



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

“DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOELECTRODO BASADO EN LA MONOAMINO OXIDASA-A, PARA LA DETECCIÓN DE SEROTONINA EN UN FLUIDO CORPORAL SIMULADO”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestro en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta:

LBT. Armando Becerra Hernández

Dirigido por:

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

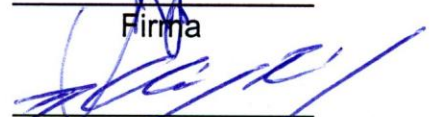
Dra. Vanessa Vallejo Becerra
Presidente


Firma

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez
Co-Directora


Firma

Dr. Abraham Ulises Chávez Ramírez
Vocal


Firma

Dra. Minerva Guerra Balcázar
Sinodal


Firma

Dra. Janet Ledesma García
Sinodal


Firma



Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Director de la Facultad de Medicina



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Introducción: Trastornos neuropsiquiátricos y del neurodesarrollo, entre los que se encuentran el trastorno depresivo mayor (TDM) y el trastorno del espectro autista (TEA), están asociados con alteraciones en los niveles del neurotransmisor serotonina. **Objetivo:** En este trabajo se describe el diseño y evaluación de un bioelectrodo para la detección y cuantificación de serotonina en un fluido corporal simulado, con base en la enzima Monoamino oxidasa-A (MAO-A). **Metodología:** El bioelectrodo desarrollado está basado en un electrodo serigrafado de carbono, modificado con una matriz de nanotubos de carbono multipared (MWCNT) en la que se inmovilizó la enzima MAO-A. La inmovilización covalente de la enzima MAO-A en MWCNT funcionalizados se realizó mediante el método de conjugación que emplea 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) y N-hidroxi succinimida (NHS). La detección del neurotransmisor se logró a través de la determinación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado durante el proceso de desaminación oxidativa de la serotonina catalizado por la MAO-A. La capacidad electrocatalítica del bioelectrodo fue evaluada mediante voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial. **Resultados:** La enzima MAO-A inmovilizada retuvo un buen porcentaje de actividad catalítica (94.3 %), así como una buena estabilidad térmica y de pH. Además de que exhibió una buena estabilidad operacional y de almacenamiento a 4°C. Análisis de morfología de superficie por medio de microscopía electrónica de barrido revelaron la presencia de una capa fina proteica en la superficie de los MWCNT. Mediciones por microscopía electroquímica de barrido demostraron que la enzima MAO-A inmovilizada mantiene su actividad catalítica. Los registros de voltamperometría cíclica del bioelectrodo, realizados a 25° C y en fluido corporal simulado, mostraron la generación de buenas respuestas correspondientes al proceso de reducción del H_2O_2 , observadas en un intervalo de s de potencial de 0.55 V y 0.65 V vs Ag/AgCl. Asimismo, las respuestas del bioelectrodo mostraron una dependencia hacia concentraciones crecientes de serotonina, obteniéndose una relación lineal entre la magnitud de la corriente generada y la concentración de serotonina en un intervalo de 300 a 500 ng/mL, con un límite de detección de: 125 ng/mL (S/N = 3) y un límite de cuantificación de: 608 ng/mL (S/N = 3). Por último, el bioelectrodo mostró una buena estabilidad operacional y una buena capacidad de detección de serotonina en presencia de ácido ascórbico.

(Palabras clave: Bioelectrodo, Serotonina, Inmovilización enzimática, Monoamino Oxidasa)

ABSTRACT

Introduction: Neuropsychiatric and neurodevelopmental diseases such as Major Depressive Disorder and Autism Spectrum Disorder are associated with alterations in neurotransmitter serotonin levels. **Objective:** The present work describes the fabrication and evaluation of an bioelectrode for the detection of serotonin in simulated body fluid (SBF), through the use of the enzyme monoamine oxidase-A (MAO-A). **Experimental:** The proposed bioelectrode consisted on a modified carbon screen-printed electrode where the enzyme monoamine oxidase-A is immobilized on multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). Firstly a carbodiimide conjugation approach using N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) was employed to covalently immobilize the enzyme to functionalized MWCNT'S. The detection of neurotransmitter serotonin was achieved by quantifying the hydrogen peroxide (H_2O_2) formed during the process of oxidative deamination of serotonin catalyzed by the enzyme. The generated enzymatic bioelectrode was electrochemically characterized by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). **Results:** Immobilization on MWCNT'S resulted in high enzymatic activity, good thermal and pH stability, up to 94.3 % biological activity retention was achieved. Furthermore the immobilized enzyme exhibits good operational and storage stability. Surface morphology analysis of the immobilized enzyme by scanning electron microscopy (SEM) revealed the presence of a thin protein layer on the MWCNT'S surface. Scanning electrochemical microscopy measurements indicated that the immobilized enzyme retains its catalytic activity. The electrochemical measurements with the biosensor were applied in simulated body fluid pH 7.4, at 25 ° C. Cyclic voltammetry measurements showed good redox responses; electrochemical currents related to the electrochemical reduction of H_2O_2 were observed at a potential range of 0.55 V y 0.65 V vs Ag/AgCl The responses generated by the bioelectrode showed dependence towards the increment of serotonin concentration. A linear relationship between the generated currents and the concentration of serotonin was obtained in a range of 300 a 500 ng/mL, with a detection limit of: 125 ng/mL (S/N = 3) and a quantification limit of: 608 ng/mL (S/N = 3). Finally the bioelectrode showed robust operational stability and was able to detect serotonin in presence of ascorbic acid.

(Key words: Bioelectrode, Serotonin, Enzymatic immobilization, Monoamine oxidase-A)

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. SEROTONINA.....	11
1.2. MONOAMINO OXIDASA (MAO).....	14
1.3. TRASTORNOS RELACIONADOS CON SEROTONINA.....	15
1.3.1. TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR.....	15
1.3.2. TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA.....	16
1.3.3. ESQUIZOFRENIA.....	17
1.4. MÉTODOS ACTUALES PARA LA DETECCIÓN DE SEROTONINA.....	18
1.5. BIOELECTRODOS.....	19
1.6. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	21
1.7. BIOELECTRODOS DESARROLLADOS PARA LA DETECCIÓN DE SEROTONINA.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	24
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
3. METODOLOGÍA.....	24
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
3.2. MÉTODOS.....	29
3.2.1. Determinación de la actividad enzimática.....	29
3.2.2. Estandarización de las condiciones operacionales para los ensayos de actividad enzimática.....	29
3.2.3. Funcionalización de los nanotubos de carbono multipared.....	31
3.2.4. Inmovilización de la enzima MAO-A en los nanotubos de carbono multipared.....	31
3.2.5. Estudio de cinética de acoplamiento de la enzima MAO-A en los nanotubos de carbono multipared.....	33
3.2.6. Análisis de morfología de superficie de MWCNT/MAO-A mediante microscopía electrónica de barrido.....	34
3.2.7. Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima MAO-A libre e inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A).....	34
3.2.8. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la MAO-A libre e inmovilizada en MWCNT (MAO-A/MWCNT).....	35

3.2.9. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la MAO-A libre e inmovilizada en MWCNT (MAO-A MWCNT).....	35
3.2.10. Evaluación de la estabilidad térmica de la enzima MAO-A libre e inmovilizada (MWCNT/MAO-A).	36
3.2.11. Evaluación de la estabilidad operacional y de almacenamiento de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A).....	36
3.2.12. Caracterización electrocinética de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared mediante potencial Z.	37
3.2.13. Evaluación de MWCNT/MAO por microscopia electroquímica de barrido.....	38
3.2.14. Modificación del electrodo serigrafiado de carbono con la MAO-A inmovilizada en los nanotubos de carbono multipared.	39
3.2.15. Preparación del fluido corporal simulado.	40
3.2.16. Caracterización electroquímica del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A).....	40
3.2.17. Estudios operacionales del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A).	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	44
4.1. Estudio de cinética de acoplamiento de la enzima MAO-A en los nanotubos de carbono multipared.	44
4.2. Análisis de morfología de superficie de MWCNT/MAO-A mediante microscopía electrónica de barrido.	45
4.3. Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima MAO-A libre e inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A).	47
4.4. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT.	50
4.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT.	52
4.6. Evaluación de la estabilidad térmica de la enzima MAO-A libre e inmovilizada (MWCNT/MAO-A).	53
4.7. Evaluación de la estabilidad operacional y de almacenamiento de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A).....	55
4.8. Caracterización electrocinética de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared mediante potencial Z.	59

4.9. Evaluación de la actividad enzimática de la MAO-A inmovilizada en MWCNT por microscopia electroquímica de barrido.....	¡Error! Marcador no definido.
4.10. Caracterización electroquímica del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A).	61
4.11. Estudios operacionales del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A).	71
5. CONCLUSIONES.	89
6. REFERENCIAS.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración de proteína.	30
Tabla 2. Reactivos requeridos para la preparación de fluido corporal simulado (FCS) (Kokubo y Takadama, 2006).	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los procesos de biosíntesis, almacenamiento, liberación, recaptura y degradación de la serotonina.....	13
Figura 2. Esquema de un bioelectrodo enzimático.....	20
Figura 3. Esquema del bioelectrodo desarrollado para la detección electroquímica del peróxido de hidrógeno producido por la desaminación de serotonina.	25
Figura 4. Diagrama del procedimiento experimental.	28
Figura 5. Mecanismo de conjugación de proteínas en nanotubos de carbono empleando EDC en presencia de NHS.....	32
Figura 6. Representación gráfica de la cinética de acoplamiento de la enzima MAO-A en los MWCNT, mediante unión covalente mediada por EDC.	45
Figura 7. Micrografías por microscopía electrónica de barrido.....	46
Figura 8. Representación de las velocidades iniciales de reacción de la enzima MAO-A libre e inmovilizada, para la desaminación de bencilamina.	49
Figura 9. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la MAO-A libre e inmovilizada en MWCNT.....	51
Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la MAO-A libre e inmovilizada en MWCNT.....	53
Figura 11. Estudio de estabilidad térmica de la enzima MAO-A libre (MAO-A) e inmovilizada (MWCNT/MAO-A) a temperaturas de 30 - 50 °C.....	55
Figura 12. Ensayo de estabilidad operacional de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT.	57
Figura 13. Estabilidad en almacenamiento de la enzima MAO-A libre e inmovilizada en nanotubos de carbono multipared a 4° C.	58
Figura 14. Potencial Zeta de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT.	60
Figura 15. Registros de voltamperometría cíclica de las distintas configuraciones del electrodo en presencia de una solución de serotonina (400 ng/mL) en fluido corporal simulado.	62
Figura 16. Proceso de óxido-reducción electroquímico de la serotonina	62

