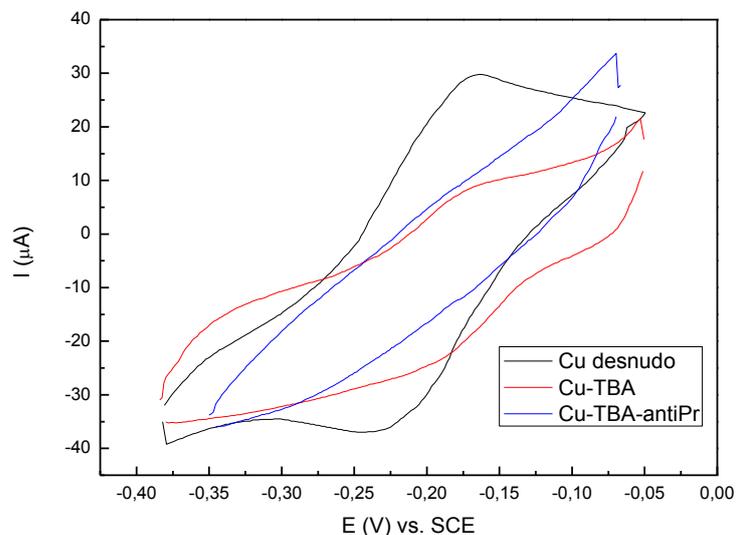


Figura IV.1.3. Perfil voltamperométrico del electrodo de trabajo de Cu-pc (negro), su perfil luego de ser incubado con TBA (2 mM) durante 30 minutos (rojo) y su perfil luego de ser incubado en solución de antiPr en buffer Tris con NaCl 0.15 M a pH 8.0 por aproximadamente 13 días a 5 °C (azul), en solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0.1 M. Velocidad de barrido 0.05 V/s.

En este caso se observa que el perfil voltamperométrico cambia drásticamente con la adsorción del antiPr. Nuevamente se detecta una disminución en la intensidad de corriente lo que también indicaría que el antiPr se adsorbe a la superficie. Los picos correspondientes a la cupla redox de rutenio dejan de ser detectables cuando se produce el ensamblado sobre el electrodo del anticuerpo. Esto muestra dos hechos: (a) que el complejo de rutenio no es capaz de llegar a la superficie del electrodo para transferir la carga porque el anticuerpo adsorbido a la superficie se lo impide, y (b) que la película de anticuerpo formada es aislante, impidiendo la transferencia electrónica a través de ella. Esto último es confirmado además por la gran caída óhmica observable en el perfil voltamperométrico.

En la figura IV.1.4 se muestran los cambios observados luego del último paso de ensamblado, en el cual el electrodo Cu/TBA/antiPr es incubado en una solución 0.1 mM de progesterona en una mezcla de buffer Tris a pH 7.5 y etanol absoluto en proporción 20/1, por aproximadamente 4 días a 5 °C.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

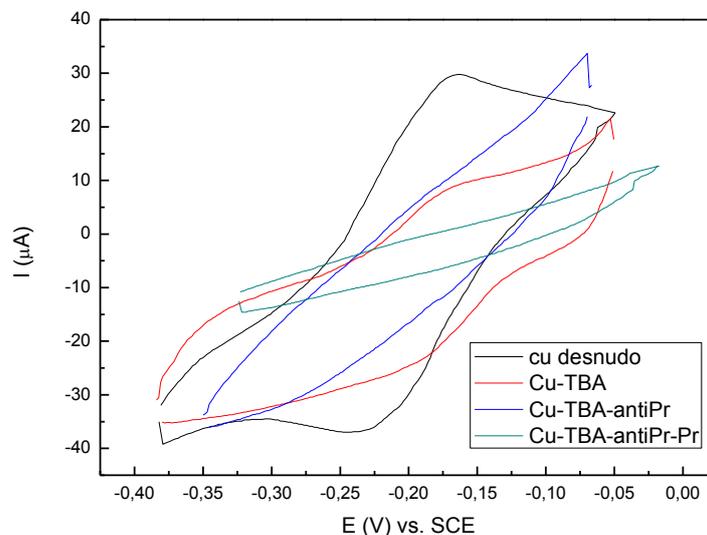


Figura IV.1.4. Perfil voltamperométrico del electrodo de trabajo de Cu-pc (negro), su perfil luego de ser incubado con TBA (2 mM) durante 30 minutos (rojo), su perfil luego de ser incubado en solución de antiPr en buffer Tris con NaCl 0.15 M a pH 8.0 por aproximadamente 13 días a 5 °C (azul) y su perfil luego de ser incubado en una solución 0.1 mM de progesterona en buffer Tris a pH 7.5 y etanol absoluto en proporción 20/1, por aproximadamente 4 días a 5 °C (verde), en solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0.1 M. Velocidad de barrido 0.05 V/s.

Nuevamente, se observa un notorio cambio en la intensidad de los picos para el perfil voltamperométrico del electrodo Cu/TBA/antiPr/Pr con respecto a las etapas de modificación anteriores, indicando que la progesterona se adsorbió a la superficie. La progesterona formaría una capa más conductora, razón por la cual disminuye notoriamente la doble capa del voltamperograma.

Por último, la figura IV.1.5 muestra los resultados registrados luego de incubar al electrodo Cu/TBA/antiPr/Pr durante 7 días a 5 °C en un extracto de útero (animal) que contenía receptores para progesterona.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

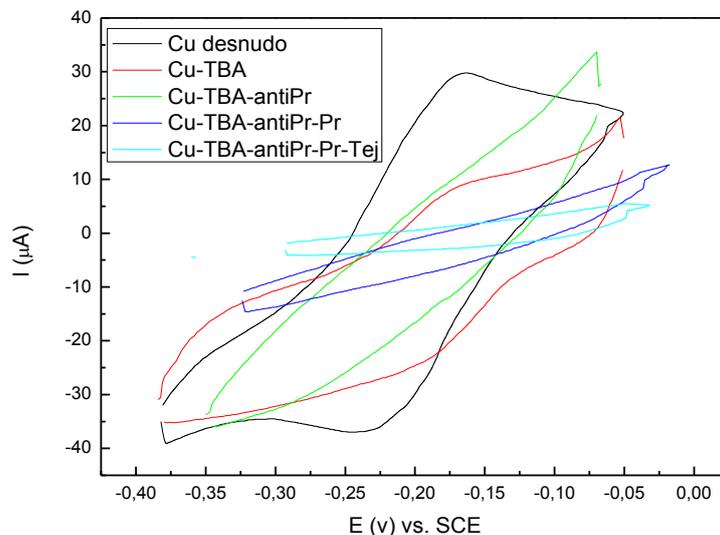


Figura IV.1.5. Perfil voltamperométrico del electrodo de trabajo de Cu-pc (negro), su perfil luego de ser incubado con TBA (2 mM) durante 30 minutos (rojo), su perfil luego de ser incubado en solución de antiPR en buffer Tris con NaCl 0.15 M a pH 8.0 por aproximadamente 13 días a 5 °C (verde), su perfil luego de ser incubado en una solución 0.1 mM de progesterona en buffer Tris a pH 7.5 y etanol absoluto en proporción 20/1, por aproximadamente 4 días a 5 °C (azul) y por último su perfil luego de ser incubado por 7 días a 5 °C en un extracto de útero (animal) que contenía receptores para progesterona (celeste), en solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0.1 M. Velocidad de barrido 0.05 V/s.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el electrodo modificado Cu/TBA/antiPr/Pr podría llegar a detectar presencia de receptores de progesterona en extracto de útero animal ya que la intensidad de corriente (y los valores de caída óhmica) en el voltamperograma vuelven a cambiar drásticamente luego de la incubación en el extracto de tejido de útero (animal). De esta forma, el sensor podría funcionar como un marcador positivo o negativo para presencia de receptores de Pr en tejidos.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

