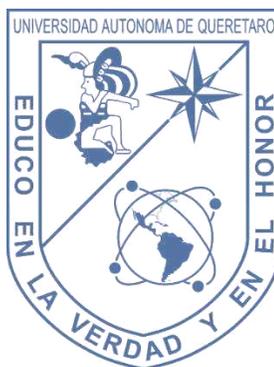


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

Ingeniería Biomédica



Desarrollo de un multi-sensor colorimétrico de glucosa, colesterol y dopamina, orientado a la obesidad por síndrome de deficiencia de recompensa

Tesis conjunta

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado en Ingeniería en Biomédica.

Presenta:

Cynthia Callejas Rosales
Kendra Dennise Góngora Bucio

Dirigido por:

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Co-director(es): Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Sinodales: Dra. Alejandra Álvarez López y Dr. Goldie Harikrishna Ozna

QUERÉTARO, QRO. a Agosto de 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Dedicatorias

A mi mamá por ser una voz de amor, aliento y esperanza, a mi papá por darme fuerza y confianza y a mis hermanas que me acompañan todos los días de mi vida como fuente de inspiración y escucha.

-Cynthia Callejas

Agradecimientos

Estoy muy agradecida con mis padres por la persona que soy hoy, por la educación y las enseñanzas que me brindaron en el camino y por siempre apoyar y respetar mis decisiones. A mi mamá por darme tanto amor a través de sus actos y a mi papá por inspirarme a vivir la vida que yo quiera, también agradezco a toda mi familia por hacer más ameno y divertido cada día de mi vida.

Quiero agradecer a todos mis maestros por enseñarme tanto, por su paciencia y ayuda y por darme las herramientas para amar cosas que no creí nunca posibles, especialmente quiero dar gracias al Dr. Juan de Dios Galindo, por enseñarnos tanto durante este proyecto y darnos siempre palabras de aliento y buenos momentos para recordar los últimos años de universidad. Agradezco de igual forma a mis compañeros y amigos que me apoyaron y acompañaron en esta trayectoria, estos años fueron mejores porque estaban a mi lado, de verdad gracias por ayudar tanto a esta chica tan despistada.

Finalmente agradezco a mi compañera y amiga Kendra Góngora porque sin ella no hubiera tomando el paso de hacer este proyecto, demostrando el buen trabajo en equipo y la gran confianza que tenemos la una en la otra.

-Cynthia Callejas

Dedicatorias

A mi mamá por siempre recordarme que soy capaz de hacer las cosas que me propongo cuando menos confianza tengo en mí, a mi papá que siempre ha sido mi vivo ejemplo de que puedes amar tu trabajo y que siempre me ha dado las fuerzas para enfrentar cualquier situación por más difícil que parezca, y a toda mi familia que cada llamada me hizo seguir adelante en esta aventura.

-Kendra Góngora

Agradecimientos

Todo lo que he logrado en la vida no habría sido posible sin las herramientas que me han brindado mis papás, es por ello que les estoy agradecida, porque solo nosotros sabemos el proceso tan difícil que fue el estar tan lejos y no poder vernos tan seguido como nos gustaría hacerlo. Siempre estaré agradecida por la confianza que me han brindado, y por siempre hablar tan orgullosos de mi cada que una persona les pregunta que es lo que yo hago.

De igual forma me gustaría agradecerle a cada uno de mis abuelitos ya que cada uno ha dejado su huella en mi vida; a mi abuelito Toño con el que siempre puedo tener pláticas muy sinceras y con el que siempre aprendo algo nuevo, no he conocido a señor más trabajador que él; a mi abuelita Cheli que siempre me ha recibido con ese espagueti que tanto me gusta desde que supo que me gustaba, nunca se lo he dicho pero siempre he pensado que es una mujer muy fuerte por todas los acontecimientos que ha pasado; a mi abuelita Alicia porque siempre que llego me muestra todo el cariño que tiene por mí, siempre he disfrutado el poder dormir con ella, y quiero decirle que aunque ella sienta que siempre que hablamos la regaño quiero que sepa que es porque siempre pienso en su bienestar porque quiero que me dure mucho tiempo; a mi abuelito Luis que cada que hablamos me pregunta si ya me titule, si abuelito por fin lo conseguí después de tanto tiempo, cuando me vuelva a preguntar podre mostrarle esta tesis y decirle que al fin se pudo, gracias por siempre preocuparse por cada etapa de mi vida.

A mi novio que, aunque si bien no ha estado desde el inicio de esta titulación si le ha tocado los últimos dos años que han sido los más difíciles, y simplemente quiero agradecerle por siempre mostrarme su apoyo cuando pensaba que no iba lograr titularme y siempre decirme las palabras correctas cada momento que lo necesitaba.

A cada una de mis amistades que formé en la etapa de la universidad, porque en ellos encontré personas muy valiosas que siempre han estado dispuestas a brindarme toda su ayuda y los cuales algunos de sus papás también vieron por mí.

A todos los maestros que estuvieron apoyándonos en este proyecto, pero en especial al Doctor Juan De Dios que siempre estuvo para nosotras no solo como maestro sino como amigo, por cada almuerzo que nos invitó y cada palabra motivadora que nos dio para seguir adelante, por cada risa que hubo en el laboratorio y por nunca hacernos sentir que era un agobio estar en el laboratorio ya que siempre era divertido estar con usted.

Y claro está, también quiero agradecerle a mi amiga y compañera en esta aventura, Cynthia Callejas, sé que ninguna de las dos sabíamos en que nos metíamos cuando aceptamos hacer la tesis, y aunque no haría nuevamente una tesis, sin duda si te escogería a ti nuevamente como mi compañera porque eres de las pocas personas con las que tengo la confianza suficiente para decir las cosas que se necesitan decir. Quiero agradecerte porque tu amistad me ha ayudado a mejorar muchos aspectos de mi personalidad. Esta aventura hubiera sido más difícil sin ti a mi lado.

-Kendra Góngora

Resumen

El uso y desarrollo de los biosensores como dispositivos clínicos se ha incrementado debido a su detección rápida, alta precisión y bajo costo, pero principalmente porque este tipo de dispositivos le permiten al usuario ahorrar tiempo al no tener que ir hasta un centro médico para realizarse pruebas.

El síndrome de deficiencia de recompensa (SDR) es un fenómeno que conduce a un deterioro del circuito de recompensa del cerebro, resultando en una deficiencia en la liberación de dopamina y desatando un comportamiento de deseo anormal por actividades que estimulan la utilización y producción de dopamina en el cerebro, como la adicción a las drogas, el alcoholismo y, de manera similar y de acuerdo a diversas teorías, la adicción a la comida.

Por esto en este trabajo se buscó la relación entre la obesidad con el síndrome de deficiencia de recompensa al desarrollar un multi-sensor colorimétrico mediante el uso de tres enzimas, Glucosa Oxidasa(GOX), Monoamino Oxidasa A (MAO-A) y Colesterol Oxidasa (COX) inmovilizadas en macroesferas de quitosano. Se realizaron estudios bioquímicos para el estudio de la oxidación de cada una de las enzimas a diferentes concentraciones y estados, y también se estudió el acoplamiento en las macroesferas.

Se obtuvieron diferentes coloraciones en las muestras a diferentes concentraciones de cada analito que permitieron su evaluación cualitativa y cuantitativa de forma exitosa, y con ayuda del método de inmovilización con quitosano se obtuvo una mayor estabilidad en las gráficas al exponer a las enzimas a diferentes pH y temperaturas, sin embargo, en la mayoría también se manifestó una baja en la actividad de las enzimas.

Palabras clave: *biosensores, síndrome de deficiencia de recompensa, Dopamina, multisensor colorimétrico, Macroesferas de quitosano.*

Abstract

The use and development of biosensors as clinical devices has increased due to their rapid detection, high accuracy and low cost, but mainly because these types of devices allow the user to save time by not having to go to a medical center for testing.

Reward deficiency syndrome (RDS) is a phenomenon that leads to an impairment of the brain's reward circuitry, resulting in a deficiency in dopamine release and triggering abnormal craving behavior for activities that stimulate dopamine utilization and production in the brain, such as drug addiction, alcoholism and, similarly and according to various theories, food addiction.

Therefore, in this work we searched for the relationship between obesity and reward deficiency syndrome by developing a colorimetric multi-sensor using three enzymes, Glucose Oxidase (GOX), Monoamine Oxidase A (MAO-A) and Cholesterol Oxidase (COX) immobilized in chitosan macrospheres. Biochemical studies were carried out to study the oxidation of each of the enzymes at different concentrations and states, and the coupling in the macrospheres was also studied.

Different colorations were obtained in the samples at different concentrations of each analyte that allowed their qualitative and quantitative evaluation in a successful way, a greater stability was also obtained with the help of the immobilization method with chitosan.

Keywords: biosensors, reward deficiency syndrome, Dopamine, colorimetric multisensor, Chitosan macrospheres.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción.....	14
2. Planteamiento del problema.....	17
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	19
6. Marco teórico.....	20
6.1. Síndrome de déficit de recompensa (SDR)	
6.1.1. Sistema de recompensa	
6.1.2. Síndrome de déficit de recompensa en la obesidad	
6.2. Biosensores	
6.2.1. Biosensores colorimétricos	
6.2.1.1. Colorimetría	
6.3. Biomarcadores enfocados al síndrome de déficit de recompensa	
6.3.1. Glucosa	
6.3.2. Colesterol	
6.3.3. Dopamina	
6.3.4. pH	
6.4. Biomoléculas	
6.4.1. Glucosa oxidasa	
6.4.2. Colesterol Oxidasa	
6.4.3. Monoamino Oxidasa A	
6.4.4. Peroxidasa	
6.5. Dispositivos colorimétricos microfluídicos.	
7. Antecedentes.....	83
7.1. Glucosa	
7.2. Colesterol	
7.3. Dopamina	
8. Metodología.....	86
8.1. Síntesis de macromoléculas de quitosano	
8.2. Funcionalización de macroesferas	
8.3. Caracterización de macroesferas	
8.3.1. Espectroscopia Raman	

8.3.2. Microscopia electrónica de barrido	
8.4. Inmovilización de las enzimas	
8.5. Método de Lowry para acoplamiento enzimático	
8.6. Actividad de las enzimas	
8.6.1. Actividad vs. Concentración	
8.6.2. Actividad vs. pH	
8.6.3. Actividad vs. Temperatura	
8.7. Evaluación del cambio de color	
8.7.1. UV-VIS	
8.7.2. Colorímetro	
8.8. Detección de analito de interés con colorimetría	
8.9. Obtención de límites de detección	
8.10. Diseño del dispositivo microfluídico	
9. Resultados.....	112
9.1. Actividad enzimática de Glucosa Oxidasa	
9.1.1 Efecto del pH	
9.1.2. Efecto de la temperatura	
9.1.3. Prueba de acoplamiento	
9.1.4. Ciclos de reuso	
9.1.5. Muestras colorimétricas	
9.1.6. Modelo RGB	
9.1.7. Distancia Euclidiana	
9.1.8. Límite de detección	
9.2. Actividad enzimática de Colesterol Oxidasa	
9.2.1. Efecto del pH	
9.2.2. Efecto de la temperatura	
9.2.3. Prueba de acoplamiento	
9.2.4. Muestras colorimétricas	
9.2.5. Modelo RGB	
9.2.6. Distancia Euclidiana	
9.2.7. Límite de detección	
9.3. Actividad enzimática de Monoamino Oxidasa A	
9.3.1. Efecto del pH	
9.3.2. Efecto de la temperatura	
9.3.3. Prueba de acoplamiento	
9.3.4. Muestras colorimétricas	

9.3.5. Modelo RGB	
9.3.6. Distancia Euclidiana	
9.3.7. Límite de detección	
9.4. Dispositivo microfluídico	
10. Conclusiones	160
11. Bibliografía	163

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Longitudes de onda del espectro visible.....	40
Tabla 2. Biosensores colorimétricos de Glucosa.....	85
Tabla 3. Biosensores colorimétricos de Colesterol.....	86
Tabla 4. Biosensores colorimétricos de Dopamina.....	87
Tabla 5. Límites de detección de GOx con distintos colorantes	127
Tabla 6. Límites de detección de COx con distintos colorantes	143
Tabla 7. Límites de detección de MAO-A con distintos colorantes	158

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funcionamiento de un biosensor	31
Figura 2. Espectro electromagnético.....	39
Figura 3. Transmitancia y absorbancia.....	41
Figura 4. Elementos básicos del espectrofotómetro.....	43
Figura 5. Círculo cromático.....	47
Figura 6. Estructura química de la glucosa.....	51
Figura 7. Estructura química del colesterol.....	55
Figura 8. Estructura química de la dopamina.....	59
Figura 9. Escala de pH.....	63

Figura 10. Reacción de Colesterol oxidasa.....	71
Figura 11. Proceso de obtención de resultados de un dispositivo colorimétrico microfluídicos.....	80
Figura 12. (a) quitosano disuelto en ácido acético, (b) adición de solución a) en hidróxido de sodio por método de goteo (c) filtrado y lavado de macroesferas.....	88
Figura 13. (a) agitación de macroesferas con solución de glutaraldehído, al 1% por dos horas (b) agitación de macroesferas con solución de glutaraldehído al 5% durante 2 horas (b) lavado de exceso de glutaraldehído.....	89
Figura 14. Acoplamiento enzimático por método de Lowry	92
Figura 15. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Glucosa oxidasa respecto al pH.....	100
Figura 16. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Colesterol oxidasa respecto al pH.....	101
Figura 17. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Monoamino Oxidasa A respecto al pH.....	102
Figura 18. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Glucosa oxidasa respecto a la temperatura.....	103
Figura 19. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Colesterol oxidasa respecto a la temperatura.....	103
Figura 20. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Monoamino oxidasa A respecto a la temperatura.....	104
Figura 21. Realización de muestras de glucosa, colesterol y dopamina, obtención de datos de colorimetría usando espectrofotómetro, toma de fotografías y análisis de datos.....	107
Figura 22. Evaluación del efecto pH sobre la actividad de la enzima glucosa oxidasa.....	113
Figura 23. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima glucosa oxidasa.....	116

Figura 24. Evaluación del acoplamiento de la enzima glucosa oxidasa con respecto al tiempo.....	118
Figura 25. Evaluación del reuso operacional de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en macro esferas de quitosano.....	120
Figura 26. Muestras colorimétricas de glucosa en papel.....	121
Figura 27. Muestras colorimétricas de glucosa en cerámica.....	122
Figura 28. Evaluación colorimétrica de glucosa oxidasa.....	122
Figura 29. Diagrama CIE 1931 de cromaticidad obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de glucosa.....	124
Figura 30. Curva de calibración para detección de glucosa oxidasa en buffer de fosfato.....	126
Figura 31. Evaluación del efecto del pH sobre la actividad de la enzima colesterol oxidasa.....	128
Figura 32. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima colesterol oxidasa.....	130
Figura 33. Evaluación del acoplamiento de la enzima colesterol oxidasa respecto al tiempo.....	132
Figura 34. Muestras colorimétricas de colesterol en papel con misma concentración y pH de 5 a 9 con intervalos de 0.5.....	133
Figura 35. Muestras colorimétricas de colesterol en papel.....	134
Figura 36. Evaluación colorimétrica de colesterol en papel.....	135
Figura 37. Diagrama CIE 1931 de cromaticidad obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de colesterol.....	136
Figura 38. Recta de calibrado de colesterol obtenido por visión por computador.....	138
Figura 39. Recta de calibrado de colesterol obtenido por visión por computador.....	140
Figura 40. Recta de calibrado de colesterol obtenido por visión por computador.....	141
Figura 41. Evaluación del efecto del pH sobre la actividad de la enzima Monoamino oxidasa A.....	144

Figura 42. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima Monoamino oxidasa A.....	145
Figura 43. Evaluación del acoplamiento de la enzima Monoamino oxidasa A respecto al tiempo.....	148
Figura 44. Muestras colorimétricas de dopamina en papel.....	149
Figura 45. Evaluación colorimétrica de dopamina en papel.....	151
Figura 46. Diagrama CIE 1931 de cromaticidad obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de dopamina.....	152
Figura 47. Recta de calibrado de dopamina obtenida por visión por computador.....	154
Figura 48. Recta de calibrado de dopamina obtenido por visión por computador.....	156
Figura 49. Prototipo del dispositivo microfluídico basado en papel que cuantifica tres analitos simultáneamente. (a) Capa hidrofóbica superior. (b) Polímero que forman los microcanales. (c) Capa fluídica de papel de celulosa. (d) Capa hidrofóbica inferior.....	159
Figura 50. Zonas del dispositivo microfluídico basado en papel.....	160

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

COx: Colesterol Oxidasa
DA: Dopamina
DAT: Transportador de dopamina
DRD2: Gen receptor de dopamina
FAD: Dinucleótidos de flavina adenina
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GAA: Glucosa alterada en ayunas
GABA: Ácido gamma-aminobutírico
GOD: Glucosa Oxidasa
GOx: Glucosa Oxidasa
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HCl: Ácido clorhídrico
IMC: Índice de masa corporal

ITG: Intolerancia a la prueba de glucosa
IR: Luz infrarroja
LC: Límite de cuantificación
LD: Límite de detección
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
MAO: Monoamino Oxidasa
MAO-A: Monoamino Oxidasa A
NAc: Núcleo accumbens
NaOH: Hidróxido de sodio
NE: Neurotransmisores norepinefrina
PEA: Neuromodulador feniletilamina
PET: Tomografía por emisión de positrones
POCT: Pruebas en el punto de atención
POD: Peroxidasa
RGB: Rojo, verde, azul
rLDL: Receptor de colesterol
R2: Coeficiente de determinación
SDR: Síndrome de deficiencia de recompensa
SEM: Microscopía electrónica de barrido
SNC: Sistema nervioso central
TDAH: Trastorno de déficit de atención con hiperactividad
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina
UV: Radiación ultravioleta
UV-VIS: Ultravioleta visible
°C: Grado Celsius

Desarrollo de un multisensor colorimétrico de glucosa, colesterol y dopamina, orientado a la obesidad por síndrome de deficiencia de recompensa.

1. Introducción

Recientemente, se han dado una serie de teorías respaldadas por gran cantidad de estudios neuroquímicos y genéticos científicamente sólidos que proporcionan pruebas que describen la adicción a la comida de una forma similar a las drogas psicoactivas. Así, de estas investigaciones se conoce el Síndrome de deficiencia de recompensa, por sus siglas SDR, el cual es un fenómeno genético y epigenético que conduce a un deterioro del circuito de recompensa del cerebro que resulta en una función hipo dopaminérgica. (Blum et al., 2014) Es decir, que este sea un fenómeno que se pasa de padres a hijos por genética o por modificaciones epigenéticas debidas a efectos ambientales, especialmente durante la etapa en la que se expresan la gran mayoría de los genes, que son el desarrollo embrionario y fetal. (Jouve de la Barrera, 2020) Esto resultando en una función en donde la producción de dopamina es menor.

El SDR involucra interacciones de poderosos neurotransmisores que desatan un comportamiento de deseo anormal, ya sea de grandes cantidades de alcohol o atracones de comida rica en carbohidratos que estimulan en el cerebro la utilización y producción de dopamina, el cual es un neurotransmisor poderoso que controla la sensación de bienestar. (Blum et al., 2014). Este también tiene una participación en el cuerpo humano de regulación de funciones diversas, como la conducta motora, la afectividad y la emotividad, e incluso la comunicación neuroendocrina (Bahena, 2000).

Blum caracterizó las complejas interacciones de neurotransmisores como la serotonina, encefalinas y el GABA, quienes regulan la activación dopaminérgica del centro de recompensa del cerebro, como “la cascada de recompensas

cerebrales”. En general, los niveles altos de encefalinas están asociados con la supresión del dolor y los niveles bajos de serotonina con la depresión, por lo que una persona que posee el alelo Taq1 A1, del gen receptor de dopamina (DRD2), no posee de suficientes sitios receptores de dopamina para liberar la cantidad normal que se requiere en el centro de recompensa del cerebro, por lo que la función de la dopamina se reduce.

Así, quienes poseen la variante A1 tienen comportamientos que los llevan a buscar formas de liberar dopamina, preferentemente en el núcleo accumbens (NAc) en el sistema mesolímbico. Esta búsqueda de activar sus vías dopaminérgicas o elevar la dopamina en su sistema, los lleva a un proceso de auto curación, en donde para compensar sus bajos receptores D2, acuden a sustancias que aumenten la función de la dopamina cerebral, como puede ser el alcohol, la cocaína o a tener gran apetito por alimentos poco saludables, que los hace caer en trastornos alimenticios como obesidad, anorexia nerviosa, etc., (Blum et al., 2014)

Estos estudios de los sistemas y receptores de dopamina del Sistema Nervioso Central han generado bastante interés por las distintas alteraciones observadas en la transmisión, ya sea directa o indirectamente, como en la adicción a drogas o incluso enfermedades tales como el Parkinson o la esquizofrenia. (Bahena-Trujillo R., 2000). Por esto, actividades nocivas para la salud que incluyen el consumo de drogas o de sustancias como el crack, cocaína, opioides, el abuso de nicotina o alcohol en gran cantidad e inclusive los atracones de carbohidratos, son algo a lo que recurren estas personas para lograr la estimulación y una mayor utilización y producción de dopamina en el cerebro. El comportamiento agresivo también se ha asociado con esta anomalía genética pues estimula el uso de dopamina en el cerebro. (Blum et al., 2014)

Al consumir estos alimentos se busca la liberación de dopamina, quien modula los circuitos de motivación y recompensa. La deficiencia de dopamina en

individuos obesos puede desatar la alimentación patológica como un medio para compensar la activación disminuida de estos circuitos. Por lo que las estrategias destinadas a conocer de mejor manera la función e interacción de la dopamina con otras sustancias, pueden ser beneficiosa en el tratamiento de estas personas. (Wang et al., 2001)

Un porcentaje del colesterol presente en el cuerpo es obtenido por medio de la dieta, esta ingesta o aportación excesiva de colesterol al comer y las mutaciones genéticas en el rLDL provocan un incremento de colesterol sérico a valores por arriba de los recomendados por los médicos, lo que fomenta enfermedades cardiovasculares. La carne, el huevo, las grasas y la leche son algunos de los alimentos de origen animal que aportan este porcentaje externo de colesterol y los cuales causan un aumento de su concentración en el suero sanguíneo y su acumulación en el cuerpo. (Maldonado et al., 2012)

Algunos alimentos ricos en colesterol resultan ser alimentos que consumimos con bastante regularidad como la carne y las grasas, presentes en comida rápida o alimentos con gran cantidad de carbohidratos, los que a su vez se convierten en glucosa. Es por esto por lo que al intentar generar placer se consume gran cantidad de estas, elevando así las cantidades o niveles de ambos en el plasma sanguíneo.

Los niveles de colesterol, al igual que de glucosa se pueden medir a través del plasma sanguíneo, debido a que este no se ve influenciado por el hematocrito. (Sanchez et al., 2015)

Es por esto por lo que es de gran importancia el estudio de la relación existente entre este neurotransmisor y otras sustancias, en este caso de la glucosa y colesterol obtenidos de alimentos con cantidades altas de carbohidratos y grasas que a la larga ocasionan padecimientos como la obesidad, y así, daríamos

respuesta a preguntas altamente polémicas como si es la obesidad hereditaria o si esta puede ser considerada más como una enfermedad que como un factor de riesgo. (Aguilera et al, 2019)

Por este motivo, en este trabajo se plantea la evaluación y estudio de un multisensor colorimétrico de glucosa, colesterol y dopamina, en donde su relación ayude para su potencial aplicación en la detección del síndrome de deficiencia de recompensa en el ámbito de trastornos alimenticios como la obesidad y dar pauta para que en un futuro se estudien otros comportamientos ligados.

El cual debe ser un sensor con un impacto importante en el sector de la salud y que nos permita obtener una determinación rápida, fácil y altamente sensible.

2. Planteamiento del problema

Puesto que hoy en día la obesidad es considerada una epidemia mundial creciente de salud a la que se enfrentan países como el nuestro, principalmente derivado de la disponibilidad cada vez mayor de alimentos poco nutritivos y el consiguiente aumento del consumo de calorías, (Gendelis et al., 2021) la federación Mundial de la salud ha enfatizado la necesidad que se tiene como sociedad de tomar acción inmediata en su prevención y control, así mismo, se ha descrito a la obesidad como una enfermedad o afección crónica, recurrente y desafortunadamente en la mayoría de los casos progresiva, lo que constituye una epidemia global, la cual se ha triplicado entre los años 1975 y 2016. Debido a esto, la población en general ha elevado su índice de masa corporal, también conocido como IMC en 1 Kg/m^2 por década, lo que también nos ha llevado a ahora enfrentarnos a un problema grave de obesidad infantil. (Aguilera et al., 2019)

Por un lado, se han hecho investigaciones para demostrar la hipótesis de que los individuos con obesidad tienen anomalías relacionadas a la actividad de la dopamina cerebral, el Dr. Wang y su equipo midió los receptores de dopamina D2 disponibles en el cerebro, y descubrió que su disponibilidad (del receptor D2 de dopamina estriatal) fue significativamente menor en los individuos obesos, es decir, que los individuos con los valores más bajos de D2 tenían el mayor IMC. (Wang et al., 2001) Así, probando la relación que existe entre una persona obesa y la disponibilidad de los receptores de dopamina.

Por esto es que es de gran importancia la comprensión de cómo esta patología puede impulsar la obesidad y su papel o relación en las diferentes regiones del cerebro involucradas en la búsqueda de recompensas y el consumo, para de esta manera comenzar a tomar acción desde un punto de partida, al igual que la comunidad médica puede comenzar a trabajar en un plan para la prevención, control y tratamiento de esta problemática mundial, específicamente con el desarrollo de nuevos sistemas de detección que sean confiables, económicos y estables para biomarcadores relacionados con el síndrome.

3. Justificación

Teniendo en cuenta las áreas de oportunidad de las técnicas de análisis, el desarrollo de un multisensor con una determinación rápida, fácil y altamente sensible que nos brinde información sobre la relación existente entre la glucosa, el colesterol y la dopamina, permitiría observar posibles problemas de desequilibrio en la producción de dopamina o recepción de glucosa y colesterol.

Kenneth Blum et al. 1996, publicaron en el American Scientist un estudio donde fundamentan el Síndrome de Deficiencia de Recompensa, estos fundamentos se encuentran basados en evidencias genéticas, debido a que descubrieron que la anomalía genética que se encuentra asociada al alcoholismo también se

encuentra asociada a otros desórdenes adictivos o compulsivos, tal es el caso del abuso de drogas y el comer en exceso teniendo a la obesidad como consecuencia.(Larocca, F., 2013) Por otra parte, los estudios neuroquímicos demuestran que el comportamiento de búsqueda de placer es un punto que tienen en común acciones como la adicción a las drogas, al alcohol o a los carbohidratos. Pues todas estas sustancias provocan en el núcleo accumbens una liberación de dopamina.

Ha sido demostrado que la cantidad disponible del transportador de dopamina estriada se correlaciona con el IMC en voluntarios sanos. (Chen et al, 2008). Así, pues en sujetos obesos la deficiencia de dopamina puede promover la alimentación patológica para activar los circuitos de recompensa. Es por ello que se buscan nuevas estrategias que estén dirigidas a estudiar la utilización de dopamina para el tratamiento y prevención de la obesidad, la cual es considerada un subtipo de problemática ligada al síndrome de deficiencia de recompensa. (Blum et al., 2014)

4. Hipótesis

Mediante la inmovilización de las enzimas Colesterol Oxidasa (COx), Glucosa oxidasa (GOx) y Monoamino Oxidasa A (MAO-A) será posible el desarrollo de un multi-sensor colorimétrico el cual nos permita realizar el estudio de la relación de estas enzimas con la obesidad por SDR.

5. Objetivos

Objetivo general: Desarrollar un prototipo de un multisensor colorimétrico para evaluar glucosa, colesterol y dopamina para el estudio de su relación con la obesidad por síndrome de deficiencia de recompensa.

Objetivos específicos:

- Desarrollar tintas cromogénicas basadas en las enzimas glucosa oxidasa, colesterol oxidasa y monoamino oxidasa A.
- Inmovilizar las enzimas en diferentes plataformas y evaluar su actividad enzimática y el efecto del pH y temperatura.
- Construir curvas de calibración basadas en el análisis de imagen.
- Desarrollar un chip microfluídico para el multi-sensado colorimétrico de dopamina, glucosa y colesterol.

6. Marco teórico

6.1. Síndrome de déficit de recompensa (SDR)

Debido a los avances de los estudios tanto en las enfermedades adictivas como a los desórdenes psiquiátricos, se ha aportado un nuevo modelo de comprensión para poder explicar adecuadamente la complejidad psicopatológica de las adicciones, a este nuevo modelo de comprensión se le llama síndrome de déficit de recompensa.

El síndrome de déficit de recompensa es un modelo que describe la asociación vista entre la transmisión dopaminérgica hipo funcional y los trastornos de intolerancia a la demora de la recompensa. (Raquel Martínez de Velasco, et al., 2015)

Este síndrome implica resistencia a la dopamina, ya que se manifiesta como una forma de privación sensorial o de los mecanismos de placer. Esto ocurre debido a que el individuo es incapaz de obtener recompensa placentera en sus actividades cotidianas. (Blum et al., 2014)

Puesto que, la recompensa de placer puede ser relativamente leve o grave, el síndrome de deficiencia de recompensa implica una serie variada de trastornos relacionados a la salud mental, los que producen diferentes tipos de comportamientos adictivos, compulsivos e impulsivos. (Blum et al., 2022)

Es bien sabido que la dopamina es un componente principal de la función cerebral, por consiguiente, también lo es del síndrome de déficit de recompensa. La dopamina se encarga de múltiples funciones importantes como neurotransmisor, como lo es el de inducir placer y en su defecto el de reducir el estrés, esta liberación de dopamina se produce en el sitio de recompensa del cerebro, donde se involucra una cascada de neurotransmisión llamada cascada de recompensa cerebral (Blum K. et al., 2020). Sin la función normal de este neurotransmisor, un sujeto sufriría de antojos y tendría una incapacidad de hacer frente al estrés, lo que haría que el sujeto se viera a la necesidad de buscar sustancias que puedan usarse para apaciguar el estado de deseo mediante la activación de centros dopaminérgicos.

Las sustancias psicoactivas, como lo son el alcohol, los opiáceos, los psicoestimulantes, y los comportamientos de riesgo, como el comer en exceso y el juego inducen la liberación de dopamina neuronal, lo que ayuda al sujeto a aliviar ese placer temporalmente. Desafortunadamente, este abuso de sustancias psicoactivas genera inactivación, el agotamiento de neurotransmisores, la inhibición de la síntesis de neurotransmisores y la disfunción estructural de los receptores. (Blum K. et al., 2014)

Si bien, el termino de síndrome de déficit de recompensa fue fundamentado basado en evidencia de tipo genético del alcoholismo (Kenneth Blum et al., 1996), se ha encontrado la misma alteración de gen

en otras enfermedades como lo son la adicción a drogas, el tabaquismo y a la ingesta excesiva de alimentos o atracones de comida. (Elizondo L., 2001)

Durante muchos años las diferentes adicciones siempre se han estudiado por separado, por lo que se sugiere que todas estas adicciones en vez de que sean endofenotipos, se vea como el verdadero fenotipo del SDR. (Blum K. et al., 2022)

Blum et al. en 2014 menciona que gracias a una prueba integral que identifica alelos vinculados a genes en los circuitos de recompensa cerebral se está de acuerdo en que las vías corticales mesolímbicas/prefrontales, incluidos los sistemas serotoninérgicos, cannabinoidérgico, endorfinérgico, GABAérgico, glutaminérgico y dopaminérgico, están relacionados con el funcionamiento saludable de la recompensa cerebral. Lamentablemente el síndrome de déficit de recompensa a diferencia de un gen uno, es muy complejo para poder obtener un análisis estadístico aceptable y así saber si puede ser hereditario. (Blum K. et al., 2020)

Como se ha mencionado anteriormente, este síndrome podría ser el posible responsable de las adicciones en algunos sujetos, y por lo general este afecta a sujetos con personalidad adictiva.

Existe la sugerencia de un vínculo entre los rasgos de la personalidad y la susceptibilidad que tiene una persona a desarrollar la necesidad de consumo de alguna droga. La mayoría de los sujetos predispuestos a una adicción tienen síntomas y signos muy definidos anteriores al inicio del consumo de drogas. Ejemplos de ellos son la impulsividad, la dificultad para seguir algún plan, una actitud de urgencia, dificultad para establecer

atención y conductas autolesivas (con la intencionalidad de hacerse daño somático a uno mismo, pero sin intención de provocarse la muerte). (Méndez-Díaz et al., 2017)

Esta sugerencia surge debido a que en modelos en animales de Wilhem CJ et al. en 2008, se observó en cepas de ratas, las cuales se clasificaron como impulsivas mediante la prueba de tarea de descuento por retraso (capacidad de resistir la tentación de una recompensa inmediata y ser capaz de retrasar esa recompensa), consumían más alcohol que aquellas ratas no impulsivas. Por otro lado, Perry J, et al en 2008, mediante misma prueba, clasificaron a las ratas en altos y bajos niveles impulsivos para después someterlas a un procedimiento que consistía en la autoadministración de la sustancia cocaína, el resultado mostró que el 80% de las cepas de ratas que tenían altos niveles de impulsividad se auto administraban cocaína, mientras que el 20% de la cepa de bajos niveles de impulsividad se auto administraban cocaína.

6.1.1. Sistema de recompensa

Para entender cómo funciona el síndrome de déficit de recompensa, es importante mencionar al sistema de recompensa, ya que este es alterado debido al síndrome de recompensa.

El sistema de recompensa del cerebro se encarga de la sensación de placer en el organismo, este sistema influye también sobre la memoria y el aprendizaje, esto debido a que el individuo recuerda y repite las acciones que le generan placer y contrario a esto evita aquellas acciones que le generan una sensación desagradable. (Elizondo L., 2001)

Es el conjunto de vías neuronales que permiten que la información fluya entre las estructuras involucradas en el procesamiento de recompensas. Las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral regulan el flujo de información proyectándose hacia el núcleo accumbens, la amígdala, el hipocampo, la corteza prefrontal y la capa pálida del lado. Todos estos sistemas se integran bajo la influencia moduladora de la dopamina. (Grace et al., 2007)

El área tegmental ventral libera dopamina durante el período de expectativa y recompensa. Los estudios a los axones de las neuronas dopaminérgicas han demostrado que estas neuronas tienen una gran diversidad anatómica. Presentan ramificaciones que les permite dirigir información simultáneamente a múltiples áreas relevantes del sistema de recompensas. (Aransay et al., 2015)

Las neuronas dopaminérgicas constantemente reciben potenciales inhibidores mediados por GABA (Grace y Bunney, 1985). Estudios han demostrado que estos potenciales inhibidores provienen del pálido ventral, que es una región productora de GABA. Por lo tanto, las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral se mantienen en un estado de inhibición por el pálido ventral. Esta inhibición es inactivada por el subículo ventral del hipocampo, permitiendo efectos tónicos de las neuronas dopaminérgicas y produciendo niveles basales de dopamina (Gonzalo Mantero, 2018). Se necesitan dos estructuras para que se produzca el paso a actividad fásica, el tegmento lateral-dorsal que permite que neuronas productoras de dopamina utilicen glutamato y el tegmento pedunculopontino que produce glutamato (Geisler y Zahm, 2005). Esta recompensa se produce durante la transición de actividad dopaminérgica tónica a fásica.

Ahora bien, la llegada de dopamina producida hasta el núcleo accumbens sucede de dos formas:

- Liberación de la dopamina fásica:

Las neuronas dopaminérgicas generan un disparo fásico después de una estimulación destacada. Liberando grandes cantidades de dopamina en la hendidura sináptica del núcleo accumbens. Estos niveles liberados de dopamina alcanzan concentraciones significativamente altas en la hendidura sináptica, lo que requiere la saturación de receptores postsinápticos D2. La mayoría de la dopamina que se libera es eliminada bastante rápido en este compartimiento espacialmente restringido por la recaptación del transportador de dopamina, con siglas DAT, anterior a salir de la hendidura sináptica. (Gonzalo Mantero, 2018)

Regulando la actividad en el núcleo accumbens de un subgrupo de neuronas. El modelo de señalización de la dopamina puede desempeñar un rol importante relacionado con las recompensas en las primeras etapas o fases del aprendizaje asociativo.

- Liberación de dopamina tónica:

Es responsable de los bajos niveles de dopamina tónica que se encuentran en el espacio extracelular del núcleo accumbens. La dopamina presente en este compartimiento no es afectada por el transportador de dopamina, pero aun así presenta concentraciones suficientes como para lograr

estimular los receptores D2 sensibles presinápticos existentes en las terminaciones aferentes. (Floresco et al., 2003).

Hay una distribución especial de los niveles tónicos de dopamina, quienes son regulados por la población general de neuronas dopaminérgicas, y que además de modular los suministros de glutamato presináptico de diversas regiones límbicas y corticales, regula la actividad de la alta cantidad de neuronas del cuerpo estriado ventral. (Gonzalo Mantero, 2018).

6.1.2. Síndrome de déficit de recompensa en la obesidad.

Las personas nos encontramos expuestas a diario a las ganas o estímulos de ingerir alimentos, por lo que debemos tomar decisiones conscientes relacionadas con la elección de los mismos, esta decisión influye en los hábitos de alimentación de la persona.