Figura 17. Respuestas amperométricas generadas por el electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT/MAO-A para de distintas concentraciones de serotonina en solución amortiguadora de fosfatos.....	65
Figura 18. Respuestas amperométricas generadas por el electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT/MAO-A para de distintas concentraciones de serotonina en fluido corporal simulado.....	66
Figura 19. Respuestas amperométricas generadas por el electrodo serigrafiado de carbono modificado con MWCNT/MAO-A para de distintas concentraciones de serotonina en solución amortiguadora de fosfatos.....	69
Figura 20. Respuestas amperométricas generadas por el electrodo serigrafiado de carbono modificado con MWCNT/MAO-A para distintas concentraciones de serotonina en fluido corporal simulado.....	70
Figura 21. Esquema que representa la conformación y mecanismo de reacción del biocatalizador MWCNT/MAO-A.....	71
Figura 22. Registros de voltamperometría cíclica de un electrodo de carbón vítreo modificado con distintos materiales en presencia de una solución de peróxido de hidrógeno en amortiguador de fosfatos.....	73
Figura 23. Proceso de reducción electroquímico del peróxido de hidrógeno.....	73
Figura 24. Registros de voltamperometría cíclica de un electrodo de carbón vítreo modificado con distintos materiales en presencia de una solución de serotonina.	75
Figura 25. Esquema que representa la evaluación de la actividad del biocatalizador MWCNT/MAO-A mediante SECM.....	77
Figura 26. Imágenes de microscopía electroquímica de barrido en modo (SG/TC) de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared.	79
Figura 27. Respuestas de reducción generadas por el biocatalizador MWCNT/MAO-A hacia distintas concentraciones de serotonina en solución amortiguadora de fosfatos.....	80
Figura 28. Respuestas de reducción generadas por el biocatalizador MWCNT/MAO-A hacia distintas concentraciones de serotonina en fluido corporal simulado.....	82

Figura 29. Respuestas amperométricas generadas por el bioelectrodo ESC/MWCNT/MAO.A en presencia de soluciones de serotonina en fluido corporal simulado.....	84
Figura 30. Registro de voltamperometría cíclica del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) en presencia de una solución de ácido ascórbico....	86
Figura 31. Registros de voltamperometría de pulso diferencial del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) en presencia de soluciones de ácido ascórbico en fluido corporal simulado	88
Figura 32. Registro de voltamperometría cíclica del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) en presencia de una solución de epinefrina.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 33. Registros de voltamperometría de pulso diferencial del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) en presencia de soluciones de epinefrina en fluido corporal simulado.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 34. Registros de voltamperometría de pulso diferencial del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) en presencia de una solución conformada por 400 ng/mL de serotonina, ácido ascórbico epinefrina en fluido corporal simulado	¡Error! Marcador no definido.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. SEROTONINA.

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT), es una de las monoaminas más antiguas filogenéticamente (Hay-Schmidt, 2000). Es reconocida por ser una de las moléculas con mayor efecto en el sistema nervioso central de vertebrados e invertebrados donde actúa como neurotransmisor/neuromodulador y como señal mitogénica durante el desarrollo (Celada, Puig, & Artigas, 2013). Se ha reportado que en el sistema nervioso central ésta molécula desempeña un papel clave en la regulación de una amplia variedad de funciones autónomas, conductuales, y cognitivas; entre las que se encuentran el aprendizaje, memoria, estado de ánimo, apetito, temperatura corporal, excitación, dolor, el comportamiento sexual, los ciclos circadianos y la liberación hormonal (Murphy & Lesch, 2008). Por otra parte, se ha demostrado que ejerce distintas funciones fisiológicas en la periferia, entre las que se encuentran la regulación de la motilidad gastrointestinal, el movimiento peristáltico, el tono vascular y la agregación plaquetaria (Mohammad-Zadeh, Moses, & Gwaltney-Brant, 2008). La biosíntesis de la serotonina en el sistema nervioso central se lleva a cabo en las células de la glándula pineal y en las neuronas serotoninérgicas, en cambio, en el sistema nervioso periférico las células enterocromafines se encargan de su biosíntesis. El precursor de la serotonina es el L- triptófano (Trp), un aminoácido neutro esencial de cadena ramificada, el cual sufre procesos de hidroxilación y descarboxilación. El proceso de hidroxilación es catalizado por la enzima triptófano hidroxilasa (Triptófano 5-monooxigenasa, *TPH*), localizada en las células enterocromafines (*tph1*) en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso entérico y en las células de la glándula pineal (*tph2*), la cual cataliza la conversión del triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Posteriormente la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), localizada en todas las células aminérgicas del sistema nervioso central y periférico, cataliza la descarboxilación del 5-hidroxitriptófano para generar 5-hidroxitriptamina

(serotonina) (Keszthelyi, Troost, & Masclee, 2009). Durante el catabolismo de la serotonina, un amplio porcentaje de ésta es degradado por la enzima monoamino oxidasa (MAO), localizada en la membrana externa mitocondrial en una gran variedad de células, donde cataliza la conversión de la 5-hidroxitriptamina a 5-hidroxiindol acetaldehído. Por último, el 5-hidroxiindol acetaldehído puede ser convertido en ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) mediante la enzima aldehído deshidrogenasa (Squires et al., 2006).

En el sistema nervioso central la serotonina es sintetizada en las terminales presinápticas de las neuronas serotoninérgicas. Posterior a su síntesis la serotonina es almacenada dentro de vesículas secretorias por medio del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2). Durante la transmisión de un potencial de acción y subsecuente despolarización de la terminal presináptica, se produce un influjo de calcio que promueve la fusión de las vesículas que contienen serotonina a la membrana plasmática y su posterior liberación al espacio sináptico (Nichols & Nichols, 2008). La serotonina liberada difunde a través del espacio sináptico, donde puede interactuar con autorreceptores acoplados a la membrana de la terminal presináptica, o con heterorreceptores localizados en la membrana postsináptica o en la membrana de otros tipos celulares, para activar vías de transducción de señales involucradas en procesos como la transmisión sináptica, despolarización neuronal, vasoconstricción, agregación plaquetaria, relajación del músculo liso, entre otros (Celada et al., 2013). Un proceso crucial para la homeostasis de la serotonina y para la regulación de su señalización es su eliminación del espacio sináptico por medio del transportador de serotonina de alta afinidad (SERT, 5-HTT) acoplado a la membrana de la terminal presináptica. La serotonina que es recapturada del espacio sináptico y regresa al interior de la terminal presináptica puede degradarse mediante la enzima monoamino oxidasa-A (MAO-A), o almacenarse nuevamente en vesículas para su posterior secreción (Figura 1) (Nichols & Nichols, 2008).

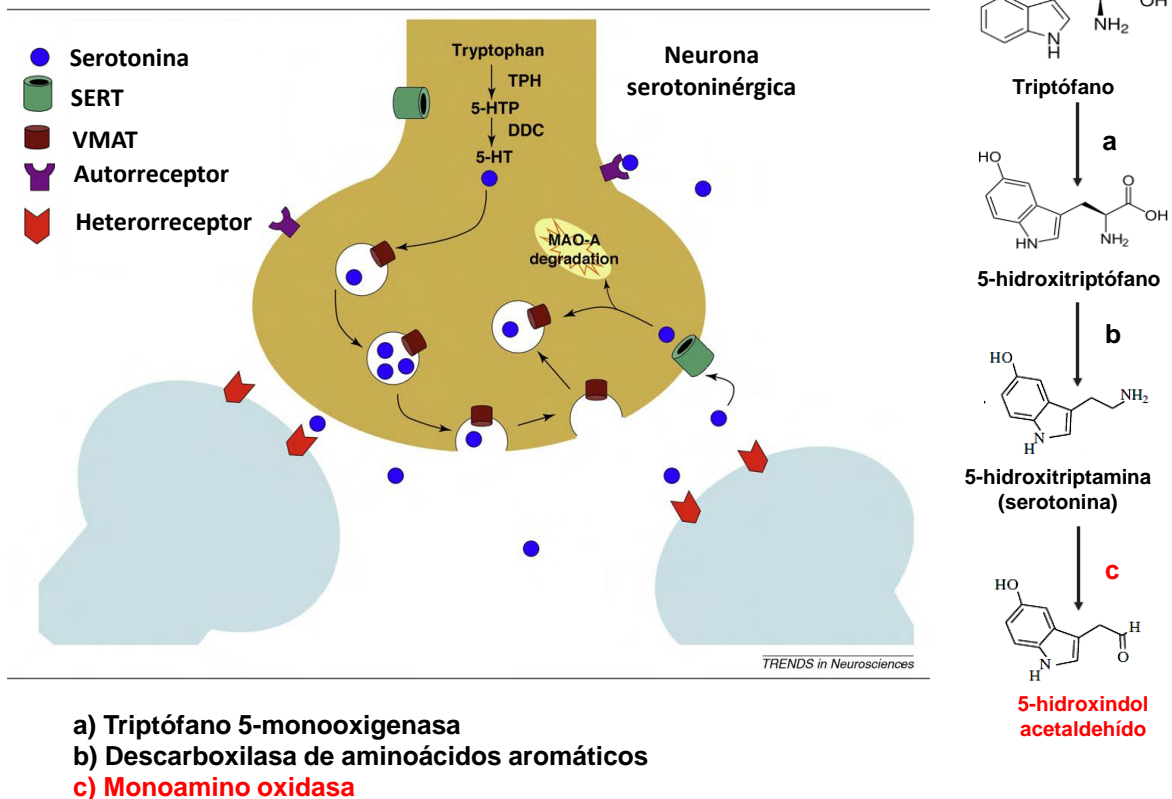


Figura 1. Representación de los procesos de biosíntesis, almacenamiento, liberación, recaptura y degradación de la serotonina. Modificado de Celada y col., 2013.