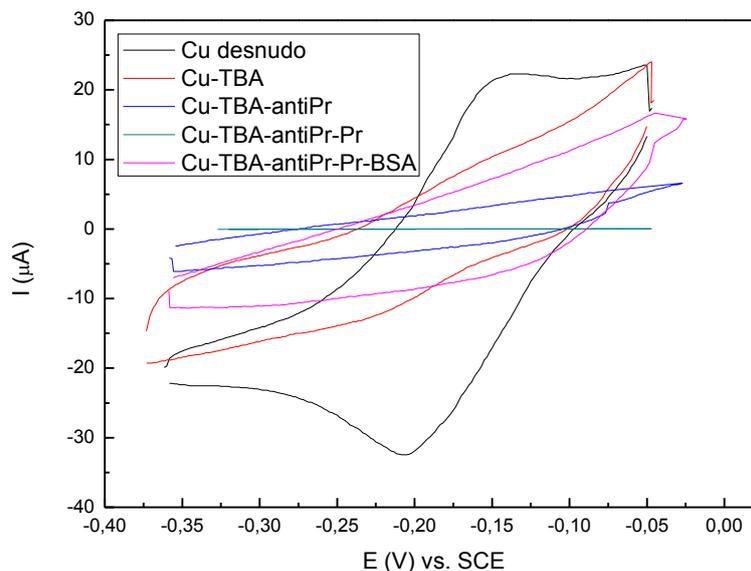
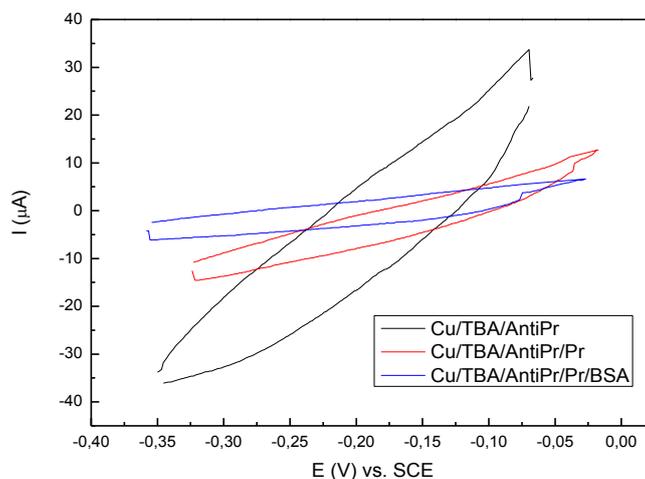


Figura IV.1.6. Perfil voltamperométrico del electrodo de trabajo de Cu-pc (negro), su perfil luego de ser incubado con TBA (2 mM) durante 30 minutos (rojo), su perfil luego de ser incubado en solución de antiPR en buffer Tris con NaCl 0.15 M a pH 8.0 por aproximadamente 13 días a 5 °C (rosado), su perfil luego de ser incubado en una solución 0.1 mM de progesterona en buffer Tris a pH 7.5 y etanol absoluto en proporción 20/1, por aproximadamente 4 días a 5 °C (azul) y por último su perfil luego de ser incubado por 7 días a 5 °C en albúmina sérica bovina (BSA) 0.5 mg/ml (verde), en solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0.1 M. Velocidad de Barrido 0.05 V/s.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

a)



b)

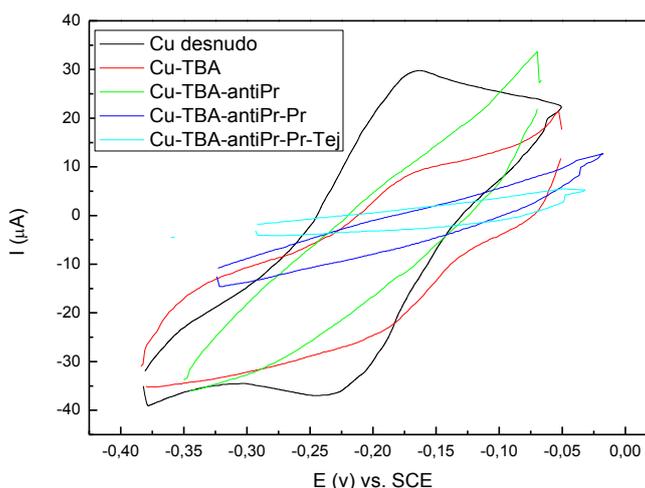


Figura IV.1.7.a) Perfil voltamperométrico del electrodo de trabajo de Cu-pc luego de ser incubado con TBA (2 mM) durante 30 minutos y en solución de antiPr en buffer Tris con NaCl 0.15 M a pH 8.0 por aproximadamente 13 días a 5 °C (negro), su perfil luego de ser incubado en una solución 0.1 mM de progesterona en buffer Tris a pH 7.5 y etanol absoluto en proporción 20/1, por aproximadamente 4 días a 5 °C (rojo) y por último su perfil luego de ser incubado por 7 días a 5°C en albúmina sérica bovina (BSA) 0.5 mg/ml (azul), en solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0.1 M. Velocidad de barrido 0.05 V/s. **b)** Perfil voltamperométrico del electrodo de trabajo de Cu-pc (negro), su perfil luego de ser incubado con TBA (2mM) durante 30 minutos (rojo), su perfil luego de ser incubado en solución de antiPr en buffer tris con NaCl 0.15 M a pH 8.0 por aproximadamente 13 días a 5 °C (verde), su perfil luego de ser incubado en una solución 0.1 mM de progesterona en buffer Tris a pH 7.5 y etanol absoluto en proporción 20/1, por aproximadamente 4 días a 5 °C (azul) y por último su perfil luego de ser incubado por 7 días a 5 °C en un extracto de útero (animal) que contenía receptores para progesterona (celeste), en solución 1 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en electrolito soporte NaClO_4 0,1 M. Velocidad de barrido 0.05 V/s.

Finalmente, se llevaron adelante experimentos en presencia de una proteína, la BSA, para realizar medidas blanco y verificar si el electrodo que contiene Pr detecta en forma selectiva la presencia de receptores.

En las figuras IV.1.6 y IV.1.7 se observa el perfil obtenido para el electrodo modificado Cu/TBA/antiPr/Pr luego de ser incubado en presencia de BSA 0.5 mg/ml. Después de incubar, no se observó un descenso en la intensidad de los picos de la cupla de Ru, demostrando que el biosensor construido es específico para receptores de PR y no captaría otros integrantes del extracto evaluado. Más aún, el perfil obtenido es muy similar al del electrodo Cu/TBA, lo cual afirma que la incubación en solución de BSA, tuvo como único efecto desorber la anti-Pr adsorbida sobre el electrodo. Si bien la proteína elegida no es el mejor blanco para el caso en estudio, permite igual pronosticar la especificidad del electrodo de Cu/TBA/antiPr/Pr para receptores de Pr.

IV.1.1- Análisis de la cupla redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} / [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$

Como se explicara, el proceso de ensamblado del electrodo desde el sustrato metálico de cobre hasta el biosensor que contiene la Anti-Pr y la Pr, se basa exclusivamente en el análisis de los cambios observados en el comportamiento de la cupla redox utilizada. Si bien se prepara la solución a partir del reactivo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, el complejo de Ru(II) se genera sobre el electrodo al ciclar entre los potenciales seleccionados.