La elección de los alimentos que consumiremos es una conducta que es influenciada por múltiples factores de tipo biológico, fisiológico, sociocultural y psicológicos en cada individuo, al igual que lo son las características de cada alimento (sabor, olor, color, etc.) (Valladares M. et al., 2019)

Encontramos diferencias menores en las propiedades reconfortantes o gratificantes de los alimentos altos y bajos en calorías en relación a la condición de saciedad después de ser ingeridos. Lo mencionado anteriormente es influyente debido a que ha sido probado que muchas personas se alimentan aun cuando no tienen hambre, lo que demuestra el placer que ocasionan algunos alimentos a causa de la estimulación del sistema de recompensa. (Valladares M. et al., 2019)

La comida rápida y las bebidas azucaradas activan circuitos cortico-subcorticales de placer y refuerzo, independientemente del hambre. Estos alimentos comestibles operan de la misma manera que se muestran las sustancias adictivas tradicionales como la cocaína y la heroína, lo que quiere decir que muestran sensibilidad neuroconductual cruzada, esto se ha demostrado a nivel molecular y neuroanatómico con técnicas de neuroquímica. (Avena et al., 2008)

Las personas que tienen obesidad mórbida pueden desarrollar una “interdependencia” a drogas ilegales después de un exitoso procedimiento médico (cirugía) que le ayude a bajar de peso. Entre el consumo intermitente de azúcares y otros alimentos adictivos, se sospecha que existe una sensibilización neuronal comparable a la descrita durante el uso alterno de drogas tradicionales como el alcohol y los opiáceos. (Avena et al., 2008)

La variabilidad de la dopamina se ha medido en los ganglios basales de personas obesas y, al igual que los adictos a las drogas, puede haber retrasado el placer de comer y la re exposición. En diferentes investigaciones se ha descrito una correlación inversa entre el número de receptores estriatales D2 de la dopamina y el IMC en sujetos obesos, similar al patrón en los adictos a las drogas. (Volkow et al., 2011)

6.2. Biosensores

Cuando se piensa en sensores, la mayor parte del tiempo se piensa en sensores que son desarrollados por el ser humano, pero dentro de los seres vivos existe comunicación entre los componentes de una célula y

un conjunto de organismos que pertenecen a un ecosistema. Esta comunicación se hace principalmente por medio de cambios fisicoquímicos. Para poder comprender como se desarrollan las relaciones entre las propiedades físicas y químicas ante un estímulo en una parte del sistema, se requiere medir el avance de los procesos de un tejido biológico o la forma en las que se comunican diversos organelos de la célula, debido a esto son necesarios sensores que puedan medir sustancias específicas.

Según la norma ISO 30128:2014 en su apartado 3.14 define a un sensor como un “dispositivo que observa y mide una propiedad física de un fenómeno natural o un proceso hecho por el hombre y convierte esa medida en una señal”.

Los sensores se pueden clasificar en dos grupos principales, esto, de acuerdo con el tipo de información que reciben:

1. *Sensores químicos*: Estos sensores son capaces de notar cambios de tipo químico y caracterizar mediante señales eléctricas. (Martín E., 2015)
2. *Sensores físicos*: Estos sensores son capaces de convertir una magnitud física en magnitudes eléctricas. (Martín E., 2015)

Es de importancia los sensores químicos debido a que se ha trabajado en aquí con un subgrupo de este tipo sensores, la base de estos se explicara a continuación.

Estos sensores químicos tienen relevancia en la investigación actual por las necesidades actuales de caracterización con un número elevado de componentes o condiciones determinadas de un analito en una muestra.

Estos sensores tienen como característica, su tamaño pequeño, su buena capacidad de ser selectivos y su bajo costo, esto en comparación con instrumentaciones distintas. (Martín E., 2015)

Para su funcionamiento los sensores químicos cuentan con dos elementos principales:

1. *Receptor*: Este se encarga de reaccionar con un determinado componente de la muestra. (Lee Y. et al., 2006.)
2. *Transductor*: Según la norma ISO 30128:2014 en su apartado 3.21 define a un transductor como un “dispositivo que convierte energía de un dominio a otro, calibrado para minimizar los errores en el proceso de conversión.”

Como se mencionó antes, los biosensores incorporan elementos de detección biológica o biomiméticos y forman parte de un subgrupo o tipo de sensores químicos. (Jiménez C. & León P., 2008)

En la *figura 1* se puede observar que los biosensores son dispositivos capaces de darnos información de tipo analítica o semiconductor con la utilización de algún elemento de reconocimiento que sea de origen biológico, en una superficie transductora mediante la inmovilización. La relación existente entre un bioreceptor y el analito generan consumo de materia, cambio en las propiedades presentes del medio, o la formación de un producto. Después el transductor convierte este cambio físico, químico o biológico ocurrido en la superficie en una señal que podemos medir, es decir, cuantificable. (Kumar A. et al., 2022)

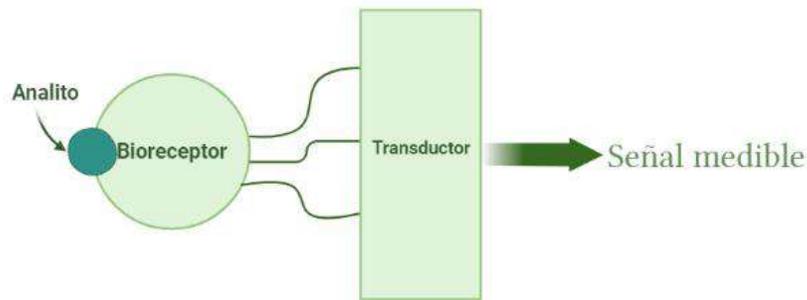


Figura 1. Funcionamiento de un biosensor.

Los biosensores se caracterizan por su bajo coste, su alta sensibilidad, una buena selectividad y el poder ser reproducidos en todo momento, todo esto tomando en cuenta la importancia de utilizar materiales estables y resistentes para ampliar la vida media del dispositivo, su fácil manejo al operarse y transportarse, su automatización, su efectividad, su corto tiempo de realización de análisis, y la obtención de resultados aceptables en tiempo real. (Castro-Ortíz L. et al., 2007)

Al igual que los sensores químicos, los biosensores consisten en dos componentes importantes:

1. *Bioreceptor*: Es una biomolécula que reconoce un analito determinado. Estos pueden biocatalizadores como las enzimas, tejidos, etc. (Lee Y. et al., 2006.)
2. *Transductor*: Este es el encargado de volver una la señal química a una señal que pueda ser medida. Existen transductores diferentes entre los que se encuentran los piezoeléctricos, calorimétricos, termoeléctricos, piroeléctricos, magnéticos, electrónicos, ópticos o electroquímicos, y electrónicos. (Lee Y. et al., 2006.)

La clasificación de biosensores atienden las variables de a continuación:

1. *El tipo de interacción:* Biocatalítico o bioafinidad.
2. *Por el método de detección:* Que sea directo o indirecto.
3. *El elemento de reconocimiento utilizado:* Célula, organela, tejido, enzima, anticuerpo, receptor, ácido nucleico, ácido nucleico peptídico (PNA) o aptómero, polímero de impresión molecular (PIM).
4. *Por el sistema de transducción:* Ya sea nanomecánico, piezoeléctrico, piezoeléctrico, electroquímico, óptico o termoeléctrico.

6.2.1. Biosensores de acuerdo con su tipo de interacción.

1. Biosensores de interacción biocatalítica:

Estos están constituidos por organelos, células, tejidos, o sistemas enzimáticos o multienzimáticos, son sistemas in-situ que se utilizan para detectar sustratos por medio del comportamiento estequiométrico de reactivos o productos, o mecanismos de inhibición enzimática que han intervenido en el proceso.

Entre los elementos típicos de reconocimiento de esta interacción se encuentran:

- *Las enzimas:* Las cuales son moléculas inmovilizadas con una naturaleza proteica, estas son altamente específicas,

regulables y específicas, y se acoplan a transductores que pueden ser calorimétricos, potenciométricos, amperométricos, piezoeléctricos u optoelectrónicos. (Jiménez C. & León P., 2008)

- *Células*: Ya sean completas o células que han sido sometidas a procesos metabólicos que permitan el monitoreo de metabolitos primarios o secundarios. (Jiménez C. & León P., 2008)
- *Organelas*: Estas se ocupan de la producción de energía y están implicadas de xenobióticos específicos. (Jiménez C. & León P., 2008)
- *Tejidos*: Se usa para controlar la calidad al determinar productos de descomposición. (Jiménez C. & León P., 2008)

2. Biosensores de interacción de bioafinidad:

Tienen la capacidad de formación de complejos entre el analito que nos interesa y el receptor, sin pasar por transformaciones químicas, y con mecanismos de respuesta excelentes. Estas interacciones dan respuestas que demandan sistemas con alta sensibilidad y precisión, cuantificándose por medio del seguimiento cinético del proceso en presencia de inhibidores competitivos, comportamiento óptico del proceso o variaciones gravimétricas. (Ruiz-Valdepeñas V., 2019)

Entre los elementos de receptores de bioafinidad se encuentran:

- *Anticuerpos*: Son moléculas que poseen una naturaleza proteica con selectividad, la fundamentación de su

mecanismo está en la reacción del antígeno-anticuerpo. (Jiménez C. & León P., 2008)

- *Las proteínas periféricas e integrales:* Estas producen canales, una activación enzimática, gradientes eléctricos que posibilitan el flujo de moléculas y la intervención de mensajeros celulares. (Jiménez C. & León P., 2008)
- *Polímeros de impresión molecular (MIPs):* Estas son moléculas de síntesis que cuentan con propiedades biomiméticas sobre mecanismos competitivos. (Jiménez C. & León P., 2008)

6.2.2. Biosensores de acuerdo con su sistema de transducción:

En la selección del sistema de transducción del biosensor es de gran importancia conocer la naturaleza de la interacción presente entre el analito y el elemento de reconocimiento, ya que si no se selecciona un buen sistema de transducción no será posible la obtención, amplificación, registro, sistematización, almacenamiento e interpretación las señales que se producen en la interacción.

1. Transductores ópticos:

- *Transductor de fibra óptica:* En sus extremos estos tienen inmovilizado el elemento de reconocimiento y el elemento de detección, al igual que tienen marcadores que permiten la detección de cambios presentes entre el elemento de reconocimiento y el analito y así difundirlos por la fibra. (Jiménez C. & León P., 2008)

- *Transductor de onda evanescente-EW*: se requiere un marcaje y tienen fundamento en la reflexión interna total de fluorescencia por medio de la absorción y la emisión de fotones. Los cambios en las características de la luz propagada a través de la guía de ondas se relacionan con los cambios en la concentración del analito. (Jiménez C. & León P., 2008)
- *Transductores de los interferómetros Mach-Zender*: aquí la concentración del analito depende del cambio del campo evanescente que se produce por la interacción del analito y del elemento de reconocimiento. (Jiménez C. & León P., 2008)
- *Transductores de resonancia de plasmones superficiales*: Los electrones de conducción de un metal oscilan simultáneamente; los plasmones se describen como oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de un metal, esto ante la exposición a un haz de luz polarizada y la medición del ángulo de resonancia, el ángulo da información sobre la concentración real de analito. (Jiménez C. & León P., 2008)

2. *Transductores electroquímicos*:

Están caracterizados por su capacidad de conservar la señal que se obtiene de una señal eléctrica. Estos transductores se utilizan en sistemas de reconocimiento biocatalíticos. En este tipo de transductores se destacan:

- *Transductor amperométrico*: basados en monitorizar la corriente que resulta de la oxidación o reducción generada de

los procesos de bioreconocimiento de una especie electroactiva, a un potencial constante. Resulta directamente proporcional la variación de corriente que se obtiene a la concentración del analito en algún intervalo determinado. (Ruiz-Valdepeñas V., 2019)

- *Transductor potenciométrico:* basado en monitorizar la variación del potencial de un electrodo de trabajo y comparándolo con el de un electrodo de referencia en una celda electroquímica, si la corriente existente entre ellos es nula, esto nos da información acerca de la actividad de los iones en la reacción electroquímica. (Ruiz-Valdepeñas V., 2019)
- *Transductor impedimétricos:* La espectroscopia de impedancia electroquímica utiliza en los materiales el análisis de las propiedades capacitivas y resistivas a través de perturbar un sistema en equilibrio con una señal de pequeña amplitud de excitación sinusoidal. Esta técnica es muy efectiva en la caracterización, estudio y análisis de recubrimientos, en baterías, en celdas de combustible, en fenómenos de corrosión y en conductividad de polímeros o tejidos. (Ruiz-Valdepeñas V., 2019)

6.2.3. Biosensores colorimétricos

En el apartado anterior se explicó a detalle lo que eran los biosensores y como estos se podían clasificar de acuerdo con su naturaleza que es obtenida de la señal de interacción sensor-analito. Es decir, que los biosensores pueden ser clasificados como electroquímicos

(amperométricos, impedimétricos, potenciométricos) y biosensores ópticos.

En los biosensores ópticos se incluye a todos los sistemas que se benefician de la interacción de la materia y la radiación electromagnética. En este tipo de biosensores, la concentración del analito que se está sensando se relaciona con el cambio de color. En ellos la radiación electromagnética se guía desde el espectrofotómetro, esta radiación interactúa con la materia, y posteriormente se reintroduce para el procesamiento electrónico.

Depende de donde se ubique la onda en el espectro electromagnético se puede hacer la clasificación de elementos de los biosensores, así surgiendo la clasificación de biosensores de tipo colorimétricos o los basados en la absorción de la luz visible.

Dentro del rango visible del espectro, la característica de medición principal de los biosensores colorimétricos es el cambio en las propiedades ópticas del sistema, el cambio de color al color que se encontraba originalmente es la señal transmitida del biosensor por la reacción de interacción entre el analito.

La técnica analítica de espectrofotometría UV-visible se utiliza en el desarrollo de biosensores colorimétricos para conocer la concentración de un compuesto en una solución. Esto se basa en la capacidad de las sustancias para absorber o emitir radiación electromagnética, así, dependiendo de la forma lineal de la concentración, es la cantidad de luz absorbida. En la identificación y cuantificación de biomoléculas en solución y de muestras biológicas, se deben de emplear reactivos que sean específicos y que reaccionen con el compuesto que se analiza y lograr formar un producto coloreado permitiendo detectarlo en muestras

complejas. Esta técnica se caracteriza por ser sencilla, precisa, accesible y útil. (Díaz M. et al., 2009.)

La espectroscopia UV-Vis se relaciona con la excitación de los electrones que se encuentran en la parte externa de los átomos, los cuales están involucrados en las uniones y por ende formación de moléculas, por lo que a menudo se la denomina "espectroscopia electrónica". Los modos generalmente realizados son los de transmitancia, reflectancia y fotoluminiscencia de las mediciones en la región UV-Vis. (Picollo M. et al., 2018). Abarcando la espectroscopia de absorción y la espectroscopia de reflectancia en la región espectral UV-vis. Quienes pueden absorber la energía de luz ultravioleta o visible y pueden ser excitadas a orbitales moleculares antienlazantes superiores son las moléculas que contienen electrones p o electrones no enlazantes (electrones n). (Wang H., et al., 2013).

En la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones está el fundamento de la espectrofotometría, en la que también se encuentran las radiaciones bajo el espectro UV-visible. Dependiendo de las condiciones del medio y también de la estructura atómica son las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula tiene la capacidad de absorber y la eficiencia con la que estas se absorben.

Las moléculas son capaces de absorber energía luminosa y almacenarla como energía interna. Cuando esta luz, que se considera energía, se absorbe por una molécula, se da un salto que va de un estado energético basal a un estado conocido como de mayor energía, o también llamado estado de excitación. Solamente se podrá absorber la energía que permita este salto del estado excitado. Cada molécula posee una serie determinada de estados excitados distintiva y que la diferencia del resto de las moléculas, es por ello que el espectro de absorción se considera

una señal de identidad para la molécula. Finalmente, las moléculas en el estado excitado liberan dicha energía que se absorbió hasta regresar al estado energético basal. (Díaz M. et al., 2009.)

El término de “luz” en espectroscopia no aplica únicamente al rango visible de radiación electromagnética, también a las formas invisibles que son UV e IR. En la espectrofotometría de absorbancia las regiones del ultravioleta y el visible son usadas.

Para entender esto se explicará brevemente lo que es el espectro electromagnético, que son todas las radiaciones electromagnéticas en orden de su frecuencia o de su longitud de onda. Como se puede observar en la *figura 2* las diferentes radiaciones electromagnéticas son diferenciadas entre sí por su frecuencia o por su longitud de onda, pues ambas se relacionan. (Cabrerizo D., 2011)

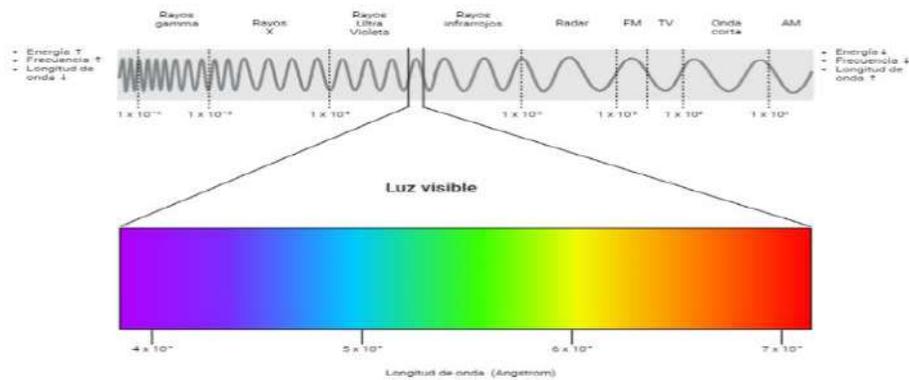


Figura 2. Espectro electromagnético

El espectro visible para el ser humano es una pequeña porción del espectro electromagnético.

Cualquier energía que se produce en esta banda estimula el ojo humano normal produciendo la sensación de visión.

- *La región UV:* son el rango de longitudes de onda que van de 195 a los 400nm. Los compuestos que poseen dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos y grupos carbonilos tienen una máxima absorbancia en la región UV, por lo que se usa esta región en específico para determinar de manera cualitativa y cuantitativa compuestos orgánicos. (Díaz M. et al., 2009.)
- *La región visible:* se puede observar esta región en la *Tabla 1*, donde se aprecian los colores visibles de una solución que corresponden a las distintas longitudes de onda de luz que se transmiten, no que se absorben. El color absorbido es el complementario del color que se transmite. Por lo que, para medir la absorción de una solución, es necesario conocer la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada de interés. (Díaz M. et al., 2009.)

Longitud de onda	Color de luz que se absorbe	Color de luz que se refleja
~ 390 – 435 nm	Violeta	Amarillo verdoso
~ 450 – 495 nm	Azul	Amarillo
~ 495 – 570 nm	Verde	Rojo
~ 560 – 590 nm	Amarillo	Azul
~ 590 – 620 nm	Naranja	Azul verdoso
~ 620 – 750 nm	Rojo	Verde azulado

Tabla 1. Longitudes de onda del espectro visible.

Como observamos en la *figura 3*, cuando un rayo de luz con una determinada longitud de onda y de intensidad I_0 incide de forma perpendicular sobre la disolución de algún compuesto químico que absorba luz o cromóforo, dicho compuesto absorberá parte de la radiación incidente (I_a) y dará paso el resto (I_t), por lo que se cumple que $I_0 = I_a + I_t$.

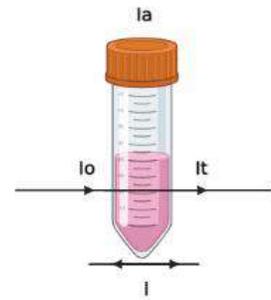


Figura 3. Transmitancia y absorbancia

- *Transmitancia (T)*: Se refiere a la relación que existe entre I_t (cantidad de luz que es transmitida que alcanza el detector una vez que ha atravesado la muestra) y I_0 (cantidad de luz que incide sobre ella), la cual normalmente está representada en porcentaje:

$$\%T = \left(\frac{I_t}{I_0}\right) (100)$$

Este resultado de transmitancia da como resultado una medida física que relaciona la intensidad incidente y la transmitida al momento de pasar por la muestra. (Díaz M. et al., 2009)

- *Absorbancia (A)*: Nos indica la cantidad de luz que absorbe la muestra, esta luz que es absorbida depende de la concentración y de la distancia que tiene que atravesar la luz a través de la solución del cromóforo, se determina como:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) \therefore T = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right)$$

Cuando ($I_o = I_t$), es decir, que la intensidad incidente y transmitida son iguales, la transmitancia es del 100% lo que nos dice que no absorbe a una determinada longitud de onda, y por lo tanto $A = \log(1) = 0$, si en otro caso se transmite solo 1% de radiación ($T = 0.01$), la absorción de radiación sería $A = \log\left(\frac{1}{0.01}\right) = 2$. (Díaz M. et al., 2009.)

Existen dos leyes fundamentales rigiendo el comportamiento de la radiación incidente absorbida cuando pasa a través de una muestra:

1. *Ley de Lambert*: La primera predice el efecto producido por el espesor del medio-muestra sobre la fricción de radiación absorbida.
2. *Ley de Beer*: La segunda nos habla del efecto que da la concentración del medio-muestra sobre la fracción de radiación que se absorbe.

Ley de Lambert-Beer: En esta se observa como la absorbancia es directamente proporcional a la longitud b de la trayectoria a través de la solución y a la concentración c del analito.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Siendo:

ε : Constante de proporcionalidad llamada también absorptividad (o absorptividad molar) expresada en $L/cm \cdot g$ si $c = g/L$ y en $L/cm \cdot mol$ si $c = mol/L$.

b : Longitud del camino que tiene que recorrer la radiación a través del medio absorbente.

c : La concentración expresada en g/L , mol/L .

Los espectrofotómetros son instrumentos en donde se realiza la medición de la cantidad de intensidad de la luz que se absorbe después de pasar por una solución muestra. (García R., 2018) Como se observa en la *figura 4*, la estructura básica del espectrofotómetro consiste:

1. *La fuente de energía radiante:* Que es una lámpara de deuterio y tungsteno.
2. *El monocromador:* Sirve para la selección de radiaciones con determinada longitud de onda, y pueden ser filtros, redes de difracción o prismas.
3. *Detector de luz.*
4. *Amplificador y convertidor de señales luminosas a señales eléctricas.*
5. *Registrador o sistema de lectura de datos.*

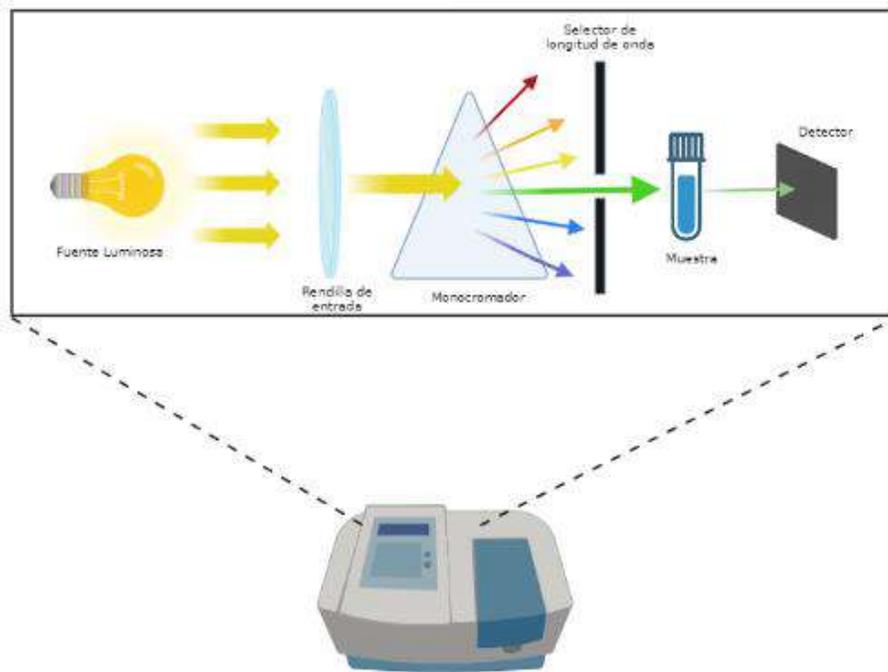


Figura 4. Elementos básicos del espectrofotómetro.

Esta basa su funcionamiento en la luz que tiene de una lámpara especial, y que es guiada por medio de un conector que selecciona y separa la luz de la longitud de onda, para después atravesar la muestra. La intensidad saliente de la luz de esa muestra se capta y comprara con la intensidad de luz incidente en la muestra, haciendo posible calcular la transmitancia, que es dependiente de la concentración de la sustancia. (García R., 2018)

6.2.3.1. Colorimetría

La colorimetría es una técnica bastante usada en laboratorios bioquímicos debido a que esta brinda información tanto cualitativa como cuantitativa sobre sustancias en disolución. (Aparicio E., 2017)

Según Florkin, 1962, “los primeros colorimétricos se calibraban a ojo, comparando el color de una solución con los de una serie de discos coloreados. Los resultados que se obtenían eran muy subjetivos y no exactos. La célula fotoeléctrica tiene la ventaja sobre el ojo humano de poder determinar el grado de absorción de un color y de ser mucho más objetiva.”

La técnica se basa en la utilización de sustancias coloreadas y la medición de la absorción de radiación de la zona visible. Algunas veces la muestra que queremos determinar no tiene un color por sí misma, en estos casos, se debe de realizar un desarrollo de color, esto se hace empleando reactivos que nos ayuden a la obtención de sustancias coloreadas de la muestra que se está estudiando. La única diferencia existente entre la colorimetría y la fotolorimetría es el instrumental que se emplea. (Cabrerizo D., 2011)

Un color es definido por los siguientes tres parámetros:

1. *Luminancia*: Es la medición luminosa de la intensidad de la radiación, expresado a veces como que un color tiene mucho brillo (que es claro) o que tiene poco brillo (que es oscuro. Medición simbolizada con L y con unidad de medida Cd/m^2 . (Aparicio E., 2017)
2. *Longitud de onda predominante*: Longitud de la radiación monocromática correspondiente. Conocida también como tono y vista como que un color es amarillo, azul, verde, etc. con símbolo λ y unidad de medida en nm o mm o Angstrom. (Aparicio E., 2017)
3. *Pureza*: Es la magnitud de la dilución de un color en blanco. Representada por un índice que varía entre 0 y 1. Se refiere a ella cuando se menciona la saturación. Simbolizada con la letra P . (Aparicio E., 2017)

En el apartado anterior se habla con mayor detalle de la ley de Lambert-Beer, esta se cumple para soluciones que están diluidas; y para valores con una concentración alta, la absorptividad cambia de acuerdo a la concentración, por fenómenos de dispersión de la luz, cambios del medio, agregación de moléculas, etc.

La aplicación evidente de la ley de Lambert-Beer es usando el colorimétrico para definir la concentración de una gran cantidad de moléculas que absorben la luz. Técnica que se extiende a sustancias no coloreadas tales como los azúcares o los aminoácidos después de realizar alguna reacción que sea capaz de convertir estas sustancias incoloras en derivados coloreados. (Díaz M. et al., 2009)

Es así como percibimos el atributo de los objetos conocido como color cuando hay luz. La luz está compuesta por ondas electromagnéticas que se propagan a unos 300 kilómetros por segundo, así que nuestros ojos en realidad no reaccionan a la materia en sí, sino que a la incidencia de la energía. Estas ondas hacen distintos tipos de luz, como infrarroja, visible, ultravioleta o blanca, dependiendo de su longitud de onda. Los objetos devuelven hacia su entorno la luz que no han absorbido y el campo visual de cada uno de nosotros interpreta estas radiaciones electromagnéticas que el entorno emite como lo que conocemos como color. (Cabrerizo D., 2011)

El color cuenta con las siguientes propiedades:

- *Tono*: Atributo por el que diferenciamos el color y designamos los diferentes colores que podemos observar (verde, violeta, anaranjado). (Sherwood, 2008)
- *Saturación*: Intensidad cromática, determinada por la cantidad de luz que un color posee. (Sherwood, 2008)
- *Brillo*: Cantidad de luz que es emitida por una fuente de luz o que se refleja por una superficie. (Sherwood, 2008)

Para entender mejor las propiedades que tiene un color, observemos la *figura 5*, en ella se puede observar un círculo cromático, donde se ordena de forma circular los colores en función de su tono. Un círculo cromático básico se compone de los colores primarios y algunos secundarios.

- En este círculo se pueden observar de por un lado los colores cálidos (rojo, naranja, y los tonos intermedios entre ellos) y del

otro lado los colores fríos (azul, verde y los tonos intermedios entre ellos). (Sherwood, 2008)

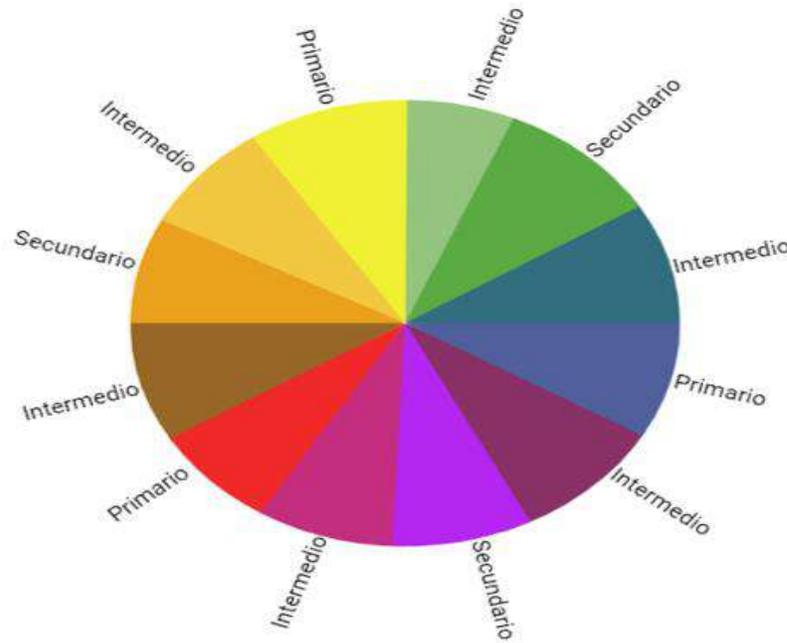


Figura 5. Círculo cromático.

Lo que hace posible identificar materiales en una mezcla es que muchos compuestos tienen espectros característicos de absorción en la región visible y ultravioleta.

- *Proteínas:* A 280 nm absorben los aminoácidos triptófano y tirosina, lo que constituye el fundamento de una técnica muy sensible para la determinación de proteínas sin que se tenga que destruir la muestra. Las proteínas absorben también en el ultravioleta lejano, a causa de los enlaces peptídicos. (Aparicio E., 2017)
- *Ácidos nucleicos y sus bases que los componen:* La máxima absorción de estos se encuentra en la región de 260 nm. Esta

magnitud constituye una medida de su integridad ya que los ácidos constituyen una medida de su integridad pues los ácidos nucleicos parcialmente degradados absorben más fuertemente que los materiales nativos. Mientras que sus bases que los componen tienen un espectro de absorción lo suficientemente diferente, lo que permitiendo usarlo en su identificación. (Aparicio E., 2017)

- *Hemoglobina*: Cuando la hemoglobina se modifica por algunas drogas o por monóxido de carbono, la presencia de estos agentes modificantes puede ser detectada y medida si la absorción máxima da un cambio característico. (Aparicio E., 2017)

6.3. Biomarcadores enfocados al Síndrome de déficit de recompensa

Debido a todo lo descrito anteriormente sobre el síndrome de deficiencia de recompensa (SDR), se relacionó y observo la importancia que existe entre este neurotransmisor (dopamina) y la glucosa y colesterol en el cuerpo humano. Esta relación viene más que nada de la cantidad de alimentos ricos en carbohidratos, grasas y azúcares que ingieren estas personas, y su búsqueda constante por liberar dopamina en el cerebro, ocasionando problemas como la obesidad. (Aguilera et al., 2019)

México está presentando un proceso de acelerado desarrollo y cambios socioculturales, más que nada debido a su entrada a la económica internacional y al mismo tiempo por cambios en la cultura alimentaria de nuestro país por transiciones demográficas, epidemiológicas y nutricionales.

La población mexicana cambia sus patrones y formas de alimentación tradicional que han tenido por generaciones a una elevada ingesta de

alimentos pobres en nutrientes, ricos en grasas saturadas, colesterol, azúcares y sodio, al mismo tiempo que se han adoptado estilos de vida muy poco saludables combinados con los acelerados procesos de urbanización. A consecuencia, se observa un aumento de enfermedades crónicas que se relacionan con la nutrición, entre ellas la diabetes, obesidad, entre otras. En recientes estudios se revela que la obesidad está en ascenso, dando a conocer que más de la mitad de la población actual padece de sobrepeso y más del 15% es obeso. La obesidad en nuestro país ya es considerada una problemática de salud pública que mostrará repercusiones en las áreas económicas, sociales y de salud a mediano y largo plazo.

Además, está la conocida tendencia de transición nutricional, que describe que la población de países en desarrollo cada vez consume dietas más parecidas a las de países desarrollados, lo que incluye crecientes cantidades de productos de origen animal, aceites vegetales, edulcorantes y alimentos procesados, y escasos granos enteros. (Ibarra, L. S., 2016)

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el 58% de los habitantes de América tiene sobrepeso y obesidad, es decir, 360 millones de personas, presentando las tasas más elevadas esta Chile con un 63%, México un 64% y Bahamas un 69%. Cabe destacar que la obesidad impacta de manera desproporcional a las mujeres, los que observamos en zonas ricas, pobres, rurales y urbanas de nuestro país, pues la tasa de obesidad femenina es un 10% mayor que en los hombres. Lamentablemente, de mantener esta tendencia, para el año 2030 más del 40% de la población mundial padecerá de sobrepeso y más de la quinta parte será obesa. (Vázquez E., et al., 2019)

Así, la dieta hoy en día está basada en carbohidratos, los cuales al entrar en el cuerpo y específicamente en la sangre, elevan los valores de glucosa y colesterol. Algunos alimentos ricos en colesterol resultan estar en comidas

que consumimos con bastante regularidad como la carne y las grasas. También consumimos bastante pan, pasta y arroz, que son algunos de los alimentos en los que se encuentra la glucosa, elevando así los niveles de ambos en el plasma sanguíneo.

Al consumir estos tipos de alimentos se busca la liberación de dopamina, quien modula los circuitos de motivación y recompensa. Pero debido al síndrome de deficiencia de recompensa (SDR), se da una deficiencia de dopamina, que desata la alimentación patológica como un medio para compensar la activación disminuida de estos circuitos. Por lo que las estrategias destinadas a conocer de mejor manera la función e interacción de la dopamina con otras sustancias, pueden ser beneficiosa en el tratamiento de estas personas. (Wang et al., 2001)

Los dispositivos de pruebas en el punto de atención se han vuelto bastante innovadores e importantes en el mundo de la medicina, especialmente por la ventaja de obtención de un diagnóstico que sea lo más rápido y eficiente posible. También debido a que las técnicas que se utilizan para diseñar estos patrones de microfluídos son rentables, requieren de menos muestras, son ambientalmente benignas y tienen un análisis rápido. Los dispositivos analíticos de microfluídos basados en papel están generando interés debido al movimiento pasivo del analito por el fenómeno capilar. (Ganesan S., et al., 2017)

Estos ayudan a reducir la cantidad de visitas clínicas, disminuir los costos en el sistema de atención médica, aumentan la satisfacción del paciente y lo ayudan a mejorar los resultados clínicos. Al igual que a personas en entornos de bajos recursos.

Los niveles de glucosa, al igual que de colesterol y dopamina se pueden medir a través del plasma sanguíneo, debido a que este no se ve influenciado por

el hematocrito. (Sánchez et al., 2015) Por este motivo, en este trabajo se plantea la evaluación y estudio de un multisensor colorimétrico con un impacto importante en el área de la salud y dando una determinación rápida, fácil y altamente sensible, al mismo tiempo que sea capaz de medir y ligar parámetros de estos biomarcadores (glucosa, colesterol y dopamina), y que su relación ayude para su potencial aplicación en la detección del síndrome de deficiencia de recompensa en el ámbito de trastornos alimenticios como la obesidad, esperando también ofrezca pautas para que en un futuro se implementen y desarrollen estudios para las otras afecciones asociadas al SDR.

6.3.1. Glucosa

La glucosa se encuentra en distintos alimentos, entre ellos frutas, cereales, pan, arroz, la pasta, y la miel. Es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza y las células la ocupan como fuente primaria para la síntesis de energía una vez combinada con oxígeno, el cual proviene de la respiración. Esta energía que se produce es muy importante pues ayuda a llevar a cabo imprescindibles procesos celulares tales como la transmisión nerviosa, el transporte activo, la contracción muscular y la producción de ciertas sustancias químicas. (Laboratorio Clínico Hematológico., 2016)

Es un monosacárido de azúcar simple cuya estructura química es $C_6H_{12}O_6$, es fuente de energía para las plantas y animales al reaccionar con oxígeno, generar dióxido de carbono y agua y liberar energía. (Bermúdez V., et al., 2007)

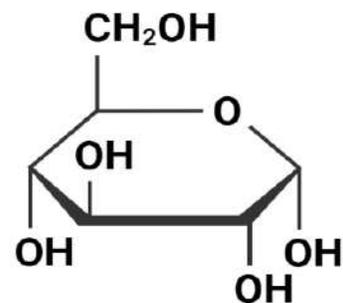


Figura 6. Estructura química de la glucosa.