La serotonina que se encuentra en el cerebro es producida por neuronas serotoninérgicas, localizadas en el mesencéfalo y prosencéfalo. Estas neuronas se organizan en nueve grupos discretos (grupos B1-B9) denominados colectivamente como núcleos de rafé. Los núcleos de rafé localizados en la región caudal (B1-B5) envían proyecciones al sistema nervioso periférico, mientras que los núcleos rostrales (B6-B9) conformados por los núcleos de rafé dorsales y mediales, envían proyecciones al prosencéfalo. De los núcleos dorsales se originan fibras finas (tipo M) las cuales forman conexiones sinápticas extensas que inervan densamente áreas corticales y el hipocampo. En el caso de los núcleos mediales, éstos envían proyecciones más gruesas (tipo D) que inervan la región dorsal del cuerpo estriado, la amígdala y la corteza prefrontal (Jacobs & Azmitia, 1992). Aun cuando las funciones de estos sistemas no han sido completamente

elucidadas, se ha indicado que los núcleos de raíz rostrales están involucrados en la modulación de funciones mentales superiores como el estado de ánimo, ansiedad, miedo y la cognición (Dayan & Huys, 2008). A nivel periférico, un 99% de la serotonina (5-HT) que circula en sangre es capturada dentro de las plaquetas, mediante el transportador SERT y posteriormente acumulada dentro de vesículas por el transportador vesicular VMAT2; mientras que el 1% restante de la 5-HT total circula de forma libre en el plasma y por lo tanto está expuesta a la actividad de enzimas catabólicas (Zalsman et al., 2011). El mecanismo de regulación de los niveles de serotonina en sangre depende de la actividad del transportador SERT así como de su tráfico a través de la membrana plasmática de las plaquetas. (Veenstra-VanderWeele & Blakely, 2012).

1.2. MONOAMINO OXIDASA (MAO).

La monoamino oxidasa (MAO) es una enzima que regula la degradación metabólica de monoaminas, catecolaminas y de serotonina en el sistema nervioso central y en diversos tejidos periféricos. Es una flavoproteína integral de la membrana externa mitocondrial en las neuronas, células gliales, células enterocromafines, hepatocitos, entre otras, que regula la disponibilidad presináptica y extrasináptica de diversas monoaminas posterior a la liberación de un neurotransmisor. Existen dos isoformas de la enzima MAO, la monoamino oxidasa-B (MAO-B) y la monoamino oxidasa-A (MAO-A), la MAO-A posee una mayor afinidad por la serotonina (5-HT) y la noradrenalina (NA) como sustratos, mientras que la MAO-B muestra preferencia por la benzilamina y por la feniletilamina; y ambas tienen la capacidad de degradar dopamina (DA) (Martín-López, Manuel Perea, Morabet, & Francisco Navarro, 2008). El mecanismo de acción de la MAO, tanto de la MAO-A como de la MAO-B implica la oxidación de distintas monoaminas y catecolaminas mediante su desaminación. En el caso de la serotonina, la MAO cataliza su desaminación en una reacción que requiere de flavin adenin dinucleótido (FAD) como cofactor y oxígeno molecular (O₂). La MAO produce la desaminación de la 5-hidroxi triptamina generando 5-hidroxiindol acetaldehído, una reacción que implica la reducción del cofactor FAD y su

posterior reoxidación mediante oxígeno molecular generándose peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y amonio. (Binda y col., 2011).

1.3. TRASTORNOS RELACIONADOS CON SEROTONINA.

1.3.1. TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR.

El trastorno depresivo mayor es una enfermedad neuropsiquiátrica severa ampliamente distribuida en todo el mundo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud afecta a 350 millones de personas, considerada como la cuarta causa de discapacidad mundial y proyectada para 2020 como la segunda causa (Kessler & Bromet, 2013; Lopez, Mathers, Ezzati, Jamison, & Murray, 2006). El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales en su quinta edición (DSM-V) la define como una enfermedad caracterizada por la presencia de al menos 5 de los siguientes síntomas: 1) estado de ánimo deprimido, 2) disminución del interés o placer por actividades cotidianas (anhedonia), 3) modificación de más de un 5 % del peso corporal, 4) insomnio o hipersomnias, 5) agitación o retraso psicomotor, 6) fatiga, 7) sentimientos de inutilidad o culpabilidad, 8) disminución de la capacidad de concentración, 9) pensamientos o ideaciones suicidas; durante un periodo de dos semanas (American Psychiatric Association, 2013).

Una de las hipótesis surgidas para la explicación del origen del trastorno depresivo mayor es la hipótesis monoaminérgica, la cual indica que la disfunción del sistema serotoninérgico está involucrada en los procesos fisiopatológicos y de patogénesis de esta enfermedad (Fakhoury, 2015). Ésta hipótesis postula que el origen del trastorno depresivo mayor se debe a la deficiencia de serotonina y a la disminución de la actividad de neurotransmisión serotoninérgica (Andrews, Bharwani, Lee, Fox, & Thomson Jr., 2015). Una hipótesis inicialmente sustentada por hallazgos que indicaron que las drogas que agotan o eliminan la serotonina disminuyen el estado de ánimo y pueden desencadenar los síntomas del trastorno depresivo mayor (Ruhé, Mason, & Schene, 2007). Posteriormente ésta hipótesis recibió mayor apoyo gracias a estudios que mostraron que la reducción de los niveles de serotonina (mediante el agotamiento de triptófano) altera el procesamiento emocional y reduce el estado de ánimo en individuos con historia

familiar de trastorno depresivo mayor (Roiser et al., 2009; Ruhé et al., 2007). De acuerdo a esto, un estudio realizado en 2009 en una población asiática demostró que sujetos que padecen trastorno depresivo mayor presentan un déficit de serotonina en plasma, observándose valores promedio de 73.3 ng/ mL en pacientes con TEA comparado con valores de 127.9 ng/ mL en sujetos sin la enfermedad (Saldanha, Kumar, Ryali, Srivastava, & Pawar, 2009).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que algunas moléculas que inhiben la acción de la monoamino oxidasa e interfieren con el proceso de recaptura de serotonina mediado por el transportador SERT presentan efectos antidepressivos significativos; promoviendo que un amplio sector de la investigación y desarrollo de fármacos dedique sus esfuerzos a la generación de nuevas sustancias con estas propiedades. (Albert, Benkelfat, & Descarries, 2012; Holmes, 2008).

1.3.2. TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA.

El trastorno del espectro autista (TEA), agrupa a un conjunto heterogéneo de desórdenes del neurodesarrollo que se caracterizan por la presencia de alteraciones cognitivas y del comportamiento (Zafeiriou y col., 2013). Actualmente, la quinta edición del manual del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V) clasifica las manifestaciones características de esta enfermedad dentro de dos dominios básicos: 1) deficiencias en la comunicación social y alteraciones en la capacidad de interacción social; 2) aparición de intereses restrictivos y comportamientos repetitivos (American Psychiatric Association, 2013). El TEA es reconocido como uno de los trastornos del desarrollo más comunes (S. K. Kim, 2015). Recientemente el Centro para el Control y prevención de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos, estimó que cerca de 1 niño por cada 96 (14.8/ 10000) ha sido identificado con TEA (Elsabbagh et al., 2012). En México la Clínica Mexicana del Autismo y Alteraciones del Desarrollo (CLIMA), determinó que la prevalencia del TEA en México es de 1 caso por cada 136 individuos típicos (14.3/10,000) (Fombonne, Marcin, Bruno, Tinoco, & Marquez, 2012).

El aumento de los niveles de serotonina en sangre total (hiperserotonemia) ha sido uno de los primeros biomarcadores identificados en pacientes con TEA. Un amplio número de estudios describen de manera consistente una elevación significativa de los niveles de serotonina (5-HT) en aproximadamente 25 a 35 % de los pacientes que presentan TEA, comparado con individuos sin la enfermedad (Gabriele y col., 2014). La hiperserotonemia en sangre observada en individuos que sufren TEA se debe a una excesiva acumulación de serotonina en el interior de las plaquetas, sin verse afectados los niveles de serotonina libre en el plasma sanguíneo (Piven et al., 1991). Un estudio reciente reportó la presencia de hiperserotonemia en aproximadamente 40 % de una población latinoamericana de sujetos con TEA, en dicho estudio, se reportaron valores promedio de concentración de serotonina de 219 ng/mL para sujetos con TEA y valores promedio de 180 ng/mL para sujetos sin TEA (Gabriele et al., 2014; Pagan et al., 2014).

1.3.3. ESQUIZOFRENIA.

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica caracterizada por la aparición de síntomas psicóticos, tales como delirios, alucinaciones, retracción social, disminución afectiva, alteraciones cognitivas y comportamiento desorganizado, durante un periodo de un mes (American Psychiatric Association, 2013). Se estima que afecta a 21 millones de personas en el mundo y comúnmente presenta co-morbilidad con trastorno depresivo mayor ya que aproximadamente de 25 – 50% de pacientes esquizofrénicos presentan episodios depresivos (Buckley, Miller, Lehrer, & Castle, 2009). La disfunción de diversos neurotransmisores entre los que se encuentran la dopamina y el glutamato han sido relacionados con la fisiopatología de la esquizofrenia (Cole, Apud, Weinberger, & Dickinson, 2012). Sin embargo, evidencia reciente indica que la disfunción del sistema serotoninérgico puede contribuir a la generación de los síntomas de este trastorno. Específicamente, las alteraciones afectivas, disfunciones en el procesamiento de estímulos emocionales, presentes en pacientes con esquizofrenia, han sido relacionadas a alteraciones en la actividad

del sistema serotoninérgico (Selvaraj, Arnone, Cappai, & Howes, 2014), ya que la serotonina desempeña un papel clave en el procesamiento emocional y en la modulación de los estados afectivos (Dayan & Huys, 2008). Un estudio publicado en 2007 indicó una disminución de la concentración de serotonina en una población europea de sujetos con esquizofrenia; en promedio los valores de serotonina en sangre total de pacientes con esquizofrenia fueron de 139 ng/mL mientras que en sujetos sin la enfermedad la concentración fue de 241 ng/mL (Marcinko et al., 2007).