A partir de la altura de los picos de intensidad de corriente observados en el registro voltamperométrico es posible obtener información acerca del número de electrones intercambiados, del área real del electrodo, del coeficiente de difusión de los componentes de la cupla y de la concentración de especie electroactiva en el seno de la solución. Además a partir de los valores de la relación entre la intensidad de pico anódica y catódica, y del comportamiento del potencial de pico a distintas velocidades de barrido de potencial se obtiene información sobre la reversibilidad del sistema. Además brindan información sobre el mecanismo de reacción, ya que a menudo, los voltamperogramas cíclicos revelan la presencia de intermediarios en las reacciones de óxido/reducción.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

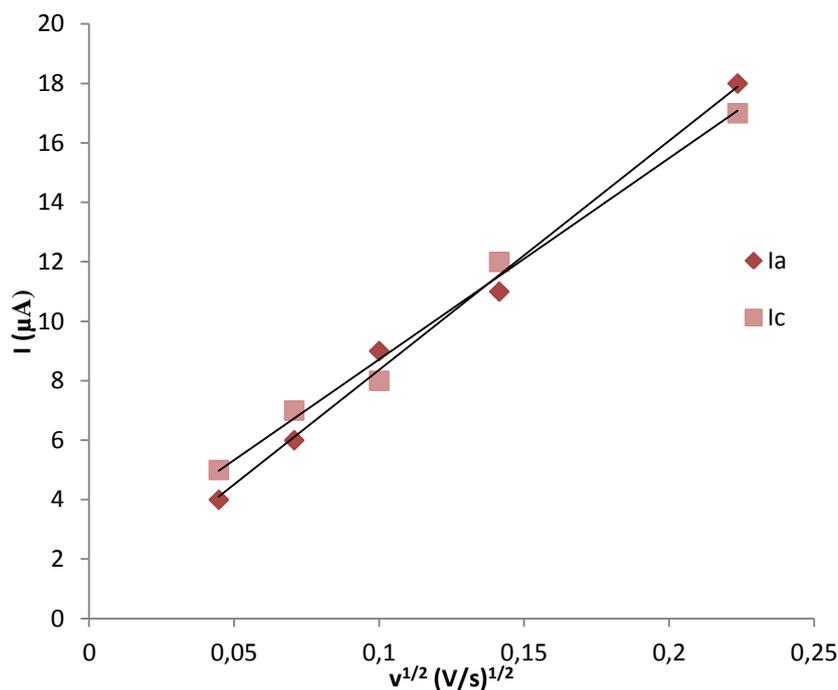


Figura IV.1.1.1. Gráfico de la intensidad de pico (I) vs. raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Se grafican los valores medidos en el proceso anódico y en el catódico. Electrodo de trabajo de Cu-pc en solución 1 mM de $[\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}]$ en soporte NaClO_4 0.1 M.

$$y(I_a) = 77,055x + 0,6546 \quad R^2 = 0,9936$$

$$y(I_c) = 67,732 + 1,9368x \quad R^2 = 0,991$$

Si un sistema es reversible e involucra un proceso de difusión, se cumple que:

$$\frac{I_{pc}}{I_{pa}} = 1 \quad (\text{II. 1.1})$$

La ecuación II.1.1 se cumple para todas las velocidades de barrido. Además, el valor del potencial de pico debe ser el mismo para toda velocidad.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

Por otra parte, en condiciones de difusión reversible se verifica la ecuación de Randles-Sevcik, la cual establece que:

$$I = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{II. 1.2})$$

siendo n el número de electrones intercambiado en la reacción, A el área del electrodo (cm^2), C la concentración de reactivo en el seno de la disolución (mol cm^{-3}), y D el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) de las especies oxidada y reducida (dependiendo de cuál sea la I de corriente estudiada, la anódica o la catódica).

De acuerdo en lo mostrado en la figura IV.1.1.1, los datos experimentales de intensidad de pico (tanto anódica como catódica) ajustaron a un comportamiento lineal al ser graficados vs. la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, lo que indica que los integrantes de la cupla no se adsorben a la superficie del electrodo. A partir de los valores de las pendientes, y aplicando la ecuación de Randles-Sevcik, se obtienen los siguientes valores de coeficientes de difusión D de la especie oxidada (rama anódica) y de la especie reducida (rama catódica):

$$D_{ox} = 1,44 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

$$D_{red} = 5,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

Los valores reportados para el coeficiente de difusión en electrolito soporte KCl 0.1 M son $8.43 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ para el complejo de hexa amino Ru (III) y $1.19 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ para Ru (II).

En el caso de utilizar electrolito soporte KNO_3 0.1 M los valores de coeficientes de difusión reportados son $8.00 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ para el complejo de hexa amino Ru (III) y $1.11 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ para el Ru (II).

Se observa que los coeficientes de difusión de la especie reducida son mayores que los coeficientes de difusión de la especie oxidada, igualmente no son exactamente iguales que en el sistema de estudio utilizado ya que se utilizó como electrolito soporte NaClO_4 0.1 M y también se empleó en los cálculos el área geométrica del electrodo que no es la misma que la real.

IV.2- Espectroscopía infrarroja

Se realizó el espectro FTIR de la sal $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (figura IV.2.1). Las bandas características del anión sulfato se encuentran en el rango de número de onda $1180\text{--}1130\text{ cm}^{-1}$ y en el rango $680\text{--}610\text{ cm}^{-1}$ en ambos casos correspondientes a vibraciones stretching [84,85]. Se espera observar bandas originadas por las moléculas de agua en la red cristalina (figura IV.2.2), en la zona $3800\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a las vibraciones stretching simétricas y asimétricas del enlace O—H y un pico en el rango $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ debido a la vibración bending simétrico del enlace O—H (ver tabla IV.2.1).

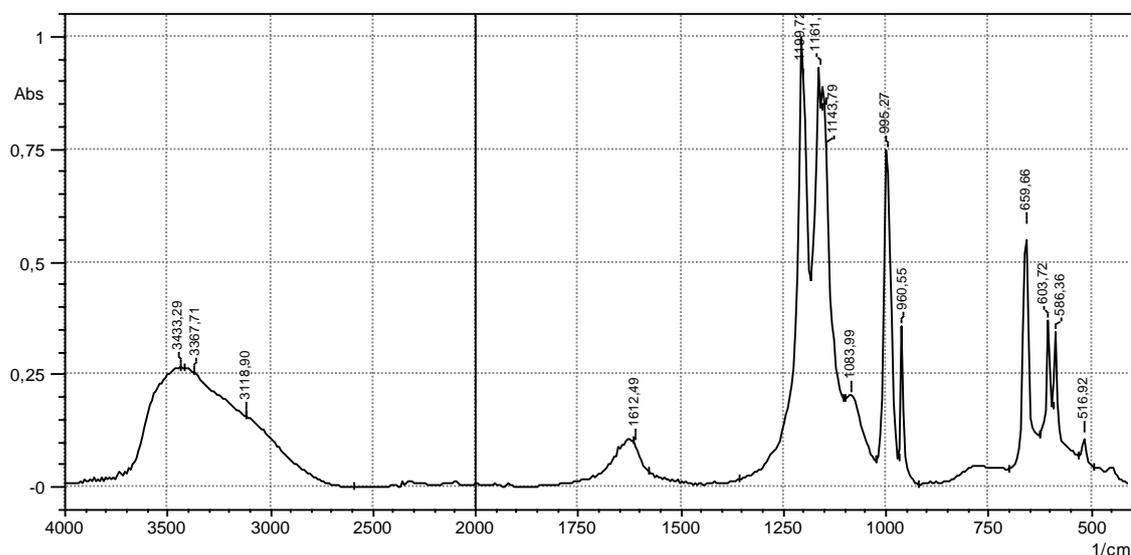


Figura IV.2.1. Espectro FTIR de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en KBr.

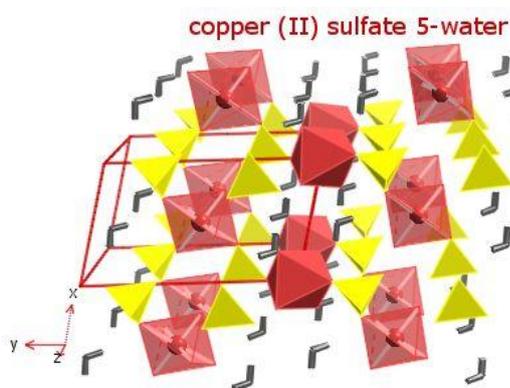


Figura IV.2.2. Estructura y celda unidad de la sal $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Se representan en rojo los cationes cobre (II), en amarillo los aniones sulfato y en gris las moléculas de agua que forman parte de la red cristalina.