La glucosa cumple funciones en las células eucariotas de las especies vivientes que habitan el planeta y que son de gran importancia como la generación de

energía para sus actividades vitales. Estas moléculas no son capaces de difundir directamente a través de las membranas celulares, es decir, requieren de ayuda para ir de un lado a otro de la pared celular, por lo que proteínas transportadoras especializadas les ayudan a lograr pasar al interior de las células y así llevar a cabo funciones importantes como la oxidación y el almacenaje, e incorporarse a la vía metabólica que predomine según las condiciones hormonales y energéticas del momento. (Bermúdez V., et al., 2007)

Al encontrarse en muchos de los alimentos que ingerimos normalmente en nuestra dieta, la glucosa pasa al torrente sanguíneo y eleva los niveles en sangre. Como respuesta, el páncreas produce y secreta insulina a la sangre, específicamente una hormona que genera el aumento de la permeabilidad de la célula y facilita así el transporte de glucosa hacia el interior celular, una vez al interior de la célula se convierte en energía y también es usada en forma de glucógeno, ácidos grasos y aminoácidos. De la misma manera, cuando no se ingiere glucosa en un tiempo prolongado como lo es durante el ayuno, se secreta glucagón, quien es una hormona pancreática hiperglucemiante que estimula al hígado y a los músculos con el objetivo de restaurar el equilibrio mediante la descomposición del glucógeno almacenado y la liberación de glucosa al torrente sanguíneo. (Laboratorio Clínico Hematológico., 2016)

Históricamente y aun hoy en día, la obesidad ha sido considerada una problemática conductual que se puede tratar simplemente con modificaciones conductuales como cambios en la dieta y el ejercicio. Pero ha sido demostrado por los avances científicos que, en otras afecciones neurológicas de la salud como el alcoholismo, existen otros importantes componentes tanto biológicos y genéticos que limitan la eficacia del individuo al momento de querer realizar estos ajustes de comportamiento para disminuir el peso y mejorar su salud y alimentación. (Blum K., et al., 2007)

Es por esto que en la obesidad y otras afecciones ligadas al síndrome de deficiencia de recompensa es fundamental abordar factores biológicos y genéticos en sinergia con las modificaciones conductuales. Se tiene la hipótesis de que uno de los factores genéticos que influye en el comportamiento y, por lo tanto, en la obesidad es una predisposición al ansia de glucosa y en general una alteración de la actividad dopaminérgica en el centro de recompensa del cerebro. Esta deficiencia de dopamina lleva a las personas a involucrarse en actividades de comportamiento excesivo, como la búsqueda incesante de alimentos pues se esperaba aumentaría la función de dopamina cerebral. Por esto se presenta este nuevo cambio de paradigma en el pensamiento sobre la obesidad, con la premisa de que consumo de grandes cantidades de alcohol o carbohidratos (atracones) estimula la producción y por ende, la utilización de dopamina en el cerebro, al igual que ocurre con la ingesta de crack/cocaína y el abuso de la nicotina. (Blum K., et al., 2007)

La importancia de tomar en cuenta este biomarcador para este síndrome viene de distintas razones, entre las cuales encontramos que el cerebro es el tejido más sensible a los cambios en la glucemia, pues si la concentración de glucosa es muy baja o alta se manifiestan síntomas como confusión mental o inconsciencia. (Laboratorio Clínico Hematológico., 2016)

También está el hecho de que la glucosa tiene un rol crítico en el metabolismo neuronal, el cerebro contiene neuronas especializadas que utilizan la glucosa como molécula de señalización, la presencia de un cambio en los niveles de glucosa ambiental conduce a alteraciones en la tasa de activación neuronal. (Barry E Levin, 2000)

En algunas otras ocasiones los altos niveles de glucosa en el suero sanguíneo pueden estar ligados a condiciones patológicas diversas como: hipertiroidismo, infarto del miocardio, enfermedad de Cushing, convulsiones, etc. Y los bajos

niveles pueden deberse a: insulinomas, hipotiroidismo, hipopituitarismo, carcinomas extrapancreáticos, mala absorción de glucosa, estados de hambre, alcoholismo, etc. (Laboratorio Clínico Hematológico., 2016)

Al obtener mediciones de glucosa en el cuerpo, son considerados normales los valores de glucemia (en ayunas) menores a 100 mg/dL en adultos, mujeres y niños, y después de dos horas de haber ingerido alimentos (carga de glucosa) los valores normales son de aproximadamente 140 mg/dL. (Rojas de P E, et al., 2012)

La revisión de estos parámetros es fundamental pues cuando los valores son superiores a los mencionados indican prediabetes, y son considerados de riesgo con posible desarrollo de diabetes tipo 2. En mujeres embarazadas es solo un poco diferente, pues si en ayunas los valores son iguales o superiores a 105 mg/dL se requerirá hacer pruebas de tolerancia oral a glucosa. Una persona diabética debe tener especial cuidado y debería monitorear sus valores continuamente pues un resultado fuera de lo normal puede significar un mal control de la diabetes. (Laboratorio Clínico Hematológico., 2016)

Las alteraciones del metabolismo de la glucosa antes de la aparición de diabetes se definen como:

- Glucosa alterada en ayunas (GAA): valores entre 100mg/dL y 125 mg/dL.
- Intolerancia a la prueba de glucosa (ITG) después de una carga de 75 gramos de glucosa y a dos horas son cifras entre 140 y 199 mg/dL.

(Rojas de P E, et al., 2012)

Por todo esto, al consumir alimentos dulces o ricos en carbohidratos y por ende de glucosa, se estimula la producción y utilización de dopamina en el cerebro

como un proceso de auto curación mediante atracones, llevándolos a caer en trastornos alimenticios como obesidad, anorexia nerviosa, etc. Además del riesgo de padecer una enfermedad como la diabetes a consecuencia del alto consumo de glucosa, se puede también afectar otros órganos por los niveles altos de glucemia como riñones, los vasos sanguíneos, la retina, entre otros. (Laboratorio Clínico Hematológico., 2016)

Se han realizado estudios de neuroimagen en animales y humanos en donde se ha encontrado que las drogas como el alcohol, los opiáceos, los psicoestimulantes, alimentos sabrosos, la glucosa, el juego y la hipersexualidad activan la liberación de dopamina, demostrado así que las regiones del cerebro involucradas en el llamado circuito de recompensa se ven afectadas por estos comportamientos. Se inician y mantienen estas actividades pues la dopamina que se libera genera placer que ayuda a aliviar el deseo o el estrés y restaurar la sensación de bienestar mediante la restauración del homeostasis de la dopamina. (Blum K., et al., 2017)

6.3.2. Colesterol

Esta molécula evolucionó después de que la atmósfera terrestre se volviera aeróbica y hoy en día el colesterol está presente en las células eucariotas, pero no en la mayoría de las procariontas. (Ma. H. et al., 2006)

Una molécula sumamente indispensable para la vida es el colesterol (3-hidroxi-5,6 colesteno) pues desempeña importantes funciones de estructura y metabolismo, ambas vitales para los seres humanos. Está anclado estratégicamente en las membranas de cada una de las células de

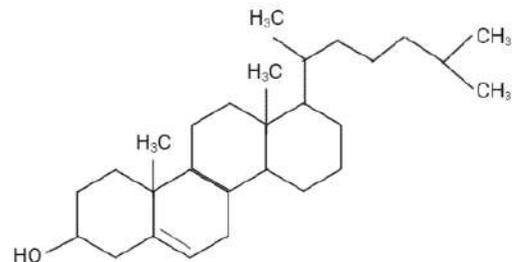


Figura 7. Estructura química del colesterol.

las que estamos formados y en ellas se encarga de modular la fluidez, permeabilidad y por supuesto, su función. (Maldonado et al., 2012)

El átomo de oxígeno en su grupo 3-OH proviene del O₂. Las membranas plasmáticas animales de las células eucariotas suelen ser ricas en colesterol a diferencia de las membranas de sus orgánulos, quienes suelen tener cantidades menores de este lípido neutro. (Ma. H. et al., 2006)

Una parte del colesterol presente en el cuerpo humano proviene de lo que consumimos (colesterol exógeno) y otra parte se sintetiza por nuestras células (colesterol endógeno) en los hepatocitos principalmente. Los alimentos forman la principal fuente externa de colesterol, en específico los que provienen de origen animal como son la carne, aves, el huevo, las grasas, el pescado y la leche, los cuales causan un aumento de su concentración en el suero sanguíneo y su acumulación en el cuerpo. Básicamente todos los tejidos formados de células con núcleo pueden sintetizar colesterol. Esta síntesis se lleva a cabo y es responsabilidad de la fracción microsómica del citosol llamada retículo endoplásmico. El colesterol tiene un papel fundamental en el cuerpo pues forma parte de las membranas de cada célula, también actúa como precursor de todas las hormonas esteroideas, ácidos biliares, y de la vitamina D, también es importante llevar una dieta equilibrada pues las mutaciones genéticas en el rLDL y una ingesta elevada de colesterol y llevan al incremento de colesterol en la sangre a valores más allá de los recomendados, favoreciendo enfermedades cardiovasculares. (Maldonado et al., 2012)

El colesterol es una sustancia con característica cerosa producida por el hígado animal y también suministrada en la dieta en alimentos como los mencionados anteriormente. No muchas personas saben que el cuerpo produce colesterol de forma natural, según los antecedentes familiares genéticos, este colesterol producido por el cuerpo es de donde proviene la mayor parte del colesterol total.

El hígado, al igual que otras células individuales en todo el cuerpo, produce colesterol, el cual puede llegar al torrente sanguíneo. Este colesterol se divide en dos, a los que se les llama comúnmente como el colesterol bueno (lipoproteína de alta densidad) o malo (lipoproteína de baja densidad) para el sistema cardiovascular. (Ma. H. et al., 2006)

Si tomamos en cuenta la alimentación de la población podríamos decir que las personas deben reducir la cantidad que ingieren de grasas saturadas, grasas trans, colesterol y grasas totales en su dieta, pues algunos estudios han demostrado una mayor mortalidad en personas con niveles bajos de colesterol, es decir, inferiores a 160 mg/dl. Las causas de estas muertes son no coronarias (algunos cánceres, enfermedades respiratorias crónicas, enfermedades hepáticas y traumatismos). Por otro lado, alguna evidencia sugiere que valores de colesterol total menores a 160 mg/dl no son peligrosos. Y en muchos países, una fracción importante de la población lidia con niveles de colesterol en este rango durante toda la vida y no presentan problemas de salud graves. (Ma, H. et al., 2006)

La hipercolesterolemia es la dislipidemia que es más frecuente e importante por su trascendencia etiopatogénica en las enfermedades cardiovasculares, la cual es una condición que se define clínicamente como la presencia de niveles excesivamente altos de colesterol en la sangre (>240 mg/dL) y elevación de LDL (>190 mg/dL). (Maldonado et al., 2012)

Existen múltiples factores que influyen en la absorción del colesterol en el cuerpo, entre ellos, la edad y el sexo pues conforme vamos envejeciendo, los niveles de colesterol van aumentando. Otro factor es la dieta y el peso pues las grasas saturadas, las grasas trans y el colesterol en lo que consumimos aumentan los niveles de colesterol, por lo que al consumirlos en menor cantidad reduciría el nivel de colesterol en el suero sanguíneo. El sobrepeso es un factor de riesgo

para enfermedades del corazón, y el aumento del colesterol en sangre. Bajar de peso puede ayudar a mejorar y bajar los niveles de LDL, colesterol total y triglicéridos en el cuerpo, así como a aumentar el HDL. La importancia de conocer los datos genéticos familiares viene de que los genes determinan en gran parte si el colesterol alto puede presentarse en los miembros de la familia y también nos da una idea de la cantidad de colesterol que produce un individuo en su cuerpo. Algunos otros factores relevantes son la composición y densidad bacteriana presente en la flora intestinal y la cantidad y composición de los ácidos biliares. (Ma. H. et al., 2006)

El colesterol total en sangre es la medida más común del colesterol en sangre y es medida en miligramos por decilitro de sangre (mg/dl). El contenido de este en la sangre es el dato clave para la información de salud relacionada con el colesterol.

La prueba estándar se realiza después de un ayuno de 9 a 12 horas sin alimentos, líquidos o pastillas. Esta nos entrega información sobre el colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos (grasas en sangre). Menos de 200 mg/dl colesterol total en sangre es el nivel deseable, de 200 a 239 mg/dl es el límite considerado alto para la enfermedad cardíaca, y 240 mg/dl y más es colesterol es considerado alto en la sangre. La persona que tiene un nivel de 240 mg/dl o más corre el doble de riesgo de sufrir algún padecimiento cardíaco que alguien con colesterol por debajo de 200 mg/dl, ya que el colesterol es tan importante en la salud del corazón y una alta cantidad es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares como la enfermedad coronaria y el accidente cerebrovascular. (Ma. H. et al., 2006)

Todos los alimentos que provienen de animales contienen colesterol, incluidos el huevo, la carne roja y los camarones, por lo cual es difícil de eliminar a pesar de que uno este cuidando su dieta. Cuando comemos, el colesterol de los alimentos

es absorbido por nuestro tracto digestivo, luego llega a nuestro hígado y puede circular a través de nuestro cuerpo en el torrente sanguíneo (Ma. H. et al., 2006), de ahí la relación que se plantea realizar en este estudio, pues podremos determinar los valores de colesterol en sangre y al mismo tiempo ligarlos con los otros dos biomarcadores (glucosa y dopamina) y llevar una respuesta más efectiva sobre la obesidad y el SDR y en general dar una pauta a conocer los valores en sangre recomendados, los varios posibles factores que repercuten en su absorción, las consecuencias de su consumo excesivo e influir para estilos de vida saludables.

6.3.3. Dopamina

Al hablar de la dopamina hablamos de las catecolaminas, quienes son compuestos formados por un núcleo catecol (un anillo de benceno con dos hidroxilos) y una cadena de etilamina o alguno de sus derivados. (Bahena-Trujillo, et al., 2000)

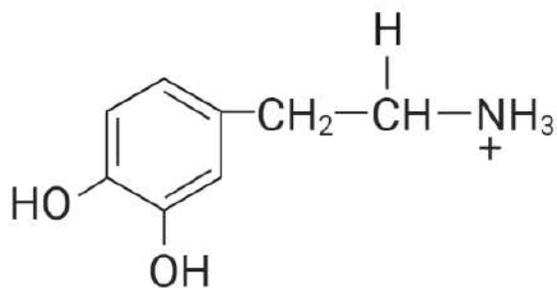


Figura 8. Estructura química de la dopamina.

Es una monoamina biogénica que pertenece a una familia de neurotransmisores llamados "catecolaminas", los cuales incluyen neurotransmisores relacionados: dopamina, norepinefrina (noradrenalina) y epinefrina (adrenalina). La dopamina ha sido implicada en la regulación de conductas apetitivas de la vida del ser humano como la alimentación, la bebida, las conductas maternas y sexuales, al igual que en conductas patológicas que van desde la adicción a las drogas hasta las enfermedades como la esquizofrenia. (Bozarth, M., 2017)

La dopamina tiene el papel en el sistema nervioso central (SNC) de control de la locomoción, la cognición, el afecto y la secreción neuroendocrina. Todas estas

acciones de la dopamina están mediadas por subtipos de receptores diferentes, en específico cinco, que son miembros de la gran superfamilia de receptores acoplados a proteína G. (Jaber, M., 1996)

La dopamina es sintetizada a partir del aminoácido llamado Ltirosina y hay mecanismos existentes de regulación de su síntesis y liberación muy precisos. A través de técnicas de clonación molecular se ha podido identificar 5 tipos diferentes de receptores dopaminérgicos, todos los cuales se acoplan a proteínas G y que se dividen en dos familias farmacológicas conocidas como D1 y D2. Los receptores de la familia D1 tiene como subtipos D1 y D5, y están acoplados a proteínas Gs. Como principal mecanismo de transducción de señales estos estimulan la formación de AMPc. Por otro lado, la familia D2 tiene a los subtipos D2, D3 y D4 lo que inhiben la formación de AMPc, también realizan la activación de canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a los canales dependientes del voltaje, efectos que igualmente son mediados por proteínas G (Gai y Gao). Debido a las tan diversas alteraciones relacionadas ya sea directa o indirectamente con la transmisión dopaminérgica, el interés y estudio de los sistemas y receptores dopaminérgicos del SNC son bastante amplios y serios. (Bahena-Trujillo, et al., 2000)

Sintetizada en el citoplasma en las terminales dopaminérgicas, la dopamina puede ser liberada al espacio sináptico de forma directa o bien ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para posteriormente ser liberada por exocitosis, en un proceso en el que la dopamina contenida en las vesículas se libera al exterior al fusionarse la membrana vesicular con la membrana de la terminal presináptica. (Südhof TC, 1995)

Se ha visto que la dopamina que es liberada de manera preferente ante una estimulación sináptica es la que ha sido recién sintetizada. Así, parece que el neurotransmisor se encuentra en dos pozas metabólicas y vesiculares; una con

dopamina recién sintetizada y otra en forma de almacén. Se piensa que la existencia de una tercera poza metabólica puede ser probable, que estaría siendo abastecida por los transportadores y que sería la fuente de la liberación de dopamina por transporte reverso. (Feldman RS, et al., 1997)

Existen diversas funciones cerebrales en las que la dopamina cumple una función reguladora de importancia. Por mencionar algunas alteraciones frecuentes están la enfermedad de Parkinson y la Esquizofrenia, y en donde podemos ver significativamente ejemplificada esta función por algunos procesos patológicos relacionados con alteraciones en la transmisión dopaminérgica. (Bahena-Trujillo, et al., 2000)

Como se mencionó anteriormente, la dopamina es participe de funciones entre las que se incluye la actividad locomotora, entre otras, pero además ha sido vinculada con procesos motivacionales como la recompensa o el reforzamiento. Las vías dopaminérgicas, en especial las proyecciones ascendentes en el área ventro-tegmental hacia el núcleo accumbens, son de importancia en el mecanismo cerebral de autoestimulación, pues se ha demostrado que ciertas drogas incrementan la transmisión dopaminérgica en áreas cerebrales límbicas que se involucran con la emotividad. (Bahena-Trujillo, et al., 2000)

Ya que el Síndrome de Deficiencia de Recompensa (SDR) fue definido como un predictor de conductas impulsivas y adictivas relacionadas en gran parte con la disfunción del sistema dopaminérgico mesolímbico (DA). (Blum K, 1996) La unión del neurotransmisor dopamina (DA) al receptor D2 DA (DRD2), por ejemplo, se ha relacionado con una variedad de comportamientos que reflejan la búsqueda de recompensa, por esto el DRD2 se ha denominado gen de recompensa.

El alelo TaqI A1 del gen DRD2 ha sido asociado más que nada con trastornos neuropsiquiátricos en general y actividades como agresividad, alcoholismo y condiciones de uso crónico de drogas. (D.S. Chester, et al, 2015) (Z. Duan, et al,

2015) Algunas otras de las asociaciones al DRD2A1 son las manifestaciones del trastorno de personalidad antisocial comórbido y las personas con trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH) o síndrome de Tourette (E. P. Noble, et al, 1998), al igual que una de las premisas que nos llevaron al estudio del síndrome, que es la gran búsqueda de novedades relacionadas a la dopamina como la ludopatía y obesidad. (Blum K, 1996) (D. E. Comings, et al, 1996)

Aunque desde un inicio se denominó a la dopamina como un neurotransmisor del placer o anti estrés, se le puede considerar principalmente como una "molécula de motivación" pues mejora a gran medida el estado de ánimo donde el individuo se siente bien y reduce el estrés aprovechando la liberación de la misma en la sinapsis.

La vía mesocortilímbica de la DA desempeña un rol particularmente importante en el arbitraje de conductas naturales que buscan recompensas, como el sexo y la alimentación, al igual que de comportamientos no naturales como el consumo crónico de drogas. Se ha finalizado la fase de consumación de la búsqueda natural de la recompensa cuando se han satisfecho los impulsos fisiológicos como el hambre y la reproducción. Por otra parte, la búsqueda de recompensas que no son naturales o críticas para la supervivencia del individuo, tienden a involucrar el aprendizaje y la formación de hábitos y, por lo tanto, se implica la satisfacción de los placeres adquiridos, es decir, que se adquirieron a través de la repetición, como el consumo y uso de alcohol, drogas, el juego y otros comportamientos de riesgo. (Febo M., et al., 2017)

Mediante la tomografía por emisión de positrones, las cuales son conocidas como PET, se descubrió que las personas obesas, personas alcohólicas y las personas dependientes a las drogas, tenían niveles significativamente más bajos de receptores D2 que los de las personas que no tienen una adicción. (N. D. Volkow, et al.,1996) Además, por medio de evidencia clínica y preclínica sabemos que la

obesidad es inversamente proporcional a los niveles de DRD2 en el cerebro y que la restricción de alimentos revirtió este hallazgo. (G. J. Wang, et al,2009) (P. K. Thanos, et al., 2008)

De esta manera y gracias a las evidencias que nos arrojan estudios como estos, podemos vincular la elaboración de dopamina en el cerebro y su presencia en el torrente sanguíneo con el síndrome de deficiencia de recompensa, de hecho, el uso de una terapia de reposición dopaminérgica natural a largo plazo, que promueva una función dopaminérgica saludable, podría conducir a una modalidad accesible, eficaz y segura para tratar los comportamientos del SDR. El apoyo adicional para este concepto proviene de la comprensión integral del papel que tiene la dopamina en el núcleo accumbens (NAc) como un mensajero "querido" del sistema DA mesolímbico. Y como Robinson et al. (2016) sugirieron, tanto en el trastorno de la adicción al juego como en la adicción a la comida, la sensibilización del sistema de "querer" da como resultado la disociación de "gustar" y "querer". (Blum K., et al., 2017)

6.3.4. pH

El pH es usado mucho en la química como una escala numérica para determinar la acidez o basicidad de una solución acuosa. Este es el algoritmo negativo en base 10 de la actividad del ion de hidrógeno.



Figura 9. Escala de pH.

Esta escala abarca los valores del 0 al 14, en donde podemos observar en la figura 9 que las soluciones con valores menores a 7 son llamadas ácidas y los en consecuencia las soluciones con valores mayores a 7 son llamadas alcalinas; Solo aquellas soluciones que tienen un valor de 7 son llamadas soluciones básicas. Cada solución tiene un pH específico que la representa, por ejemplo, el

agua pura tiene un pH de 7, este valor nos indica que es neutral, es decir, ni ácida ni alcalina. Y contrariamente de lo que se cree popularmente, los valores del pH pueden ser inferiores que 0 o mayor que 14, como es el caso de los ácidos y las bases que son muy fuertes. Sin embargo, estos valores son difíciles de medir con una alta presión (Lim, 2006)

En la actualidad los diversos campos científicos como lo es en la biología, la medicina, la química, la agricultura, la ciencia de los alimentos, las ciencias ambientales, la ingeniería química, la nutrición y muchos otros, la determinación cuantitativa del pH es muy importante.

Como se mencionó, el pH es el logaritmo negativo en base 10 de la actividad del ion hidronio solvatado (H_3O^+), pero a menudo se expresa como la medida de la concentración de iones hidronio en una solución. El hidronio es el nombre común que se le da al catión acuoso H_3O^+ . Es el ion oxonio producido por la protonación de la molécula de agua. Es un ion positivo que se forma cuando el ácido de Arrhenius se disuelve en agua; Estos ácidos en solución liberan un protón o ion hidrógeno positivo H^+ , a las moléculas de agua circundantes (H_2O), que forman parte del disolvente. (Buck 2002)

Por lo tanto, las sustancias químicas que tienen como propiedad ser ácidas se denomina ácidas, y a las sustancias que tienen propiedades de ser base, se les denomina básicas. Su importancia de tomarlo en cuenta en los estos estudios viene de que se planea hacer a futuro mediciones en el suero sanguíneo, y los diversos fluidos del cuerpo humano realizan funciones que incluyen lubricación, transporte de oxígeno y nutrientes y la protección. Debido a estas funciones y a la capacidad de realizarlas correctamente, se debe de variar el grado de acidez o alcalinidad para que estas funciones puedan ajustarse dependiendo de la sustancia que se esté ensayando, determinando el valor de uso óptimo. Pues es un error pensar que nuestro cuerpo tiene un valor de pH constante; Muchas soluciones en el cuerpo humano tienen concentraciones de iones de hidrógeno

casi neutras (valores cercanos a 7), aunque este no es el caso en todo el cuerpo. (Vázquez E, et al., 2016)

Por esto y otras razones que se mencionaran a continuación es importante controlar cuidadosamente los niveles de acidez-basicidad en cada fluido corporal y también de las sustancias presentes en el multisensor.

Se sabe desde hace mucho tiempo que los principales encargados de realizar catálisis enzimática son los cambios en la concentración de iones de hidrógeno.

Michaelis y Davidsohn intentaron explicar la característica curva que relaciona velocidad versus pH en forma de campana obtenida para muchas reacciones catalizadas por enzimas. Ellos propusieron que la enzima, que se suponía que era anfótera, podía existir en su forma ácida, básica o isoelectrónica, y sugirieron que era este último estado de la enzima el que era catalíticamente activo. Estudios experimentales posteriores de la cinética del pH llevaron a la conclusión de que es el estado de ionización del complejo enzima-sustrato, no la enzima libre, lo que hace que la velocidad catalítica cambie a medida que cambia el pH. Sin embargo, fue Haldane quien sugirió que más que el punto isoelectrónico de la enzima era la distribución de carga asociada con ciertos grupos funcionales de la enzima quien era responsable de las alteraciones que se observaban en las tasas de catálisis enzimática inducida, es decir, debido a cambios en la concentración de iones de hidrógeno.

Todos los estudios sobre el efecto del pH sobre la actividad enzimática han proporcionado información realmente útil sobre el mecanismo catalítico de las enzimas.

Por lo tanto, podemos admitir que los experimentos, donde se involucra la cinética del pH, pueden brindar información sobre la naturaleza de los ácidos y los grupos básicos en la enzima relacionada con los catalizadores.

Estos incluyen: correlacionar pK particulares de aminoácidos libres con residuos de aminoácidos tal como existen en las proteínas; la posibilidad de que los pasos limitantes de la velocidad en un mecanismo cinético puedan cambiar a medida que se altera el pH; y finalmente, la posibilidad de que un pK cinéticamente importante pueda representar un cambio conformacional requerido de la enzima en lugar de la interacción de un grupo en la enzima con el sustrato. (H.J., 1975)

La influencia que tiene el pH sobre la actividad enzimática depende de la naturaleza de los aminoácidos en el sitio activo que sufre con protones y desprotonación, así como de cambiar de forma de la ionización de aminoácidos.

Las enzimas tienen una gran sensibilidad a los cambios de pH y funcionan mejor dentro de un rango muy limitado, es decir, a un determinado pH óptimo, es por esto que realizamos distintas pruebas repetidas a diferente pH, de esta manera podemos encontrar un rango o pH óptimo en que trabajan nuestras enzimas, esto para obtener los mejores resultados en la experimentación. (Battestin V., et al., 2007)

6.4. Biomoléculas

6.4.1. Glucosa oxidasa

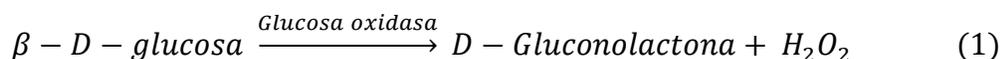
Hoy en día, las enzimas tienen muchas aplicaciones debido a su función catalítica, se utilizan en innumerables procesos tecnológicos y en general han registrado avances significativos en la industria, especialmente en la industria Farmacéutica y Biológica, lo que ha tenido este impacto en los productos de medios de diagnóstico como el inmunoensayo enzimático, en química clínica

y química seca, donde las técnicas de inmovilización están cada vez más desarrolladas debido a la creciente estabilidad del sistema.

En la bioquímica clínica, las enzimas se utilizan en una variedad de métodos de diagnóstico, como biosensores e inmunocromatográfica. En química seca, se introducen tiras reactivas para cuantificar parámetros importantes en el consultorio médico y ampliarlas para el autocontrol por parte de los pacientes. (Bilbao, et al. 2000)

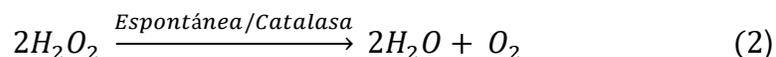
Todas las enzimas oxidasas usan oxígeno molecular como fuente de oxidación en el catalizador, y dependiendo de la capacidad de la enzima para transferir dos o cuatro electrones al oxígeno, provocando peróxido de hidrógeno o agua. (Reviejo, et al., 2000)

La glucosa-1-oxidasa (GOX) (beta-D-glucosa: oxígeno-1-oxidoreductasa, EC 1.1.3.4) es caracterizada debido a que cataliza la oxidación de beta-D-glucosa a D-gluconolactona y peróxido de hidrógeno y ambos se descomponen espontánea y catalíticamente. Sin embargo, la actividad enzimática de GOX se disminuye tras la acumulación de peróxido de hidrógeno y la inactivación de la enzima; El producto generado de la degradación de la D-gluconolactona, el ácido glucónico (C₆H₁₂O₇) se acumula y reduce el pH de la solución. No es sorprendente que tanto el ácido glucónico como el peróxido de hidrógeno puedan hacer que el producto inhiba la GOX.

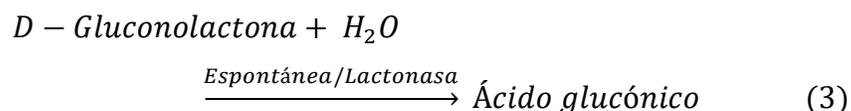


Normalmente, la actividad de la enzima complementa la actividad de la catalasa, la cual se encarga de descomponer el peróxido de hidrógeno en

oxígeno y agua. Teniendo en cuenta el sistema combinado de hidrólisis de glucosa oxidasa-catalasa y gluconolactona, tenemos:



Así, la oxidación de glucosa por acción enzimática genera la formación de ácido glucónico.



Estructuralmente, la glucosa oxidasa es un homodímero formado por dos subgrupos idénticas de 80 kDa y dos dinucleótidos de flavina adenina (FAD) unidos de forma no covalente. La coenzima FAD actúa como transportador de electrones durante la catálisis. Su forma que más comúnmente encontramos disponible proviene de *A. niger*, esta contiene aproximadamente un 20 % en peso de aminoazúcar y aproximadamente un 16-19 % en peso de carbohidratos, en los que el 80 % en peso son moléculas de manosa unidas por N- u O-glucosídicamente.

La glucosa oxidasa se crea naturalmente por algunos hongos e insectos y su función natural está relacionada a gran manera con su actividad catalítica, lo que incluye actividad antibacteriana y antifúngica al producir peróxido de hidrogeno. (Wong, et al., 2008)

En medicina, medir los niveles de glucosa tanto en sangre como en orina es de gran interés porque ayuda a diagnosticar, controlar y seguir a los pacientes diabéticos, y la introducción de las tiras reactivas ha tenido un impacto particularmente grande en los beneficios obtenidos para manejar esta condición.

Hay muchas tecnologías disponibles para desarrollar este dispositivo de diagnóstico; Las enzimas GOD y POD se inmovilizan mediante adsorción o polimerización, y se utilizan varios colorantes y estabilizadores para realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas de sangre y orina. Existen diferentes métodos para la inmovilización de la glucosa oxidasa, como por ejemplo los que hacen uso de albumina bovina y glutaraldehído en el entrecruzamiento con el soporte y los que se vincula la enzima al covalente con las membranas de diferentes naturalezas. (Bilbao, et al., 2000)

Difiere de otras deshidrogenasas que actúan sobre la glucosa, pero no pueden usar el oxígeno como aceptador de hidrógeno. Como coenzima utiliza flavín adenín dinucleótido (FAD) transcurriendo la reacción en dos etapas. En la primera etapa se hace una remoción de dos átomos de hidrogeno de la glucosa con la siguiente reducción del FAD provocando la formación de la lactona. Después viene una segunda etapa donde los átomos de hidrogeno son movidos hacia el oxígeno molecular, formando peróxido de hidrogeno y al mismo tiempo la oxidación de la coenzima.

Esta enzima opera en un amplio rango de pH. A pH alcalino es inestable, debido a que libera actividad. Su velocidad de reacción máxima entre 4 y 6.5 con un ligero pico en 5.5.

Se debe tener en cuenta la temperatura porque los cambios en este parámetro provocan cambios en la concentración de oxígeno. Su solubilidad disminuye al aumentar la temperatura. La velocidad de reacción permanece constante a temperaturas entre los 30° y 60°C. En este sentido, la enzima se mantiene estable durante 6 horas a 40°C en el rango de pH de 4.5 a 6.0, mientras que a 50°C la actividad disminuye un 10% durante el mismo período. A temperaturas de 60°C y superiores, la inactivación se produce más rápido dependiendo del pH. (Voget, 1985)

6.4.2. Colesterol oxidasa

El colesterol oxidasa (COx) es utilizada comúnmente utilizada cuando se busca el desarrollar un biosensor de colesterol, debido a que se usa como el elemento biosensible. Es una flavoenzima que tiene un dinucleótido de flavina adenina (DFA), la cual acelera la deshidrogenación del grupo hidroxilo C(3)-OH en la molécula de colesterol. Esta enzima se caracteriza por ser simple, específica y altamente sensible, su hace uso de ella para la determinación del colesterol sérico. (Medrano C., 2012)

Usando DFA, la COx cataliza la oxidación e isomerización del 3 β -hidroxiesteroide con el doble enlace trans $\Delta^5 - \Delta^6$ del anillo esteroide, produciendo Δ^4 -3-cetona (4-colesten-3-ona) respectivamente y peróxido de hidrogeno. El DFA es el principal aceptor de hidruro del alcohol. Por lo tanto, la reducción de este convierte los equivalentes redox en dioxígeno como aceptor final como se puede observar en *la figura 10*. (Medrano C., 2012)

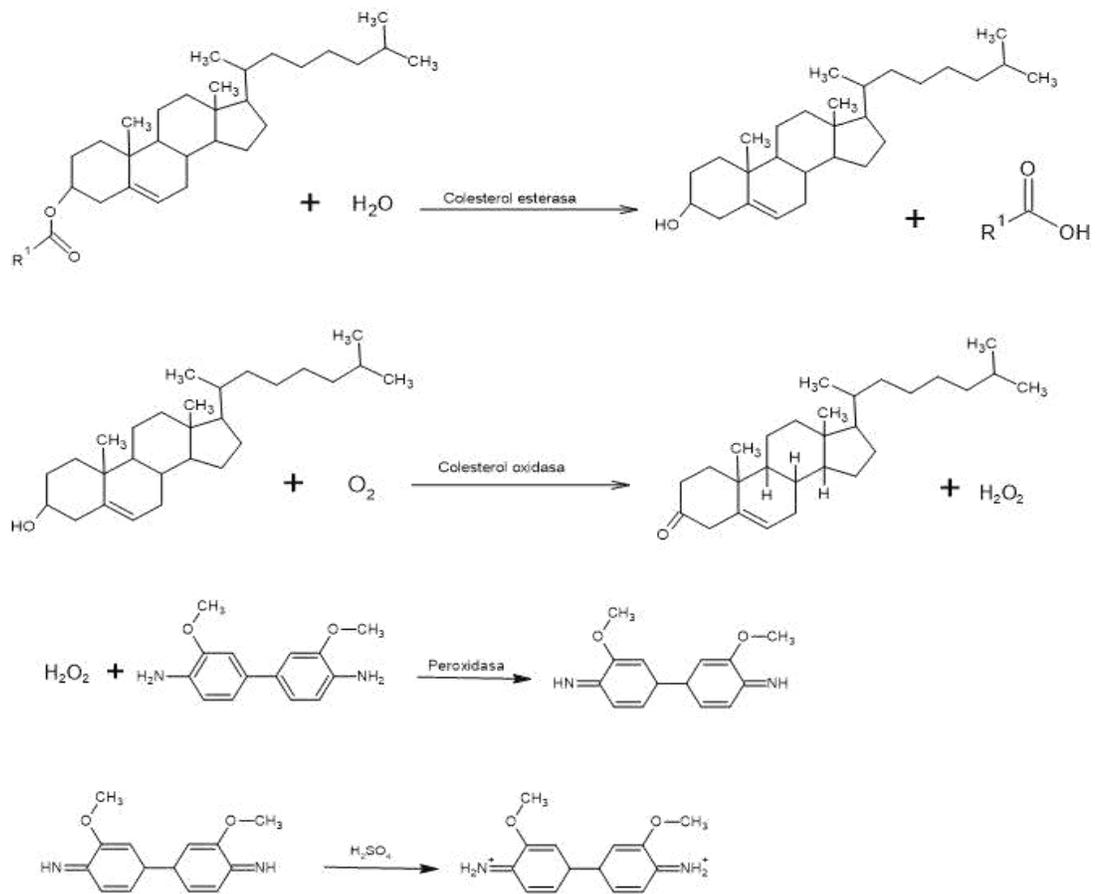


Figura 10. Reacción de Colesterol oxidasa

El colesterol oxidasa es una enzima intracelular o extracelular producida por diversos microorganismos. Las colesterol oxidasas pueden ser enzimas intrínsecas unidas a la membrana ubicadas en el exterior de la célula o pueden aislarse del filtrado del líquido como una enzima extracelular. (Kumari L. & Kanwar S., 2012)

Las bacterias que producen al colesterol oxidasa se clasifican principalmente en dos subclases:

1. *Patógenos:* Estas bacterias utilizan el colesterol como fuente.

2. *No patógenos*: Estas necesitan del colesterol oxidasa para infectar a los macrófagos del huésped.

Estos dos tipos de bacterias regulan el alza de la expresión de colesterol oxidasa en presencia del colesterol.

Hay muchos microorganismos de diferentes entornos que pueden producir colesterol oxidasa, pero las fuentes más comunes de colesterol oxidasa son las bacterias *Sterptomyces hygroscopius* y *Brevibacterium sterolicum*.

El colesterol oxidasa tiene un gran valor comercial ya que se usa rutinariamente en los laboratorios para el ensayo de colesterol sérico. Esto se debe a que la monitorización del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y del colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero ya que es importante para el diagnóstico de hiperlipemia o enfermedad aterosclerótica. (Medrano C., 2012)

Los procedimientos aplicados para la extracción y purificación del colesterol oxidasa son similares a los aplicados a las enzimas. Sin embargo, generalmente se requieren diferencias sutiles en los procedimientos de extracción y purificación para obtener un rendimiento y la clarificación.

Las técnicas adoptadas para la extracción dependen de la naturaleza de la secreción de la enzima, es decir, si es intracelular o extracelular. Se cree que el colesterol oxidasa de *Nocardia rhodochrous* es una enzima intrínseca unida a la membrana ubicada en el exterior de la célula, por lo que la enzima puede extraerse de las células bacterianas mediante tratamiento con Triton X-100 o tripsina, o en un nivel más bajo con un tampón de fosfato, pero no utilizando violaciones mecánicas de las células

o cambiando la fuerza de pH o el tampón iónico. (Kumari L. & Kanwar S., 2012)

Uno de los problemas que se presenta es que bajo ciertas condiciones el colesterol celular puede no oxidarse y aun así ser un buen sustrato bajo otras.