Por otra parte, estudios que reportan la generación de modelos animales transgénicos, en los que se interfiere con la expresión del receptor de serotonina 5-HT1 y el transportador de serotonina SERT, muestran que los animales con estas alteraciones presentan fenotipos de ansiedad y depresión, así como la aparición de respuestas anormales a estímulos estresantes (Richardson-Jones et al., 2011; Weisstaub et al., 2006). Otro indicio de que la desregulación serotoninérgica podría ser causa de los síntomas negativos y la co-morbilidad depresiva en pacientes esquizofrénicos, es el descubrimiento de que los inhibidores selectivos de la serotonina son efectivos para el tratamiento de los síntomas negativos afectivos de éste desorden. Además, se ha demostrado que la alteración metabólica de la serotonina contribuye al deterioro emocional y a la aparición de alteraciones afectivas (Singh, Singh, Kar, & Chan, 2010).

1.4. MÉTODOS ACTUALES PARA LA DETECCIÓN DE SEROTONINA.

La implicación de la serotonina (5-HT) en diversas condiciones patológicas ha motivado la búsqueda de metodologías selectivas para su determinación en muestras biológicas. Una amplia variedad de métodos analíticos clásicos que incluyen fluorimetría, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ensayos inmunoenzimáticos, radioinmunoensayo, ensayos de quimioluminiscencia, electroforesis capilar y espectrometría de masas han sido empleados para éste propósito durante varias décadas. Sin embargo, estos métodos requieren de instrumentación especializada, son metodologías costosas

con tiempos de análisis amplios y que a menudo requieren de procesos complejos para la preparación de las muestras (Mirzaei & Sawan, 2014).

1.5. BIOELECTRODOS.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define un bioelectrodo como “un dispositivo integrado autónomo capaz de proveer información analítica específica semicuantitativa o cuantitativa mediante el uso de un elemento de reconocimiento biológico, el cual está en contacto espacial directo con un transductor. Los bioelectrodos son dispositivos analíticos con la capacidad de convertir un evento biológico en una señal que puede ser cuantificable (Grieshaber y col., 2008; Kirsch y col., 2013). De manera general, un bioelectrodo está conformado por: a) un elemento de reconocimiento biológico o biorreceptor que tiene unión específica con el analito de interés en una muestra, b) una arquitectura de interfaz eléctrica donde sucede el evento biológico específico el cual genera una señal bioquímica, c) un elemento transductor (que comúnmente es un electrodo), el cual recoge la señal generada del evento de unión del analito y el biorreceptor y la convierte en una señal eléctrica. Moléculas como los ácidos nucleicos y los anticuerpos han sido ampliamente utilizadas como elementos de reconocimiento biológicos para la construcción de bioelectrodos, sin embargo, las enzimas son los elementos biológicos utilizados con mayor frecuencia (Grieshaber et al., 2008). En el caso de los sistemas de transducción para el desarrollo de bioelectrodos, los transductores de tipo electroquímico (electrodos) son los más utilizados, debido a su de bajo costo, a la sencillez de su diseño y a su capacidad de miniaturización (Sassolas y col., 2012). Los bioelectrodos pueden ser aplicados para detección de distintos analistas en una gran diversidad de muestras, que incluyen fluidos corporales (sangre, saliva, orina), muestras de alimentos, cultivos celulares y muestras ambientales (aire, agua, suelo, plantas) (Kirsch et al., 2013).

Los bioelectrodos de tipo enzimático comprenden un grupo muy importante dentro del desarrollo de esos dispositivos, ya que aprovechan la alta afinidad y selectividad que presentan las enzimas hacia sus moléculas diana (sustratos). Generalmente para su construcción se emplean enzimas de óxido-

reducción, las cuales catalizan reacciones en las que se consumen o generan electrones. Un bioelectrodo enzimático consiste en una capa de bio-reconocimiento formada por enzimas inmovilizadas sobre la superficie de un electrodo. Durante el proceso de reconocimiento, la capa enzimática interactúa con el analito, que puede ser un sustrato, co-sustrato o cofactor. De la interacción entre la enzima y el analito se genera una reacción de óxido-reducción en la que se liberan electrones, los cuales son detectados y convertidos en una señal eléctrica por el transductor (Putzbach y Ronkainen, 2013).

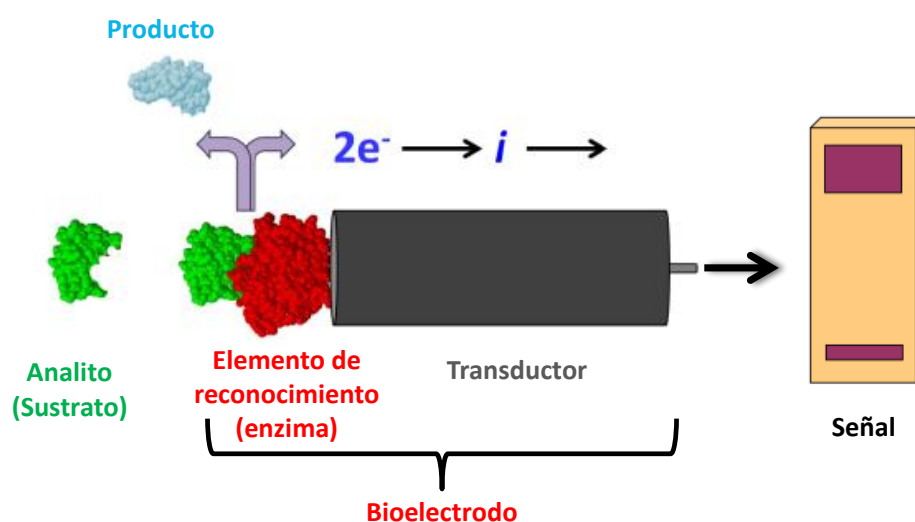


Figura 2. Esquema de un bioelectrodo enzimático. Modificado de Putzbach y Ronkainen, 2013.

De acuerdo a su diseño, los bioelectrodos enzimáticos pueden ser dispositivos con una alta sensibilidad, debido a su capacidad de adaptar y confinar interacciones específicas entre distintas moléculas biológicas. Las ventajas que presentan estos dispositivos sobre los sistemas analíticos clásicos provienen de sus características sencillas de operación, ya que generalmente no requieren de una instrumentación especializada ni de usuarios altamente capacitados para su utilización. Por otra parte, los bioelectrodo pueden ser dispositivos económicos y miniaturizables, lo que permite su fácil manipulación y transporte (Grieshaber et al., 2008). En conjunto estas características permiten que este tipos de

dispositivos tengan la capacidad de complementar y en algunos casos, reemplazar a los métodos analíticos clásicos, en el área industrial, alimenticia, ambiental, agrícola, farmacéutica, biomédica y clínica (Kirsch et al., 2013).

1.6. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.

Existen inconvenientes inherentes al uso de enzimas como elementos de reconocimiento en bioelectrodos, entre los que se encuentran: 1) la probabilidad de que la enzima difunda desde el transductor hacia el medio; 2) el mantenimiento de la estabilidad y actividad de la enzima en condiciones de almacenaje y de operación; y 3) el aseguramiento de que la enzima pueda ser reutilizable en ensayos posteriores (Sassolas et al., 2012). Estas dificultades pueden resolverse gracias al uso de técnicas de inmovilización enzimática, definida como el confinamiento de estas biomoléculas en una matriz o soporte distinto al que se encuentran de forma nativa, haciéndolas insolubles. Una gran variedad de materiales insolubles pueden ser utilizados como soportes o matrices para la inmovilización enzimática, siendo los más comunes los polímeros inertes y materiales inorgánicos (Datta et al., 2013).

El uso de la inmovilización en el diseño de bioelectrodos ofrece distintas ventajas, ya que provoca que la enzima se disponga a corta distancia del transductor o que entre en contacto directo con él (ya que la enzima puede inmovilizarse en la superficie del transductor); promoviéndose una transferencia más eficiente de la señal generada por la reacción catalítica (Putzbach & Ronkainen, 2013). Otra ventaja que ofrece esta técnica es el favorecimiento de la reutilización de la enzima, ya que al estar confinada en una forma insoluble se permite que ésta conserve su actividad catalítica y que se mantenga disponible para la realización de varios ensayos, (dependiendo de la técnica de inmovilización utilizada), disminuyéndose la cantidad de enzima requerida y los costos de operación. Existen cinco técnicas principales para la inmovilización enzimática: adsorción, unión covalente, atrapamiento, afinidad y microencapsulación; de entre éstas la inmovilización por unión covalente y por

atrapamiento son las estrategias más empleadas para la construcción de bioelectrodos. (Datta et al., 2013).

1.7. BIOELECTRODOS DESARROLLADOS PARA LA DETECCIÓN DE SEROTONINA.

La serotonina es una molécula electroactiva, posee la capacidad de ser fácilmente oxidable, lo que permite su detección electroquímica. Desde la década de 1970 se han desarrollado distintos métodos electroquímicos basados en su oxidación mediante electrodos convencionales; técnicas como la voltametría cíclica, la voltamperometría, la cronoamperometría y la espectroscopia impedancia electroquímica han sido las más empleadas (Mirzaei & Sawan, 2014). En 2007 el grupo de Li y Lin desarrollaron un sensor con base en un electrodo de carbón vítreo recubierto con un polímero de polipirrol y nanopartículas de oro para provocar la oxidación de la serotonina y su posterior detección mediante voltametría. El dispositivo diseñado presentó alta sensibilidad hacia la corriente de oxidación de la serotonina, aún en muestras biológicas que contenían dopamina y ácido ascórbico, logrando una respuesta lineal amplia: de 7.0×10^{-9} M a 2.2×10^{-6} M y un límite de detección de 1.0×10^{-9} M (Li & Lin, 2007).