Tabla IV.2. 1. Asignación de señales para el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

número de onda (cm^{-1})	Asignación
517	Sin asignar
586	Bandas características del anión sulfato. Stretching
604	
660	
961	
995	
1084	
1144	
1161	
1200	
1612	Bending simétrico del enlace O—H del agua
3119	Stretching simétrico y asimétrico del enlace O—H del agua
3368	
3433	

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

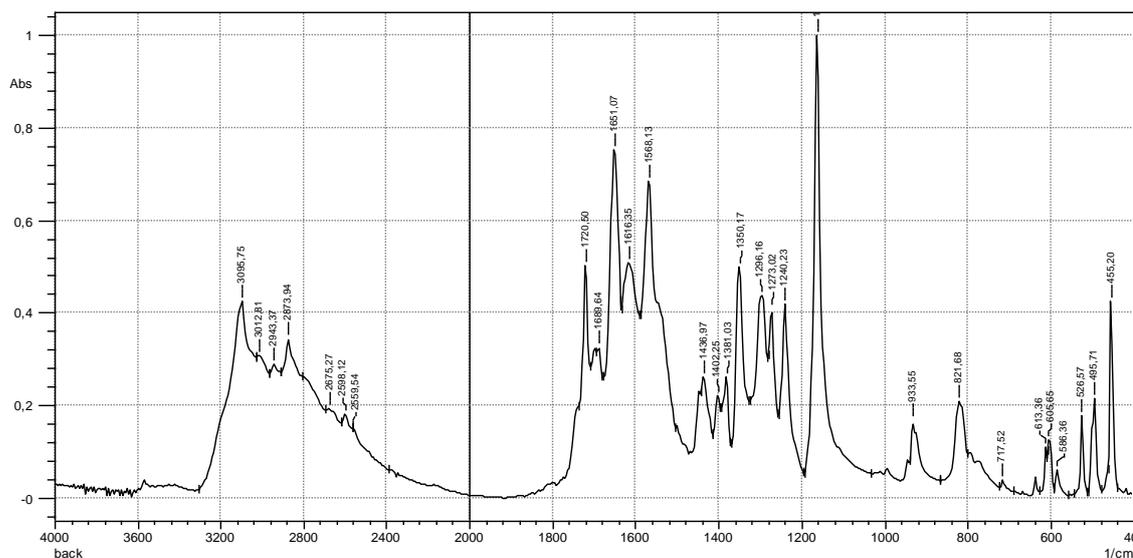


Figura IV.2.3. Espectro FTIR de TBA sólido al 1 % en KBr.

Los compuestos heterocíclicos muestran bandas stretching C—H en la región 3080–3000 cm^{-1} , si el compuesto contiene un grupo N—H, se observa una banda stretching N—H en la región 3500–3200 cm^{-1} , y su posición depende de la formación de puentes de hidrógeno [84]. Estos compuestos muestran patrones de bandas característicos en la región 1600–1300 cm^{-1} en la región de stretching del anillo. La naturaleza de los distintos sustituyentes afecta dicho patrón. Otra región característica es la zona 800–600 cm^{-1} , donde se observan las bandas bending fuera del plano del C—H [84].

El espectro del TBA disperso en una pastilla de KBr (figura IV.2.3) ha sido reportado por Méndez et al. (2007) cuya asignación se muestra en la tabla IV.2.2. [72]. La asignación de las bandas corresponde a la numeración que se muestra en la figura IV.2.4.

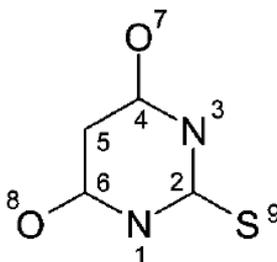


Figura IV.2.4. Numeración utilizada en la molécula de TBA para la asignación de las bandas del espectro infrarrojo [72].

Tabla IV.2.2. Asignación de señales para el TBA sólido [72].

TBA número de onda (cm⁻¹)	Asignación
455	Bending simétrico del anillo en el plano
496	Bending asimétrico del anillo en el plano
527	Bending C ₄ —C ₅ —C ₆
586	Bending N ₁ —H fuera del plano
606	Bending del anillo fuera del plano
613	Bending N ₃ —H fuera del plano
718	Bending N—H y C ₅ —H fuera del plano
773	Deformación del anillo fuera del plano
822	Bending C ₅ —H fuera del plano
934	Deformación del anillo en el plano
1163	Stretching C—S, wagging N—H en el plano, wagging C ₅ —H en el plano, wagging O—H en el plano.
1240	Stretching O—H y wagging C ₅ —H en el plano
1273	Sin asignar
1296	Wagging en el plano de C ₅ —H, O—H y N—H
1350	Stretching asimétrico N ₁ -C ₂ -N ₃
1381	Deformación asimétrica del anillo en el plano
1402	Stretching C ₆ -N ₁ y wagging N ₃ -H
1437	Bending O-H en el plano
1568	Tioamida scissoring
1616	Stretching C=O
1651	Stretching C=O
1690	Stretching C=O
1721	Stretching C=O
2560	Stretching O-H
2598	Stretching O-H
2675	Stretching O-H
2874	Stretching NH-O
2943	Stretching N-H
3013	Stretching N-H
3096	Stretching C ₅ -H

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

El espectro FTIR que se obtuvo para el complejo Cu-TBA se muestra en la figura IV.2.5. En la figura IV.2.6 se observa la superposición de los espectros del complejo Cu-TBA y TBA sólido.