Una aplicación del colesterol oxidasa, es la delimitación del colesterol de la membrana plasmática como el oxidado en la célula intacta. A pesar de ello, el tratamiento con colesterol oxidasa puede promover la calidad permeable pasiva de la membrana plasmática a solutos pequeños como los iones de potasio. Que ocurra esto es de preocupar porque estas fugas pueden conducir a la inflamación osmótica, la lisis celular y la oxidación de las reservas intracelulares. Sin embargo, la fuga de lactato deshidrogenasa del citoplasma fue insignificante. Dada a esta impermeabilidad a las macromoléculas, el colesterol oxidasa no debería entrar en el citoplasma. (Lange Y, 2005)

Hace mucho tiempo supo que la mayor parte del colesterol en células eucariotas complejas, como los macrófagos, se intercambiará con un sumidero de lípidos extracelulares como una indicación de que la membrana plasmática era rica en esteroides. Se llegó a una conclusión similar a partir de estudios de fraccionamiento subcelular. Sin embargo, no se ha podido demostrar un cálculo preciso de la fracción de colesterol en la membrana plasmática. Es por ello por lo que la susceptibilidad a las sondas enzimáticas se utiliza ampliamente como criterio para la exposición o cripticidad de proteínas, fosfolípidos y glicoconjugados en la superficie de células y organelas.

En el caso del colesterol oxidasa, al menos el 90% del colesterol no esterificado total fue atacado por el colesterol oxidasa en glóbulos rojos

fijados con glutaraldehído, mientras que alrededor del 80% se oxido en hepatocitos fijados. (Lange Y, 2005)

El método del colesterol oxidasa para la estimación del colesterol en la superficie celular requiere menos cálculos y suposiciones. Estudios hechos ayudan a corrobora la suposición de que los conjuntos de esteroides susceptibles e insensibles residen en diferentes membranas. (Kumari L. & Kanwar S., 2012)

La susceptibilidad al colesterol oxidasa del colesterol, ya sea en forma química o isotópica, se ha utilizado para caracterizar la redistribución de esteroides en células intactas fijadas después de diversos estímulos y perturbaciones.

6.4.3. Monoamino oxidasa A

La monoamino oxidasa (MAO) es una enzima importante en la desanimación de aminas biogénicas en el cuerpo. Existen dos formas bioquímicamente distintas de esta misma enzima las cuales son, A y B, estas están codificadas en genes separados en el cromosoma X humano. (Gökhan S. & Xandra O., 1991)

Esta asociación indica que el propio gen MAO-A es un determinante principal de los niveles de actividad, aparentemente, en parte, a través de elementos reguladores no codificantes.

Es una enzima que contiene flavina que degrada una variedad de aminas biogénicas, incluidos los neurotransmisores norepinefrina (NE), dopamina (DA) y serotonina (5-HT), así como en el neuromodulador feniletilamina (PEA). Se han identificado dos formas de la enzima, MAO-A y MAO-B, sobre la base de la diferencia de peso molecular, afinidades de sustrato,

sensibilidades de inhibidor y propiedades inmunológicas. Estas enzimas se expresan en todo el cuerpo, pero difieren en el desarrollo y la expresión específica de la célula. (Garrick & Murphy, 1982)

La dopamina (DA) es un sustrato tanto para MAO-A como para MAO-B, aunque la mayoría de los tejidos expresan niveles más altos de MAO-B en astrocitos y neuronas serotoninérgicas, esta exhibe mayor afinidad por la serotonina (5-HT) y norepinefrina (NE) mientras que MAO-A se expresa en niveles más altos en neuronas catecolaminérgicas y tiene más afinidad por el neuromodulador feniletilamina (PEA). (Shih J. et al., 1999)

La capacidad de los MAO para catabolizar neurotransmisores las vuelve grandes candidatas para el estudio de enfermedades neurológicas y rasgos de comportamiento y psiquiátricos. (Shih J. & Thompson R., 1999)

Se han caracterizado clones cDNA de longitud completa para MAO-A y MAO-B humanos, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para MAO-A y Mao-B en humanos, indican que estas dos proteínas están codificadas en genes separados.

La enzima MAO-A se puede medir en fibroblastos de piel cultivados y placeta, mientras que la MAO-B se puede medir en plaquetas y linfocitos. Los fibroblastos de la piel son bastante bajos, con proporciones de actividad MAO-A (80% - 100%) y actividad MAO-B (0% - 20%). (Edelstein et al., 1978).

Existen aumentos drásticos en la actividad de MAO-A en las células debido al envejecimiento, esto puede ser debido por la edad del donante o a la entrada de las células en senescencia en cultivo y al tratamiento de glucocorticoides. Estas variaciones de actividad de la MAO indican afectar

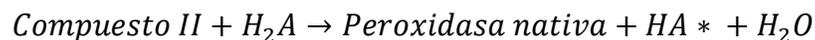
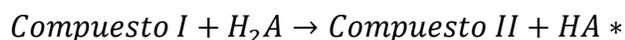
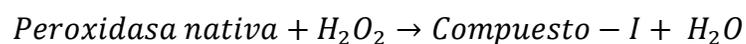
los rasgos neurofisiológicos y de comportamiento en los humanos. (Gökhan S. & Xandra O., 1991)

Un hallazgo interesante implica a MAO-A en el control del comportamiento agresivo en humanos. Es por ello por lo que se han realizado estudios tanto de la MAO-A y MAO-B donde se busca polimorfismos que puedan estar relacionados con otros fenotipos psiquiátricos. Se ha encontrado que la mayoría de los polimorfismos de MAO-A conocidos afectan las secuencias intrónicas o introducen un cambio silencioso en los polimorfismos del marco de lectura abierto. (Shih J. & Thompson R., 1999)

La mayoría de los polimorfismos MAO-A conocidos afectan las secuencias intrónicas o introducen un cambio silencioso en los polimorfismos del marco de lectura abierto. Se ha encontrado un polimorfismo VNTR que afecta la actividad transcripcional en el promotor del gen MAO-A, el cual se asocia a niveles bajos de actividad de MAO-A, esta variante ocurre con frecuencia más alto de lo normal en los pacientes con trastornos de pánico. (Lu et al., 1999)

6.4.4. Peroxidasa

La peroxidasa es una enzima ampliamente utilizada para la determinación de peróxido de hidrógeno y pequeños peróxidos orgánicos. Durante la reacción con peróxido, la forma nativa de la enzima se oxida en un paso de dos electrones, formando el llamado compuesto -I. La regeneración de la forma natural se produce en dos pasos separados de reducción de un electrón utilizando un intermedio llamado compuesto -II:



Puede utilizarse aminas aromáticas, compuestos fenólicos, hexacianoferrato(II), yoduro, ascorbato, entre otras como donante de electrones.

Los diseños de electrodos más simples utilizan el monitoreo directo de la transferencia de electrones mediante peroxidasa a un potencial más negativo de 0.6 versus ECS. Esta corriente es causada por la minoración electroquímica de los compuestos-I y -II, en la mayoría de los materiales de electrodos. Para que esto no suceda, los compuestos electrónicos anteriores se han utilizado como intermediarios, ya sea en disolución o inmovilizados, que reaccionan con la peroxidasa oxidada.

De esta forma, cuanto menor sea la velocidad de reacción entre la peroxidasa y el mediador, mayor será la concentración de enzima que se utilizara para evitar la dependencia de la señal de la concentración del mediador, así como para obtener una elevada sensibilidad de los electrodos.

Una de las razones por las que es importante la determinación de H_2O_2 a nivel industrial debido a la implicación de su liberación y el daño que puede generar al medioambiental.

Como ya se ha mencionado, una característica común de varias oxidasas es su producción de H_2O_2 en la oxidación de sus correspondientes sustratos. Por este motivo, para solucionar los problemas relacionados con el alto potencial requerido para el monitoreo electroquímico directo de peróxidos, se ha propuesto el uso de biosensores bienzémáticos para peroxidases y diferentes tipos de oxidasas. (Reviejo, et al., 2000)

La peroxidasa (POD) se produce en plantas y en algunas células animales. La misma acelera la oxidación de muchos compuestos orgánicos por el peróxido de hidrógeno, como son las aminas (o-fenilendiamina), p-fenilendiamina, bencidina, fenoles e hidroquinona. La especificidad de la peroxidasa por los peróxidos es alta y solo los hidroperóxidos de H₂O₂, metilo y etilo se combinan con ella. Es difícil la realización de una comparación de la actividad de peroxidases de diferente origen si se utilizan diferentes sustratos.

Si se desea medir la actividad de la peroxidasa, el producto de oxidación o el sustrato inalterado se determina de forma química o por medio de espectrofotometría a diferentes tiempos de reacción. Además, en ausencia de peroxidasa, la oxidación de ciertos compuestos orgánicos puede ser catalizada por H₂O₂ y trazas de metales pesados. (Lück, 1965)

La peroxidasa de rábano picante es una enzima importante que contiene hemo y que ha sido estudiada durante más de un siglo, de esta forma poniendo a nuestra disposición nueva información sobre su estructura tridimensional y sus intermediarios catalíticos, los mecanismos de catálisis y la función de residuos de aminoácidos específicos. Se investigan su estructura y función y ofrecen la oportunidad de desarrollar enzimas diseñadas para aplicaciones prácticas en productos naturales y síntesis de productos químicos finos, diagnósticos médicos y biorremediación.

La peroxidasa de rábano picante es obtenida de una fuente vegetal y continúa siendo estudiada por investigadores de varias disciplinas debido a sus aplicaciones prácticas y comerciales. En la actualidad, se ha avanzado mucho en la comprensión de su estructura y mecanismo catalítico mediante ingeniería de proteínas y otras técnicas. (Nigel, 2004)

6.5. Dispositivos colorimétricos microfluídicos

Hoy en día se busca que la medicina y en específico el tiempo de espera para obtener un diagnóstico sea lo más rápido y eficiente posible, cada vez el ritmo de vida es más rápido, por lo que el ámbito de los biosensores se ha vuelto innovador y de alta demanda. Aquí exponemos información referente a los dispositivos colorimétricos microfluídicos, pues las técnicas que se utilizan para diseñar estos patrones de microfluídos son rentables, requieren de menos muestras, son ambientalmente benignas y tienen un análisis rápido. En especial los dispositivos analíticos de microfluídos basados en papel se están convirtiendo en herramientas de gran importancia en el área analítica debido al movimiento pasivo del analito debido al fenómeno capilar, es decir que no necesita de fuerzas externas para moverse a lo largo del papel. (Ganesan, et al., 2017)

Las pruebas en el punto de atención, conocidas como POCT se han vuelto relativamente populares en los países desarrollados como alternativa a la medicina convencional y para mejorar la atención al paciente. Estas nuevas pruebas son necesarias en los países en desarrollo porque ayudan a reducir el número de visitas clínicas, reducen económicamente lo que ayuda tanto a los pacientes como al sistema de atención médica, por lo que aumenta la satisfacción del paciente y mejoran los resultados clínicos. Pensemos también en algo de mucha importancia, que es el poder brindar servicios clínicos para personas en entornos de bajos recursos. Las pruebas con tiras de papel, denominadas pruebas inmunocromatográficas de flujo lateral son y se plantea que sean más usadas en estos escenarios. (Wijitar, et al., 2010)

Actualmente algunos tipos de pruebas de tiras de papel están disponibles comercialmente, las más conocidas son por ejemplo las pruebas de embarazo, aunque también existen pruebas para la diabetes, las drogas de abuso, y la prueba de biomarcadores de patógenos.



Figura 11. Proceso de obtención de resultados de un dispositivo colorimétrico microfluídicos.

Como se mencionó, estos dispositivos se están volviendo una alternativa líder pues son herramientas analíticas que se pueden realizar en donde sea que el individuo se encuentre. También debido a su portabilidad, bajo costo y facilidad de uso, pues se diseñan y desarrollan dispositivos que sean pequeños y fáciles de transportar, se busca que sean obtenidos por un precio no muy elevado y que conste de pocos pasos y sea fácil de entender y seguir el proceso de realización de muestras.

Las lecturas colorimétricas son el método de detección más común en estos dispositivos de microfluídicos, pues permite el análisis cualitativo, semicuantitativo y completamente cuantitativo de múltiples analitos. Existen muchas formas de obtener una salida que sea colorimétrica en dichos dispositivos, incluidas el uso de nanopartículas, tintes, indicadores redox y de pH. Al escoger alguno de ellos tenemos que tomar en cuenta que cada uno posee ventajas e inconvenientes específicos.

Al mismo tiempo es importante saber y conocer que existen múltiples variables que al momento de la experimentación afectan el análisis de las reacciones colorimétricas en los sistemas basados en papel de microfluídicos,

entre ellos la homogeneidad del color en las muestras, los métodos de captura de imágenes y el manejo de los datos. (Morbioli G., et al., 2017)

En algunos estudios se utiliza un solo tinte para la medición de un solo analito y en algunos otros los dispositivos están diseñados para cuantificar simultáneamente los analitos mediante la utilización de múltiples indicadores para cada analito, lo que se espera mejore la precisión del ensayo. El uso de múltiples indicadores para un solo analito permite generar diferentes colores de indicadores en diferentes rangos de concentración de analitos, al mismo tiempo que se aumenta la capacidad para distinguir mejor los colores visualmente.

La mayoría de las pruebas con tiras de papel utilizan la detección cualitativa de analitos, esto a través de cambios de color visibles. En el ensayo, la fuerza capilar hace que el flujo se dirija a lo largo de la matriz de papel y se combinen los elementos involucrados. Sin embargo, cuando nos interesan los niveles de analitos el análisis cualitativo no es suficiente, ya que estos valores son importantes para el diagnóstico o el tratamiento. Por lo tanto, los estudios están dirigidos más que nada al desarrollo de pruebas con tiras de papel que sean cuantitativas, las cuales son más complejas pues estos dispositivos aún requieren instrumentación y personal capacitado para su uso y están limitados a un solo analito.

Por lo tanto, las ventajas de las pruebas con tiras de papel y la utilidad de los microfluídicos se combinan para crear un potencial significativo para las pruebas en el lugar de atención sin instrumentos debido a su bajo coste, su capacidad para utilizar múltiples analitos, su pequeño volumen de muestra y su estabilidad inherente.

Para obtener los resultados de las muestras se cuantifica comparando las intensidades de color generadas por desconocidos con las generadas por

concentraciones conocidas de analitos. Sin embargo, con solo observar estas muestras no es suficiente pues igualar el color y la intensidad a simple vista puede ser complicado por muchos factores, incluida la percepción diferente del color, las diferencias en la iluminación o el ángulo observado y la diferencia entre los colores de un color impreso seco y los que se ven en papel húmedo. Por estas razones simples se ha hecho un esfuerzo por realizar análisis cuantitativos para pruebas de diagnóstico basadas en microfluidos en papel, y mediante la utilización de cámaras o escáneres registrar la intensidad del color.

Una alternativa que se introduce es la utilización de los teléfonos con cámara y los escáneres portátiles, una opción importante pues pueden ser utilizados por personal no calificado en áreas remotas. Sin embargo, se discutieron limitaciones, como lo es la transmisión de datos de campo a expertos remotos, el retraso en el proceso de toma de decisiones y los problemas con las imágenes que dependen de las cámaras digitales. Un enfoque que pretende superar estas limitaciones de los enfoques colorimétricos es usar múltiples indicadores para un solo analito. Pues es posible una mayor discriminación visual al desarrollar más de un color en lugar de diferentes tonos o intensidades de un solo color. Esperando así que los indicadores múltiples proporcionen resultados más precisos en comparación con las pruebas de un solo color, ya que permiten promediar en múltiples puntos de detección para el mismo analito las diferencias en el tono y la intensidad del color, permitiendo así el diagnóstico por parte de personal no capacitado sin la necesidad de transmitir los resultados a un laboratorio o médico.

Las pruebas colorimétricas presentadas aquí utilizan la enzima oxidasa para descomponer el analito y producir peróxido de hidrógeno. Por tanto, el peróxido de hidrógeno oxida los indicadores, provocando un cambio de color evidente. Cada indicador produce un color diferente y también cambiará de color a diferentes concentraciones de analito, lo que nos da un mayor rango

dinámico durante el análisis. Esto permite utilizar el dispositivo para analizar muestras de control de suero u orina y capturar imágenes de pruebas completamente desarrolladas utilizando una cámara digital.

Como el plan a futuro es que se distribuyan y sean de fácil acceso para la población, los dispositivos de diagnóstico deben permanecer estables durante semanas o incluso más tiempo de ser posible, para que sean útiles en el campo de la salud y para su uso en países en desarrollo. Por lo tanto, es indispensable estudiar el rendimiento de los dispositivos después de ser preparados y almacenados durante varios días a diferentes temperaturas. La importancia de esto yace en que las enzimas oxidasas pueden degradarse, agregarse o desplegarse durante el almacenamiento en seco. Se han utilizado azúcares no reductores como la sacarosa y la trehalosa, y polioles como el manitol para estabilizar las proteínas secas durante el almacenamiento.

Para las muestras se puede utilizar la colorimetría de un solo color a diferentes concentraciones del mismo tinte, aunque el uso de diferentes colores puede proporcionar una mayor capacidad de discriminación visual y en específico a diferentes concentraciones de analito debería proporcionar más precisión que a diferentes tonos o intensidades de un solo color.

Dadas todas las características antes mencionadas, los estudios que se hacen hoy en día pretenden generar dispositivos que midan simultáneamente diferentes analitos que sean relevantes para el ámbito médico. Dando como resultado dispositivos de microfluídos basados en papel como un dispositivo alternativo fácil de usar, económico y portátil para pruebas en el punto de atención y diagnóstico de autocontrol.

Este estudio utiliza el principio de oxidación de indicadores con peróxido de hidrógeno generado por enzimas oxidasas específicas del analito; la

determinación de glucosa, colesterol y dopamina se realizó en muestras de suero de control para demostrar la idoneidad de este dispositivo en el análisis e investigación de muestras biológicas. (Wijitar, et al., 2010)

En este trabajo, se diseña, implementa y caracteriza una plataforma óptica basada en un teléfono inteligente para el análisis colorimétrico del hematocrito sanguíneo utilizando un dispositivo microfluídico desechable. Mediante el uso de una cámara integrada en el teléfono inteligente, se toman fotografías al dispositivo y se analizan imágenes de sangre humana en el microcanal mediante una aplicación móvil. Con la ayuda de un programa de procesamiento de imágenes en el teléfono inteligente, se determinan varios niveles de analitos. Obteniendo así los límites de detección, descartando interferentes y obteniendo su sensibilidad.

Por lo tanto, mediante la utilización de la ventaja del efecto microfluídico, se puede lograr con éxito una determinación rápida y sensible del hematocrito de la sangre humana, determinarse los valores de analitos de manera conveniente y precisa utilizando el dispositivo de microfluídos desechable y luego procesarse la información RGB con la cámara del teléfono inteligente y la aplicación de análisis de imágenes móviles. (Sang, et al., 2017)

7. Antecedentes

7.1. Glucosa

La *tabla 2* presenta ejemplos seleccionados de aplicaciones de biosensores colorimétricos de glucosa, mostrando características como la fase sensorial, el colorante que permite manifestar una coloración visible en la muestra, la muestra en la que se experimenta y el límite de detección del biosensor.

Glucosa				
Fase sensora	Colorante	Muestra	Límite de detección	Referencia
Glucosa oxidasa/FeCl ₃ /K ₃ Fe (CN) ₆	Nanopartículas de azul de Prusia (PBNP)	Vino de uva blanca	3.29mM Rango de detección lineal de 4mM – 0.5mM	(Huang Dai et al., 2018)
Glucosa oxidasa/uricasa/lactato deshidrogenasa	Una mezcla de 4-aminoantipirina y ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico, diclorhidrato de o-dianisidina, yoduro de potasio, ácido negro y ácido amarillo	Suero y orina	Glucosa (0.5- 20mM) Lactato (1 – 25mM) Ácido úrico (0.1 – 7mM)	(Wijitar Dungchai et al., 2010)
Glucosa oxidasa	Membranas celulosas Solución acuosa de NaOH/urea que se modificó con sodio	Orina	0.45mM Rango de detección lineal de 1mM – 11mM	(Xiaogang Luo et al., 2019)
Glucosa oxidasa conjugada con grafito/MnO ₂	3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB)	Sangre	3.1 mg/dL Rango de cuantificación lineal de 25 mg/dL – 300 mg/dL	(Po-Chun Lee et al., 2013)
Glucosa oxidasa/uricasa	3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB)	Suero	Ácido úrico: 0.003mM Rango de detección lineal (0.01mM – 1mM); Glucosa: 0. 014mM Rango de detección lineal (0.02mM – 4mM)	(Xu Wang et al., 2018)
Glucosa oxidasa	3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB)	Sangre	0.28mM Rango de detección: 0.5mg/ml – 2.84 mg/ml	(Han Zhang et al., 2020)
Glucosa oxidasa	3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB)	Sudor artificial	Glucosa: ~200 mM	(Ahyeon Koh et al., 2016)

Tabla 2. Biosensores colorimétricos de Glucosa.

Como se puede observar, el colorante más utilizado para determinar los niveles de concentración de Glucosa, por medio de la Glucosa oxidasa, es el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

Otro rasgo que se identifica es el tipo de muestra, pues los biosensores colorimétricos están ampliamente interesados en la investigación del área médica, por lo que las muestras más frecuentadas son la orina y el suero sanguíneo.

7.2. Colesterol

De manera similar a la *tabla 2*, en la *tabla 3* se presentan algunos ejemplos seleccionados de aplicaciones de biosensores colorimétricos de colesterol, en ella se muestran características como la fase sensora, el colorante que permite

manifiestar una coloración visible en la muestra, la muestra en la que se experimenta y el límite de detección del biosensor.

Colesterol				
Fase sensora	Colorante	Muestra	Límite de detección	Referencia
colecsterol oxidasa	3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	Suero sanguíneo	0.76 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	(Lin, et al. 2017)
colecsterol oxidasa	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)	muestras de leche en polvo	0,2 nmol/L	(Akhtar, et al, 2015)
colecsterol oxidasa	3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	sangre humana	8 μM	(Chung, et al. 2018)
	Reactivo de Liebermann-Buchard	leche enlatada (B1–B5) y productos de yogur fresco (A1–A5)	0,00430 mg/ml	(Adu,et al. 2019)
colecsterol oxidasa	Nanopartículas de oro funcionalizadas.	Solución acuosa y suero humano	0,2 mg/dL	(Narsingh, et al. 2018)
colecsterol oxidasa	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS2-)	Suero humano	0,10 μM (3σ /pendiente)	(Ruimin, et al, 2012)
colecsterol oxidasa	puntos cuánticos de grafeno (GQD) y 3, 3, 5, 5-tetramethylbenzidine (TMB)	Suero humano	0,006 mM	(Narsingh, et al. 2015)

Tabla 3. Biosensores colorimétricos Colesterol.

Como se puede observar, el colorante más utilizado para la determinar las concentraciones de colesterol con la enzima Colesterol oxidasa, es la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), a pesar de que también se han descubierto métodos que hacen uso de las nanopartículas como método de coloración. Ya que el colesterol es estudiado debido a que su alta concentración en el cuerpo humano puede traer consecuencia para la salud se puede observar que las muestras que más reinciden son aquellas realizadas con suero sanguíneo.

7.3. Dopamina

Se tomaron en cuenta las mismas características que en las tablas de los puntos anteriores, pero esta vez para el analito de dopamina.

Dopamina				
<i>Fase sensora</i>	<i>Colorante</i>	<i>Muestra</i>	<i>Límite de detección</i>	<i>Referencia</i>
Monoamino oxidasa	nanopartículas de oro (AHMP-AuNP)	suero humano y muestras de orina	0.07 μ M	(Feng, et al. 2013)
Monoamino oxidasa	Nanopartículas de plata	Solución preparada de dopamina	40 nM	(Youhui, et al. 2011)
Monoamino oxidasa	3,3',5,5'-tetrametilbencidina	Orina humana y muestras farmacéuticas		(Jun, et al. 2019)
Monoamino oxidasa	Nanopartículas de oro.	líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) y suero sanguíneo humano	3×10^{-9} M.	(Dan, et al. 2016)
Monoamino oxidasa	Nanopartículas de Oro	Suero fetal bobino Orina	Suero: 1.6×10^{-6} M Orina: 5.7×10^{-7} M	(Yumin Leng et al., 2015)
Monoamino oxidasa	Nanopartículas de oro (AuNP)	Cerebro de rata basado en microdiálisis	0.5nM	(Biao Kong et al., 2011)
Monoamino oxidasa	3,3',5,5'-tetrametilbencidina	Solución preparada de dopamina	1.67 μ M	(Zhu J. et al., 2019)

Tabla 4. Biosensores colorimétricos de Dopamina.

En la *tabla 4* podemos observar que el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) no es el colorante más utilizado, y se encontró que en este analito es más frecuente el uso de nanopartículas como colorantes en la determinación de dopamina.

Aunque la dopamina es uno de los neurotransmisores del sistema nervioso central y está involucrado en la regulación de diferentes funciones en el cuerpo, no hay muchos estudios donde se relacione a la dopamina con otras biomoléculas.

8. Metodología

8.1. Síntesis de macroesferas de quitosano

La aplicación de biocatalizadores en fase sólida se ha vuelto muy estudiado y cada vez se informan más resultados sobre la inmovilización de enzimas en micropartículas que poseen un área de superficie específica alta y numerosos sitios activos disponibles para fijar las moléculas de enzima.

En este estudio se hizo uso del quitosano como material de apoyo para la inmovilización de las enzimas involucradas en el multisensor. Después de modificaciones químicas, sus grupos amino e hidroxilo reactivos, hacen posible el acoplamiento de enzimas. El quitosano es un poliaminosacárido natural obtenido por N-desacetilación de la quitina, es una buena opción de uso en los biosensores debido a sus características pues es un material atóxico, biocompatible y biodegradable. (Biró E. et al., 2008)

Enseguida se describe la preparación de las macroesferas de quitosano utilizadas por el método de precipitación (*Figura 12*).

Se utilizó quitosano (C3646, de caparazones de cangrejo) para la preparación de las macroesferas por el método de precipitación.

- Primero, se disolvió quitosano (2 % p/v) en una solución acuosa de ácido acético (2 % p/v). Luego se añadió esta solución gota a gota a través de un tubo capilar usando una jeringa pequeña, en un líquido de coagulación suavemente agitado (hidróxido de sodio 1 N y 26% v/v de etanol).

Las macroesferas obtenidas después de este paso se filtraron y lavaron con agua destilada hasta neutralidad.

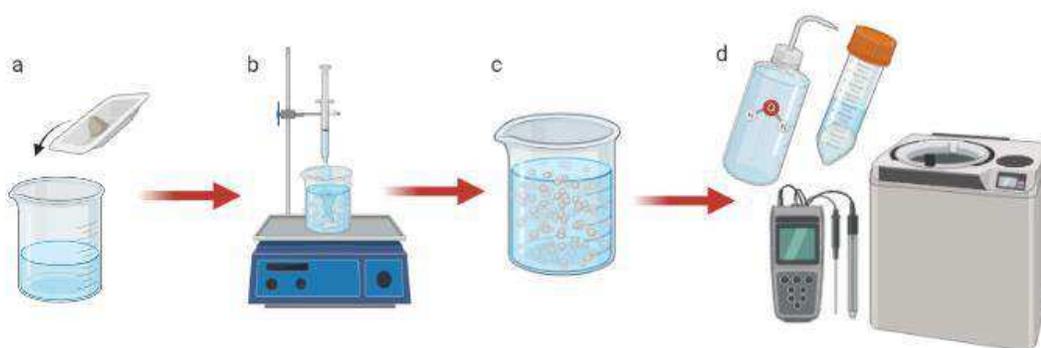


Figura 12. (a) quitosano disuelto en ácido acético, (b) adición de solución a) en hidróxido de sodio por método de goteo (c) filtrado y lavado de macroesferas.

8.2. Funcionalización de macroesferas de quitosano

Los enlaces cruzados se realizaron mezclando las macroesferas con una solución de glutaraldehído de 1% y 5% durante 4, es decir, dos horas para cada uno. Pasado este tiempo se lavó el exceso de glutaraldehído con agua destilada haciendo centrifugado, después de cada lavado se midió el pH y se continuo con el proceso hasta neutralidad.

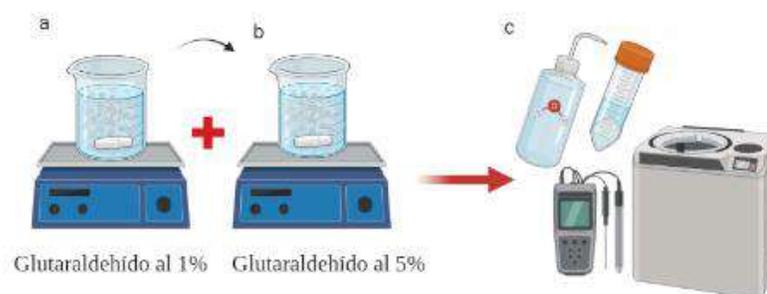


Figura 13. (a) agitación de macroesferas con solución de glutaraldehído, al 1% por dos horas (b) agitación de macroesferas con solución de glutaraldehído al 5% durante 2 horas (b) lavado de exceso de glutaraldehído.

8.3. Caracterización de macroesferas

Debido a los cambios de color que ocurren durante las reacciones químicas causadas por la interacción entre las diferentes concentraciones de colesterol, glucosa y dopamina presentes en la muestra y las enzimas correspondientes, se utilizaron técnicas de caracterización que incluyen espectroscopia Raman

y microscopía Raman y microscopía electrónica de barrido para determinar estos cambios (SEM).

8.3.1. Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman ha tenido un gran crecimiento en la investigación y en aplicaciones biomédicas debido a su gran versatilidad, a la facilidad en la preparación de las muestras y a la gran cantidad de información química que nos brinda. Ayuda a estudiar la composición química in vivo e in-vitro de forma no destructiva, sin contacto y tiene la capacidad para proporcionar discriminación espacial como información sobre el tamaño, longitud y radio de la muestra. Además, se puede utilizar en el laboratorio durante la fase de investigación para identificar la estructura química de los biomateriales o como herramienta de control de calidad en los procesos de fabricación (Castro J., et al., 2013).

Debido a estas ventajas, se enviaron muestras de las macroesferas a ser estudiadas y caracterizadas por espectroscopia Raman. Esta es una técnica mediante la cual se capta la luz que ha sido esparcida inelásticamente por los medios de interés, esta luz trae consigo información a nivel molecular, por lo que hace posible obtener un espectro único característico de nuestro material (Hernández K., 2021).

8.3.2. Microscopia electrónica de barrido

La microscopía de barrido electrónico (SEM) es una técnica de obtención de imágenes muy utilizada en investigación de materiales debido a su alta resolución y capacidad de analizar características topográficas, morfológicas, de composición química, de cristalografía (estructura y

orientación de grano) y de dinámica de reacciones de las muestras que quieran estudiarse. (Clavijo J. 2013).

Se enviaron muestras a ser estudiadas y caracterizadas por un equipo de SEM ya que nos interesa conocer la morfología y tamaño obtenido de las macroesferas, este estudio obtiene dicha información cuando detecta la respuesta del material al impacto de un haz de electrones (llamados primarios). Al ser impactada por el haz de electrones de alta energía, la muestra produce una serie de señales que son registradas en los diferentes detectores del equipo, y cada una de dichas señales ofrece independientemente información acerca de la muestra. Para adquirir la “imagen” se hace mover el haz en el plano xy de forma que recorra el área deseada. La resolución que puede alcanzarse en la superficie del material, puede ser tan alta como 2 nm (Clavijo J. 2013).

8.4. Inmovilización de enzimas.

Se verifico el pH de las macroesferas de quitosano, debido a que se requería que las macroesferas tuvieran un pH entre 7 a 7.5 pues en este pH se encuentra una mejor actividad enzimática.

Una vez neutralizado el pH, se depositó 1mg de macroesferas de quitosano en 100 microtubos, y después se le agregaron 5µL de enzima.

Una vez hecho esto se dejó reposar la enzima junto con las macroesferas por media hora.

8.5. Acoplamiento enzimático.

Las enzimas se cuantificaron mediante el método de Lowry, el cual se desarrolla en dos fases: Una de las reacciones es la que se da

previamente de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+} , en presencia de tartrato para evitar la precipitación, formando un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico. (Flores R. & Ruiz S., 2017) y La reacción que se genera con el reactivo de Folin-Ciocalto el cual determina el fenol, que es reducido por los grupos fenólicos presentes en las proteínas a un complejo azul oscuro, medido colorimétricamente. Este complejo tiene dos máximos de absorción en longitudes de onda de 560 y 680 nm. (Flores R. & Ruiz S., 2017).

Procedimiento:

- **Solución A:** Para ella se añadieron 100 ml de una solución de carbonato de sodio 0.1 M en 0.1 M de NaOH.
- **Solución B:** Se añadió sulfato de cobre 2% w/v y se aforo con agua destilada hasta los 5 ml.
- **Solución C:** Consiste en añadir tartrato de sodio 1% w/v y diluir con agua destilada hasta los 5 ml.
- **Solución D:** Se agregaron 100 ml de la solución A, con 1 ml de la solución B y 1 ml de la solución C.

En la *figura 14* se puede observar el procedimiento del acoplamiento enzimático, para esto la solución D se dividió en microtubos, colocando 1.5 ml de la solución D en estos. Después se añadieron 500 μ L de Folin con 25 μ L de la enzima.

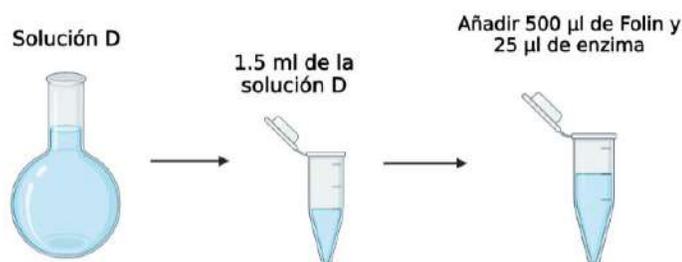


Figura 14. Acoplamiento enzimático por método de Lowry.

8.6. Actividad enzimática.

Para determinar si las enzimas eran inmovilizadas en las macroesferas de quitosano, se midió la actividad enzimática de las enzimas inmovilizadas utilizando métodos estándar indicados por Sigma.

Para estandarizar el método, primero se midió la actividad en solución, para después medir la actividad de la enzima ya inmovilizada en las macroesferas de quitosano.

8.6.1. Glucosa Oxidasa

Se midió el cambio de absorbancia a 500 nm a 35°C y con un pH de 5.1, esto debido a la producción de o-dianisidina oxidada.

Preparación de soluciones:

- *Solución A: Buffer de acetato de sodio a 50mM con pH 5.1 a 35°C.*
Se prepararon 500 ml en agua purificada usando acetato de sodio trihidratado, se ajustó el pH a 5.1 a 35°C con HCl 1 M.
- *Solución B: Solución de o-dianisidina 0.21 M.*
Se disolvieron 20mg de o-dianisidina en 8ml de agua purificada, luego se diluyó de 5.35 ml – 200 ml con el Buffer de acetato.
- *Solución C: Solución de D-glucosa, 10% w/v.*
En 60 ml de agua desionizada se disolvieron 6 mg de D-glucosa.

- *Solución D: Solución peroxidasa.*

La solución de la enzima peroxidasa se preparó en agua desionizada conteniendo aproximadamente 60 U/ml de purpurogalina.

- *Solución E: Solución de enzima Glucosa Oxidasa.*

Se preparó una solución de Glucosa Oxidasa en el Buffer de acetato conteniendo aproximadamente 0.5 U/ml.

Una vez preparadas las soluciones, se colocaron en una cubeta UV.

	Test
Solución B (o-dianisidina 0.21M)	2.4 ml
Solución C (glucosa 10% w/v)	0.5 ml
Solución D (Peroxidasa)	0.1 ml

Se mezcló por inversión, monitoreando la absorbancia contra aire hasta que fue constante, entonces se agregó:

Solución E (Glucosa Oxidasa)	0.1 ml
------------------------------	--------

Se mezcló rápidamente y se midió el incremento de absorbancia contra aire por 2 – 4 minutos, obteniendo el $\Delta A_{500 \text{ nm}}/\text{minuto}$.

8.6.2. Colesterol Oxidasa

Se midió el cambio de absorbancia a 500 nm a 25°C y con un pH de 7.5, esto debido a la producción de o-dianisidina oxidada.

Preparación de soluciones:

- *Solución A: Buffer fosfatos 50 mM con pH 7.5 a 25°C.*
Se preparó una solución de 6.8 mg/ml de fosfato de potasio, monobásico, anhídrido en agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.5 a 25°C con KOH 1M.
- *Solución B: Solución al 0.1% w/v de o-dianisidina.*
Se prepararon 0.025 g de o-dianisidina en 25 ml de la solución A.
- *Solución C: Solución al 0.5% w/v de colesterol con 10% w/v de Tritón x-100.*
Se disolvieron 250 mg de colesterol en 5 ml de Tritón y 45 ml de agua desionizada.
- *Solución D: Solución Peroxidasa.*
Se preparó una solución que contenía 100 U/ml de pirogalol en agua desionizada.
- *Solución E: Solución Colesterol Oxidasa.*
Se preparó una solución conteniendo 0.1 U/ml de Colesterol Oxidasa en la solución A.

Una vez preparadas las soluciones, se colocaron en celdas UV:

	Test	Blanco
Solución B (o-dianisidina 0.1% w/v)	2.7 ml	2.7 ml
Solución C (colesterol 0.5% w/v)	0.1 ml	0.1 ml
Solución D (Peroxidasa)	0.1 ml	0.1 ml

Se mezcló y equilibró la absorbancia a 25°C, entonces se agregó:

	Test	Blanco
Solución A (Buffer fosfatos)	-	0.1 ml
Solución E (Colesterol Oxidasa)	0.1 ml	-

Se mezcló por inversión y se midió el incremento en absorbancia a 500nm por 5-10 minutos.

8.6.3. Monoamino Oxidasa A

Se midió el cambio de absorbancia a 500 nm a 25°C y con un pH de 7.5, esto debido a la producción de o-dianisidina oxidada.