Por otra parte, Mozzafari y colaboradores lograron diseñar electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas (conjuntos moleculares formados espontáneamente por adsorción) de captopril/tiofenol para la adsorción selectiva de serotonina y su posterior detección por voltametría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial. Estos dispositivos resultaron ser un medio efectivo para la adsorción y transferencia de electrones de la serotonina, con una alta selectividad en muestras con ácido ascórbico y dopamina; obteniéndose un límite de detección de 1.2×10^{-9} M (Mozaffari, Chang, & Park, 2010).

Recientemente se describió un bioelectrodo enzimático amperométrico para la detección y cuantificación de serotonina en muestras de comida, por medio de la inmovilización de la enzima tirosinasa (monofenol monooxigenasa), sobre un electrodo de pasta de carbono. El biosensor consistió en un electrodo empacado

con nano-polvo de carbono sobre el que se inmovilizó la enzima tirosinasa de forma covalente. La detección y cuantificación de la serotonina fue realizada mediante la reducción electroquímica de la o-serotonin-quinona, producto de la reacción catalizada por la tirosinasa. De acuerdo a los autores éste biosensor logró una respuesta lineal de 4 a 140×10^{-6} M y un límite de detección de 0.84×10^{-6} M. (Apetrei I.M. & Apetrei C., 2013).

Como se ha descrito previamente, existen diversas enfermedades neuropsiquiátricas como la esquizofrenia, el trastorno depresivo mayor y el trastorno del espectro autista cuyos procesos de patogénesis y fisiopatología están ligados a mecanismos que implican alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica y en los niveles del neurotransmisor serotonina. Los métodos disponibles actualmente para para la detección y cuantificación de serotonina comprenden el uso de técnicas analíticas que requieren de instrumentación especializada, tiempos de análisis prolongados, personal capacitado y que son de limitada disponibilidad. Los bioelectrodos representan una opción tecnológica viable debido a que son dispositivos analíticos autónomos de sencilla operación, portátiles, que no requieren de personal capacitado para su uso, ofrecen tiempos de análisis reducidos y son relativamente económicos. La detección y cuantificación de los niveles de serotonina puede aportar información relevante sobre el riesgo, presencia y curso de trastornos en los que el sistema serotoninérgico presenta alteraciones. Con base en esto, el presente trabajo propone el diseño y construcción de un bioelectrodo que emplee la enzima monoamino oxidasa-A, para la detección indirecta de serotonina. Lo cual comprende un primer acercamiento hacia el desarrollo de un dispositivo que pueda ser empleado a futuro como una herramienta auxiliar para el tamizaje, diagnóstico y seguimiento de trastornos en los que la neurotransmisión serotoninérgica está alterada.

2. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Construir y caracterizar un bioelectrodo con base en la enzima monoamino oxidasa-A inmovilizada, que permita la detección de serotonina en un fluido corporal simulado.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Inmovilizar la enzima monoamino oxidasa-A de forma covalente en un soporte conformado por nanotubos de carbono multipared.
- Determinar el efecto del pH, efecto de la temperatura, actividad y cinética enzimática de la monoamino oxidasa-A inmovilizada sobre el soporte.
- Desarrollar el bioelectrodo mediante la modificación de un electrodo serigrafiado de carbono con la monoamino oxidasa-A inmovilizada en el soporte.
- Caracterizar el bioelectrodo mediante técnicas electroquímicas para lograr la determinación de serotonina a través de la detección de peróxido de hidrógeno en un fluido corporal simulado.
- Evaluar el rendimiento operacional del bioelectrodo por medio de estudios de estabilidad, de interferencia y de validación.

3. METODOLOGÍA.

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El sistema desarrollado en el presente protocolo se esquematiza en la Figura 3. Un bioelectrodo empleado para la detección indirecta de serotonina conformado por: un soporte de nanotubos de carbono multipared (MWCNT) **(1)**, en el que se inmovilizó la enzima monoamino oxidasa-A (MAO-A) **(2)**, acoplado a un electrodo serigrafiado de carbono **(3)**, el cual tuvo la función de detectar el peróxido de hidrógeno producido por la desaminación oxidativa de la serotonina (5-hidroxi triptamina), catalizada por la MAO-A. La detección de serotonina se llevó a cabo al caracterizar la señal electroquímica (corriente) generada por el proceso de oxidación del peróxido de hidrógeno a nivel del electrodo serigrafiado de

carbono, mediante los métodos electroquímicos de voltametría cíclica y amperometría.

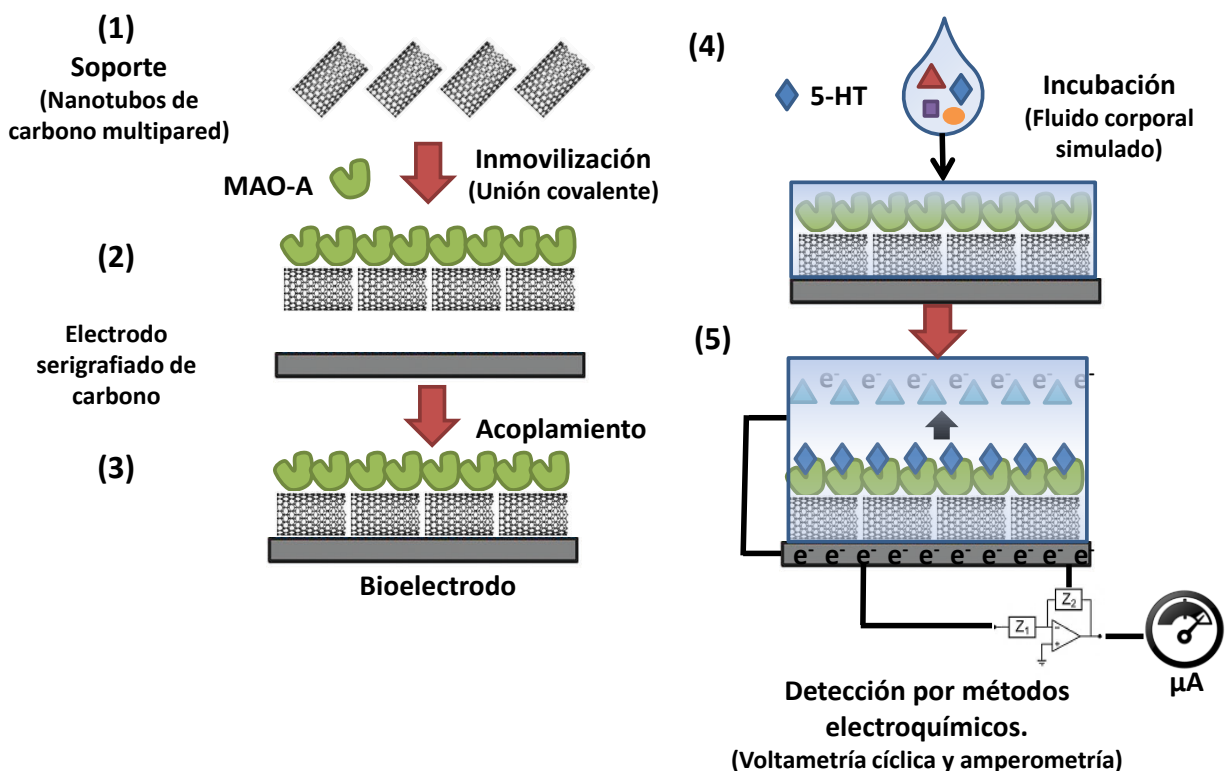


Figura 3. Esquema del bioelectrodo desarrollado para la detección electroquímica del peróxido de hidrógeno producido por la desaminación de serotonina.

En la Figura 4 se muestra diagrama referente a las distintas fases experimentales que se llevaron a cabo para el desarrollo y caracterización del bioelectrodo. En la primera fase se llevó a cabo la inmovilización de la enzima monoamino oxidasa-A sobre la superficie de un soporte conformado por nanotubos de carbono multipared (MWCNT). Los nanotubos de carbono son estructuras huecas de carbono conformadas por una o varias paredes tubulares, con diámetros en la escala de los nanómetros. La estructura tubular de los nanotubos de carbono está conformada por un arreglo hexagonal ordenado de átomos de carbono unidos mediante enlaces tipo sp^2 (Tilmaciu & Morris, 2015). Comparado con otros nanomateriales los nanotubos de carbono poseen propiedades estructurales, mecánicas, eléctricas, y ópticas que ofrecen ventajas para su aplicación en el desarrollo de biosensores y bioelectrodos (Biju, 2014). Los

nanotubos de carbono pueden funcionar como andamios o plataformas en las cuales se puede inmovilizar diversas moléculas como ácidos nucleicos y proteínas, debido a que poseen una amplia área específica de superficie. Por otra parte, se ha reconocido que debido a su tamaño, alta conductividad, alta estabilidad y sensibilidad química, así como su alta actividad electrocatalítica, éstos materiales son adecuados para el diseño de bioelectrodos/biosensores que integran enzimas que generan especies electroactivas (Münzer et al., 2013).

La inmovilización se llevó a cabo mediante la funcionalización de los nanotubos de carbono multipared, para lograr la formación de grupos carboxilo libres en su superficie, y posteriormente promover la conjugación de las moléculas de monoamino oxidasa-A a través de su unión de forma covalente. La inmovilización enzimática por unión covalente es una técnica basada en el hecho de que las cadenas laterales de aminoácidos como arginina, ácido aspártico, lisina, histidina, así como los extremos amino y carboxilo terminal presentes en la enzima, pueden formar enlaces covalentes con distintos grupos funcionales nucleofílicos en la matriz (grupos tiol, indol, imidazol, hidroxilo etc.) dependiendo de su reactividad y de su grado de exposición (Zucca & Sanjust, 2014).