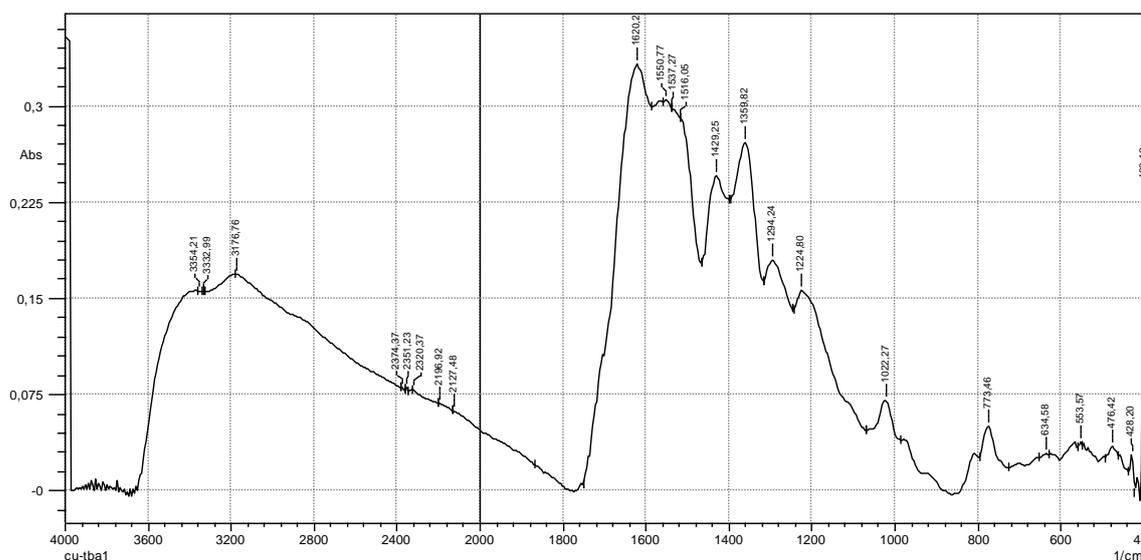


Figura IV.2.5. Espectro FTIR del complejo Cu-TBA sólido. Al 1% en KBr

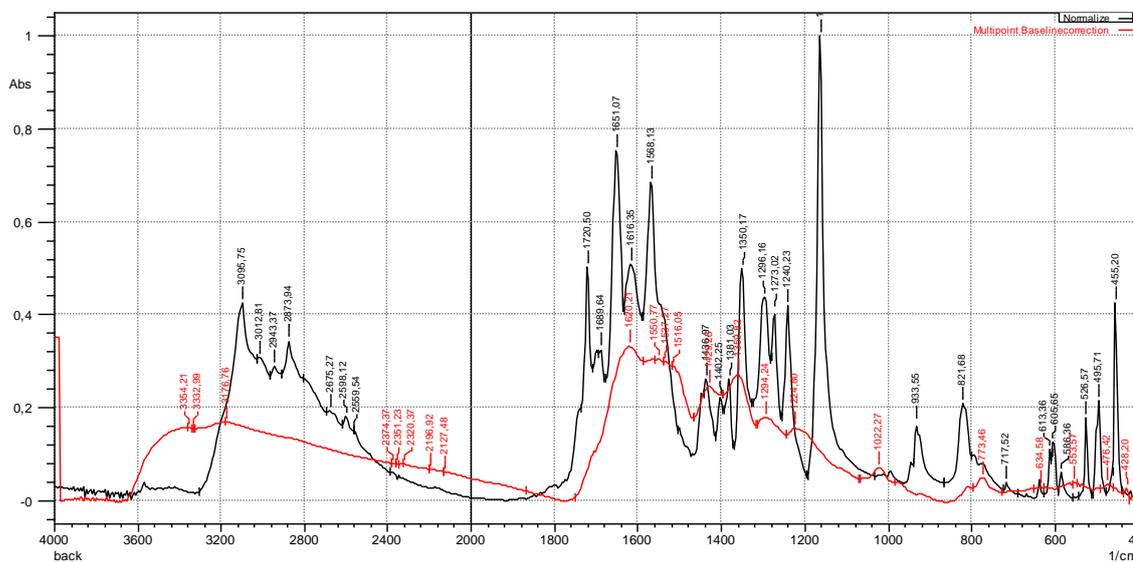


Figura IV.2.6. Espectros FTIR superpuestos del complejo Cu-TBA sólido (rojo) y TBA sólido (negro). Al 1% en KBr

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

No se observan las señales características del anión sulfato en el espectro Cu-TBA, lo cual muestra la eficacia de los lavados para separar dicho anión del complejo.

A partir de las figuras IV.2.5 y IV.2.6 se realiza el siguiente análisis, teniendo en cuenta que el ligando presenta cambios en la densidad electrónica de sus enlaces debido a la coordinación y por lo tanto existe un corrimiento de las bandas características. También puede haber una pérdida de simetría (equivalencia) de los grupos sustituyentes, y por lo tanto, pueden multiplicarse el número de bandas.

Cuando se superponen los espectros del complejo y del ligando se realizan las observaciones que se detallan en la tabla IV.2.3.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

Tabla IV.2.3. Comparación de bandas en los espectros FTIR de TBA y Complejo Cu-TBA

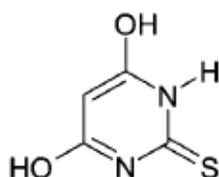
TBA número de onda (cm ⁻¹)	Complejo Cu-TBA número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
455	428	Bending simétrico del anillo en el plano
496	476	Bending asimétrico del anillo en el plano
527	553	Bending C ₄ —C ₅ —C ₆
586	-----	Bending N ₁ —H fuera del plano
606	-----	Bending del anillo fuera del plano
613	634	Bending N ₃ —H fuera del plano
718	-----	Bending N—H y C ₅ —H fuera del plano
773	773	Deformación del anillo fuera del plano
822		Bending C ₅ —H fuera del plano
934		Deformación del anillo en el plano
-----	1022	C=S stretching y tioamida scissoring
1163	≈1162 (muy débil)	Stretching C—S, wagging N—H en el plano, wagging C ₅ —H en el plano, wagging O—H en el plano.
1240	1225	Stretching O—H y wagging C ₅ —H en el plano
1273	-----	Sin asignar
1296	1294	Wagging en el plano de C ₅ —H, O—H y N—H
1350	1359	Stretching asimétrico N ₁ -C ₂ -N ₃
1381	-----	Deformación asimétrica del anillo en el plano
1402	-----	Stretching C ₆ -N ₁ y wagging N ₃ -H
1437	1429	Bending O-H en el plano
1568	1550	Tioamida scissoring
1616	1620	Stretching C=O
1651	-----	Stretching C=O
1690	-----	Stretching C=O
1721	-----	Stretching C=O
2560	2128	Stretching O-H
2598	2197	Stretching O-H
2675	2320	Stretching O-H
2874	2351	Stretching NH-O
2943	2374	Stretching N-H
3013	-----	Stretching N-H
3096	3176	Stretching C ₅ -H
-----	3335	Stretching N ₁ -H

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

A partir de los datos resumidos en la tabla IV.2.3 se puede concluir que:

- Desaparecen las bandas del C=O en 1651, 1690 y 1721 cm^{-1} lo que podría indicar que la unión se produce a través de los oxígenos.
- También se observan cambios conformacionales en la estructura del ligando cuando se une al cobre, lo que se evidencia también con la desaparición de las bandas en 586, 606, 718, 822, 934, 1381, 1402, 3013 cm^{-1} . Muchos de ellos se relacionan con cambios en los nitrógenos contiguos a los oxígenos, los que también podría evidenciar que la unión al metal ocurre a través de los oxígenos.
- También se detectan cambios conformacionales ya que las bandas en 455, 496, 527, 613, 1240, 1350, 1437, 1568 y 3096 cm^{-1} sufren corrimientos.
- Evidenciaría también la formación de este complejo, la aparición de señales nuevas en 1022 y 3335 cm^{-1} , que corresponden al C=S stretching y tioamida scissoring y stretching N₁-H.
- Con respecto a las bandas de 2560 a 2943 cm^{-1} que aparecen corridas en el complejo también y asignadas a stretching O-H, podríamos concluir que corresponden a humedad de ambiente en el caso del TBA y restos de solvente en el complejo.
- Teniendo en cuenta las observaciones anteriores se propone que en el complejo sintetizado el ácido tiobarbitúrico funciona como un ligando multifuncional [86], pudiendo además establecer que la unión del TBA al Cu ocurre a través de los grupos OH del ligando y con una estequiometría molar de 2 Cu por 1 TBA.

En resumen, en el complejo formado el TBA actuaría como ligando del cobre a través de una de sus formas tautoméricas (figura IV.2.7). Esta estructura explica la desaparición de las señales que involucran al grupo N₁-H, porque al formarse el doble enlace C=N se pierde el H. También explica la aparición de las señales relativas al C=S en 1022 cm^{-1} , y la desaparición de las señales producidas por el stretching C=O.



N7

Figura IV.2.7. Una de las posibles formas tautoméricas del ácido 2-tiobarbitúrico [72].

IV.3 - Espectroscopía Visible

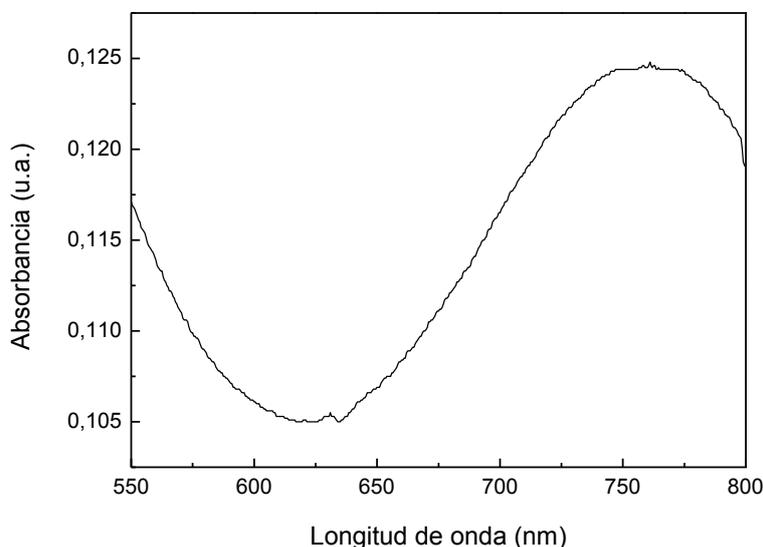


Figura IV.3.1. Espectro visible del complejo Cu-TBA. Solvente etanol. Temperatura ambiente. Región del espectro visible 550 a 800 nm.