Preparación de soluciones:

- *Solución A: Buffer fosfatos 50 mM con pH 7.5 a 25°C.*
Se preparó una solución de fosfato de potasio, monobásico, con una concentración de 6.8 mg/ml en agua desionizada. El cual se ajustó su pH a 7.5 a una temperatura de 25°C con KOH 1M.
- *Solución B: Solución al 0.2% w/v de o-dianisidina.*
100 mg de o-dianisidina se han preparado en 50 ml de la solución A.
- *Solución C: Solución D-dopamina, 0.001% w/v.*
En 100 ml de agua desionizada se disolvió un 1 mg de dopamina

- *Solución D: Solución Peroxidasa.*

Se preparó una solución conteniendo 100 U/ml de pirogalol en agua desionizada.

8.7. Evaluación del sustrato

Para estas pruebas se hicieron soluciones en diferentes concentraciones dependiendo del rango de concentración de la enzima en el suero sanguíneo del organismo humano.

8.7.1. Glucosa oxidasa:

Se investigó el rango de la glucosa en suero sanguíneo, siendo este:

< 140 mg/dL → Normal

140 – 199 mg/dL → Prediabetes

200 mg/dL → Diabetes II

Se decidió realizar 10 diferentes concentraciones por arriba y debajo de este rango.

Se partió de una solución madre de 300 mg/dL en un matraz aforado de 50 ml. De esta solución se realizaron las demás concentraciones.

Siendo estas:

- | | |
|---------------------|----------------------|
| <i>1. 100 mg/dl</i> | <i>6. 200 mg/dl</i> |
| <i>2. 120 mg/dl</i> | <i>7. 220 mg/dl</i> |
| <i>3. 140 mg/dl</i> | <i>8. 240 mg/dl</i> |
| <i>4. 160 mg/dl</i> | <i>9. 280 mg/dl</i> |
| <i>5. 180 mg/dl</i> | <i>10. 300 mg/dl</i> |

A estas soluciones se les ajustó a un pH de 7 con NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M. Después se colocaron 395 μ l de cada concentración en cubetas UV.

8.7.2. Colesterol oxidasa:

Se investigó el rango de las concentraciones del colesterol total en la sangre del cuerpo humano, siendo este:

125 – 200 *mg/dl*

Con este rango en mente, se decidió hacer 10 diferentes soluciones con diferentes concentraciones, siendo estas arriba y debajo del rango.

Se inició con una solución madre de 500 *mg/dl* en un matraz aforado de 50 ml. Con esta solución madre se realizaron las demás soluciones.

Siendo estas:

- | | |
|------------------------|------------------------|
| 1. 37.54 <i>mg/dl</i> | 6. 158.20 <i>mg/dl</i> |
| 2. 50.05 <i>mg/dl</i> | 7. 210.90 <i>mg/dl</i> |
| 3. 66.74 <i>mg/dl</i> | 8. 281.25 <i>mg/dl</i> |
| 4. 88.99 <i>mg/dl</i> | 9. 375 <i>mg/dl</i> |
| 5. 118.65 <i>mg/dl</i> | 10. 500 <i>mg/dl</i> |

A estas soluciones se les ajustó a un pH de 7 con NaOH 0.1M y HCl 0.1 M. Después se colocaron en cubetas UV.

8.7.3. MAO-A:

Se investigó el rango de las concentraciones de dopamina en el suero sanguíneo, siendo el siguiente:

$$0 - 30 \text{ pg/ml}$$

Con este rango en mente, se decidió hacer 5 diferentes soluciones con diferentes concentraciones, siendo estas arriba del rango, específicamente debido a que los valores presentes están en un rango muy pequeño.

Se inició con una solución madre de $10 \mu\text{g/ml}$ en 100 ml. Con esta solución madre se realizaron las demás soluciones.

Siendo estas:

- | | | |
|------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1. $10 \mu\text{g/ml}$ | 4. $0.5 \mu\text{g/ml}$ | 7. $0.005 \mu\text{g/ml}$ |
| 2. $5 \mu\text{g/ml}$ | 5. $0.1 \mu\text{g/ml}$ | 8. $0.003 \mu\text{g/ml}$ |
| 3. $1 \mu\text{g/ml}$ | 6. $0.01 \mu\text{g/ml}$ | 9. $0.0015 \mu\text{g/ml}$ |

A estas soluciones se les ajustó a un pH de 7 con NaOH 0.1M y HCl 0.1 M. Después se colocaron en cubetas UV.

8.8. Actividad respecto al pH

8.8.1. Glucosa oxidasa

Del rango de concentraciones anteriormente mencionadas, se escogió una concentración media del rango para realizar estas pruebas. Por lo que se preparó una solución de glucosa 180 mg/dl en un matraz de 50 ml.

Esta solución se dividió en 9 tubos y una vez dividida se le ajustó a cada uno un pH distinto con NaOH 0.1M y HCl 0.1M.

Teniendo como resultado 9 soluciones de una misma concentración con diferentes pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.6, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)

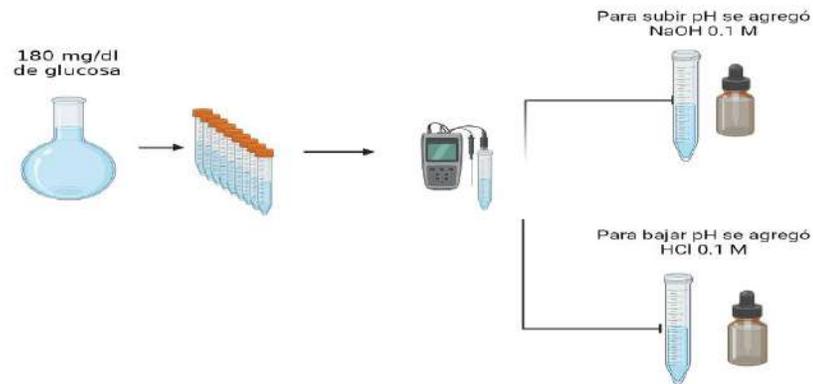


Figura 15. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Glucosa oxidasa respecto al pH.

8.8.2. Colesterol oxidasa

Del rango de concentraciones anteriormente mencionadas (véase punto 8.7.2.), se escogió una concentración media del rango para realizar estas pruebas. Por lo que se preparó una solución de colesterol de 118.65 mg/dl en un matraz aforado de 50 ml.

Esta solución se dividió en 9 tubos de ensayo y después de dividir la solución, el pH en cada tubo se ajustó a un pH diferente haciendo uso de NaOH 0.1M para bajar el valor de pH y HCl 0.1M para aumentar el valor de pH.

Logrando así 9 soluciones de una misma concentración con diferentes pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.6, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)

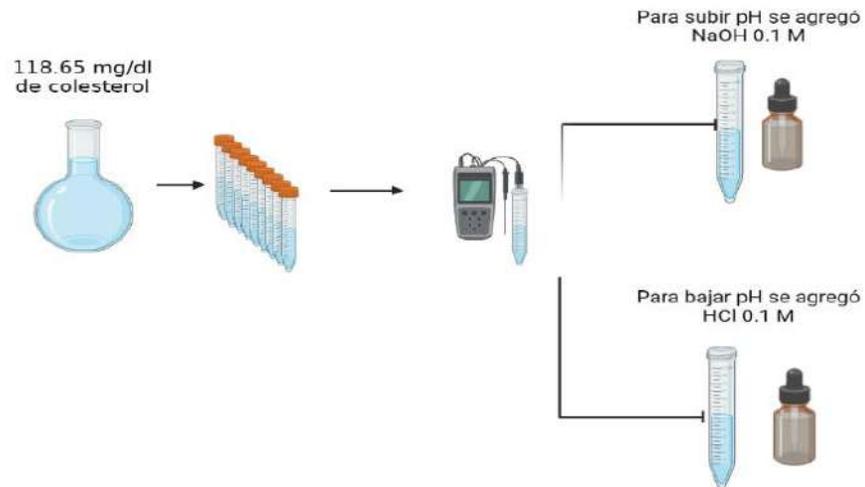


Figura 16. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Colesterol oxidasa respecto al pH.

8.8.3. MAO-A

Del rango de concentraciones anteriormente mencionadas (véase punto 8.7.3.), se escogió una concentración media del rango para realizar estas pruebas.

Por lo que se preparó una solución de dopamina 10 µg/dl en un matraz aforado de 50 ml.

Esta solución se dividió en 9 tubos y una vez dividida la solución en los tubos se le ajustó a cada uno un pH distinto con NaOH 0.1M y HCl 0.1M.

Se obtuvieron 9 soluciones de una misma concentración con diferentes pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.6, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)

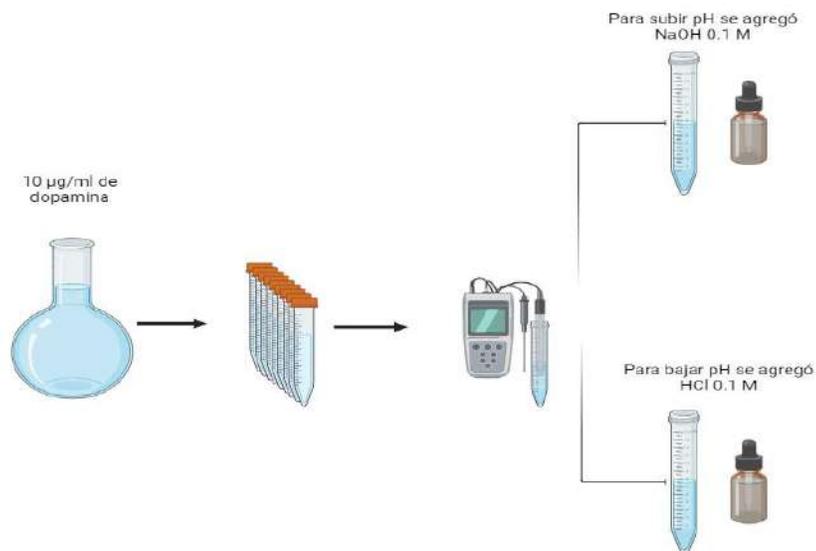


Figura 17. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Monoamino Oxidasa A respecto al pH.

8.9. Actividad respecto a la temperatura

Para observar la actividad de las enzimas a diferentes temperaturas se realizaron las siguientes pruebas.

8.9.1. Glucosa oxidasa

Del rango de concentraciones realizadas anteriormente, se escogió una concentración media del rango para realizar estas pruebas. Por lo que se preparó una solución de glucosa de 180 mg/dl en 50ml.

Esta solución se dividió en 6 tubos y una vez dividida la solución, se colocó cada tubo en baño maría a diferentes temperaturas (15°C, 25°C, 35°C, 45°C y 55°C)

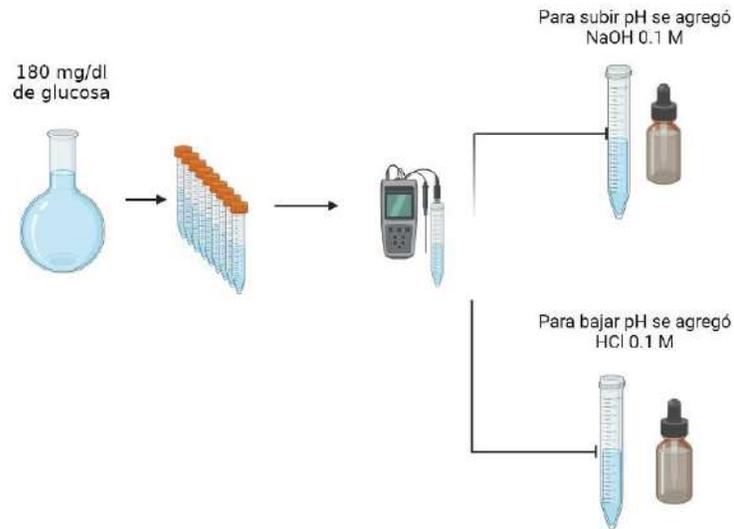


Figura 18. Preparación de soluciones para actividad enzimática de Glucosa oxidasa respecto a la temperatura.

8.9.2. Colesterol oxidasa

Del rango de concentraciones realizadas anteriormente, se escogió una concentración media del rango para realizar estas pruebas. Por lo que se preparó una solución de colesterol de 118.65 mg/dl en 50ml. Esta solución se dividió en 6 tubos y una dividida la solución, se colocó cada tubo en baño maría a diferentes temperaturas (15°C, 25°C, 35°C, 45°C y 55°C)

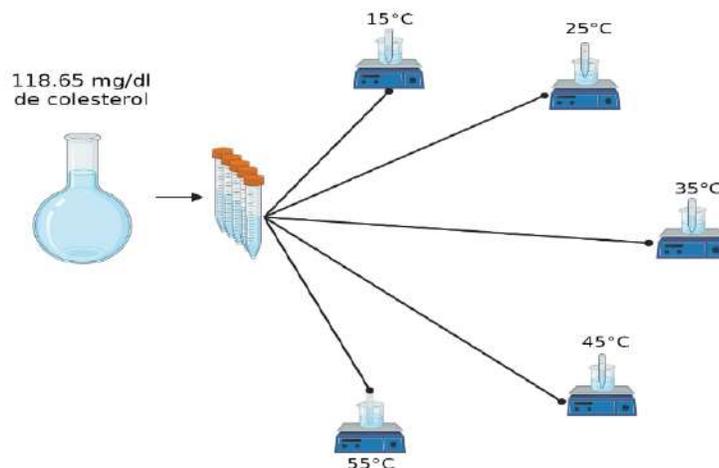


Figura 19. Preparación de soluciones para actividad enzimática de *Colesterol oxidasa* respecto a la temperatura.

8.9.3. MAO-A

Del rango de concentraciones realizadas anteriormente, se escogió una concentración media del rango para realizar estas pruebas. Por lo que se preparó una solución de dopamina de 10 $\mu\text{g/dl}$ en 50ml.

Esta solución se dividió en 6 tubos y una dividida la solución, se colocó cada tubo en baño maría a diferentes temperaturas (15°C, 25°C, 35°C, 45°C y 55°C)

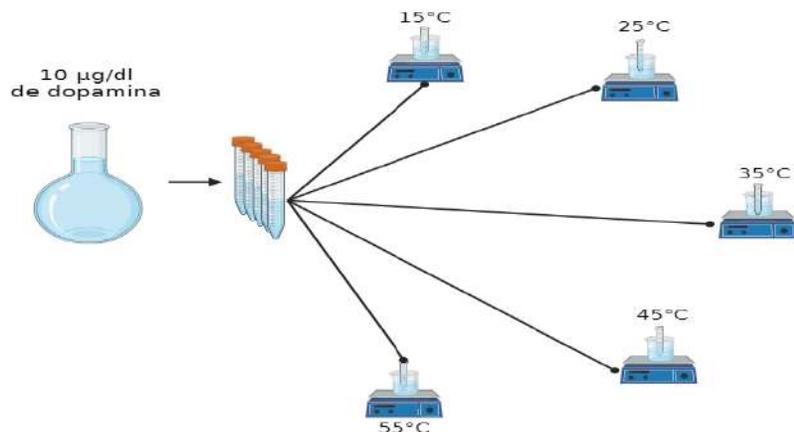


Figura 20. Preparación de soluciones para actividad enzimática de *Monoamino oxidasa A* respecto a la temperatura

8.10. Evaluación de color

Para estas pruebas se utilizó la premisa en la que los cambios en el color de una solución indican la ocurrencia de una reacción química que detecta un analito y la intensidad del color depende de la concentración de los reactivos o productos que participan en dicha reacción.

La detección en el análisis colorimétrico se basa en la reflexión y transmisión de la radiación, que depende de la interacción de la radiación visible con un producto colorido en un solvente o un sólido.

Por esto se realizó la evaluación de cambios de color en las muestras por medio del uso de dispositivos como el UV-vis y un dispositivo colorimétrico que evalúa el modelo de color RGB.

8.10.1. UV-vis

Un método que examina la interacción entre la radiación electromagnética en la región ultravioleta que es visible con la materia es la espectroscopia ultravioleta-visible.

Por esto, se usó este método para obtener de forma cuantitativa las concentraciones elementales de nuestras soluciones. Se realizaron pruebas en el espectrofotómetro para corroborar los cambios de color experimentados por las diferentes concentraciones de los analitos expuestos.

8.10.1.1. Pruebas de Glucosa:

Se preparó 5ml de colorante agregando 10mg de O-Dianisidina y aforando con buffer de fosfatos a pH 7.5.

Se preparó 1ml de peroxidasa y 1ml de enzima glucosa oxidasa a 1mg/ml con buffer de fosfatos pH 7.5.

Posteriormente, se agregó a cada una de las cubetas UV 395 μ l de las diferentes concentraciones realizadas (véase el punto evaluación del sustrato) de glucosa (una concentración por celda), más las siguientes cantidades de cada una de las soluciones anteriormente preparadas.

- 3µl de Glucosa oxidasa
- 3µl de peroxidasa
- 100µl de O-Dianisidina

8.10.1.2. Pruebas de colesterol:

Se preparó 5ml de colorante agregando 10mg de O-Dianisidina y aforando con buffer de fosfatos a pH 7.5.

Se preparó 1ml de peroxidasa y 1ml de enzima colesterol oxidasa a 1mg/ml con buffer de fosfatos pH 7.5.

Posteriormente, se agregó a cada una de las celdas del espectrofotómetro ml de las diferentes concentraciones realizadas (véase el punto evaluación del sustrato) de colesterol (una concentración por celda), más las siguientes cantidades de cada una de las soluciones anteriormente preparadas:

- 3µl de Colesterol oxidasa
- 3µl de peroxidasa
- 100µl de O-Dianisidina

8.10.1.3. Pruebas de dopamina:

Se preparó 5ml de colorante agregando 10mg de O-Dianisidina y aforando con buffer de fosfatos a pH 7.5.

Se preparó 1ml de peroxidasa y 1ml de enzima colesterol oxidasa a 1mg/ml con buffer de fosfatos pH 7.5.

Posteriormente, se agregó a cada una de las celdas del espectrofotómetro ml de las diferentes concentraciones realizadas (véase el punto evaluación del sustrato) de colesterol (una

concentración por celda), más las siguientes cantidades de cada una de las soluciones anteriormente preparadas:

- 25µl de Monoamino oxidasa A
- 25µl de peroxidasa
- 200µl de O-Dianisidina

Conforme se realizaron las muestras se introdujeron en el espectrofotómetro y se obtuvieron los valores correspondientes de cada una, los cuales se revisan más adelante en el apartado de resultados.

También se tomaron fotos de cada una de las muestras tomando en cuenta una buena iluminación y el tiempo transcurrido desde la preparación de la muestra para lograr observar claramente su alteración de color de las mismas a medida que se aumentó la concentración.

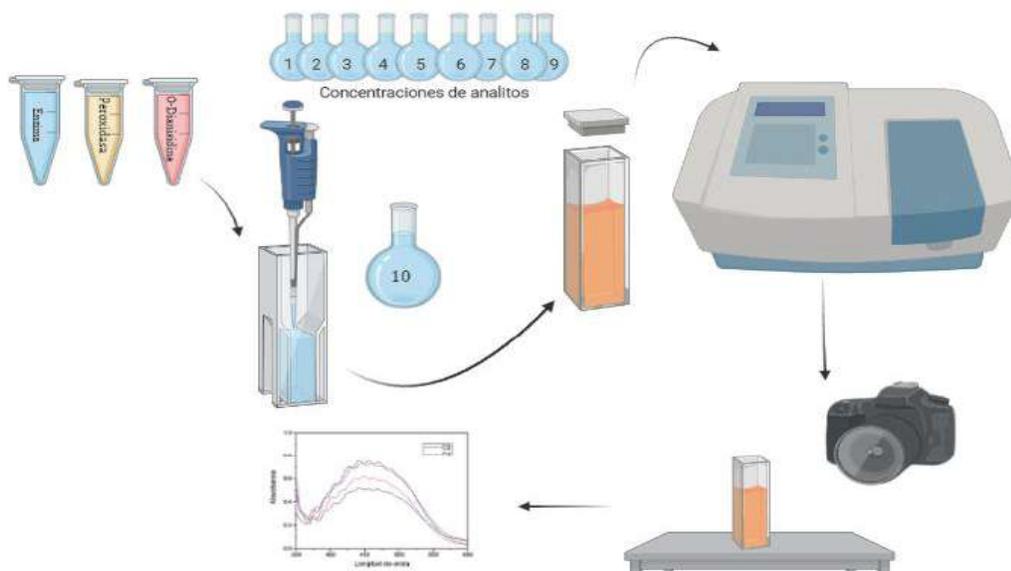


Figura 21. Realización de muestras de glucosa, colesterol y dopamina, obtención de datos de colorimetría usando espectrofotómetro, toma de fotografías y análisis de datos.

8.10.2. Colorímetro

Una vez se comprobaron los cambios de color de forma cuantitativa en solución con ayuda de la espectroscopia UV-vis, pasamos a realizar las pruebas de colorimetría directamente en papel y con las enzimas inmovilizadas en las macroesferas de quitosano previamente preparadas.

Al realizar esto con un dispositivo colorimétrico se obtuvieron los valores de un espacio de coordenadas tridimensional específico, donde cada punto está representado por un valor en el modelo de color de los más utilizados que es el RGB, convirtiendo así la información de color en valores numéricos que pueden considerarse información analítica. (Fan Y. et al., 2021).

Para la realización de estas pruebas se prepararon las soluciones de glucosa, colesterol y dopamina a diferentes concentraciones.

8.10.2.1. Pruebas colorimétricas de glucosa

Se preparó 50 ml de O-Dianisidina a 2mg/ml aforando con buffer de fosfatos pH 7.5.

Se preparó 1ml de peroxidasa y 1ml de enzima glucosa oxidasa a 1mg/ml con buffer de fosfatos pH 7.5.

Se cortaron pequeños círculos de papel de aproximadamente 1 cm de diámetro, a los cuales se les agregó un 1gr de quitosano, el cual se acomodó de forma homogénea y cuidando que cubriera toda la circunferencia. A cada uno de estos círculos se les agregó 2 gotas de pipeta Pasteur de cada una de las concentraciones de analito (una

concentración por círculo), más la cantidad de las siguientes soluciones:

- 100µl de enzima Glucosa oxidasa
- 100µl de peroxidasa
- 1ml de O-Dianisidina

8.10.2.2. Pruebas colorimétricas de colesterol

Se preparó 50 ml de O-Dianisidina a 2mg/ml aforando con tampón de fosfatos pH 7.5.

Se preparó 1ml peroxidasa y 1ml enzima colesterol oxidasa a 1mg/ml con buffer de fosfatos pH 7.5.

Se cortaron pequeños círculos de papel de aproximadamente 1 cm de diámetro, a los cuales se les agrego un 1gr de quitosano, el cual se acomodó de forma homogénea y cuidando que cubriera toda la circunferencia. A cada uno de estos círculos se les agrego 2 gotas de pipeta Pasteur de cada una de las concentraciones de analito (una concentración por círculo), más la cantidad de las siguientes soluciones:

- 100µl de enzima colesterol oxidasa
- 100µl de peroxidasa
- 1ml de O-Dianisidina

8.10.2.3. Pruebas colorimétricas de dopamina.

Se preparó 50 ml de O-Dianisidina a 2mg/ml aforando con un tampón de fosfatos de pH 7.5.

Se preparó 1ml de peroxidasa y 1ml de enzima glucosa oxidasa a 1mg/ml con buffer de fosfatos pH 7.5.

Se cortó pequeños círculos de papel de aproximadamente 1 cm de diámetro, a los cuales se les agrego un 1gr de quitosano, el cual se acomodó de forma homogénea y cuidando que cubriera toda la circunferencia. A cada uno de estos círculos se les agrego 0.5 ml de cada una de las concentraciones de analito (una concentración por circulo), más la cantidad de las siguientes soluciones:

- 25µl de enzima MAO-A
- 25µl de peroxidasa
- 1ml de O-Dianisidina

Al agregar todos los reactivos, cada una de las muestras adquirió un color específico, el cual, con ayuda de un dispositivo de colorimetría que obtiene los espacios de color RGB, se midió y registro a diferentes tiempos para posteriormente estudiarse en los resultados.

8.11. Detección de analito de interés por medio de colorimetría

Para la detección del analito por medio de colorimetría fue necesario realizar curvas de calibración para cada uno de ellos.

Las curvas de calibración son representaciones gráficas de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. Conociendo la relación funcional, es posible conocer la concentración en una muestra dada mediante la medida de la señal.

Para realizar estas curvas se tomaron las concentraciones mencionadas anteriormente de cada analito. Estos patrones se midieron en el espectrofotómetro. En él se colocó un blanco el cual no contenía ningún analito, pero si los mismos reactivos. Cada patrón se midió por triplicado.

8.12. Determinación de parámetros de desempeño

Para cada analito, se determinó un rango de concentración lineal. Los parámetros utilizados para evaluar la linealidad son los siguientes:

1. Coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99
2. Que se cumpla la aleatoriedad de los residuos.

Las concentraciones se prepararon de forma independiente tres veces. Este parámetro se evalúa calculando el porcentaje de desviación estándar relativa de la respuesta obtenida.

$$\%Dev = \frac{s}{\bar{x}}(100)$$

Donde:

La desviación estándar de las mediciones está representada por s y \bar{x} el promedio de las mediciones.

También se calcularon parámetros de precisión para tres niveles de concentración: valor alto, valor medio y valor bajo, todos dentro del rango lineal de cada elemento.

Los valores finales de concentración se compararon con un valor en específico que ya era conocido.

8.13. Obtención de límite de detección

En cuanto al límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), se determinaron en base a la señal analítica obtenida al analizar disoluciones con muy baja concentraciones muy bajas de elementos de trabajo.

Después de determinar el valor de densidad óptica, se calcularon el valor medio (\bar{x}) y la desviación estándar (s) de cada elemento.

El límite de detección es obtenido mediante la siguiente ecuación:

$$LD = \bar{x} + 3s$$

La ecuación del límite de cuantificación para obtenerlo es:

$$LC = \bar{x} + 10s$$

Después de eso, los valores de detección y evaluación cuantitativa se obtuvieron en las unidades de concentración con la ecuación de la curva de calibración apropiada (Miller, et al., 2002)

8.14. Diseño del dispositivo microfluídico.

Para el diseño del dispositivo microfluídico se tomaron en cuenta diferentes características que debía tener para su correcto funcionamiento, siendo estas:

Propiedades mecánicas variables: los materiales debían de poseer cierta rigidez para facilitar su fabricación y debía tener una geometría estable que permitiera una parametrización correcta de los análisis.

Baja interacción con el fluido: Para lograr los resultados deseados, los materiales utilizados no debían de reaccionar con el fluido de la muestra, absorber moléculas o interferir con el fluido del ensayo.

Materiales y procesos de fabricación rápidos y económicos: El método de fabricación debía permitir un rápido proceso de desarrollo. Para poder ser aplicado en investigaciones académicas también debía de estar basado en materiales baratos y fáciles de conseguir.

9. Resultados

9.1. Actividad enzimática de la Glucosa Oxidasa (GOx)

9.1.1. Efecto del pH

La *figura 22* representa los resultados de las pruebas realizadas al cambiar el pH de las soluciones de glucosa en un rango de 5 a 9 con intervalos de 0.5. Los resultados indican que la enzima, tanto libre como inmovilizada, tiene una actividad máxima en soluciones ligeramente acidas. Una diferencia que es notable en el sistema inmovilizado es que este ayudo a la enzima a resistir en un rango de pH más amplio.

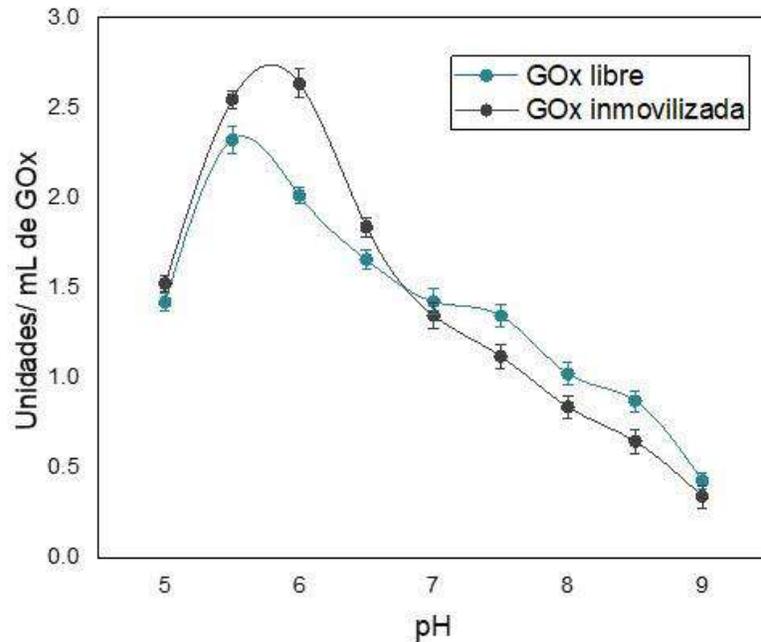


Figura 22. Evaluación del efecto pH sobre la actividad de la enzima glucosa oxidasa

En la gráfica de enzima libre podemos observar que a un pH de 5 alcanza aproximadamente un 63% de actividad, la misma que va en un aumento notablemente de 100% a un pH 5.5, para después descender su actividad aproximadamente a un 77% en un pH 6.5.

Podemos observar en la actividad de la enzima inmovilizada que un pH 5 se alcanza aproximadamente 55% de actividad, y un 100% a un pH 5.8, descendiendo posteriormente a un 63.4% en un pH de 6.5. En ambas pruebas se puede observar una baja continua de actividad después de un pH 6.

Según Singh y col en 2013, el pH óptimo para activar la glucosa oxidasa es de 4 a 6. Por lo tanto, el pH obtenido de la actividad en la experimentación está dentro del rango apropiado, posible debido a que la afinidad del sustrato por la enzima es el adecuado.

La actividad máxima aumentó un 18.19% después de haber inmovilizado a la enzima. También se observa que el pH óptimo de la enzima libre es de 5.5, y de la enzima inmovilizada es de 5.8, este incremento de pH se puede atribuir a los efectos del microentorno, es decir, que la enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual al combinarse, Debido a que se inmovilizo la enzima en material (quitosano) con propiedades catiónicas, el pH del microambiente (6.2-7) es mayor que el pH optimo del solvente (5-6), asegurando un pH optimo y una estabilidad optima, tienen las enzimas hacia valores de pH ligeramente más altos o alcalinos, al mismo tiempo se amplía el rango de pH en el que puede actuar la enzima.

Como se mencionó, esto está relacionado con el quitosano y su acidez, ya que se protona en soluciones ácidas y pH de descomposición entre 6.2 a 7.0 (dependiendo del grado de desacetilación). Esto lo convierte en un poderoso absorbente de iones que se cargan negativamente en soluciones a valores de pH por debajo de 6, utilizando el mecanismo de intercambio de aniones. Por lo tanto, a valores de pH inferiores a 6, la capacidad de adsorción de cationes se reduce significativamente, y a valores de pH superiores a 7, la capacidad de adsorción de aniones es nula. Se puede decir entonces que la selectividad del quitosano depende del pH de la solución.

El glutaraldehído se utiliza para entrelazar las cadenas de quitosano y estabilizarlo en soluciones ácidas, esto debido a que puede formar en solución polímeros de diferentes pesos moleculares, los cuales reaccionan con los grupos aminos expuestos de la proteína, del quitosano en este caso, para producir el entrecruzamiento. Esto se utiliza usada para mejorar la eficiencia de adsorción y también para mejorar la selectividad de adsorción.

Por esta razón, se utilizó el glutaraldehído para el entrecruzamiento de las partículas pues los estudios de Emese Biró et al. 2007, demuestran que las partículas reticuladas con glutaraldehído al 1% sufrieron mucho menos contracción o deformación, pero su forma y superficie se volvió bastante irregular. Así mismo, la aplicación del 5% de agente reticulante preservó casi por completo la forma regular y la superficie lisa de la esfera de quitosano, haciéndola más dura pero también más quebradiza.

9.1.2. Efecto de la temperatura

La *figura 23* muestra los resultados de la influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima. Se observa que el rango de temperatura en el que la enzima mostró mayor actividad fue entre 35°C a 45°C tanto para la enzima libre como para la enzima inmovilizada.

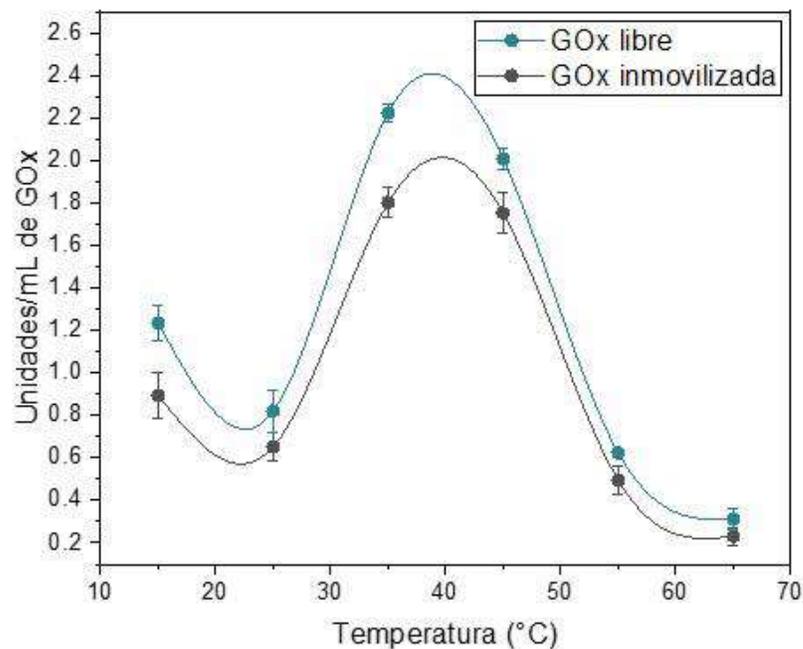


Figura 23. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima glucosa oxidasa.

A una temperatura de 25°C la enzima libre muestra aproximadamente 37% de actividad, incrementando notablemente a su temperatura óptima de 39°C, donde la actividad fue del 100%, para después seguir disminuyendo su actividad al continuo aumento de temperatura.

Se observan los efectos de la temperatura en la enzima inmóvil gracias al quitosano donde a los 35°C alcanza una actividad del 92%, con una temperatura optima a los 40°C, y disminuyo a un 25% de actividad a los 55°C.

De acuerdo con Singh y col en 2013, la temperatura óptima para la activación de la glucosa oxidasa se encuentra entre 30°C y 40°C, lo que nos hace saber que los resultados del proyecto son correctos debido a que los mismos concuerdan con ese rango.

En el caso de la temperatura, la actividad de la enzima inmovilizada disminuyo un 16.67%, y también hubo un pequeño cambio en cuanto a la temperatura optima aumentando de 39°C sin inmovilizar a 40°C para la enzima inmovilizada.

A medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de reacción; Se puede determinar que cuando alcanza el máximo de actividad comienza una disminución de la misma, que es provocada por la desnaturalización de la enzima, debido a un aumento de energía cinética de las moléculas que reaccionan.

Aunque ha habido una mejora en el régimen de temperatura óptima para la enzima inmovilizada, hubo más perdida de actividad que en la enzima libre, lo cual puede deberse al hecho de que las condiciones cuando se realiza la experimentación causan la desnaturalización de la enzima.

9.1.3. Prueba de acoplamiento

La gráfica (*figura 24*) fue generada a partir de la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con las macroesferas de quitosano con relación al tiempo necesario para su correcta inmovilización.

Entre los métodos de inmovilización de enzimas por unión química se encuentra el método de unión de soportes, es el método de inmovilización más utilizado y se dispone de más información al respecto. La elección del soporte y del tipo de enlace es muy importante para obtener una buena actividad posterior del biocatalizador.

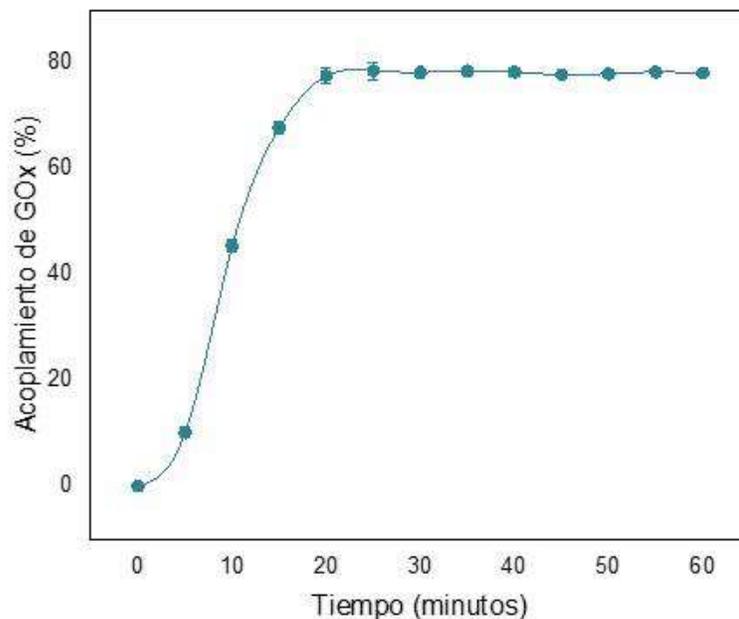


Figura 24. Evaluación del acoplamiento de la enzima glucosa oxidasa con respecto al tiempo.

Se observa que a 5 minutos de comenzar las pruebas se logró inmovilizar aproximadamente 10% de glucosa oxidasa, conforme pasan los minutos el acoplamiento sigue aumentando, a los 10 minutos tenemos más del 40% de

enzima inmovilizada y después de 20 minutos se logró inmovilizar aproximadamente 79% de glucosa oxidasa.

Observamos que después de 20 minutos el acoplamiento enzimático se mantiene constante incluso a los 60 minutos de comenzada la experimentación, esto debido a que las moléculas de enzima presente se han unido a la cantidad de sustrato disponible.

La inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en quitosano fue utilizada debido a que se pueden formar partículas de soporte de diferentes tamaños y mediante varios métodos, en este caso hablamos de macropartículas realizadas por el método de precipitación, las cuales poseen un área de superficie específica alta y numerosos sitios activos disponibles para que se fijen las moléculas de enzima. Además, el menor tamaño de las partículas de soporte ayuda bastante pues el impedimento de difusión interna disminuye.