En la segunda fase se caracterizó bioquímicamente la MAO-A inmovilizada en el soporte por medio de un ensayo espectrofotométrico, con el objetivo de determinar las alteraciones en su actividad y cinética a causa de su inmovilización. Además de examinar la actividad de la MAO-A, se evaluó su cinética de Michaelis-Menten, para determinar el valor de velocidad máxima de la reacción catalizada por dicha enzima (V_{max}), así como el valor de concentración de sustrato al cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima de reacción (K_m), o constante de afinidad. Por otra parte, se determinaron las condiciones de pH y temperatura óptimas en las que se alcanza la mayor actividad de la MAO-A. Para esto se realizaron ensayos espectrofotométricos basados en la conversión del sustrato de la MAO-A bencilamina en un aldehído, el cual absorbe a un valor de longitud de onda específico, permitiendo su cuantificación y por lo tanto indicando la actividad de la enzima.

La tercera fase comprendió la modificación de un electrodo serigrafiado de carbono con la monoamino oxidasa-A inmovilizada en los nanotubos de carbono multipared.

En la cuarta fase experimental se realizó la caracterización electroquímica del bioelectrodo construido para evaluar sus propiedades electrocatalíticas, por medio de técnicas electroquímicas de voltametría cíclica y amperometría, para lograr la detección de serotonina en un fluido corporal simulado.

Finalmente, en la quinta etapa experimental se llevaron a cabo estudios operacionales del bioelectrodo desarrollado. De manera específica, se realizó un estudio de estabilidad de ensayo, un estudio de interferencias en el ensayo, con el objetivo de determinar la fiabilidad del bioelectrodo para ser empleado como un método para la detección de serotonina.

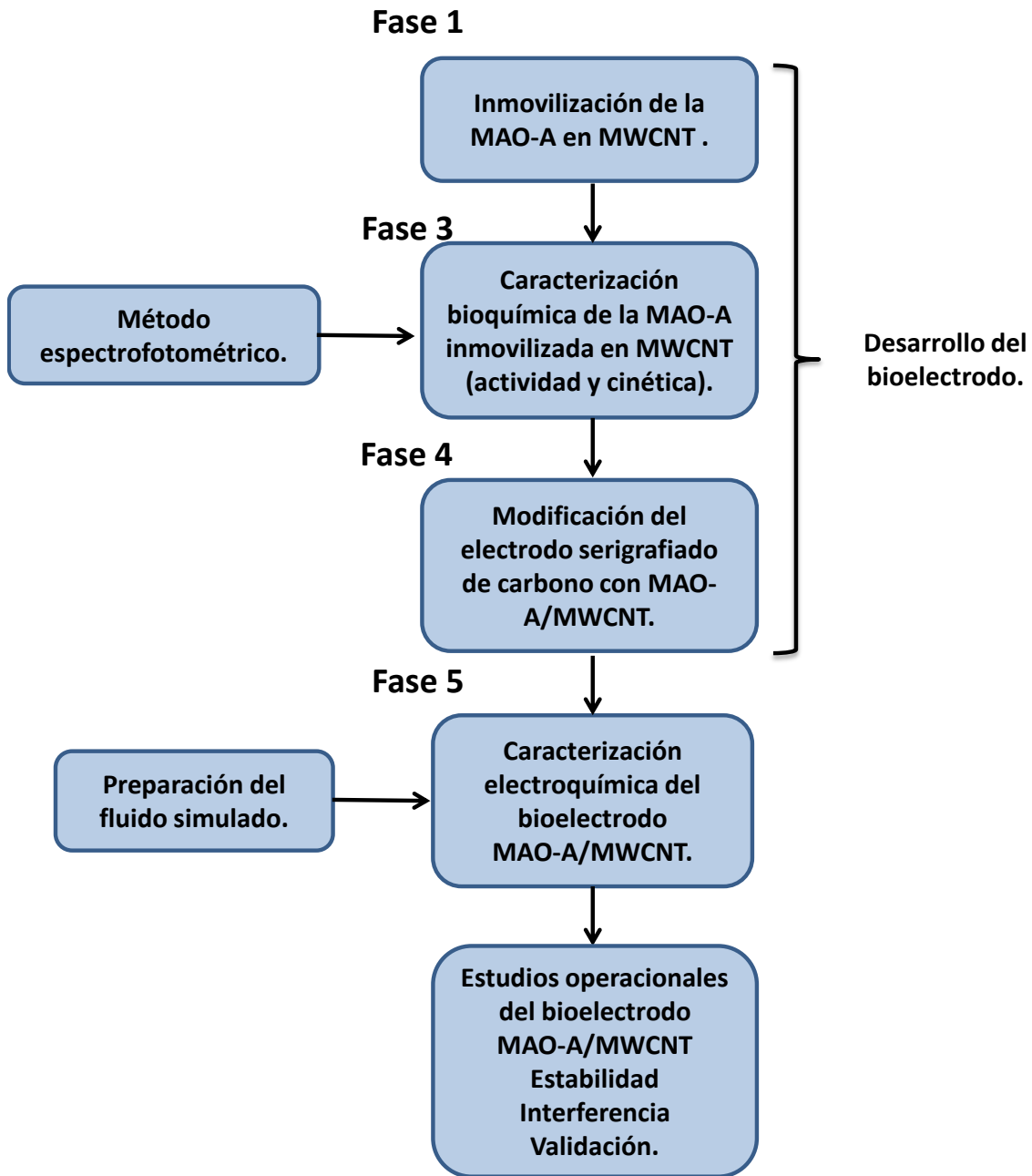


Figura 4. Diagrama del procedimiento experimental.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Determinación de la actividad enzimática.

Para determinar la actividad de la enzima MAO-A se empleó el método espectrofotométrico de actividad reportado por Dunn y colaboradores (2008), basado en la desaminación oxidativa de la bencilamina catalizada por la MAO-A y la producción de benzaldehído, el cual absorbe a una longitud de onda de 250 nm (Dunn y col., 2008). Los ensayos se llevaron a cabo al mezclar en una celda de cuarzo 800 μ l de solución amortiguadora de fosfatos (NaH_2PO_4 , 10 mM y Na_2HPO_4 , 10 mM, pH 6.5), 100 μ l de una solución de bencilamina en agua destilada (50 mM) y 100 μ l de una solución de MAO-A (0.95 mg/ mL; 1.05 U/ μ l).

La actividad enzimática, definida como el cambio de absorbancia en función del tiempo, se determinó al seguir el incremento de la absorbancia a 250 nm debido a la producción del benzaldehído (Dunn, Marshall, Munro, & Scrutton, 2008). Por cada molécula de sustrato que convierte la MAO-A se forma una molécula de benzaldehído, por lo tanto la actividad de la MAO-A se calculó como:

$$A = \frac{\Delta N}{\Delta t} = \frac{\Delta(c V)}{\Delta t} = \frac{\Delta(E/\epsilon d)V}{\Delta t} = \frac{V/\epsilon d}{\Delta t}$$

Dónde: V es el volumen de la celda (1 mL, 10^{-3} L); ϵ es el coeficiente de extinción molar de la bencilamina ($13.8 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$); d es la distancia de la celda (1 cm) y Δt es el tiempo de reacción (minutos).

La actividad específica de la MAO-A se obtuvo al dividir la actividad entre la cantidad de proteína en la reacción en miligramos, definida como U, o la cantidad de enzima capaz de desaminar 1 μ mol de bencilamina por minuto por unidad de soporte.

3.2.2. Estandarización de las condiciones operacionales para los ensayos de actividad enzimática.

Con la finalidad de conocer los parámetros óptimos necesarios para la realización de los ensayos enzimáticos se realizaron pruebas de estandarización

de la cantidad de enzima y tiempo de reacción requeridos. Para determinar el tiempo en el que la MAO-A catalizó la degradación (desaminación) de serotonina se realizaron ensayos de actividad enzimática en los que se examinó la generación del producto enzimático en función del tiempo. Para esto se realizó el ensayo de actividad descrito en la sección anterior, en el que la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente (25 °C) y se realizaron mediciones continuas de densidad óptica en un espectrofotómetro UV-Vis calibrado a 250 nm, cada 5 minutos durante un periodo de 30 minutos. Los valores densidad óptica obtenidos se utilizaron para construir una curva tipo en la que se graficó la generación del producto (densidad óptica) vs el tiempo transcurrido en la reacción (minutos). El tiempo en el que se observó la mayor generación de producto fue seleccionado como el tiempo óptimo de reacción.

Para determinar la cantidad de enzima en los distintos ensayos se empleó el método de Lowry para cuantificación de proteínas. Dicho método se basa en la reacción de Biuret, en la que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con cobre en condiciones alcalinas para producir Cu^+ , el cual reacciona a su vez con el reactivo de Folin. Esta reacción resulta en la formación de color azul, cuya absorbancia se registró a 630 nm (Lowry et al., 1951).

Se construyó una curva de calibración conformada por 8 soluciones de albúmina sérica bovina (BSA, fracción V, Sigma) como proteína estándar en un intervalo de concentración de 0 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las soluciones se prepararon al diluir una solución estándar (*stock*) de 2 mg/mL como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración de proteína.

Solución estándar BSA (μL)	0	2.5	5	12.5	25	50	125	250
Agua destilada (μL)	500	498	495	488	475	450	375	250
Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	10	20	50	100	200	500	1000

El método se llevó a cabo al agregar en una celda de cuarzo 100 μl de las soluciones estándar de BSA, o de muestra (enzima MAO-A) y 1250 μl de una solución conformada por Na_2CO_3 (2 % p/v); CuSO_4 (1 % p/v) y $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartrato de sodio potasio, 2 % p/v). Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se les añadió 100 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) bajo agitación suave, dejando reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, y posteriormente se registró la densidad óptica de las soluciones a 630 nm con ayuda de un espectrofotómetro UV-Vis.