Debido a su baja solubilidad, para proceder a su análisis, el complejo debió ser disuelto en etanol y se midió el espectro de la solución sobrenadante. Debido a esto no es posible obtener datos cuantitativos como el coeficiente de extinción molar, porque no se conoce exactamente la cantidad del complejo disuelta.

La figura IV.3.1 muestra el espectro de absorción para el complejo Cu-TBA en la zona 550 nm a 800 nm de la región visible del espectro. Se distingue un pico de absorción en 760 nm. De acuerdo a la bibliografía, la mayoría de los complejos de cobre son de color azul o verde; las excepciones se producen por la presencia de fuertes bandas en la región ultravioleta, lo que hace que el complejo tome color rojo o marrón [87], tal como se observó en el precipitado obtenido como resultado de la síntesis del complejo Cu-TBA en este trabajo. El complejo de Cu-TBA reportado por Zaki y col. también es de color marrón [88]. Sin embargo, durante la síntesis, luego del agregado de NaOH, se observó el cambio de color celeste característico del sulfato de cobre, a un azul marino intenso. Este color se debe a la presencia de una banda de absorción en la región 600-900 nm, coincidente con el máximo de absorbancia observado en el complejo sintetizado disuelto en etanol. Como se mencionara, esta banda es característica de los complejos de cobre (II), y se asocia a una serie de varias transiciones electrónicas de tipo d-d, asociadas al ion central e influenciadas por la presencia del ligando, que

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

aparecen superpuestas ya que sus valores de energía son muy cercanos [87], lo cual explica el ancho del máximo de absorbancia observado en el espectro.

A partir de los 600 nm se observa un aumento en los valores de absorbancia hacia menores longitudes de onda, que corresponden a la presencia de bandas de transferencia de carga entre el metal y el ligando, o transiciones electrónicas del propio TBA en el rango UV-visible [72], estas bandas son habitualmente mucho más intensas que las correspondientes a las transiciones *d-d* [87].

Capítulo V. Conclusión

El trabajo transcurrió con éxito de acuerdo a los objetivos iniciales.

Los electrodos de cobre (Cu) utilizados fueron construidos manualmente, incluyendo esto el armado y acondicionamiento posterior (lijado y pulido).

Luego de verificar la correcta construcción, los electrodos atravesaron una serie de etapas de ensamblado y modificación controladas cada una de ellas por voltamperometría cíclica. En este sentido, cada paso del mismo es evaluado luego de su realización, mediante medidas de VC en presencia de una cupla redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}/[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$, en la ventana de trabajo $E=-0.4$ a $E=-0.03$ V vs SCE.

Se desarrollaron las diferentes etapas de ensamblado con éxito, fueron verificadas y medidas por VC, dando como resultado un electrodo modificado Cu/TBA/AntiPR/PR capaz de detectar en forma selectiva (en principio) la presencia de receptores de PR en tejidos.

Se concluye entonces, que un electrodo de cobre que atraviesa correctamente por las etapas de ensamblado, podría comportarse como uno biosensor que detecta positivos y negativos en cuanto a presencia o ausencia de receptores de Progesterona en tejidos por lo tanto este trabajo constituye un aporte al desarrollo de los biosensores electroquímicos y los resultados obtenidos servirán para futuras investigaciones en el tema.

El proyecto también incluyó la síntesis del complejo Cu-TBA, una de las especies que podría estar involucrada en el perfil voltamperométrico del sistema. Se logró la síntesis de un complejo de coordinación cobre/ácido 2-tiobarbitúrico, caracterizándolo mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y espectroscopía visible. El análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR) del complejo indicaría que la unión del TBA al Cu involucra los grupos OH del ligando y con una estequiometría molar de 2 Cu por 1 TBA.

Bibliografía

- [1] X. Zhang, H. Ju, and J. Wang, *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical Applications*. 2008.
- [2] J. T. La Belle, K. Bhavsar, A. Fairchild, A. Das, J. Sweeney, T. L. Alford, J. Wang, V. P. Bhavanandan, and L. Joshi, "A cytokine immunosensor for multiple sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 3, pp. 428–31, Oct. 2007.
- [3] I. E. Tothill, "Biosensors for cancer markers diagnosis.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 55–62, Feb. 2009.
- [4] N. D. Käppel, F. Pröll, and G. Gauglitz, "Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 9–10, pp. 2295–300, May 2007.
- [5] V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, and J. M. Pingarrón, "Nanostructured progesterone immunosensor using a tyrosinase-colloidal gold-graphite-Teflon biosensor as amperometric transducer.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 596, no. 1, pp. 86–91, Jul. 2007.
- [6] C. Lanari and A. . Molinolo, "Progestágenos y cáncer de mama: desarrollo de un modelo experimental," *Rev. QuímicaViva*, vol. 2, no. 3, 2003.
- [7] B. Pedram, A. van Oeveren, D. E. Mais, K. B. Marschke, P. M. Verbost, M. B. Groen, and L. Zhi, "A tissue-selective nonsteroidal progesterone receptor modulator: 7,9-difluoro-5-(3-methylcyclohex-2-enyl)-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochromeno[3,4-f]quinoline.," *J. Med. Chem.*, vol. 51, no. 13, pp. 3696–9, Jul. 2008.
- [8] L. Ristic, *Sensor technology and devices*, I. Norwood: Artech House, 1994.
- [9] A. K. Turner, *Biosensor: fundamentals and applications*. New York: O.U. Press., 1987.
- [10] E. S. Bromage, G. G. Vadas, E. Harvey, M. A. Unger, and S. L. Kaattari, "Validation of an Antibody-Based Biosensor for Rapid Quantification of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) Contamination in Ground Water and River Water," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, pp. 7067–7072, 2007.
- [11] A. Y. Kolosova, J.-H. Park, S. A. Eremin, S.-J. Kang, and D.-H. Chung, "Fluorescence Polarization Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody for the Detection of the Organophosphorus Pesticide Parathion-methyl," *J. Agric. Food Chem*, vol. 51, pp. 1107–1114, 2003.
- [12] P. D'Orazio, "Biosensors in clinical chemistry - 2011 update.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 412, no. 19–20, pp. 1749–1761, Jun. 2011.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

- [13] L.-C. Su, R.-C. Chen, Y.-C. Li, Y.-F. Chang, Y.-J. Lee, C.-C. Lee, and C. Chou, "Detection of Prostate-Specific Antigen with a Paired Surface Plasma Wave Biosensor," *Anal. Chem.*, vol. 82, pp. 3714–3718, 2010.
- [14] B. Eggins, *Biosensors, an introduction*. John Wiley & Sons Ltd, 1996.
- [15] S. Rodriguez-Mozaz, M. J. Lopez de Alda, and D. Barceló, "Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 386, no. 4, pp. 1025–41, Oct. 2006.
- [16] J. Tschmelak, G. Proll, and G. Gauglitz, "Improved strategy for biosensor-based monitoring of water bodies with diverse organic carbon levels," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, pp. 979–983, 2005.
- [17] X. Jiang, D. Li, X. Xu, Y. Ying, Y. Li, Z. Ye, and J. Wang, "Immunosensors for detection of pesticide residues," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 11, pp. 1577–1587, 2008.
- [18] L. A. Terry, S. F. White, and L. J. Tigwell, "The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, pp. 1309–1316, 2005.
- [19] J. Wang, "Electrochemical Glucose Biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 108, pp. 814–825, 2008.
- [20] Y. Chang, S. Hung, Y. Lee, R. Chen, L. Su, O. C. Lai, and C. Chou, "Discrimination of Breast Cancer by Measuring Prostate-Specific Antigen Levels in Women ' s Serum," *Anal. Chem.*, pp. 5324–5328, 2011.
- [21] B. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*. John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- [22] M. Zayats, O. A. Raitman, V. L. Chegel, A. B. Kharitonov, and I. Willner, "Probing Antigen-Antibody Binding Process by Impedance Measurements on Ion-Sensitive Field-Effect Transistor Devices and Complementary Surface Plasmon Resonance Analyses: Development of Cholera Toxin Sensors," *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 4763–4773, 2002.
- [23] H. Xu, X. Zhao, J. R. Lu, and D. E. Williams, "Relationship between the Structural Conformation of Monoclonal Antibody Layers and Antigen Binding Capacity," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 2422–2428, 2007.
- [24] J. S. Mitchell and T. E. Lowe, "Ultrasensitive detection of testosterone using conjugate linker technology in a nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 7, pp. 2177–83, Mar. 2009.
- [25] G. Shan Xuan, S. Wook Oh, and E. Yul Choi, "Development of an electrochemical immunosensor for alanine aminotransferase," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, pp. 365–371, 2003.
- [26] C. G. Bauer, A. V. Eremenko, E. Ehrenteich-Föster, F. F. Bier, A. Makower, H. B. Halsall, W. R. Heineman, and F. W. Scheller, "Zeptomole-Detecting Biosensor for Alkaline Phosphatase in an Electrochemical Immunoassay for 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid," *Anal. Chem.*, vol. 68, pp. 2453–2458, 1996.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