Al mismo tiempo que se optó por la elección del quitosano debido a sus características importantes al ser un soporte orgánico o polímero natural y es atóxico, biocompatible y biodegradable. También debido a que las enzimas recubiertas de quitosano sufren menos el efecto de lixiviación por las interacciones iónicas entre la enzima y el soporte. Es importante mencionar que el quitosano en forma de perlas (en este estudio en macroesferas), mostró también excelentes resultados al permitir la inmovilización del doble de enzimas.

9.1.4. Ciclos de reuso

Esta prueba se realizó para evaluar la estabilidad operacional de la glucosa oxidasa inmovilizada. En la *figura 25* podemos observar que en el segundo ciclo de operación aún se contaba con el 90% de la actividad proteolítica y

continúa bajando poco a poco conforme aumentan los ciclos de operación, para en el quinceavo ciclo aún se contaba con aproximadamente un 65% de actividad.

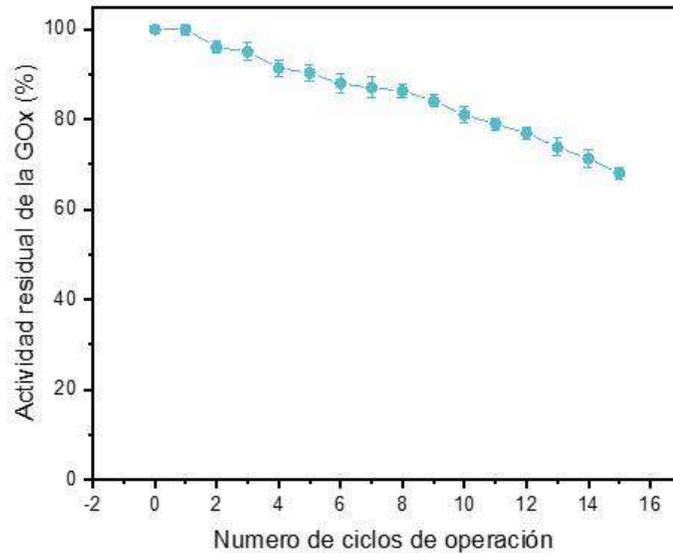


Figura 25. Evaluación del reuso operacional de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en macro esferas de quitosano.

Según Dwevedi y Kayastha en 2009, el uso repetido del sistema catalítico debilitará la fuerza de unión entre la enzima y el soporte, lo que provocará una pérdida de actividad.

Los resultados obtenidos con respecto a la reciclabilidad de la glucosa oxidasa inmovilizada con quitosano se obtuvieron utilizando glutaraldehído para inmovilizar la glucosa oxidasa, creando un entrecruzamiento covalente entre los grupos amino presentes en el portador y las enzimas. Esta reticulación da como resultado una mayor estabilidad y durabilidad.

9.1.5. Muestras colorimétricas.

Se realizaron las pruebas colorimétricas en solución y en papel, se observa que a medida que aumenta la concentración de glucosa en las muestras, el color naranja-rojo representativo del colorante o-dianisidina utilizado se volvió cada vez más intenso. Esto se debe a que la glucosa es oxidada por el oxígeno disuelto en presencia de GOx y produce peróxido (H_2O_2), después este H_2O_2 oxida o-dianisidina por la presencia de peroxidasa de rábano picante. Así, dependiendo de la cantidad de glucosa oxidada y la creciente cantidad de peróxido liberado al aumentar la concentración de glucosa, obtenemos tonos cada vez más intensos.

Mediante la experimentación se determinó que conforme pasa el tiempo, y después de agregar todos los componentes a las muestras, estas se vuelven cada vez más oscuras hasta alcanzar un color homogéneo, es más fácil observar el color final de las muestras en papel ya que a diferencia de las muestras en cerámica, estas no se sedimentan con el tiempo, sino que al secarse mantienen su respectivo color de acuerdo con su concentración.

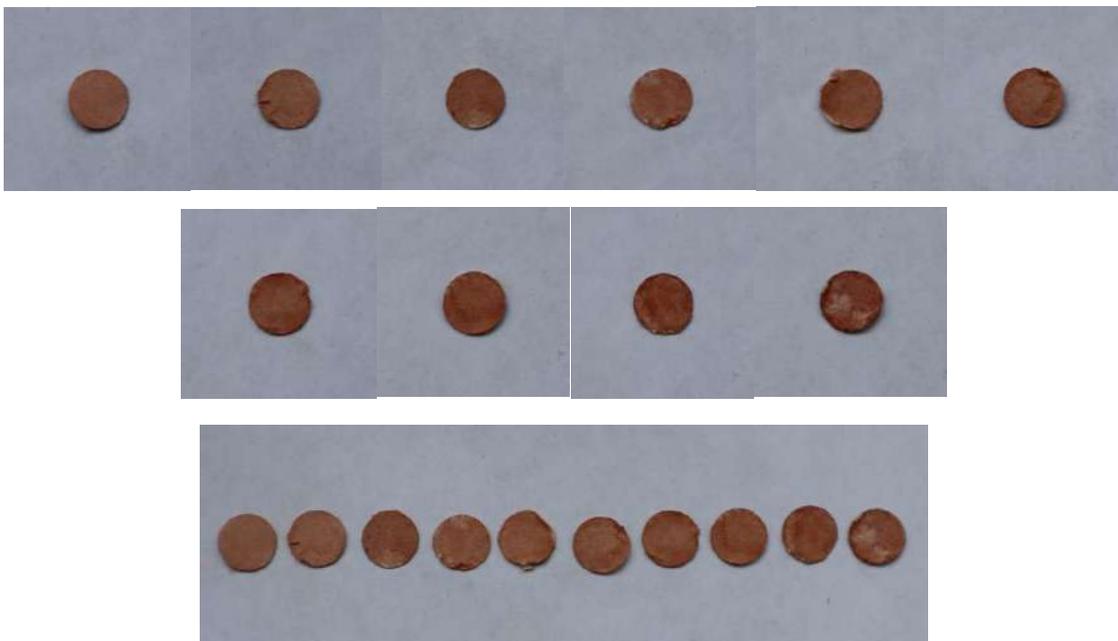


Figura 26. Muestras colorimétricas de glucosa en papel.

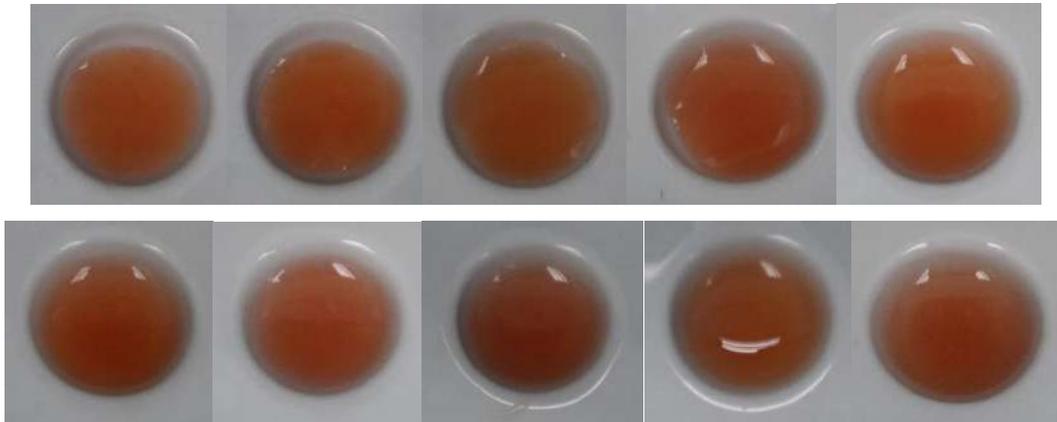


Figura 27. Muestras colorimétricas de glucosa en cerámica.

9.1.6. Modelo RGB

Para determinar los valores de las muestras colorimétricas en un canal de combinación de colores primarios RGB y visualizar el cambio de color en las soluciones con respecto a la concentración

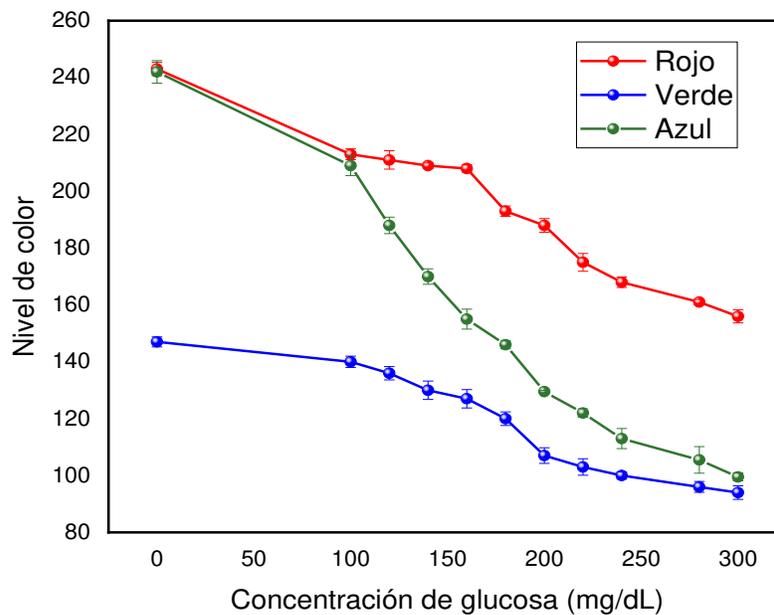


Figura 28. Evaluación colorimétrica de glucosa oxidasa.

Se observa en la *figura 28* que los valores RGB de las muestras van disminuyendo conforme aumenta la concentración de glucosa, esto debido a

que, en imágenes en color de 8 bits por canal, los valores de intensidad varían de 0 (negro) a 255 (blanco) para cada uno de los componentes RGB (rojo, verde, azul). Así, al aumentar la concentración de glucosa en la solución, el color se vuelve más oscuro, por lo que los valores tenderán al cero que representa el negro y entre menos concentración el tono es más claro, por lo que los valores del pixel en RGB son más altos.

Según la gráfica, cuando la muestra no posee concentración de glucosa, los valores de RGB son los mayores, con rojo y verde en valores de 244 y azul en 148, y que conforme aumentamos la concentración los valores van disminuyendo hasta alcanzar 158 en rojo, 100 en verde y 95 en azul.

También podemos observar que el canal R de las pruebas colorimétricas es más alto debido a la utilización del colorante (o-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) utilizado como sustrato de peroxidasa y el cual produce un producto final soluble de color rojo-anaranjado.

De esta forma podríamos determinar la concentración de glucosa al hacer una relación valor RGB-concentración con solo obtener el valor RGB de un pixel, si obtenemos valores altos la concentración es menor y con valores bajos la concentración será más alta.

En la *figura 29*, podemos observar el histograma acromático CIE, que representa la capacidad de reconocimiento del ojo humano según dos parámetros CIE x e y. El proceso CIE transforma la distribución espectral de la energía luminosa de un objeto en un parámetro de luminancia Y y dos coordenadas de cromo x, y, asignando color a tono y saturación en un diagrama CIE bidimensional.

El diagrama CIE se basa en la selección de tres colores primarios como colores estándar, creando mezclas aditivas de todos los demás colores del

espectro. El valor del triestímulo es la cantidad de los tres colores primarios (rojo, verde y azul) que ayudan a describir un estímulo de color, los cuales son llamados X, Y, Z.

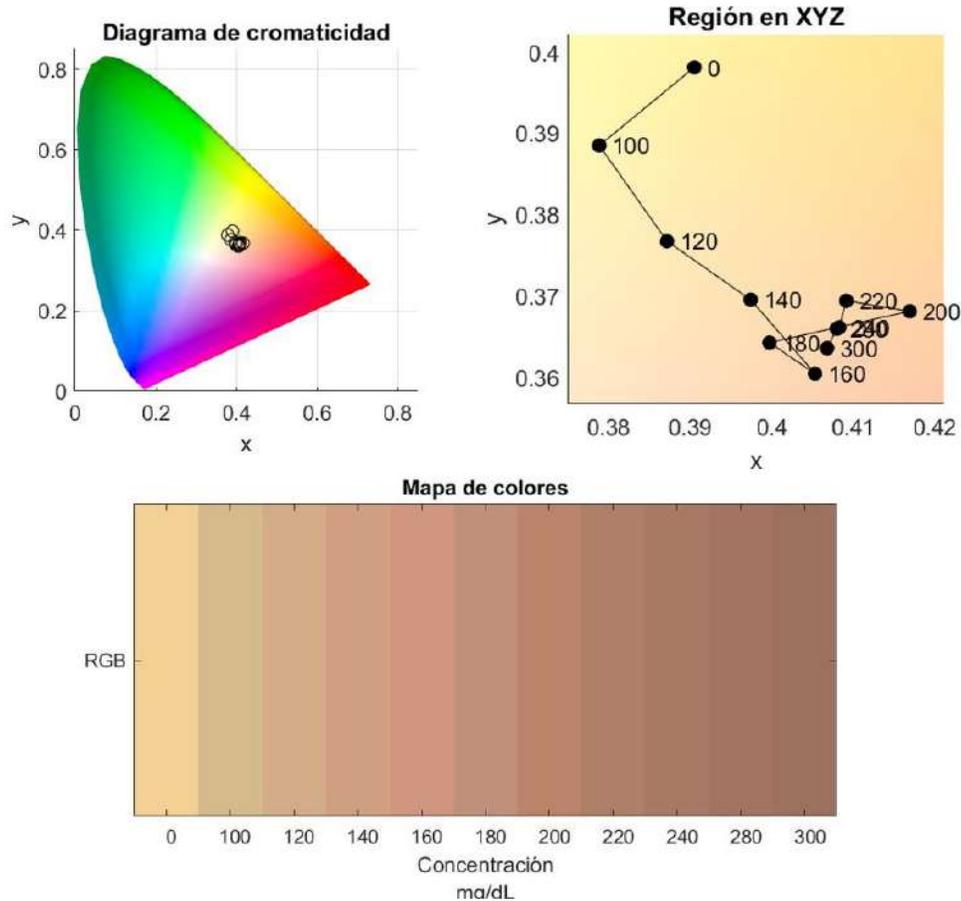


Figura 29. Diagrama CIE 1931 de cromaticidad obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de glucosa.

Los límites exteriores del diagrama CIE representan los colores puros expresados con sus correspondientes longitudes de onda. El blanco se coloca aproximadamente en el centro y aquí es el área en la que el nivel de saturación es el más bajo.

Con la aplicación del diagrama CIE es evidente que las mediciones de glucosa realizadas en este proyecto se encuentran aproximadamente en la

región naranja amarillento y la región rosa naranja, dándonos como resultado unos colores marrones-anaranjados.

Gracias al mapeo de los colores nos damos cuenta de que los resultados son positivos debido a que como se esperaba, mientras más concentración de glucosa tengamos el color de esta muestra se tornara más oscuro.

9.1.7. Distancia Euclidiana

El propósito del modelo de color es simplificar los parámetros de color de manera estandarizada, donde se dan las coordenadas tridimensionales y el subespacio de este sistema, donde cada color está representando por un solo punto.

Es por ello por lo que se hizo uso del método de la Distancia Euclidiana determinando así la diferencia de color computacionalmente.

La distancia Euclidiana se calculó mediante la ecuación:

$$DE = \sqrt{(R_M - R_C)^2 + (G_M - G_C)^2 + (B_M - B_C)^2}$$

Se usaron los valores RGB (color rojo, verde y azul) promedio de cada área seleccionada, estos obtenidos por medio de una prueba con un colorímetro a cada una de las muestras de glucosa a diferentes concentraciones. En donde:

DE es la distancia Euclidiana.

M es el valor de la muestra en cierta concentración

C es el control negativo de la reacción.

Después de obtener el cambio de color dependiendo de la concentración de glucosa, los resultados se pueden utilizar para construir una curva estándar (*figura 30*) de la dependencia de la distancia euclidiana de la concentración de glucosa oxidasa.

La pendiente de la curva de calibración obtenida mediante el ajuste lineal fue de 0.50442 y un coeficiente de $R^2 = 0.98101$, el cual indica que el incremento del color esta aplicado en un 98.101% del aumento de la concentración de glucosa que va de 0 mg/dl hasta 300 mg/dl.

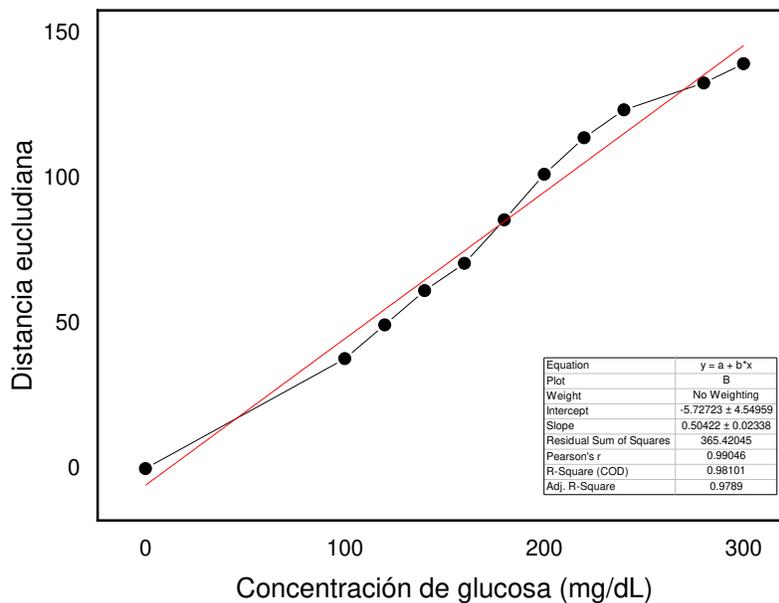


Figura 30. Curva de calibración para detección de glucosa oxidasa en buffer de fosfato.

9.1.8. Límite de detección

De acuerdo con la *figura 30*, obtenemos valores para la determinación del límite de detección, donde σ es la desviación estándar y s es la pendiente de la ecuación.

$$\sigma = 0.345$$

$$s = 0.50422 \text{ mg/dL}$$

$$LOD = \frac{3\sigma}{s}$$

$$LOD = \frac{3(0.345)}{0.50422} = 2.052 \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ o } 1.653 \text{ mM de glucosa oxidasa.}$$

La *Tabla 5* recopila los límites de detección reportados en la bibliografía, comparado con el método desarrollado en este proyecto, el límite de detección en el sensor presentado por Xu Wang et al, en 2018 es el único más bajo, por lo tanto, consideramos aceptable el límite de detección en este proyecto ya que es inferior a la mayoría de los métodos discutidos en la bibliografía presentada en la tabla.

<i>Colorante</i>	<i>Límite de detección</i>	<i>Referencia</i>
Nanopartículas de azul de Prusia (PBNP)	3.29mM	(Huang Dai et al., 2018)
Una mezcla de 4-aminoantipirina y ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico, diclorhidrato de o-dianisidina, yoduro de potasio, ácido negro y ácido amarillo	0.5- 20mM	(Wijitar Dungchai et al., 2010)
Membranas celulósicas Solución acuosa de NaOH/urea que se modificó con sodio	0.45mM	(Xiaogang Luo et al., 2019)
3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB)	3.1 mg/dL	(Po-Chun Lee et al., 2013)
3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB)	0.014mM	(Xu Wang et al., 2018)
3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB)	0.28mM	(Han Zhang et al., 2020)
3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB)	~200 mM	(Ahyeon Koh et al., 2016)

Tabla 5. Límites de detección de Glucosa Oxidasa con distintos colorantes.

9.2. Actividad enzimática de Colesterol Oxidasa (ChOx)

9.2.1. Efecto del pH

La matriz y el método utilizado en la inmovilización enzimática comúnmente afectan las propiedades bioquímicas de la misma.

Los resultados que se obtuvieron de las pruebas realizadas se pueden observar en la *figura 31*, donde, es notorio que al cambiar el pH de las soluciones de colesterol oxidasa en un rango de 5 a 9 con intervalos de 0.5. Los resultados demostraron que la enzima, tanto libre como inmovilizada, tiene una actividad máxima en soluciones neutras y ligeramente básicas.

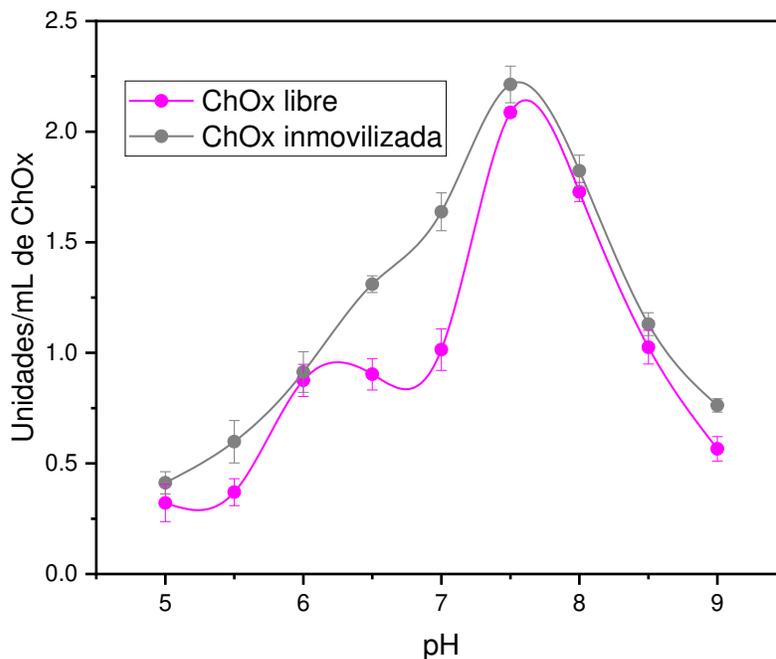


Figura 31. Evaluación del efecto del pH sobre la actividad de la enzima colesterol oxidasa.

En la enzima libre podemos observar que a un pH de 5 alcanza aproximadamente un 18% de actividad, alcanzando su 100% de actividad a

un pH de 7.5. En un pH de 8 la actividad enzimática se redujo drásticamente a un 87% para que en un pH de 9 esta bajara al 29%.

En la actividad de la enzima inmovilizada con quitosano, se puede observar que a pH 5, su actividad alcanzó aproximadamente el 20%, aumentando a su 100% a pH 7.5, para al final disminuir al 33% a pH 9.

De acuerdo con BioSystems en 2011, el pH óptimo para la activación del colesterol oxidasa se encuentra en 7, el cual está cerca de los valores obtenidos en el estudio de inmovilización de colesterol oxidasa.

Si bien, el pH óptimo no se modificó en comparación con la enzima libre, la actividad enzimática máxima aumento un 5.82% con la inmovilización de la enzima.

Este aumento de la actividad puede atribuirse a que la enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual cuando se combina, debido a que tenemos una enzima inmovilizada en el material, que en este caso es quitosano, que tiene características catiónicas, el pH del microentorno es mayor que el pH óptimo del solvente, haciendo que el pH se desplace hacia valores ligeramente más altos de pH.

El glutaraldehído se utilizó para entrecruzar cadenas de quitosano y estabilizarlas en soluciones acidas, debido a que puede formar en solución polímeros de diferentes pesos moleculares, los cuales reaccionan con los grupos aminos expuestos del quitosano para así producir el entrecruzamiento.

9.2.2. Efecto de la temperatura

En la *figura 32* se observa que el intervalo de temperatura donde la enzima mostro mayor actividad fue en el intervalo de 25°C a 45°C tanto para la enzima libre como la enzima inmovilizada

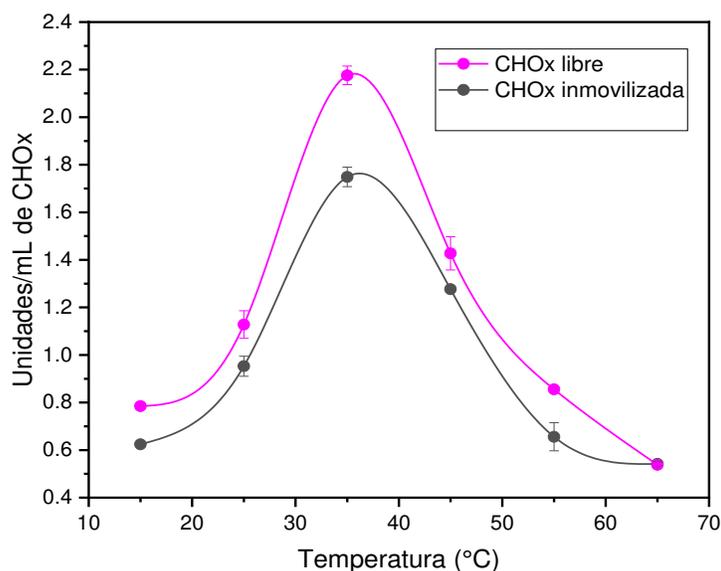


Figura 32. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima colesterol oxidasa.

Al momento de comenzar a aumentar la temperatura y después de los 20°C se observa un incremento en la actividad de la enzima, así, cuando se alcanza una temperatura de 25°C la enzima libre muestra aproximadamente 51.3% de actividad, incrementando notablemente y llegando a su máximo (actividad del 100%) y temperatura óptima a 36°C, para enseguida comenzar a disminuir su actividad al continuo aumento de temperatura, por ejemplo, a los 45°C ya disminuyó su actividad a un 65.1%, y a los 55°C es tan solo de 32.1%.

A los 25°C se tiene una actividad del 42.3%, y al igual que en la enzima libre, se obtiene un aumento de la actividad conforme aumenta la temperatura hasta alcanzar una temperatura optima de 36.5°C y posteriormente comenzar a tener una actividad decreciente conforme sigue aumentando la

temperatura, así, a los 45°C ya ha bajado a 72.31% y a los 55°C se tiene tan solo un 36.7% de actividad.

De acuerdo con Wang y Mu, la temperatura óptima para la activación del colesterol oxidasa es 35°C, lo que está muy cerca de los resultados que se obtuvieron en el presente estudio tanto en la enzima inmovilizada y la enzima libre.

Con estas pruebas respecto a la temperatura, observamos que la actividad de la enzima inmovilizada disminuyó un 18.81% con respecto a la enzima libre, pero también hubo un pequeño cambio en cuanto a la temperatura óptima aumentando medio grado, de 36°C sin inmovilizar a 36.5°C para la enzima inmovilizada.

Durante la experimentación, cuando se aumenta la temperatura hay un aumento de velocidad de reacción; por lo que al llegar al pico de actividad comienza la degradación debido a la desnaturalización de la enzima debido a un aumento en la energía cinética de las moléculas que reaccionan.

El quitosano puede modificarse químicamente y/o reaccionar con otros compuestos, produciendo materiales compuestos que pueden influir positivamente en la estabilidad de la temperatura de la enzima inmovilizada, y todo esto es debido a su alta reactividad.

Si bien se logró llegar a un punto termoestable un poco mayor mediante el proceso de inmovilización, hubo más pérdida en la cantidad de enzima inmovilizada que en las pruebas con la enzima libre, lo cual puede deberse a que las condiciones del proceso experimental provocan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

9.2.3. Prueba de acoplamiento

La inmovilización de la enzima colesterol oxidasa en quitosano fue utilizada debido a que se pueden formar partículas de soporte de diferentes tamaños y mediante varios métodos, en este caso en particular nos referimos a macropartículas realizadas por el método de precipitación, se optó por macropartículas debido a sus numerosos sitios activos disponibles que se pueden fijar a las moléculas de la enzima, además, el tamaño más pequeño de las partículas del portador ayuda a prevenir la difusión interna a medida que se contra.

En la *figura 33* se puede observar la evaluación del acoplamiento de la enzima colesterol oxidasa con las macroesferas de quitosano en relación con el tiempo necesario para su correcta inmovilización.

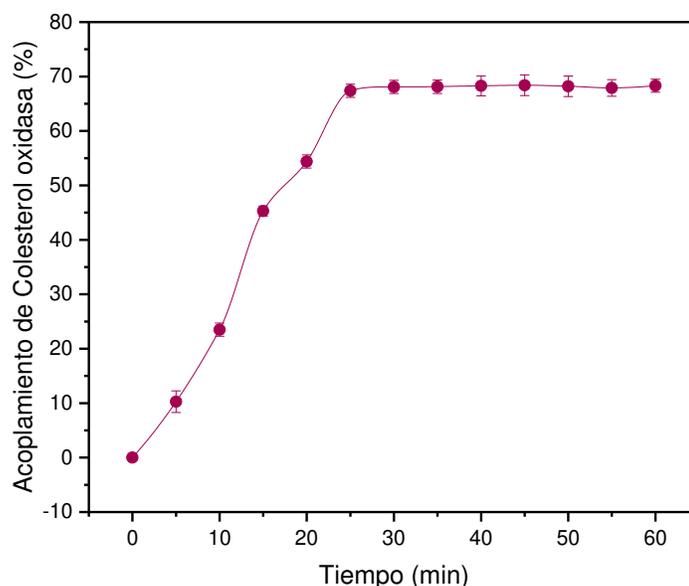


Figura 33. Evaluación del acoplamiento de la enzima colesterol oxidasa respecto al tiempo.

Se observa que a 5 minutos de comenzar las pruebas se logró inmovilizar aproximadamente 10% de colesterol oxidasa, y conforme pasa el tiempo el

acoplamiento sigue en un aumento constante, siendo así que a los 15 minutos se ha obtenido un acoplamiento del 45% de enzima inmovilizada, para los 25 minutos obtener un 67.5% de acoplamiento. A partir de los 25 minutos el acoplamiento de la enzima se mantiene constante, lo que continua así incluso a los 60 minutos de haber comenzado la prueba, esto ocurre porque las moléculas de enzima presentes se han unido a la cantidad disponible de sustrato.

Este acoplamiento fue resultado de la buena elección del soporte, en este caso, de quitosano, el cual es conocido por ser un soporte orgánico atóxico, biocompatible y biodegradable. Se sabe que las enzimas que son recubiertas de quitosano tienen un contacto más pequeño con la interacción de iones entre enzimas y soporte.

9.2.4. Muestras colorimétricas.

Se realizaron pruebas colorimétricas de colesterol en papel para determinar el valor de pH al que la coloración tiene la mejor intensidad, esto a la misma concentración, pero a diferentes valores de pH con diferencias de 0.5 (5-9), se puede observar que a valores más bajos de pH los colores que se plasman son más claros, en valores de pH 7 y 7.5 se obtienen colores naranja-rojizos con mayor intensidad, y en valores más altos de pH el color vuelve a mostrarse con una menor intensidad.

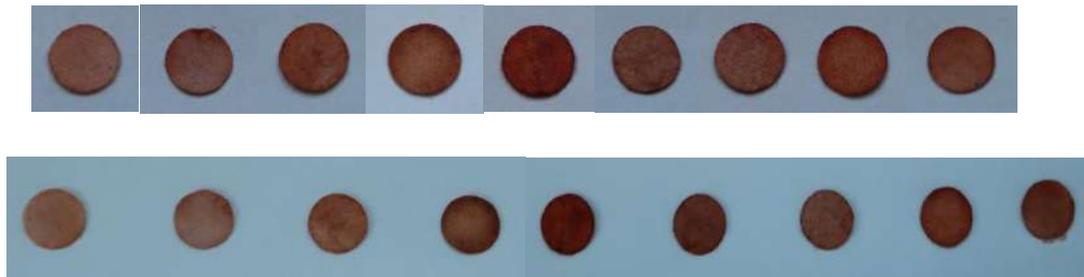


Figura 34. Muestras colorimétricas de colesterol en papel con misma concentración y pH de 5 a 9 con intervalos de 0.5.

Por esta razón se realizaron las pruebas colorimétricas de colesterol en papel a diferentes concentraciones a un pH de 7.5.

La *figura 35* muestra las pruebas colorimétricas en papel a diversas concentraciones de colesterol, y determina que a medida que aumenta la concentración de colesterol en las muestras, el color naranja-rojizo representativo del colorante o-dianisidina utilizado, se volvió cada vez más intenso. Esto se debe a que el colesterol es oxidado por el oxígeno disuelto en presencia de CHOD y produce peróxido (H_2O_2), después este H_2O_2 oxida o-dianisidina por la presencia de peroxidasa de rábano picante.

Así, dependiendo de la cantidad de colesterol oxidado y la creciente cantidad de peróxido liberado al aumentar la concentración de colesterol, obtenemos tonos cada vez más intensos.

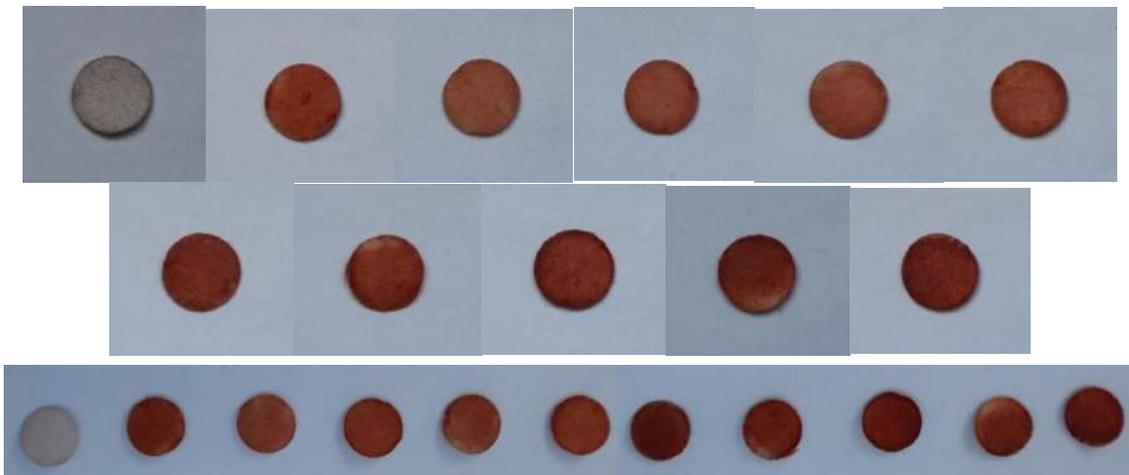


Figura 35. Muestras colorimétricas de colesterol en papel.

Mediante la experimentación se determinó que conforme pasa el tiempo y después de agregar todos los componentes a las muestras, estas se vuelven cada vez más oscuras hasta alcanzar un color homogéneo y final.

Así, cuando no tenemos ninguna concentración de colesterol la muestra es muy clara, casi blanca, y conforme vamos aumentando la concentración obtenemos tonalidades naranja-rojas (características del colorante O-Dianisidina) cada vez más oscuras.

9.2.5. Modelo RGB

Para determinar los valores de las muestras colorimétricas en un canal de combinación de colores primarios RGB y visualizar el cambio de color en las soluciones con respecto a la concentración, se utilizó un dispositivo que a partir del píxel de una imagen almacena la información de su tono y nos da estos 3 valores, los cuales observamos graficados a continuación.

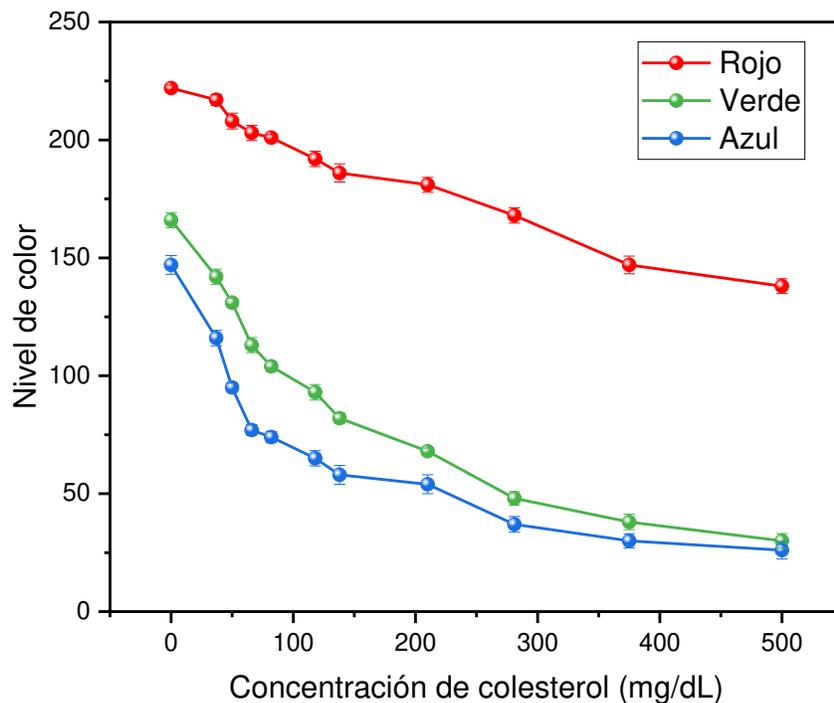


Figura 36. Evaluación colorimétrica de colesterol en papel.

Se observa en la *figura 36* que los valores RGB de las muestras van disminuyendo al aumentar la concentración de colesterol en la solución, por

lo que el color se vuelve más oscuro, y como resultado los valores tenderán al cero que representa el negro o en general tonalidades más oscuras y entre menos concentración el tono es más claro, por lo que los valores del pixel en RGB son más altos.

Según la gráfica, cuando la muestra no posee concentración de colesterol, los valores de RGB son los mayores, con rojo en 224, verde en valores de 165 y azul en 145, y que conforme aumentamos la concentración los valores van disminuyendo hasta alcanzar 138 en rojo, 32 en verde y 25 en azul.

Se observa claramente que el canal Rojo de la gráfica es más alto debido a la utilización del colorante (o-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) el cual es usado como sustrato de peroxidasa y produce un producto final soluble de un color entre amarillo-anaranjado-rojo característico.