3.2.3. Funcionalización de los nanotubos de carbono multipared.

Los nanotubos de carbono multipared (MWCNT) fueron donados amablemente por la Dra. Lorena Álvarez Contreras, del Centro de Investigaciones en Materiales Avanzados (CIMAV S.A., México). La funcionalización de nanotubos de carbono multipared se llevó a cabo mediante oxidación con ácido nítrico (HNO_3) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Rosca y col., 2005). Para esto, 40 mg de nanotubos de carbono se suspendieron en 50 mL de una solución conformada por HNO_3 (70%, 37.5 mL) y H_2SO_4 (98 %, 12.5 mL), proporción 3:1 (v/v). La suspensión de nanotubos fue sonicada durante 3 horas a temperatura ambiente (25° C), y se mantuvo en agitación durante la noche (~15 horas). Posteriormente los nanotubos de carbono fueron recuperados mediante centrifugación y resuspendidos en 50 mL de agua destilada. Los nanotubos obtenidos fueron sometidos a una serie de lavados con agua desionizada hasta que el pH de la solución de lavado fue neutro (pH 7). Finalmente los nanotubos se obtuvieron por centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos y se secaron en un horno a 80° C durante 5 horas.

3.2.4. Inmovilización de la enzima MAO-A en los nanotubos de carbono multipared.

Para la inmovilización de la enzima MAO-A en los nanotubos de carbono multipared se empleó una modificación del método de unión covalente reportado por Kim et al. (2017), que emplea 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida

(EDC) como agente activador del soporte (B. C. Kim et al., 2017). En dicho método la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida reacciona con los grupos carboxilo de los nanotubos de carbono, para formar el intermediario reactivo O-acilourea, el cual reacciona con los grupos amino libres en la enzima produciéndose un enlace de tipo amida estable. Es necesario mencionar que el intermediario O-acilourea es inestable y susceptible, lo cual interfiere con la unión, sin embargo, la adición del compuesto N-hidroxi succinimida lo estabiliza, convirtiéndolo en un éster más estable e incrementado la eficiencia de la unión (Gao & Kyratzis, 2008) (Figura 5).

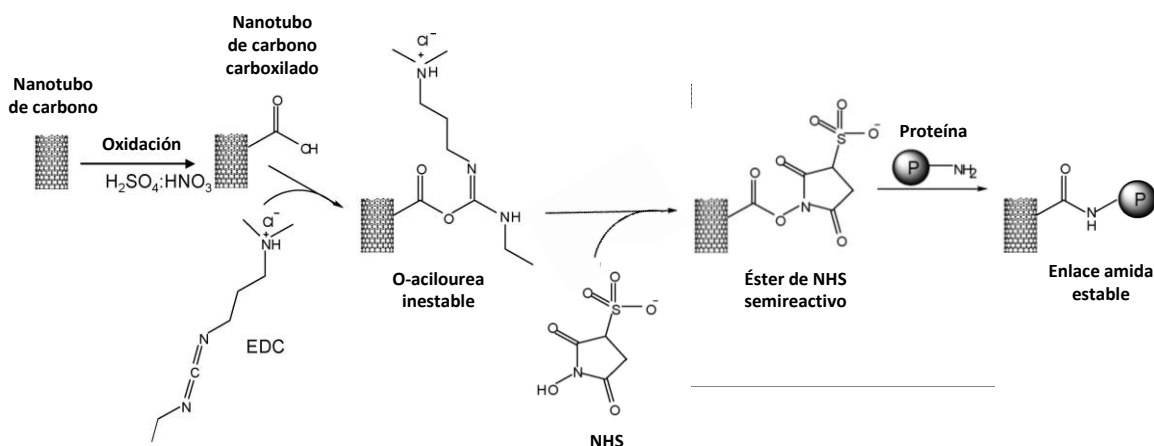


Figura 5. Mecanismo de conjugación de proteínas en nanotubos de carbono empleando EDC en presencia de NHS. Modificado de Gao & Kyratzis, 2008.

De acuerdo a esto, la inmovilización de la enzima MAO-A en los nanotubos de carbono multipared se realizó al preparar una suspensión de nanotubos de carbono funcionalizados (4 mg) en 5 mL de agua desionizada por sonicación, durante 1 hora a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente se agregó a la suspensión de MWCNT 1 mL de solución amortiguadora de ácido-N-morfolino etanosulfónico (MES, 500 mM, pH 6.2), 2.3 mL de una solución acuosa de N-hidroxi succinimida (NHS, 500 mM en amortiguador MES) y 1.2 mL de una solución acuosa de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC 70 mM). Al finalizar, los MWCNT fueron obtenidos mediante centrifugación y lavados 3 veces con solución amortiguadora MES para eliminar los residuos de EDC, MES y urea.

Para inmovilizar la MAO-A se añadió 1 mL de solución de enzima (0.095 mg/mL; 1.05 U/ μ L) en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 , 10 mM y Na_2HPO_4 , 10 mM pH 6.5), a 1 mL de la suspensión de MWCNT (4 mg/ mL). Posteriormente la mezcla se mantuvo en agitación orbital a 200 rpm durante 60 minutos a 4° C, y se permitió que el acoplamiento de la enzima ocurriera durante 15 horas a 4 °C. Finalmente los nanotubos de carbono conjugados con la enzima MAO-A (denominado MAO-A/MWCNT) fueron recuperados por centrifugación a 3500 rpm y se suspendieron en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos.

3.2.5. Estudio de cinética de acoplamiento de la enzima MAO-A en los nanotubos de carbono multipared.

Para examinar el acoplamiento de la enzima MAO-A a los nanotubos de carbono se llevó a cabo un ensayo de cinética de acoplamiento. Este ensayo evalúa la cantidad de enzima que se acopla al soporte mediante un método espectrofotométrico. El ensayo consistió en mantener una de las mezclas de MAO-A/ MWCNT (1 mL) a 4°C durante un periodo de 60 minutos, y se obtuvieron muestra del sobrenadante durante los minutos 0, 3, 6, 15, 30, 45 y 60 mediante centrifugación (1500 rpm).

Posteriormente se cuantificó la proteína total de cada uno de los sobrenadantes mediante el método de Lowry (véase la sección 1), para construir una curva de cinética en la que se graficó el cambio de densidad óptica versus el tiempo. Dicha curva permitió apreciar el acoplamiento de la enzima al soporte, el cual es indicado por una reducción de la concentración de la enzima presente en los sobrenadantes conforme transcurre el tiempo. Además se determinó la cantidad de enzima inmovilizada en los nanotubos de carbono, expresada como microgramos de proteína por miligramo del soporte:

$$\frac{\mu\text{g}_{MAO-A}}{\text{mg}_{MWCNT}}$$

3.2.6. Análisis de morfología de superficie de MWCNT/MAO-A mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

La microscopía electrónica es una técnica que permite la obtención de información estructural de materiales en una resolución a escala de nanómetros. La microscopía electrónica de transmisión (MET, SEM en inglés Transmission Electron Microscopy) provee información estructural de materiales sólidos en dos dimensiones en una mayor resolución que la microscopía electrónica de barrido. En la técnica de MET una imagen es generada por medio de la transmisión de electrones a través de la muestra. Los electrones son generados por un filamento de tungsteno en una cámara de vacío y posteriormente son enfocados y acelerados a través de un campo electromagnético para formar un haz que se hace pasar a través de la muestra. Los electrones que logran atravesar la muestra son colectados en una superficie reactiva donde se genera la imagen. Para la inmovilización enzimática, la MET ha sido empleada para visualizar la distribución de la enzima en un soporte determinado, además de que provee información sobre el tamaño de la partícula y morfología de los materiales. (Mohamad, Marzuki, Buang, Huyop, & Wahab, 2015).

Con el objetivo de caracterizar los materiales empleados para la inmovilización de la enzima MAO-A, así como visualizar su inmovilización en nanotubos de carbono multipared (MWCNT) se llevó a cabo un análisis de morfología de superficie por medio de microscopía electrónica de transmisión. Se usó el microscopio electrónico marca Hitachi, modelo HT770 (3146-02), para evaluar: a) nanotubos de carbono funcionalizados y b) nanotubos de carbono funcionalizados posterior al procedimiento de inmovilización de la enzima MAO-A.

3.2.7. Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima MAO-A libre e inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A).

La evaluación de los valores cinéticos de la enzima MAO-A (K_m y V_{max}) en su forma soluble e inmovilizada se llevó a cabo por medio del método espectrofotométrico de actividad enzimática descrito previamente. Para la determinación de la actividad catalítica de la MAO-A inmovilizada se emplearon

100 µl de la suspensión MWCNT/MAO-A los cuales fueron resuspendidos en 800 µl de amortiguador de fosfatos (NaH₂PO₄, 10 mM y Na₂HPO₄, 10 mM, pH 6.5) y se les añadió 100 µl de bencilamina en agua destilada. Posteriormente se incubaron durante 10 minutos a 25° C, y se recuperó el sobrenadante por centrifugación para la posterior lectura de su absorbancia. Para las determinaciones con la enzima libre e inmivilizada emplearon soluciones de sustrato (bencilamina) a un intervalo de concentraciones de 10 mM a 100 mM. Los valores de los parámetros de cinética se obtuvieron mediante el modelo de Lineweaver- Burk:

$$\frac{1}{[v]} = \frac{Km}{Vmax} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{[Vmax]}$$

Dónde *v* es la actividad de la MAO-A y *S* es la concentración del sustrato.

3.2.8. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la MAO-A libre e inmivilizada en MWCNT (MAO-A/MWCNT).

Para evaluar el efecto del pH en la actividad catalítica de la MAO-A soluble e inmivilizada, se realizaron ensayos de actividad empleando distintas soluciones amortiguadoras en un intervalo de pH de 3 a 10. Se empleó solución acuosa de glicina (0.01 M) para el intervalo de pH 3-4, solución acuosa de acetato de sodio (0.01 M) para pH 4.5-6, solución amortiguadora de fosfatos (NaH₂PO₄, 0.01 M y Na₂HPO₄, 0.01 M) para pH 6.5-8, y solución amortiguadora de Tris (0.01 M) para pH 8.5-10. Posteriormente se obtuvo la actividad enzimática relativa (expresada como porcentaje, %) mediante el cálculo de la relación entre la actividad enzimática a distintos valores de pH y la actividad enzimática al pH óptimo.

$$\frac{\textit{Actividad a pH}_i}{\textit{Actividad a pH óptimo}} \times 100$$

3.2.9. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la MAO-A libre e inmivilizada en MWCNT (MAO-A MWCNT).