- [27] U. Bilitewski, "Protein-sensing assay formats and devices.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 568, no. 1–2, pp. 232–47, May 2006.
- [28] J. Janata, M. Josowicz, and D. M. DeVaney, "Chemical sensors.," *Anal. Chem.*, vol. 70, p. 179R–208R, 1998.
- [29] T. Hofmann, K. Schröder, J. Zacheja, and J. Binder, "Fluid characterization using sensor elements based on interdigitated electrodes," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 37, pp. 37–42, 1996.
- [30] E. Katz and I. Willner, "Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors," *Electroanalysis*, vol. 15, no. 11, pp. 913–947, 2003.
- [31] E. Souteyrand, D. Nicolas, E. Queau, and J. R. Martin, "Influence of surface modifications on semiconductor gas sensor behaviour," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 26–27, pp. 174–178, 1995.
- [32] E. C. Alocilja and S. Pal, "Microbiological Detectors for Food Safety Applications," pp. 1–26, 2010.
- [33] M. M. Castillo-ortega, D. E. Rodriguez, J. C. Encinas, and M. Plascencia, "Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline \pm poly (n - butyl methacrylate) composites," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 85, pp. 19–25, 2002.
- [34] M. P. Kreuzer, M. Pravda, C. K. O. Sullivan, and G. G. Guilbault, "Novel electrochemical immunosensors for seafood toxin analysis," *Toxicon*, vol. 40, pp. 1267–1274, 2002.
- [35] T. J. Wooster and A. M. Bond, "Ion selectivity obtained under voltammetric conditions when a TCNQ chemically modified electrode is presented with aqueous solutions containing tetraalkylammonium cations.," *Analyst*, vol. 128, no. 11, pp. 1386–1390, 2003.
- [36] T. J. Wooster, A. M. Bond, and M. J. Honeychurch, "An Analogy of an Ion-Selective Electrode Sensor Based on the Voltammetry of Microcrystals of Tetracyanoquinodimethane or Tetrathiafulvalene Adhered to an Electrode Surface," vol. 75, no. 3, pp. 586–592, 2003.
- [37] D. R. The, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Technical report Electrochemical biosensors : recommended definitions and classification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, pp. 121–131, 2001.
- [38] R. Jelinek and S. Kolusheva, "Carbohydrate Biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 5987–6015, 2004.
- [39] S. Chen, L. Liu, J. Zhou, and S. Jiang, "Controlling Antibody Orientation on Charged Self-Assembled Monolayers," *Society*, no. 16, pp. 2859–2864, 2003.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

- [40] S. Jin Kim, K. Vengatajalabathy Gobi, H. Tanaka, Y. Shoyama, and N. Miura, "A simple and versatile self-assembled monolayer based surface plasmon resonance immunosensor for highly sensitive detection of 2,4-D from natural water resources," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 130, pp. 281–289, 2008.
- [41] K. Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, and E. Tamiya, "Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors.," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 2, pp. 782–7, Jan. 2007.
- [42] J. Chen, J. Tang, F. Yan, and H. Ju, "A gold nanoparticles/sol-gel composite architecture for encapsulation of immunoconjugate for reagentless electrochemical immunoassay," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2313–2321, 2006.
- [43] Z. Xiubo, F. Pan, B. Cowsill, J. R. Lu, L. Garcia-Gancedo, A. J. Flewitt, G. M. Ashley, and J. Luo, "Interfacial Immobilization of Monoclonal Antibody and Detection of Human Prostate-Specific Antigen," *Langmuir*, vol. 27, pp. 7654–7662, 2011.
- [44] J.-Y. Byeon, F. T. Limpoco, and R. C. Bailey, "Efficient Bioconjugation of Protein Capture Agents to Biosensor Surfaces Using Aniline-Catalyzed Hydrazone Ligation," *Langmuir*, vol. 26, no. 19, pp. 15430–15435, 2010.
- [45] K. Kam-Wing Lo, K. Hing-Kit Tsang, K.-S. Sze, C.-K. Chung, T. Kwok-Ming Lee, K. Yin Zhang, W.-K. Hui, C.-K. Li, J. Shing-Yip Lau, D. Chun-Ming Ng, and N. Zhu, "Non-covalent binding of luminescent transition metal polypyridine complexes to avidin, indole-binding proteins and estrogen receptors," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 251, pp. 2292–2310, 2007.
- [46] J. S. Mitchell, Y. Wu, C. J. Cook, and L. Main, "Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance biosensing of small molecules.," *Anal. Biochem.*, vol. 343, no. 1, pp. 125–35, Aug. 2005.
- [47] J. V. Mercader, C. Suárez-Pantaleón, C. Argulló, A. Abad-Somovilla, and A. Abad-Fuentes, "Hapten Síntesis and Monoclonal Antibody-Based Immunoassay Development for Detection of the Fungicide Trifloxystrobin," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, pp. 2581–2586, 2008.
- [48] U. Schlecht, Y. Nomura, T. Bachmann, and I. Karube, "Reversible Surface Thiol Immobilization of Carboxyl Group Containing Haptens to a BIAcore Biosensor Chip Enabling Repeated Usage of a Single Sensor Surface," *Bioconjugate Chem.*, vol. 13, pp. 4763–4773, 2002.
- [49] G. Conneely, M. Aherne, H. Lu, and G. Guilbault, "Electrochemical immunosensors for the detection of 19-nortestosterone and methyltestosterone in bovine urine," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 121, no. 1, pp. 103–112, Jan. 2007.
- [50] E. Ehrentreich-Förster, F. W. Scheller, and F. F. Bier, "Detection of progesterone in whole blood samples.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 18, no. 4, pp. 375–80, Apr. 2003.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