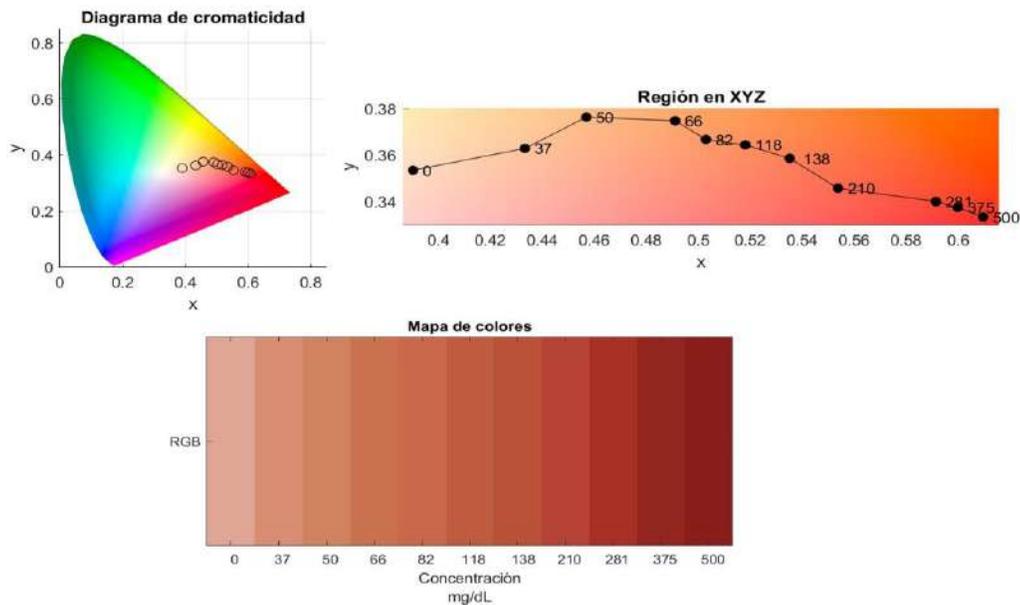


Figura 37. Diagrama CIE 1931 de cromaticidad obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de colesterol.

Como podemos observar en la *figura 37*, todos los colores visibles son una figura tridimensional, por esto el diagrama de cromaticidad es representado como un diagrama tridimensional de los valores triestímulos X, Y, y Z de un espacio de color, así, un color es expresado en términos de coordenadas de cromaticidad.

El parámetro Y nos brinda información sobre la medición del brillo de un color, mientras que x e y representan la cromaticidad de un color.

Con este diagrama observamos que la colorimetría obtenida de colesterol tiene coordenadas cromáticas que van desde valores de $(x, y) = (0.38, 0.35)$ a $(x, y) = (0.62, 0.38)$, los cuales representan una coloración naranja-rojiza, mostrando que a medida que hay un aumento en la concentración de colesterol en la muestra, aumenta el brillo o luminosidad, y al mismo tiempo la cromaticidad o saturación del color, generando colores que van desde claros hasta unos cada vez más oscuros claramente visibles en el mapa de colores.

9.2.6. Distancia Euclidiana

El ojo humano se basa en una combinación de los colores primarios para poder observar otro tipo de colores. El modelo de color pretende respaldar una definición estándar de color especificando las coordenadas tridimensionales y el subespacio del sistema en el que cada color está representado por un único punto.

Se hizo uso del método de la Distancia Euclidiana para determinar las diferentes tonalidades de las muestras de colesterol computacionalmente.

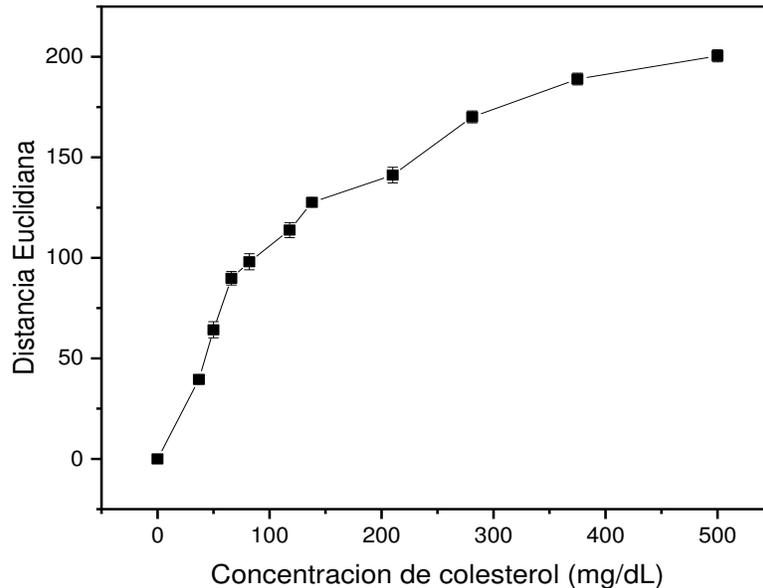


Figura 38. Recta de calibrado de colesterol obtenido por visión por computador.

La distancia Euclidiana se calculó mediante la ecuación:

$$DE = \sqrt{(R_M - R_C)^2 + (G_M - G_C)^2 + (B_M - B_C)^2}$$

Se usaron los valores RGB (color rojo, verde y azul) promedio de cada área seleccionada, estos obtenidos por medio de una prueba con un colorímetro a cada una de las muestras de colesterol a diferentes concentraciones. En donde:

DE es la distancia Euclidiana.

M es el valor de la muestra en cierta concentración

C es el control negativo de la reacción.

Observando la *Figura 38*, se determinó que el método colorimétrico de visión por computador es parcialmente lineal en ciertos rangos de concentración de colesterol.

Debido a las ventajas que presenta una ecuación de primer grado; como lo es la sencillez de representar gráficos, la facilidad de resolver la ecuación y su sencillez de comprobar y dar una respuesta exacta; se decidió que para describir la gráfica obtenida de los valores de la ecuación anterior, el gráfico se dividió en dos partes para potenciar el valor de coeficiente de determinación (R^2), que evalúa el grado de relación lineal entre dos variables y el oscilar entre 0 y 1, si su valor se acerca más a 1, encajará mejor el modelo. Por lo que en general, para los métodos colorimétricos de visión por computador, valores de R^2 superiores a 0,98 son considerados buenos para el análisis cuantitativo.

Una vez que se obtiene el cambio de color versus la concentración de colesterol, los resultados se pueden usar para construir una curva de calibración para cada gráfico (*Figura 39 y Figura 40*) de distancia euclidiana versus concentración de colesterol.

La primera parte de la gráfica se muestra en la *Figura 39* a continuación, la cual contiene el rango de concentraciones de 0 a 120 mg/dL de colesterol, la pendiente de la curva de calibración obtenida para la sección mediante el ajuste lineal fue 1.01408 y se obtuvo un coeficiente de $R^2= 0.93369$, el cual indica que el incremento del color esta aplicado en un 93.369% del aumento de la concentración de colesterol

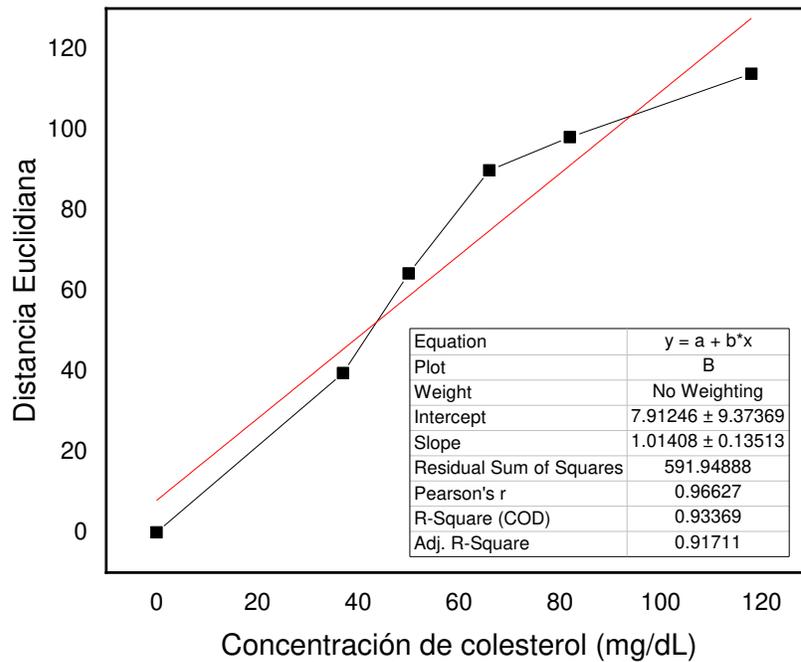


Figura 39. Recta de calibrado de colesterol obtenido por visión por computador.

La segunda sección de la gráfica, *Figura 40* muestra el rango de concentraciones de colesterol desde 120 mg/dL a 500 mg/dL de colesterol, donde encontramos que el coeficiente de determinación (R^2), el cual es una medida de la relación lineal entre la distancia Euclidiana y la concentración de colesterol fue de 0.94088, el cual indica que el incremento del color esta aplicado en un 94.088% del aumento de la concentración de colesterol.

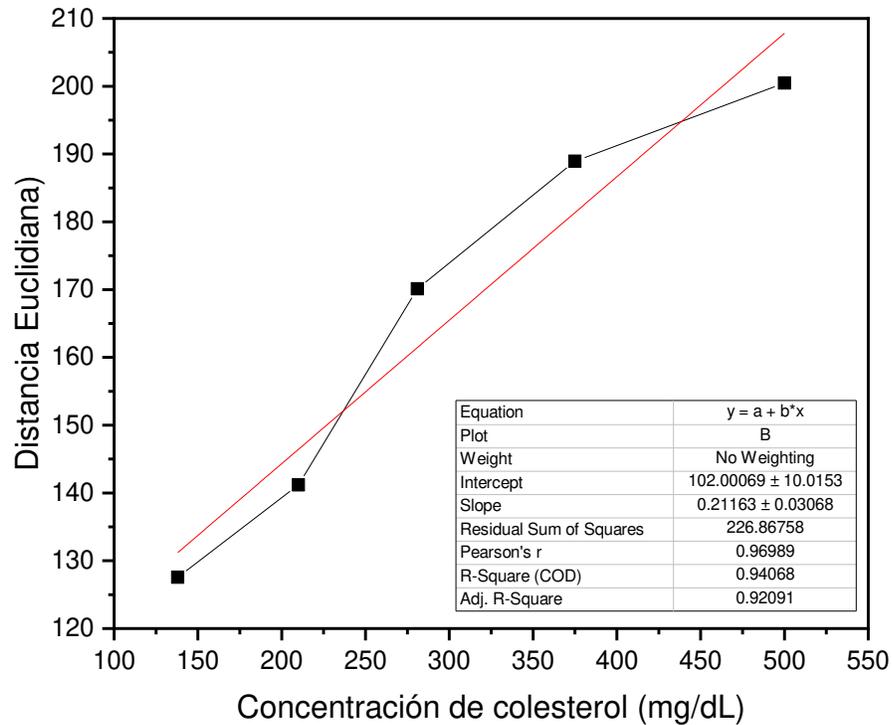


Figura 40. Recta de calibrado de colesterol obtenido por visión por computador.

Con esto podemos observar que obtenemos mejores valores de R2 con la segmentación de la primera grafica obtenida a concentraciones de 0-120mg/dL, aun así, estos valores se encuentran por debajo de los valores de R2 superiores a 0,98, los cuales son considerados buenos para el análisis cuantitativo.

9.2.7. Límite de detección

Tomando en cuenta la *figura 39* (gráfica obtenida de concentraciones de 0 a 120 mg/dL), obtenemos valores para la determinación del límite de detección, sabiendo que σ es la desviación estándar y s la pendiente de la ecuación.

$$\sigma = 0.145$$

$$s=1.01408 \text{ mg/dl}$$

$$LOD = \frac{3\sigma}{s}$$

$$LOD = \frac{3(0.145)}{1.01408} = \mathbf{0.42896} \frac{\mathbf{mg}}{\mathbf{dL}} \text{ o } \mathbf{0.11 mM} \text{ de colesterol oxidasa.}$$

De acuerdo con la *figura 40*, para determinar el límite de detección se obtuvieron los siguientes valores de acuerdo con la gráfica obtenida de concentraciones de 125 a 500 mg/dL, donde σ es la desviación estándar y s es la pendiente de la ecuación. Mediante los valores extraídos del uv-vis se obtuvo el valor de la desviación estándar correspondiente:

$$\sigma = 0.145$$

$$s=0.21163 \text{ mg/dl}$$

$$LOD = \frac{3\sigma}{s}$$

$$LOD = \frac{3(0.145)}{0.21163} = \mathbf{2.05547} \frac{\mathbf{mg}}{\mathbf{dL}} \text{ o } \mathbf{0.53 mM} \text{ de Colesterol oxidasa.}$$

La *Tabla 6* recopila los límites de detección reportados en la bibliografía, comparando con el método desarrollado en este proyecto, el límite de detección que se obtuvo aquí tiene un valor más grande o alto comparado a los presentados por otros estudios, sin embargo, para fines del proyecto este límite es aceptable debido a que el colesterol en suero sanguíneo se presenta en un rango de 125 – 200 mg/dL.

<i>Colesterol</i>		
<i>Colorante</i>	<i>Límite de detección</i>	<i>Referencia</i>
3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	0.76 μ M	(Lin, et al. 2017)
Ácido 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)	0.2 nmol/L	(Akhtar, et al, 2015)
3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	8 μ M	(Chung, et al. 2018)
Reactivo de Liebermann-Buchard	0.00430 mg/ml	(Adu, et al. 2019)
Nanopartículas de oro funcionalizadas.	0.2 mg/dL	(Narsingh, et al. 2018)
2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfónico) (ABTS ²⁻)	0.10 μ M	(Ruimin, et al, 2012)
puntos cuánticos de grafeno (GQD) y 3, 3, 5, 5-tetramethylbenzidine (TMB)	0.006 mM	(Narsingh, et al. 2015)

Tabla 6. Límites de detección de Colesterol Oxidasa con distintos colorantes.

9.3. Actividad enzimática de la Monoamino oxidasa A (MAO-A)

9.3.1. Efecto del pH

El propósito del método de inmovilización no es afectar la afinidad de la enzima por el sustrato y la estabilidad del biocatalizador en un amplio rango de pH y temperatura.

La *figura 41* es el gráfico de pH óptimo de la enzima monoamino oxidasa A en estado libre y de la enzima monoamino oxidasa inmovilizada con

quitosano, en esta, se puede observar que el pH óptimo obtenido tanto para la enzima libre y la enzima inmovilizada es el mismo, aunque la actividad haya disminuido en gran medida en la enzima inmovilizada.

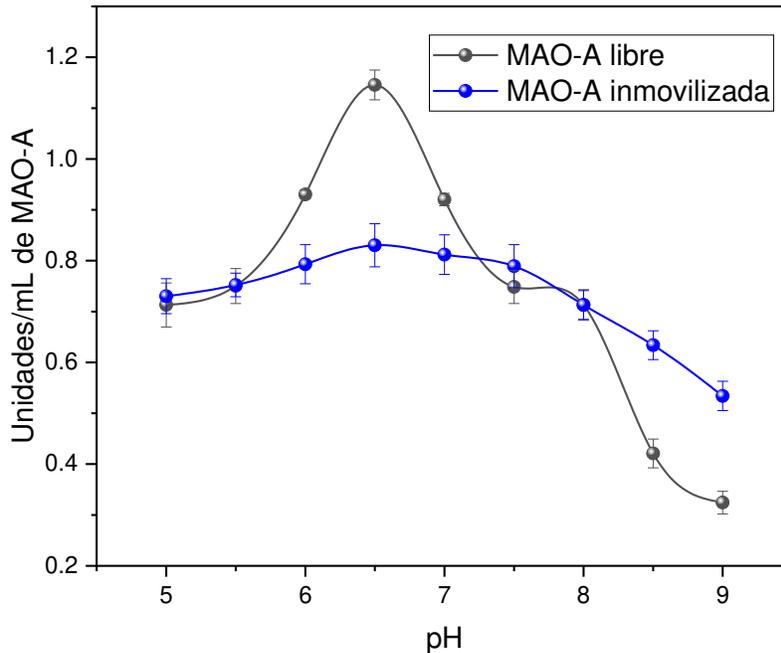


Figura 41. Evaluación del efecto del pH sobre la actividad de la enzima Monoamino oxidasa A.

En la enzima que se encuentra libre podemos observar que a un pH de 5 alcanza aproximadamente un 60.86% de actividad, alcanzando su 100% de actividad a un pH de 6.5. En un pH de 7.5 la actividad enzimática se redujo a un 65.21% para posteriormente bajar a 29.56% en un pH de 9.

En la actividad enzimática de la monoamino oxidasa inmovilizada con quitosano podemos observar que a un pH de 5 se alcanza aproximadamente 84.70% de su actividad, aumentando a su 100% de actividad en pH 6.5, para disminuir a un 62.35% de su actividad a un pH de 9. En el gráfico de la enzima inmovilizada se puede observar que la actividad enzimática se vuelve más estable incluso cuando el pH aumenta a valores más alcalinos, es decir, que

se mantiene sin cambios drásticos durante las variaciones de pH, y que en el punto en el que la enzima libre ha tenido un drástico descenso de actividad, la enzima inmovilizada aun muestra una actividad apenas en descenso ligero. Por lo que, aunque con la inmovilización no se logre un pico alto de actividad, se mantuvo una actividad casi constante conforme se elevó el pH a valores alcalinos.

Esto se debe a que la interacción del biocatalizador con la matriz quitosano-glutaraldehído afecta el equilibrio de ionización de los aminoácidos esenciales del sitio activo de la misma.

9.3.2. Efecto de la temperatura

La influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima Monoamino oxidasa A se muestra en la *figura 42*, en ella podemos observar que en el rango de temperatura de 25°C-45°C es donde la enzima mostró una actividad mayor, esto en la enzima libre como en la enzima inmovilizada.

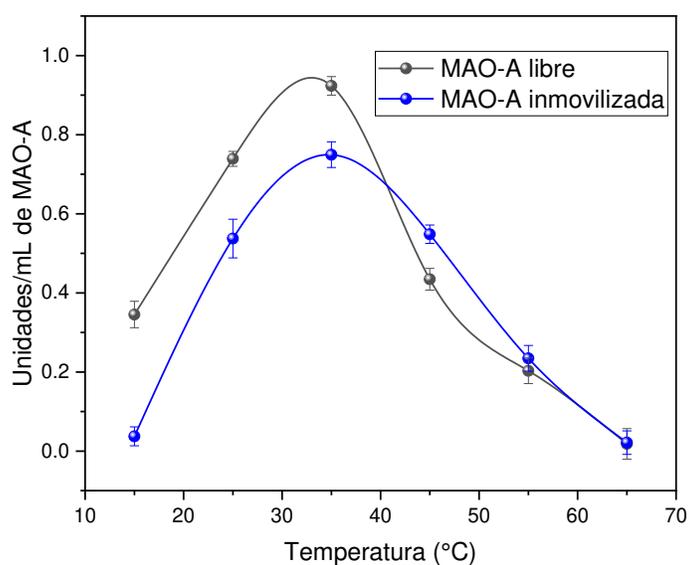


Figura 42. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima Monoamino oxidasa A.

En la *figura 42* observamos como comienza a elevarse la temperatura, y al mismo tiempo la actividad aumenta, cuando se alcanzan los 25°C la enzima libre muestra aproximadamente un 78.49% de actividad, lo cual sigue incrementando notablemente conforme sigue aumentando la temperatura hasta llegar a su nivel más alto y temperatura óptima de 33°C, para enseguida comenzar a descender su actividad con el continuo aumento de temperatura, y observamos que a los 41°C ya disminuyó su actividad a un 72.04%, a los 45°C es de 47.31% y a los 55°C ha disminuido hasta un 21.5%.

El efecto de la temperatura sobre la enzima inmovilizada de quitosano se puede observar claramente ya que a 25°C la actividad es del 71.62%. A medida que aumenta la temperatura, la actividad también aumenta hasta alcanzar la actividad máxima a la temperatura óptima de 35°C, después de esto y conforme sigue aumentando la temperatura, comienza un descenso de actividad y a los 41°C ya ha bajado la actividad a un 90.54%, a los 45°C un 74.32% y a los 55°C se tiene tan solo un 31.08%.

De acuerdo con Becerra A, 2018, la temperatura óptima para la activación del MAO-A es 30°C-35°C, lo que está dentro del rango en el estudio tanto para la enzima inmovilizada y la enzima libre.

Con estas pruebas que involucran la relación de la enzima con la temperatura, observamos que la actividad de la enzima inmovilizada disminuyó un 20.43% con respecto a la enzima libre, también obtuvimos un ligero cambio en la temperatura óptima de 33°C para la enzima que se encuentra libre a 35°C para la enzima inmovilizada.

Por otro lado, la gráfica de la enzima inmovilizada se volvió ligeramente más estable conforme fue aumentando la temperatura, específicamente después de los 35°C, pues originalmente la enzima libre mostraba un decaimiento muy

drástico después de dicha temperatura, el cual se volvió más estable y uniforme en la enzima inmovilizada.

En la experimentación, a medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de reacción, y luego de alcanzar el pico de actividad, comienza una disminución, provocada por la desnaturalización de la enzima como resultado del aumento de la energía cinética de las moléculas que reaccionan.

Si bien se logró llegar a un punto termoestable ligeramente mayor con la inmovilización, hubo gran pérdida en la cantidad de MAO-A inmovilizada cuando se inmovilizó con el quitosano, esto puede deberse a que las condiciones del proceso experimental causan desnaturalización o pérdida de actividad enzimática.

9.3.3. Acoplamiento

La inmovilización enzimática genera la base para conseguir la aplicación repetida de la enzima y una mayor estabilidad.

En la *figura 43* se puede ver la gráfica obtenida tras la inmovilización de la enzima MAO-A con las macroesferas de quitosano en función del tiempo necesario para una adecuada inmovilización.

Se observa que a 5 minutos de comenzar las pruebas se logró inmovilizar aproximadamente 13% de la enzima Monoamino oxidasa A y después de 10 minutos se logró inmovilizar aproximadamente 69% de la misma.

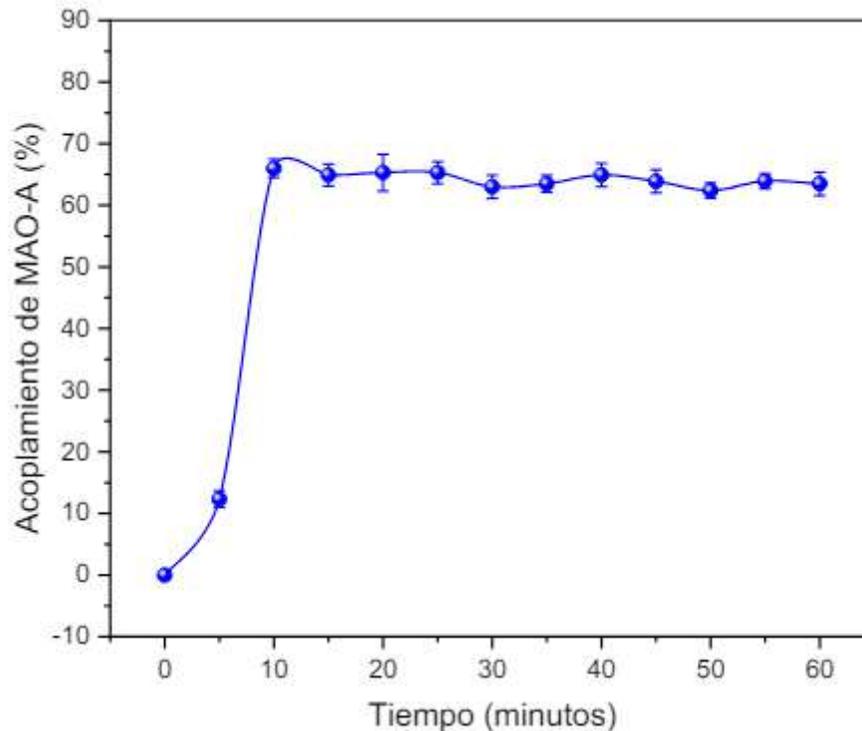


Figura 43. Evaluación del acoplamiento de la enzima Monoamino oxidasa A respecto al tiempo.

Notamos que después de 10 minutos el acoplamiento de la enzima permaneció casi constante incluso 60 minutos después del inicio de la experimentación, esto se debe a que las moléculas de enzima presentes se han unido a la cantidad de sustrato disponible.

La inmovilización de la monoamino oxidasa A en quitosano fue utilizada debido a que se pueden formar partículas de soporte de diferentes tamaños y mediante varios métodos (en este caso las macropartículas realizadas por el método de precipitación), las cuales poseen un área de superficie específica alta y numerosos sitios activos donde son capaces de unirse las moléculas de enzima. Además, el menor tamaño de las partículas de soporte ayuda bastante pues el impedimento de difusión interna disminuye.

9.3.4. Muestras colorimétricas

Se realizaron pruebas colorimétricas de dopamina en papel a diferentes concentraciones. Como se observa en las imágenes, durante la experimentación y conforme pasa el tiempo después de agregar todos los componentes a las muestras, estas se vuelven cada vez más oscuras al ir aumentando su concentración de dopamina hasta alcanzar un color homogéneo y final al secarse completamente.



Figura 44. Muestras colorimétricas de dopamina en papel.

Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de dopamina en las muestras, el color naranja debido al colorante o-dianisidina utilizado se vuelve ligeramente más oscuro. Esto se debe a que se utiliza el oxígeno para eliminar el grupo amino de la molécula, lo que lleva a la formación de aldehído y amonio respectivamente y la liberación de peróxido (H_2O_2), este H_2O_2 luego la oxida o-dianisidina debido a la presencia de peroxidasa de rábano picante. Por lo tanto, dependiendo de la cantidad de MAO-A en la

muestra y de la creciente cantidad de peróxido liberado, a medida que aumenta la concentración de dopamina obtenemos colores cada vez más intensos.

A diferencia de las muestras de colesterol y glucosa, los colores que se obtuvieron para la dopamina son visiblemente más claros, esto debido a que el rango normal de concentración que se manejan en sangre para la dopamina están en 0 - 30 pg/mL, lo cual la hace difícilmente medible y menos visible al realizar las muestras colorimétricas. Sin embargo, aun así, podemos observar de forma cualitativa un leve cambio en las tonalidades de naranja, pues efectivamente se vuelven ligeramente más oscuras conforme aumenta la concentración.

9.3.5. Modelo RGB

Para obtener valores que nos ayuden a examinar cuantitativamente los cambios de color de muestras colorimétricas, se hizo uso de un dispositivo que almacena información sobre su color o brillo en función de los píxeles de la imagen y proporciona 3 valores en el canal de forma cuantitativa el cambio de color de las muestras colorimétricas, se utilizó un dispositivo que a partir de píxeles de una imagen almacena la información de su tono o luminosidad y nos arroja 3 valores en un canal de combinación de colores primarios RGB. De esta forma determinamos el cambio de color y el aumento de intensidad en las muestras en función de la concentración, y se obtuvieron los valores graficados a continuación.

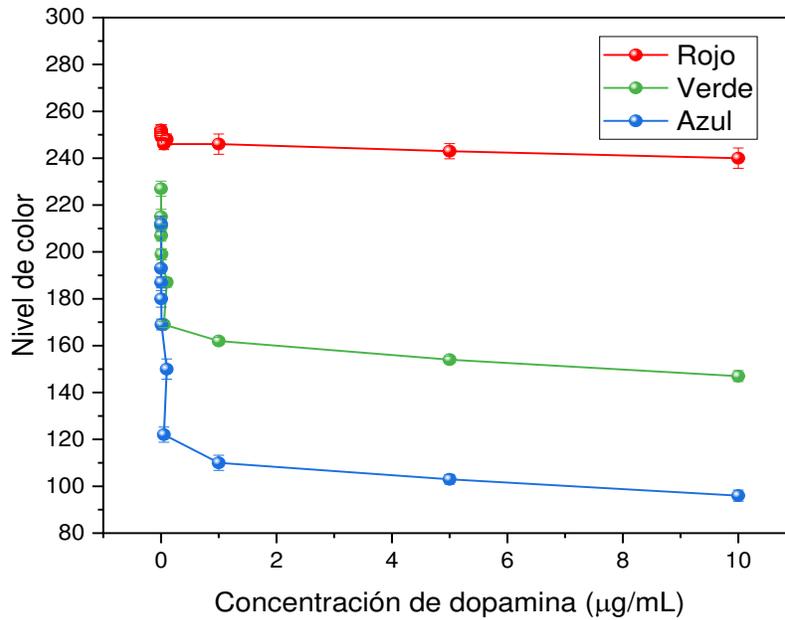


Figura 45. Evaluación colorimétrica de dopamina en papel.

En la *Figura 45* se puede observar que los valores RGB de las muestras disminuyen debido al aumento de concentración del analito, considerando que, en una imagen en color con 8 bits por canal, el valor de intensidad de cada color o el rango del componente RGB (rojo, verde, azul) desde el 0, representado por el color más oscuro (negro), hasta 255, representado como el color más claro (blanco).

Entonces inicialmente cuando la concentración es baja el color más claro, por lo que los valores del pixel en RGB o nivel de color son más altos, y al aumentar la concentración de muestra en muestra, el color será más oscuro, por lo que los valores o nivel de color tenderán al cero que representa el negro.

Según la gráfica, al comenzar con una concentración baja de dopamina, los valores de RGB son los mayores, con rojo en 252, verde en valores de 227 y

azul en 212, y que conforme aumentamos la concentración de esta, los valores van disminuyendo hasta alcanzar 240 en rojo, 147 en verde y 96 en azul.

Como se mencionó anteriormente, podemos observar en la gráfica al igual que en las imágenes, que las tonalidades no cambiaron de forma drástica conforme se aumentó la concentración de dopamina, sino que los cambios son ligeramente perceptibles debido a la pequeña cantidad de analito que se maneja en las muestras, sin embargo, al graficar los valores RGB podemos comprobar de forma cuantitativa que efectivamente las muestras presentan un cambio de color que se vuelve más oscuro conforme aumenta la concentración, incluso cuando los valores medidos son muy pequeños.

El canal rojo que se encuentra en el gráfico es el más alto porque el tinte (o-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina)), se usa como sustrato de peroxidasa y produce un producto final soluble característico de color amarillo-anaranjado.

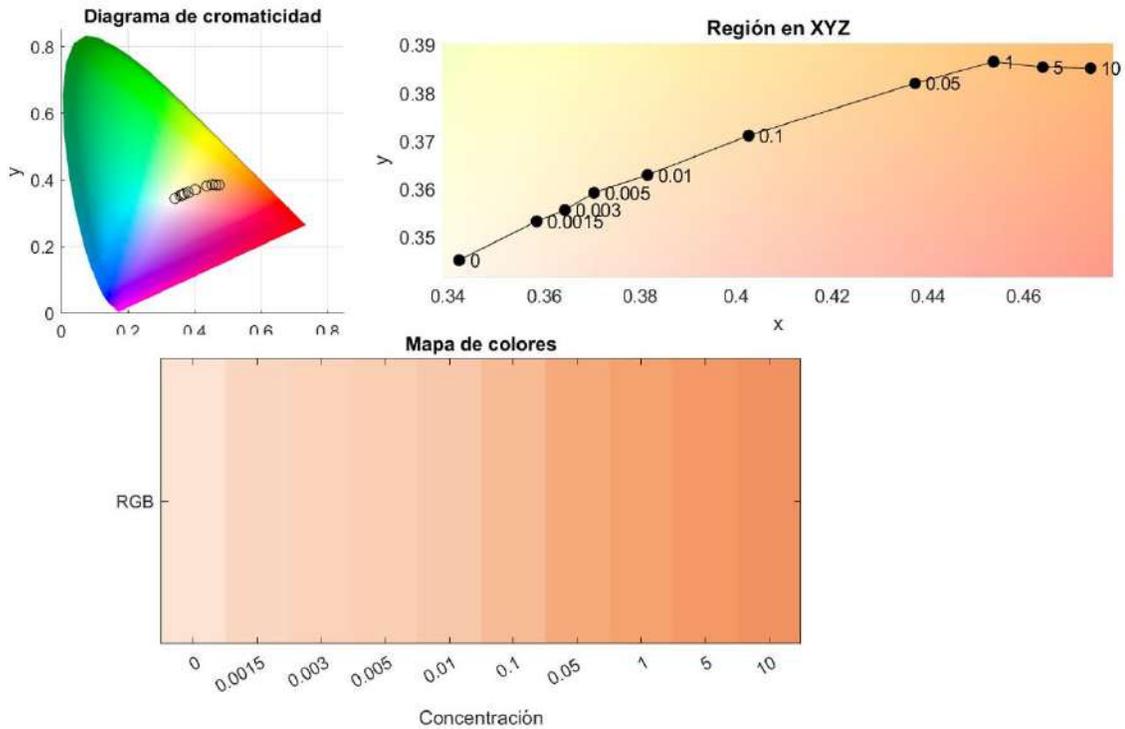


Figura 46. Diagrama CIE 1931 de cromaticidad obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de dopamina.

Como podemos observar en la *figura 46*, tenemos un diagrama completo de todos los colores visibles en forma tridimensional, este diagrama de cromaticidad está representado como un diagrama tridimensional de los valores triestímulos X, Y, y Z de un espacio de color.

El parámetro Y nos da información de la medida del brillo o luminosidad de un color, mientras que x e y representan la cromaticidad de un color.

Con este diagrama observamos que la colorimetría obtenida para dopamina tiene coordenadas cromáticas que van desde valores de $(x,y) = (0.34, 0.34)$ a $(x, y) = (0.47, 0.39)$, los cuales representan una coloración naranja-rojizo, en este caso muy claros, e indican que conforme aumenta la concentración, aumenta el brillo o luminosidad, y al mismo tiempo la cromaticidad o

saturación del color, generando un color cada vez más oscuro claramente visible en el mapa de colores.

9.3.6. Distancia Euclidiana

Un modelo de color tiene la finalidad de facilitar la identificación de colores de forma estandarizada, con cada color representado por un único punto. Para determinar computacionalmente la desviación del color se hizo uso del método de distancia euclidiana.

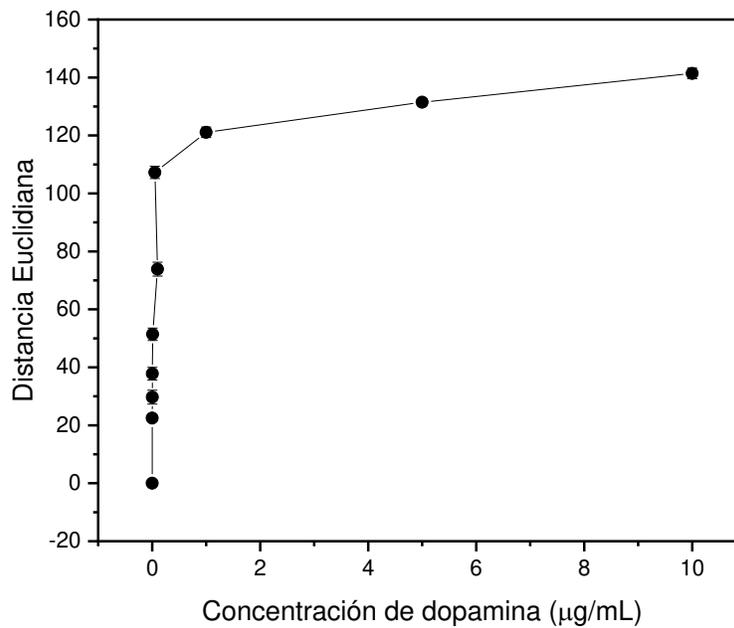


Figura 47. Recta de calibrado de dopamina obtenida por visión por computador.

La distancia Euclidiana se calculó mediante la ecuación:

$$DE = \sqrt{(R_M - R_C)^2 + (G_M - G_C)^2 + (B_M - B_C)^2}$$

Se usaron los valores RGB (color rojo, verde y azul) promedio de cada área seleccionada, estos obtenidos por medio de una prueba con un colorímetro

a cada una de las muestras de dopamina a diferentes concentraciones. En donde:

DE es la distancia Euclidiana.

M es el valor de la muestra en cierta concentración

C es el control negativo de la reacción.

Una vez obtenido el cambio de color dependiendo de la concentración de dopamina, los resultados se pueden utilizar para construir una curva de calibración (*Figura 47*) dependiendo de la distancia euclidiana y la concentración de MAO-A.

Observando la gráfica anteriormente mencionada se determinó que el método colorimétrico de visión por computador es especialmente lineal en un rango corto de concentración de dopamina, específicamente en un inicio de la gráfica y en concentraciones bajas. En general, para los métodos colorimétricos de visión por computador, valores de R^2 superiores a 0,98 son considerados buenos para el análisis cuantitativo.

Debido a las ventajas de las ecuaciones de primer grado; como la simplicidad de representar gráficos, la facilidad para resolver las ecuaciones y su sencillez de comprobar y dar una respuesta exacta. El gráfico ha sido representado de esta manera y segmentado para resaltar la primera parte de la ecuación donde ocurre la linealidad y así mejorar el valor del coeficiente (R^2), que evalúa la magnitud de la relación lineal entre dos variables y cuando fluctúa entre 0 y 1, cuanto más cerca esté su valor de 1, mejor se ajustará el modelo.

La *Figura 48*, representada a continuación, se muestra el rango de concentración de dopamina, el cual es de 0 a 0.010 $\mu\text{g/mL}$.

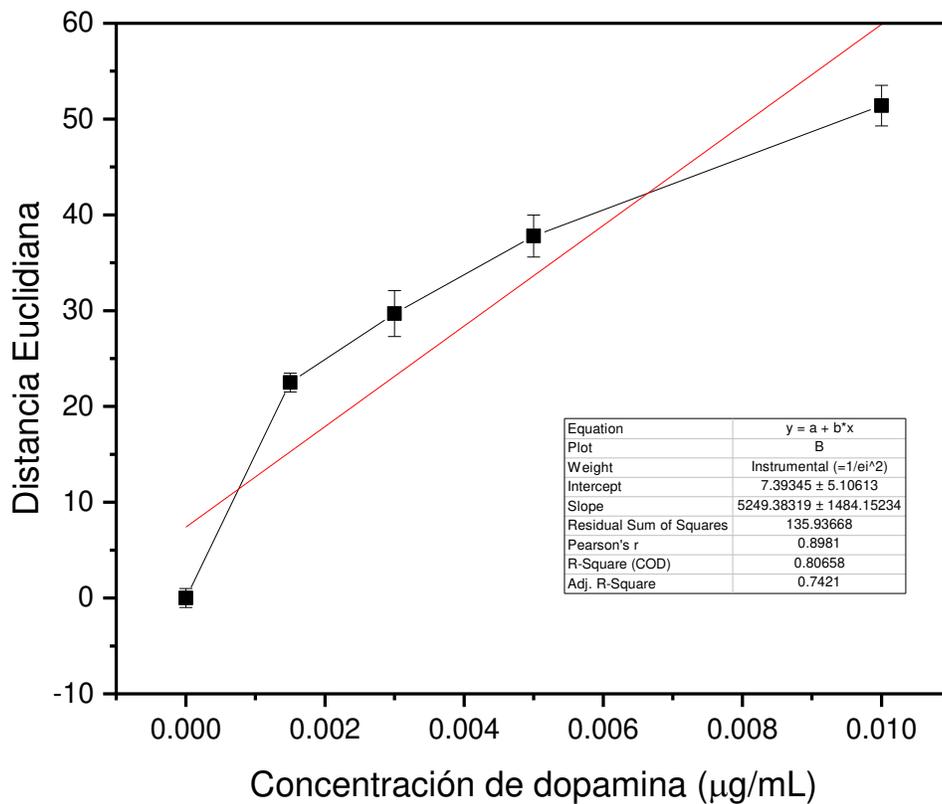


Figura 48. Recta de calibrado de dopamina obtenido por visión por computador.

El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.80659. Este coeficiente es el indicador de la relación lineal entre la distancia Euclidiana y la concentración de dopamina.

Con esta segmentación podemos observar que obtenemos un mejor valor de R^2 , aun así, este valor se encuentra por debajo de los valores de R^2 deseados (superiores a 0.98), los cuales son considerados buenos para el análisis cuantitativo. La pendiente obtenida mediante el ajuste lineal fue de 5249.38319, y el incremento del color está aplicado en un 80.65% del aumento de la concentración de dopamina que abarca desde 0 a 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

9.3.7. Límite de detección

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, 1975) menciona que el límite de detección es un número el cual se expresa en unidades de concentración o cantidad. Por lo que, describe el más valor más bajo de concentración o cantidad de una sustancia (Corley, Johannes, 2003). Y según The American Chemical Society (1980) este límite es la concentración más baja de un analito que puede detectarse de manera confiable mediante un procedimiento analítico. (Corley, Johannes, 2003).

Para determinar el límite de detección según la figura 48, la cual fue obtenida de concentraciones de 0 a 0.010 µg/mL de dopamina, se obtuvieron los valores que se señalan a continuación, donde σ es la desviación estándar y s es la pendiente de la ecuación.

$$\sigma = 0.023$$

$$s = 5249.38319$$

$$LOD = \frac{3\sigma}{s}$$

$$LOD = \frac{3(0.023)}{5249.38319} = 1.3144 \times 10^{-5} \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \mathbf{13.1 \frac{\text{pg}}{\text{mL}}}$$

$$\text{o } \mathbf{8.5543 \times 10^{-5} \text{ mM de MAO - A .}}$$

La *Tabla 7* proporciona una descripción general de los límites de detección reportados en la bibliografía. Comparando estos resultados con los obtenidos en este proyecto, se puede observar que el límite de detección resultante aquí es más bajo o pequeño que el presentado por Zhu J. et al en 2019, esto es bueno debido a que en ambos proyectos se hizo uso del mismo colorante y lo cual significa que se logró mejorar la sensibilidad de detección de MAO-A.

<i>Colorante</i>	<i>Límite de detección</i>	<i>Referencia</i>
nanopartículas de oro (AHMP-AuNP)	0.07 μ M	(Feng, et al. 2013)
Nanopartículas de plata	40 nM	(Youhui, et al. 2011)
3,3',5,5'-tetrametilbencidina		(Jun, et al. 2019)
Nanopartículas de oro.	3×10^{-9} M.	(Dan, et al. 2016)
Nanopartículas de Oro	Suero: 1.6×10^{-6} M Orina: 5.7×10^{-7} M	(Yumin Leng et al., 2015)
Nanopartículas de oro (AuNP)	0.5nM	(Biao Kong et al., 2011)
3,3',5,5'-tetrametilbencidina	1.67 μ M	(Zhu J. et al., 2019)

Tabla 7. Límites de detección de Monoamino oxidasa A con distintos colorantes.

9.4. Dispositivo microfluídico de tres compartimientos

Para el diseño y la fabricación del dispositivo en donde se realizaría la colorimetría simultánea se priorizó un dispositivo no invasivo, portátil, rápido, económico, reproducible, sensible y específico a biomarcadores de colesterol, glucosa, dopamina y pH para el estudio de la obesidad en relación con el síndrome de deficiencia de recompensa SDR.

El diseño se optimizó para adaptarlo al análisis colorimétrico, especialmente tomando en cuenta el objetivo final y futuro de la captación de la señal de la reacción colorimétrica por medio de una imagen tomada con ayuda de un teléfono inteligente, así beneficiando el diagnóstico de una forma nueva, fácil y rápida.

El diseño en estrella facilito el flujo uniforme de múltiples micro fluidos a las áreas de reconocimiento y así lograr obtener respuestas individuales para cada bioensayo.

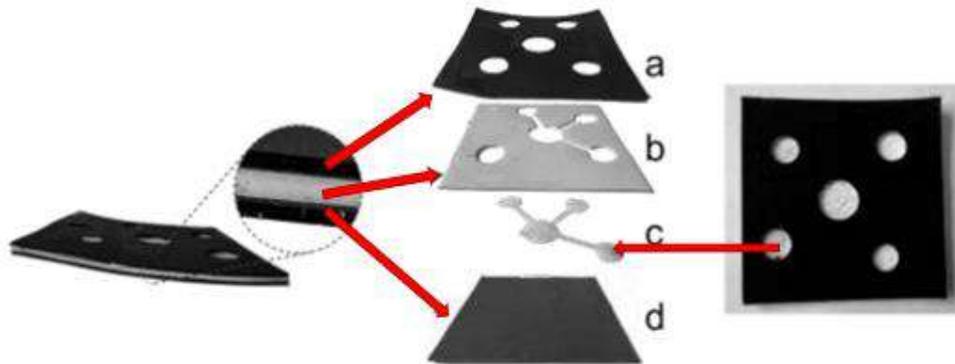


Figura 49. Prototipo del dispositivo microfluídico basado en papel que cuantifica tres analitos simultáneamente. (a) Capa hidrofóbica superior. (b) Polímero que forman los microcanales. (c) Capa fluidica de papel de celulosa. (d) Capa hidrofóbica inferior

La *Figura 49* se muestra un prototipo del biosensor microfluídico, el cual se realizó en papel en el cual se integran tintas cromogénicas, quienes cuantifican los 3 analitos mencionados de forma simultánea. El prototipo se diseñó estructuralmente en dos dimensiones (2D), incorporando una red de canales fluidicos en la plataforma de papel de celulosa (c) y formando barreras hidrofóbicas mediante diversas capas (a,b y d).

Las técnicas de fabricación del dispositivo microfluídico facilitaron el desarrollo de estas capas fluidicas e hidrofóbicas. Esta técnica incorpora una cuchilla controlada por computadora y un plotter de corte en lugar de tinta. El plotter y el software utilizado para la manipulación de la impresora por computadora permitió diseñar y cortar con precisión en aproximadamente 30-60s (dependiendo del material utilizado y de la complejidad de la forma) las diversas características buscadas, incluidas esquinas o agujeros de radio pequeño.

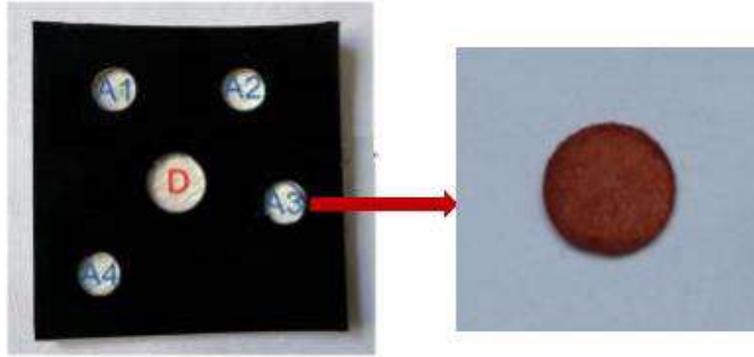


Figura 50. Zonas del dispositivo microfluídico basado en papel.

El diseño del sistema de micro fluidos en papel consta de un canal central de papel absorbente (*Figura 50*), en el que se introducirá una muestra para su estudio (zona D) y una red de 3 canales fluídicos en la plataforma de papel de celulosa (c en *Figura 49*, zonas A1, A2, A3 en *Figura 50*), formando barreras hidrofóbicas con un polímero (b en *Figura 49*) que dirigen la muestra a las tres áreas de reacción aisladas (*Figura 50*, zonas A1 – A3), cada una de las cuales contiene los reactivos correspondientes y en donde se realizan los bioensayos de forma independiente.

10. Conclusiones

Como se mencionó anteriormente, se ha aportado un nuevo modelo de comprensión para poder explicar adecuadamente la complejidad psicopatológica de las adicciones, en específico con relación a el síndrome de déficit de recompensa, que engloba una amplia gama de trastornos mentales y provoca diferentes tipos de conductas adictivas, compulsivas e impulsivas. (Blum et al., 2022)

El síndrome de deficiencia de recompensa (SDR) desata la alimentación patológica como un medio para compensar la activación disminuida de los circuitos dopaminérgicos. (Avena et al., 2008)

Durante el desarrollo de este proyecto se tomó en cuenta las características fundamentales de los biosensores como: accesibilidad, detección sensible, repetibilidad y ser selectivo, además del uso de materiales estables y resistentes para alargar la vida media del dispositivo, su fácil manejo de operar y transportar, su automatización, su efectividad, su corto tiempo de análisis, y la capacidad de obtención de resultados en tiempo real. (Castro-Ortíz L. et al., 2007) Lo cual nos llevó experimentación y periodos de prueba y error, sin embargo, se logró crear un prototipo y obtener pruebas colorimétricas a diferentes concentraciones en papel.

Para ello se ha hecho uso de reactivos específicos con el fin de cuantificar e identificar biomoléculas en solución, como el colorante O-Dianisidina, que reaccionaron con los compuestos que se analizaron y formaron un producto coloreado que detectamos en las diferentes muestras cualitativas y cuantitativas (por medio de procesamientos electrónicos con ayuda de dispositivos de radiación electromagnética).

Así, se relacionó y observo la importancia que existe entre este neurotransmisor (dopamina) y la glucosa y colesterol en el cuerpo humano. Dicha relación es importante por la cantidad de alimentos ricos en carbohidratos, azúcares y grasas que consumen las personas en la actualidad, especialmente aquellas que constantemente buscan de ellas para liberar dopamina, lo que termina como ocasiona como consecuente problemas de salud como los es la obesidad. (Aguilera et al., 2019)

De acuerdo con los resultados obtenidos, el límite de detección obtenido en este proyecto para glucosa fue de 2.052 mg/dl o 1.653 mM de glucosa oxidasa, el cual es considerado aceptable debido a que es menor que la mayoría de los resultados obtenidos para glucosa por otras investigaciones revisadas para este documento (*tabla 5*), al mismo tiempo que se encuentra muy por debajo de los valores que se espera detectar del analito en el suero sanguíneo para este estudio.

Para el colesterol, el límite de detección resultante es de 0.428 mg/dl o 0.11 mM de colesterol oxidasa para concentraciones de 0-120mg/dl y para concentraciones de 120-500 mg/dl el resultado fue un límite de detección de 2.055 mg/dl o 0.53 mM . Comparados con otros estudios relacionados, estos resultados podrían considerarse malos debido a que se obtuvo valores más altos a los presentados en la *tabla 6*, sin embargo, para fines del proyecto este límite es aceptable debido a que el colesterol en suero sanguíneo se presenta en un rango de 125 – 200 mg/dl.

Finalmente, en el caso de la dopamina, el límite de detección de la monoamino oxidasa A fue de 13.1 pg/ml o $8.5543 \times 10^{-5} \text{ mM}$ de monoamino oxidasa A. Al comparar estos resultados con otros estudios, se puede observar que el límite de detección obtenido es más bajo que el presentado por Zhu J. et al en 2019, aun cuando en ambos proyectos se hizo uso del

mismo colorante, lo cual es satisfactorio e importante para la optimización de su detección en suero sanguíneo.

En general con ayuda del método de inmovilización con quitosano se obtuvo una mayor estabilidad en las gráficas al exponer a las enzimas a diferentes pH y temperaturas, sin embargo, en la mayoría también manifestó una baja en la actividad de las enzimas.

Algunos de los retos involucrados a este estudio estuvieron la medición de la monoamino oxidasa A, debido a la cantidad tan reducida contenida en el suero sanguíneo. Aun con esta complejidad se logró obtener un valor detectable, sin embargo, los valores que se manejan en suero sanguíneo de dopamina van de 0-30 pg/ml, y aquí se obtuvo un límite de detección de tan solo *13.1 pg/ml*, lo cual deja espacio para continuar con la investigación y la optimización de la medición y detección de dicho analito.

Así mismo, la realización del prototipo del dispositivo microfluídico de tres compartimientos genero distintos retos, desde el diseño, la elección de los materiales utilizados en cada una de las capas, y el perfeccionamiento constante de la microfluídica involucrada.

Con este estudio se espera dar pauta para que en un futuro no muy lejano se desarrollen soluciones y tratamientos a enfermedades relacionadas tanto a las adicciones como a la obesidad, comenzando con poner sobre la mesa la importancia de la salud mental y física de la población actual.

11. Bibliografía

Adu J., Amengor C., Kabiri N., Orman E., Gameli Patamia S., Korkor Okrah B. (2019) "Validation of a Simple and Robust Liebermann–Burchard Colorimetric Method for the Assay of Cholesterol in Selected Milk Products in Ghana", *International Journal of Food Science*, vol. 2019,7 pag.

Aguilera C., Labbé T., Busquets J., Venegas P., Neira C., Valenzuela A.. (2019). *Obesidad: ¿Factor de riesgo o enfermedad?. Rev Med Chile*, ., pp. 470-474.

Akhtar Hayat, Waqar Haider, Yousuf Raza, Jean Louis Marty. (2015) Colorimetric cholesterol sensor based on peroxidase like activity of zinc oxide nanoparticles incorporated carbon nanotubes, *Talanta*, Volume 143, pp 157-161.

Aransay A., Rodríguez-López C., García-Amado M., Clascá F., Prensa L. (2015). Long-range projections neurons of the mouse ventral tegmental area: a single-cell axon tracing analysis. *Front. Neuroanat.* (2015; 9:59)

Avena N. M., Rada P., Hoebel B. G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev.*(2008;32:20-39).

A.W. Martinez, S.T. Phillips, E. Carrilho, S.W. Thomas, H. Sindi, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3699–3707

Bach AWJ, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan S-W, Seeburg PH, et al (1988) cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4934-4938

Barry E Levin. (2000). Glucose-regulated dopamine release from substantia nigra neurons, *Brain Research*, Volume 874, Issue 2, pp 158-164.

Battestin V., Macedo G. (2007). Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 191-199.

Becerra A. (2018). Diseño y caracterización de un bioelectrodo basado en la monoamino oxidasa-a, para la detección de serotonina en un fluido corporal simulado. Universidad autónoma de Querétaro.

Bahena-Trujillo R, Flores G., Arias-Montaño J. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed* 2000; 11:39-60.

Bermúdez V., Bermúdez F., Arraiz N., Leal E., Linares S., Mengual E., Valdelamar L., Rodríguez M., Seyfi H., Amell A., Carrillo M., Silva C., Acosta A., Añez J., Andara C., Angulo V., & Martins G.. (2007). Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 26(2), 76-86.

Biao Kong, Anwei Zhu, Yongping Luo, Yang Tian, Yanyan Yu, Guoyue Shi, (2011). Sensitive and Selective Colorimetric Visualization of Cerebral Dopamine Based on Double Molecular Recognition**. DOI: 10.1002/anie.201007071

Bilbao Y., Valdés L., Blanco Y.. (2000). Inmovilización covalente de glucosa oxidasa y peroxidasa. *Revista Cubana de Farmacia*, 34(2), 108-112.

Biró E. & Németh Á. & Sisak C. & Feczko T. & Gyenis J. (2008). Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 70. 1240-6.

Bozarth, M.A. (2017). "Dopamine." In A.E. Wenzel (ed.), *The Sage Encyclopedia of Abnormal and Clinical Psychology* (pp. 1173-1177). Thousand Oaks, CA: Sage Publications.

Blum K., Baron D., Lott L., Ponce J., Siwicki D., Boyett B., Steinberg B., Modestino E., Fried L., Hauser M., Simpatico T., Downs B., McLaughlin T., Hajela R., Badgaiyan R., (2020). In Search of Reward Deficiency Syndrome (RDS)-free Controls: The "Holy Grail" in Genetic Addiction Risk Testing. *Curr Psychopharmacol.*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7236426/>

Blum K., Berman M., Demetrovics Z., Barh D., Gold Genetic(2014).Addiction Risk Score (GARS): molecular neurogenetic evidence for predisposition to Reward Deficiency Syndrome (RDS). *Mol Neurobiol.* 2014 Dec;50(3):765-96. doi: 10.1007/s12035-014-8726-5.

Blum, K., Dennen C., Elman I., Bowirrat A., Thanos P.K., Badgaiyan E., Downs B., Bagchi D., Baron D., Braverman E., Gupta A., Green R., McLaughlin T., Barth D., & Golf M., (2022). Should Reward Deficiency Syndrome (RDS) Be Considered an Umbrella Disorder for Mental Illness and Associated Genetic and Epigenetic Induced Dysregulation of Brain Reward Circuitry? *J Pers Med.*, <https://www.mdpi.com/2075-4426/12/10/1719>

Blum K, Sheridan PJ, Wood RC, Braverman ER, Chen TJ, Cull JG, Comings DE (1996) The D2 dopamine receptor gene as a determinant of reward deficiency syndrome. *J R Soc Med* 89(7):396–400

Blum K., Thanos P. K. and Gold M. S. (2014). Dopamine and glucose, obesity, and reward deficiency syndrome. *Frontiers in psychology*, Volumen 5, pp. 1-6.

Blum K., Thomas J.H. Chen, Meshkin B., B. William Downs, Cory A. Gordon, Blum S., F. Mangucci J., R. Braverman E., Arcuri V., Deutsch R., Manuel –Martinez- Pons. (2007). Genotrim™, a DNA-customized nutrigenomic product, targets genetic factors of obesity: Hypothesizing a dopamine–glucose correlation demonstrating reward deficiency syndrome (RDS), Volume 68, Issue 4, pp. 844-852

Blum K., Gold M., Demetrovics Z., Archer T., K Thanos P., Baron D., D. Badgaiyan R.. (2017). Substance use disorder a bio-directional subset of reward deficiency syndrome. *Frontiers In Bioscience*, 22, 1534-1548

Breakefield XO, Giller EL Jr, Nurnberger JI, Castiglione CM, Buchsbaum MS, Gershon ES (1980) Monoamine oxidase type A in fibroblasts from patients with bipolar depressive illness. *Psychiatr Res* 2:307-314

Buck, R. P., Rondinini, S., Covington, A. K., Baucke, F. G. K., Brett, C. M. A., Camoes, M. F. Milton, M. J. T., Mussini, T., Naumann, R., Pratt, K. W., Spitzer, P. and Wilson G. S. «Measureentof pH. Definition, Standards, and Procedires. » (*Pure Appl. Chem.*) 74 (2002): 2169–2200.

Carmen Lucia Medrano C., (2012). OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS DE POLIANILINA CON APLICACIÓN POTENCIAL EN LA DETECCIÓN DE COLESTEROL.,
[https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/540/1/Tesis Carmen Lucia Medrano Pesqueira.pdf](https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/540/1/Tesis%20Carmen%20Lucia%20Medrano%20Pesqueira.pdf)

Castro J., Villanueva A., Ortiz C. (2013). Espectroscopia Raman y sus aplicaciones, Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.

Castro-Ortíz L., Luna V., Villalobos R. (2007). Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. *Revista internacional de contaminación ambiental*.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0188-49992007000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Chung, M., Jang, Y. J., & Kim, M. I. (2018). Convenient Colorimetric Detection of Cholesterol Using Multi-Enzyme Co-Incorporated Organic-Inorganic Hybrid Nanoflowers. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 18(9), 6555–6561.

CJ, Mitchell SH. Rats bred for high alcohol drinking are more sensitive to delayed and probabilistic outcomes. *Genes Brain Behav.* 2008;7(7):705-13.

Clavijo J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Vol. 3, Nº. 3, págs. 133-146

Corley, Johannes. (2003). Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals.*

D. E. Comings, R. J. Rosenthal, H. R. Lesieur, L. J. Rugle, D. Muhleman, C. Chiu, G. Dietz and R. Gade: A study of the dopamine D2 receptor gene in pathological gambling. *Pharmacogenetics*, 6(3), 223-34 (1996)

D. S. Chester, C. N. DeWall, K. J. Derefinko, S. Estus, D. R. Lynam, J. R. Peters and Y. Jiang: Looking for reward in all the wrong places: dopamine receptor gene polymorphisms indirectly affect aggression through sensationseeking. *Soc Neurosci*, 1-8 (2015)

Dan Wen, Wei Liu, Anne-Kristin Herrmann, Danny Haubold, Matthias Holzschuh, Frank Simon, Alexander Eychemülle. (2016). Simple and Sensitive Colorimetric Detection of Dopamine Based on Assembly of Cyclodextrin-Modified Au Nanoparticles. Volume12, Issue18, pp 2439-2442.

Deckert J, Catalano M, Syagailo YV, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, Nothen MM, et al (1999) Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet* 8:621–624

Diaz M., Ruiz J., Reyes E., Cejudo A., Novo J., Peinado J., Meléndez F., Fiñana I., (s.f.). 8. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. 8 (uco.es)

Diezma B., Correa E. (2017). Biosensores y sistemas ópticos y de visión avanzados: su aplicación en la evaluación de la calidad de productos IV gama. *Agrociencia* (Uruguay). DOI: 10.31285/agro.22.1.2

Dulce Maria Andrés Cabrerizo, J. L. (s.f.). Física y Química. Obtenido de <https://books.google.com.mx/books?id=bKKIb3z4FgwC&pg=PA168&dq=que+es+un+espectro+electromagnetico&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEWjwqKTSilbkAhVCYKwKHR4ICdMQ6AEIOTAC#v=onepage&q=que>

%20es%20un%20espectro%20electromagnetico&f=false

E. P. Noble, T. Z. Ozkaragoz, T. L. Ritchie, X. Zhang, T. R. Belin and R. S. Sparkes: D2 and D4 dopamine receptor polymorphisms and personality. *Am J Med Genet*, 81(3), 257-67 (1998),

Edelstein SB, Castiglione CM, Breakefield XO (1978) Monoamine oxidase activity in normal and Lesch-Nyhan fibroblasts. *J Neurochem* 31:1247-1254

Elizondo L., J. A. (2001). El Síndrome de déficit de recompensa. <https://www.liberaddictus.org/reflexiones-adictol%C3%B3gicas/674-el-sindrome-de-deficit-de-recompensa.html>

Fan Y., Li J., Guo Y., Xie L., Zhang G.(2021). Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review, *Measurement*, Volume 171.

Febo M., Blum K., Badgaiyan R., Baron D., Thanos P., Colon-Perez L., Demetrovics Z., Gold M.. (2017). Dopamine homeostasis: brain functional connectivity in reward deficiency syndrome. *22*, 669-691.

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. *Principles of neuropsychopharmacology*. Sunderland, Sinauer, 1997: 277-344.

Feng Jiu-Ju, Han Guo, Yong-Fang Li, Yun-Hua Wang, Wan-Yi Chen, and Ai-Jun Wang, (2013). *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5 (4), 1226-1231

Fowler et al 1982 Fowler CJ, Mantle TJ, Tipton KF. The nature of the inhibition of rat liver monoamine oxidase types A and B by the acetylenic inhibitors clorgyline, l-deprenyl and pargyline. *Biochem Pharmacol* 1982;31:3555–61.

Flores Ramos, Leenin, & Ruiz Soto, Anthony. (2017). Implementación de una metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(4), 371-381. Recuperado en 06 de febrero de 2023, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000400002&lng=es&tlng=es.

Floresco S. B., West A. R., Ash B., Moore H., Grace A. A. (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat. Neurosci.* (2003; 6:968-973).

Florkin. y Stotz E. *Comprehensive Biochemistry*. Vol.3 *Methods for the Study of Molecules*, Amsterdam. Elsevier.1962

G. J. Wang, N. D. Volkow, P. K. Thanos and J. S. Fowler: Imaging of brain dopamine pathways: implications for understanding obesity. *J Addict Med*, 3(1), 8-18 (2009) DOI: 10.1.097/ADM.0b013e31819a86f7

Ganesan Sriram, Mahesh P. Bhat, Pravin Patil, Uluvangada T. Uthappa, Ho-Young Jung, Tariq Altalhi, Tushar Kumeria, Tejraj M. Aminabhavi, Ranjith Krishna Pai, Madhuprasad, Mahaveer D. Kurkuri, (2017) Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review, Volume 93, pp. 212-227.

García R., (2018). Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro. *Avances en Química*.
https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/87008/CONICET_Digital_Nro.14279992-2fa1-48b5-93d6-7674ea150cf9_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Garrick NA, Murphy DL (1982) Monoamine oxidase type A: differences in selectivity towards norepinephrine compared to serotonin. *Biochem Pharmacol* 31:4061-4066

Geisler S., Zahm D. S. (2015). Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J. Comp. Neurol.* (2005;490:270-294).

Gökhan S., Xandra O., (1991). Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683299/>

Gonzalo M. S. (2018). Sistema de recompensa del cerebro y neuronas del placer. Universidad de Sevilla

Grace A. A., Bunney B. S. (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.*(2007; 30:220-227).

Grace A. A., Bunney B. S. (1985). Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res.*(1985; 333:271-284)

Green & Youdim 1975 Green AR, Youdim MBH. Effects of monoamine oxidase inhibition by clorgyline, deprenyl or tranycypromine on 5-hydroxy-tryptamine concentrations in rat brain and hyperactivity following subsequent tryptophan administration. *Br J Pharmacol* 1975;55:415–22.

Grundler, P. and L. Springer., Chemical Sensors, An Introduction for Scientist and Engineers. 1^a ed. 2007, Leipzig: Springer.

Han Zhang, Zheyuan Chen, Jing Dai, Wei Zhang, Yuqian Jiang, Anhong Zhou, (2020). A low-cost mobile platform for whole blood glucose monitoring using colorimetric method. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105814>

Hernández K. (2021). ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA CARACTERIZAR E IDENTIFICAR BIOMARCADORES. Universidad Autónoma de San Luis Potosí

H.J. (1975). The Effect of Temperature and pH on Enzyme Activity. In: Initial Rate Enzyme Kinetics. Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, vol 22.

Huang Dai, Yuqing Li, Qi Zhang, Yingchun Fu, Yanbin Li. (2018). A colorimetric biosensor based on enzymecatalysis-induced production of inorganic nanoparticles for sensitive detection of glucose in white grape wine. DOI: 10.1039/c8ra06347h

Ibarra, L. S., (2016). Review: Transición Alimentaria en México. Razón y Palabra, 20(94), 162-179.

ISO/IEC 30128:2014(en), Information technology — Sensor networks — Generic Sensor Network Application Interface. (2014). <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:30128:ed-1:v1:en>

Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., & Caron, M. G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35(11), 1503–1519. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(96\)00100-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00100-1)

Jimenez C., León P. (2008). BIOSENSORES: APLICACIONES Y PERSPECTIVAS EN EL CONTROL Y CALIDAD DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTICIOS. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-40042009000100017&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Johnston JP (1968) Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* 17:1285–97

Kumar A., Mittal S., Das M., Saharia A., Tiwari M. (2022). Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal*. 10.1016/j.aej.2022.12.040

Jun Wang, Yuyan Hu, Qi Zhou, Lianzhe Hu, Wensheng Fu, and Yi Wang. (2019). ACS Applied Materials & Interfaces, 11 (47), 44466-44473.

Kumari L., Kanwar S., (2012). Cholesterol Oxidase and Its Applications. DOI: 10.4236/aim.2012.22007

Laboratorio Clínico Hematológico. (2016). ABC del Laboratorio: Glucosa / Glucose. 22(11/12): 577-584

Lee Y., Mutharasan R. Biosensors. first-page-pdf (sciencedirect.com)

Lim, K. F. «Negative pH Does Exist.» (Journal of Chemical Education) 83 (2006): 1465

Lin, T., Zhong, L., Chen, H. et al. (2017) A sensitive colorimetric assay for cholesterol based on the peroxidase-like activity of MoS₂ nanosheets. Microchim Acta 184, 1233–1237.

Liu, J., Z. Cao, and Y. Lu, Functional nucleic acid sensors. Chem. Rev., 2009. 109: p. 1948-1998.

Lück Hans. (1965) Peroxidase, Methods of Enzymatic Analysis (Second Printing, Revised), pp 895-897

Lu R-B, Lee J-F, Ko H-C, Shih JC (1999) No association of MAOA gene with antisocial personality disorder. Paper presented at the 1999 World Congress on Psychiatric Genetics, Monterey, CA, October 14–18

Ma, H., & Shieh, K. J. (2006). Cholesterol and human health. The Journal of American Science, 2(1), 46-50.

Maldonado S. O., Ramírez S. I., García S. J. R., Ceballos R. G. M., & Méndez B. E.. (2012). Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, Vol. 43(2), pp. 7-22.

Martín E. (2015). APLICACIÓN DE SENSORES Y BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTIOXIDANTES. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/14019/TFG-I-271.pdf;jsessionid=B16328ACA6C35272756FC753DD0F34FC?sequence=1>

Martínez De Velasco, R., Barbudo, E., Perez-Templado, J., Silveira, B., & Quintero, J. (2015). Revisión de la asociación entre obesidad y TDAH (2015;43(1):16–23).

Méndez-Díaz, Mónica, Romero Torres, Brenda M., Cortés Morelos, Jacqueline, Ruíz-Contreras, Alejandra E., & Prospéro García, Oscar. (2017). Neurobiología de las adicciones. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(1), 6-16, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0026-17422017000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Miller J.N. y Miller J.C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. 4a ed. Prentice Hall, Madrid, España, 278 pp.

Morbioli G., Mazzu-Nascimento T., Stockton A., Carrilho E.. (2017). Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review, Volume 970, pp. 1-22.

N. D. Volkow, G. J. Wang, J. S. Fowler, J. Logan, R. Hitzemann, Y. S. Ding, N. Pappas, C. Shea and K. Piscani: Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 20(9), 1594-8 (1996) DOI: 10.1111/j.1530-0277.1996.tb05936.x

N.W. Tietz, *Clinical Guide to Laboratory Tests*, W.B. Saunders Company, PA, 1995

Narsingh R. Nirala, Preeti S. Saxena, Anchal Srivastava. (2018) Colorimetric detection of cholesterol based on enzyme modified gold nanoparticles, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 190, pp 506-512.

Narsingh R. Nirala, Shiju Abraham, Vinod Kumar, Anushka Bansal, Anchal Srivastava, Preeti S. Saxena. (2015) Colorimetric detection of cholesterol based on highly efficient peroxidase mimetic activity of graphene quantum dots, Volume 218, pp 42-50.

Nigel C. Veitch. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, Volume 65, Issue 3, 249-259.

Reviejo A., Pingarrón J.M. (2000). Biosensores electroquímicos. Una herramienta útil para el análisis medioambiental alimentario. Universidad Complutense de Madrid.

Rojas de P E., Molina R., & Rodríguez C.. (2012). Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 10(Supl. 1), 7-12.

Ruimin Li, Cen Xiong, Zhiyou Xiao, Liansheng Ling. (2012) Colorimetric detection of cholesterol with G-quadruplex-based DNazymes and ABTS²⁻, Volume 724, pp 80-85.

P. K. Thanos, M. Michaelides, Y. K. Piyis, G. J. Wang and N. D. Volkow: Food restriction markedly increases dopamine D2 receptor (D2R) in a rat model of obesity as assessed with in-vivo muPET imaging ((¹¹C) raclopride) and in-vitro ((³H) spiperone) autoradiography. *Synapse*, 62(1), 50-61 (2008) DOI: 10.1.002/syn.20468

Perry J, Carroll M. The role of impulsive behavior in drug abuse. *Psychopharmacology*. 2008;200(1):1-26.

Picollo M., Aceto M., Vitorino T. (2018) UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*.

Po-Chun Lee, Nan-Si Li, Ying-Pei Hsu, Chen Peng, Hung-Wei Yang. (2013). Direct glucose detection in whole blood by colorimetric assay based on glucose oxidase-conjugated graphene oxide/MnO₂ nanozymes. DOI: 10.1039/x0xx00000x

Técnicas Aparicio E., (2017). Técnicas colorimétricas. *Articulo08_Tecnicas_colorimetricas.pdf* (cleu.edu.mx)

Ruiz-Valdepeñas V. (2019). Desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado directo de analitos de relevancia alimentario y clínica en muestras de elevada complejidad. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/59673/1/T41867.pdf>

Sanchez J. B., Zeballos C. H. (2015). Glucosa, ¿qué tubo de recolección usar?. *Rev Med Hered.*, vol. 26, pp. 60-61.

Sang C. Kim, Uddin M. Jalal, Sung B. Im, Sungho Ko, Joon S. Shim. (2017). A smartphone-based optical platform for colorimetric analysis of microfluidic device, Volume 239, pp 52-59.

Sherwood. (s.f). *A Guide to Colorimetry. A GUIDE TO COLORIMETRY* (coleparmer.com)

Shih J. & Thompson R. (1999). Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *Am J Hum Genet*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1377964/>

Shih J., Chen K., Ridd M., (1999). MONOAMINE OXIDASE: From Genes to Behavior. *Annu Rev Neurosci.* DOI: 10.1146/annurev.neuro.22.1.197

Sigma, (s.f), Enzymatic Assay of Cholesterol Oxidase, <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-cholesterol-oxidase>

Sigma, (s.f), Enzymatic Assay of Glucose Oxidase, <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-glucose->

Structuren Se-Young Son, Jichun Ma, Youhei Kondou, Masato Yoshimura, Eiki Yamashita, Tomikate Tsukihara, (2007). Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. DOI: 10.1073/pnas.0710626105

Südhof TC. The synaptic vesicle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 1995; 375:64

Tancredi P., (2011). Desarrollo de un sensor colorimétrico para detectar Plomo. (Desarrollo de un sensor colorimétrico para detectar Plomo _2_) (udelar.edu.uy)

Tracking cell Lange Y., (s.f.). Tracking cell cholesterol with cholesterol oxidase. | Elsevier Enhanced Reader. DOI: 10.1016/S0022-2275(20)41521-4

Valladares M., Obregón A., Pino C. (2019). Asociación entre el sistema de recompensa del cerebro y elección de comida en adultos mayores y de mediana edad. *Revista de la Facultad de Medicina.* <https://www.redalyc.org/journal/5763/576366658018/html/>

Vázquez E., Calderón Z. G., Arias J. (2019). Sedentarismo, alimentación, obesidad, consumo de alcohol y tabaco como factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2. <https://www.redalyc.org/journal/5645/564561530005/>

Vázquez E, Rojas T.. (2016). pH: Teoría y 232 problemas. Universidad autónoma metropolitana.

Voget C. (1985) Producción de glucosa oxidasa. Universidad Nacional de la plata.

Wang G. J., Volkow N. D., Logan J., Pappas N.R., Wong C. T., Zhu W., Netusll, Fowler J. S. (2001). Brain dopamine and obesity. *The Lancet*, Volume 357, pp. 354-357.

Wang H., Chu P. (2013). Chapter 4 - Surface Characterization of Biomaterials, Characterization of Biomaterials, pp. 105-174.

Wang G. J., Volkow N. D., Logan J., Pappas N.R., Wong C. T., Zhu W., Netusil, Fowler J. S. (2001). Brain dopamine and obesity. *The Lancet*, Volume 357, pp. 354-357.

Wijitar Dungchai, Orawon Chailapakul, Charles S. (2010). Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.019>

Wong, C.M., Wong, K.H. & Chen, X.D. (2008) Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 927–938.

Xiaogang Luo, Jian Xia, Xiangyang Jiang, Mengru Yang, Shilin Liu, (2019). Cellulose-Based Strips Designed Based on a Sensitive Enzyme Colorimetric Assay for the Low Concentration of Glucose Detection. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03180>

Xu Wang, Fang Li, Ziqi Cai, Kaifan Liu, Jing Li, Boyang Zhang, Jianbo He, (2018). Sensitive colorimetric assay for uric acid and glucose detection based on multilayer-modified paper with smartphone as signal readout. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0939-4>

Y.Y. Lin, J. Wang, G. Liu, H. Wu, C.M. Wai, Y. Lin, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1659–1665.

Youhui Lin, Cuie Chen, Chunyan Wang, Fang Pu, Jinsong Ren, Xiaogang Qu. (2011) Silver nanoprobe for sensitive and selective colorimetric detection of dopamine via robust Ag–catechol interaction, Issue 4.

Yumin Leng, Kun Xie, Liqun Ye, Genquan Li, Zhiwen Lu, Junbao He, (2015). Gold-nanoparticle-based colorimetric array for detection of dopamine in urine and serum. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.038>

Z. Duan, M. He, J. Zhang, K. Chen, B. Li and J. Wang: Assessment of functional tag single nucleotide polymorphisms within the DRD2 gene as risk factors for post-traumatic stress disorder in the Han Chinese population. *J Affect Disord*, 188, 210-7 (2015)

Zhu, J., Peng, X., Nie, W., Wang, Y., Gao, J., Wen, W., Selvaraj, J.N., Zhang, X., Wang, S., Hollow copper sulfide nanocubes as multifunctional nanozymes for colorimetric detection of dopamine and electrochemical detection of glucose, *Biosensors and Bioelectronics* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111450>.