- [51] G. Conneely, M. Aherne, H. Lu, and G. G. Guilbault, "Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine," *Anal. Chim. Acta*, vol. 583, pp. 153–160, 2007.
- [52] R. C. Stevens, S. D. Soelberg, S. Near, and C. E. Furlong, "Detection of Cortisol in Saliva with a Flow-Filtered, Portable Surface Plasmon Resonance Biosensor System," *Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 6747–6751, 2008.
- [53] Y. Wang, A. Brunsen, U. Jonas, J. Dostálek, and W. Knoll, "Prostate Specific Antigen Biosensor Based on Long Range Surface Plasmon-Enhanced Fluorescence Spectroscopy and Dextran Hydrogel Binding Matrix," *Anal. Chem.*, vol. 81, pp. 9625–9632, 2009.
- [54] W.-C. Law, K.-T. Yong, A. Baev, and P. N. Prasad, "Sensitivity improved surface plasmon resonance biosensor for cancer biomarker detection based on plasmonic enhancement.," *ACS Nano*, vol. 5, no. 6, pp. 4858–64, Jun. 2011.
- [55] J. Pingarron, P. Yanezsedeno, and a Gonzalezcortes, "Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 19, pp. 5848–5866, Aug. 2008.
- [56] H. A. Engström, P. O. Andersson, and S. Ohlson, "A label-free continuous total-internal-reflection-fluorescence-based immunosensor," *Anal. Biochem.*, vol. 357, pp. 159–166, 2006.
- [57] J. Tschmelak, N. Käppel, and G. Gauglitz, "TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in milk based on ultra-sensitive progesterone detection in water," *Anal Bioanal Chem.*, vol. 382, pp. 1895–1903, 2005.
- [58] K. Campbell, L. D. Stewart, G. J. Doucette, T. L. Fodey, S. A. Haughey, N. Vilariño, K. Kawatsu, and C. T. Elliott, "Assessment of Specific Binding Proteins Suitable for the Detection of Paralytic Shellfish Poisons Using Optical Biosensor Technology," *Anal. Chem.*, vol. 79, pp. 5906–5914, 2007.
- [59] K. S. Carmon, R. E. Baltus, and L. a Luck, "A biosensor for estrogenic substances using the quartz crystal microbalance.," *Anal. Biochem.*, vol. 345, no. 2, pp. 277–83, Oct. 2005.
- [60] Y. F. Xu, M. Velasco-García, and T. T. Mottram, "Quantitative analysis of the response of an electrochemical biosensor for progesterone in milk," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, pp. 2061–2070, 2005.
- [61] P. J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard, and R. J. O’Kennedy, "Antibody production, design and use for biosensor-based applications.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 10–26, Feb. 2009.
- [62] P. Norouzi, V. K. Gupta, F. Faridbod, M. Pirali-Hamedani, B. Larijani, and M. R. Ganjali, "Carcinoembryonic Antigen Admittance Biosensor Based on Au and ZnO Nanoparticles Using FFT Admittance Voltammetry.," *Anal. Chem.*, pp. 1564–1570, Feb. 2011.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

- [63] Y. Huang, M. C. Bell, and I. I. Suni, "Impedance Biosensor for Peanut Protein Ara h 1," *Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 9157–9161, 2008.
- [64] H. Yang, R. Yuan, Y. Chai, L. Mao, H. Su, W. Jiang, and M. Liang, "Electrochemical immunosensor for detecting carcinoembryonic antigen using hollow Pt nanospheres-labeled multiple enzyme-linked antibodies as labels for signal amplification," *Biochem. Eng. J.*, vol. 56, pp. 116–124, 2011.
- [65] A. J. Bard, G. Inzelt, and F. Schilz, *Electrochemical Dictionary*. Berlin: Springer, 2008.
- [66] F. Scholz, *Electroanalytical Methods. Guide to Experiments and Applications*. My Copy, 2010.
- [67] R. N. Adams, *Electrochemistry at Solid Electrodes*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1969.
- [68] S. H. Pine, J. B. Hendrickson, and G. S. Hammond, *Química Orgánica*. México, McGraw Hill, 1988.
- [69] D. A. Skoog and D. M. West, *Análisis Instrumental*. Madrid, McGraw Hill, 2001.
- [70] Hobart H. Willard, Lynne L. Merritt, Jr., John A. Dean, Frank A. Settle, Jr., "Métodos Instrumentales de Análisis". México, Grupo Editorial Iberoamericana, 1991.
- [71] M. . Cerdá, L. Luzuriaga, M. Wörner, and E. Méndez, "Suitability of Copper Based Electrodes for Assessing the Interaction Between Ru (III)-Hexaammine and Myoglobin," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 5, pp. 1618–1633, 2010.
- [72] E. Méndez, M. F. Cerdá, J. S. Gancheff, J. Torres, C. Kremer, J. Castiglioni, M. Kieninger, and O. N. Ventura, "Tautomeric Forms of 2-Thiobarbituric Acid As Studied in the Solid, in Polar Solutions, and on Gold Nanoparticles," *J. Phys. Chem*, pp. 3369–3383, 2007.
- [73] M. J. Moneris, F. J. Arévalo, H. Fernández, M. A. Zon, and P. G. Molina, "Integrated electrochemical immunosensor with gold nanoparticles for the determination of progesterone," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 166–167, pp. 586–592, 2012.
- [74] J. M. Gasc, J. M. Renoir, C. Radanyi, I. Joab, P. Tuohimaa, and E. E. Baulieu, "Progesterone receptor in the chick oviduct: An immunohistochemical study with antibodies to distinct receptor components," *J. Cell Biol.*, vol. 99, no. 4 I, pp. 1193–1201, 1984.
- [75] J. M. de Las Mulas, Y. Millán, and R. Dios, "A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog," *Vet. Pathol.*, vol. 42, no. 2, pp. 200–212, 2005.
- [76] Adriana Vasconcellos C., Marco Paredes H., Daniela Núñez R., Eduardo Barrientos V., Yoselyn Olmazábal S. y Javiere Navarrete V., "Estudio de la Expresión de los Receptores de Progesterona y Estrógeno en el Endometrio de Ovejas alimentadas con dieta normal y dieta suplementada" *Int. J. Morphol.*, 28 (2): 575-581, 2010.

Evaluación de Receptores de Progesterona mediante Inmunosensores Electroquímicos

- [77] Adriana Vasconcellos C., Marco Paredes H., Johanna Carrasco R., y Daniela Núñez R., "Análisis de la Expresión de Receptores de Estrógeno y Progesterona en el Endometrio de Ovejas de las razas Romney Marsh y Araucana" *Int. J. Morphol.*, 21 (1): 97-100, 2009.
- [78] Dres. Javier Pintos, Ana Pérez-Galán "Cáncer de mama: costo-efectividad de la determinación de receptores hormonales y tratamiento adyuvante con tamoxifeno en estadios I y II" *Rev Med Uruguay* 16:114-122, 2000.
- [79] R. J. Murphy and G. Svehla, "Analytical study of metal – thiobarbituric acid complexes," *Anal. Chim. Acta*, vol. 99, pp. 115–124, 1978.
- [80] C. A. Vasconcellos, B. N. Sepúlveda, J. J. Castillo, and C. C. Rosas, "Presencia de receptores de estrógeno y de progesterona en el endometrio de ovejas prepúberes. Estudio inmunocitoquímico," *Int. J. Morphol*, pp. 393–396, 2005.
- [81] F. J. Arévalo, G. A. Messina, P. G. Molina, M. A. Zón, J. Raba, and H. Fernández, "Determination of progesterone (P4) from bovine serum samples using a microfluidic immunosensor system.," *Talanta*, vol. 80, no. 5, pp. 1986–92, Mar. 2010.
- [82] D.-D. Li, J.-L. Tian, W. Gu, X. Liu, and S.-P. Yan, "A novel 1,2,4-triazole-based copper (II) complex: Synthesis, characterization, magnetic property and nuclease activity," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 104, pp. 171–179, 2010.
- [83] O. Blajiev, T. Breugelmans, R. Pintelon, H. Terryn, and a Hubin, "Potentiodynamic EIS investigation of the 2-methyl-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole adsorption on copper," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 25, pp. 7451–7459, Oct. 2008.
- [84] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2004.
- [85] V. Haber, "Study of the amorphous product of dehydration of copper (II) sulfate pentahydrate" *Chem. zvesti* 31 (2) 190-196 (1977).
- [86] N. N. Golovnev, M. S. Molokeev, S. N. Vereshchagin, V. V. Atuchin, M. Y. Sidorenko, and M. S. Dmitrushkov, "Crystal structure and properties of the precursor [Ni(H₂O)₆](HTBA)₂·2H₂O and the complexes M(HTBA)₂(H₂O)₂ (M=Ni, Co, Fe)," *Polyhedron*, vol. 70, pp. 71–76, Mar. 2014.
- [87] Frank Albert Cotton, Geoffrey Wilkinson "Química inorgánica avanzada", Limusa, 2005 - 1669 páginas
- [88] Zaki, Z.M. and G.G. Mohamed, Spectral and thermal studies of thiobarbituric acid complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2000. 56: p. 1245-1250.