Para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad de la MAO-A se realizaron ensayos de actividad en los que la solución amortiguadora de fosfatos

(NaH_2PO_4 , 0.01 M y Na_2HPO_4 , 0.01 M) en la reacción se incubó a distintas temperaturas: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 y 70 °C. De igual manera los resultados se expresaron como la relación entre los valores de actividad enzimática a distintas temperaturas y la actividad enzimática a la temperatura óptima.

$$\frac{\textit{Actividad a temperatura}_i}{\textit{Actividad a temperatura óptima}} \times 100$$

3.2.10. Evaluación de la estabilidad térmica de la enzima MAO-A libre e inmovilizada (MWCNT/MAO-A).

La evaluación de estabilidad térmica de la enzima MAO-A en su forma libre e inmovilizada (MWCNT/MAO-A) se realizó al mantener en incubación 1 mL de solución de MAO-A (enzima (0.095 mg/mL; 1.05 U/ μl) o 1 mL de suspensión MWCNT/MAO-A (4 mg) en amortiguador de fosfatos a temperaturas de: 30, 35, 40 y 50 °C. Las muestras se incubaron en un baño térmico a temperatura controlada durante distintos periodos de tiempo. Se tomaron muestras regularmente para la determinación de la actividad enzimática de acuerdo al método previamente descrito.

3.2.11. Evaluación de la estabilidad operacional y de almacenamiento de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A).

El estudio de la estabilidad operacional de la enzima MAO-A inmovilizada (MWCNT/MAO-A) se llevó a cabo empleando una columna cromatográfica (Bio-Rad). Previo a su uso, la columna fue lavada tres veces con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (10 mM, pH 6.5) y posteriormente se empacó con 1 mL de la suspensión MWCNT/MAO-A (4 mg). Se llevó a cabo la reacción enzimática al agregar 900 μl de amortiguador de fosfatos y 100 μl de solución de bencilamina (50 mM) durante 10 minutos. Posteriormente se permitió la elución del solvente para su análisis espectrofotométrico y determinación de actividad enzimática. Al finalizar la reacción (considerada como 1 ciclo), se lavó la columna con 2 mL de

solución amortiguadora de fosfatos. Se llevaron a cabo 15 ciclos consecutivos empleando soluciones nuevas de amortiguador y bencilamina, repitiéndose el procedimiento de lavado previo a cada ciclo.

La evaluación de la estabilidad de almacenamiento de la enzima inmovilizada (MWCNT/MAO-A) se realizó al mantener 1 mL de la suspensión (4 mg) a 4 °C en amortiguador de fosfatos (10 mM, pH 6.5). Se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática de la muestra durante un periodo de 30 días.

3.2.12. Caracterización electrocinética de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared mediante potencial Z.

La afinidad de una enzima a una partícula no depende solamente del tipo de interacciones químicas que puedan existir, también depende de las interacciones electrostáticas que puedan formarse entre ambos elementos. Cuando una partícula acarreadora (soporte) y una proteína se encuentran en una fase líquida, estas desarrollan una carga eléctrica debida a sus características iónicas, y cada partícula se encuentra rodeada por una capa fija de iones con carga opuesta, denominada capa Stern, la cual a su vez está envuelta por una capa difusa de iones con distintas polaridades. En este caso el potencial eléctrico en la capa difusa disminuye exponencialmente conforme la distancia desde la superficie de la partícula incrementa. De acuerdo a esto, el potencial eléctrico que se encuentra a nivel donde la capa difusa y la capa de Stern se unen es denominado como potencial Zeta. Este valor es de mucha importancia para el estudio de la inmovilización enzimática ya que se conoce experimentalmente que cuando el potencial de las partículas se acerca a 0, éstas tienden a agregarse (Schultz y col., 2008).

Se realizó un estudio del potencial Zeta con el objetivo de evaluar la interacción de la enzima MAO-A acoplada a los nanotubos de carbono multipared y el sustrato serotonina. Para esto, se obtuvieron los valores de potencial zeta por medio del equipo electrocinético SurPASS para muestras sólidas, empleando una celda ajustable con una separación de placas de $100 \pm 2 \mu\text{m}$. Se usaron placas de

carbón vítreo como superficies conductoras, en las que se depositó el soporte con la enzima acoplada. Se evaluó el valor del potencial zeta del bioconjugado en presencia de distintas concentraciones de serotonina (50, 100, 200 y 400 ng/mL) en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 , 10 mM y Na_2HPO_4 , 10 mM) a pH 6,5.

Existe evidencia la cual indica que tanto el pH de las partículas, así como el de la fase líquida tienen un efecto en el valor del potencial Z y por lo tanto en el comportamiento que éstas tendrán cuando se encuentran juntas en solución, ya que influye en la carga neta de las partículas así como en el punto isoeléctrico de éstas. Debido a esto, se realizaron determinaciones de potencial Zeta evaluando el efecto del pH, empleando soluciones de serotonina (400 ng/mL) en amortiguadora de fosfatos (NaH_2PO_4 , 10 mM y Na_2HPO_4 , 10 mM) a pH de 6, 6.5, 7, 7.5 y 8.

3.2.13. Evaluación de MWCNT/MAO por microscopia electroquímica de barrido.

La microscopía electroquímica de barrido (SECM por sus siglas en inglés Scanning Electrochemical Microscopy) es una técnica que incorpora componentes electroquímicos, posicionadores y controladores computarizados. Durante el experimento una corriente es aplicada a través de un ultramicroelectrodo inmerso en una solución electrolítica situado a poca distancia de un sustrato, el cual puede ser un material conductor, semiconductor o aislante. Tanto el ultramicroelectrodo (que funciona como electrodo de trabajo) como el sustrato, forman parte de una celda electroquímica que a su vez incorpora un electrodo de referencia, auxiliar, y en algunos casos un electrodo de trabajo secundario. El ultramicroelectrodo es usado para hacer un barrido de la superficie del sustrato, registrando las respuestas electroquímicas generadas a nivel del ultramicroelectrodo o en el propio sustrato, generando información sobre los fenómenos que suceden entre ambas fases (Mohamad et al., 2015). La SECM ha mostrado un gran potencial para el estudio de biomoléculas inmovilizadas, así como en el estudio de reacciones biológicas a nivel de la interfaz electrodo-sustrato. Por otra parte, esta técnica puede ser empleada para detectar especies electroactivas generadas por

enzimas rédox inmovilizadas, permitiendo determinar la cinética de la transferencia de electrones ocurrida en una determinada reacción (Lu, Wang, & Liu, 2007; Zigah, Pellissier, Fabre, Barrière, & Hapiot, 2009).

La actividad enzimática de la MAO-A acoplada a los nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A) se evaluó mediante microscopía electroquímica de barrido. Se empleó un microscopio de barrido BioLogic modelo ac-SECM/SECM470, con una configuración de cuatro electrodos, la cual consistió en una barra de grafito como electrodo auxiliar, un electrodo de Ag/AgCl (3 M KCl) como referencia, un ultramicroelectrodo de platino (25 μm diámetro) como electrodo de trabajo y un electrodo de grafito como electrodo de trabajo secundario. En la superficie del electrodo secundario se depositó el material (MWCNT/MAO-A) para su evaluación a 25 °C. La distancia entre el ultramicroelectrodo y el electrodo secundario fue de 34 μm . La evaluación de la actividad catalítica de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT se aplicó un potencial -0.7 V en el electrodo de trabajo (MWCNT/MAO-A), para promover la reducción del peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente. Los electrolitos empleados para las determinaciones consistieron en dos soluciones de amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 , 10 mM y Na_2HPO_4 , 10 mM, pH 6.5) con concentraciones de 200 ng/mL y 500 ng/mL de serotonina.

3.2.14. Modificación del electrodo serigrafiado de carbono con la MAO-A inmovilizada en los nanotubos de carbono multipared.

Para el desarrollo del bioelectrodo se empleó un electrodo serigrafiado de carbono (ESC, Dropsens, España) cuya superficie (2 cm x 2cm) se limpió mediante sonicación en un baño de acetona al 20 % en agua desionizada. Posteriormente se le realizaron dos lavados con agua desionizada y un lavado con etanol al 96 % y se dejó secar a temperatura ambiente (25° C). En la superficie del electrodo fueron depositadas dos gotas (aproximadamente 2 μl) de la MAO-A inmovilizada en los nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A), y se secó a temperatura ambiente. Finalmente el electrodo modificado (ESC/MWCNT/MAO-A) fue sometido a tres lavados con una solución de PBS 20 mM para eliminar el

soporte que no se adsorbió a su superficie, y se almacenó en PSB 20 mM a 4° C hasta la realización de las pruebas electroquímicas.

3.2.15. Preparación del fluido corporal simulado.

Un fluido corporal simulado (FCS) es una solución que contiene concentraciones de iones similares a las presentes en el plasma humano. Este tipo de solución ha sido ampliamente utilizada en para procesos de evaluación *in vitro* de biomateriales y en la caracterización electroquímica de bioelectrodos (Kokubo & Takadama, 2006). Para llevar a cabo la caracterización del bioelectrodo se preparó una solución de fluido simulado al agregar en 1 L de agua desionizada los reactivos que se indican en la tabla 1:

Tabla 2. Reactivos requeridos para la preparación de fluido corporal simulado (FCS) (Kokubo & Takadama, 2006).

	Reactivo	Ion	Concentración (mM)	Cantidad
1	NaCl	Na ⁺	142	8.035 g
2	NaHCO ₃	HCO ₃ ⁻	27	0.355 g
3	KCl	K ⁺	5	0.225 g
4	K ₂ HPO ₄	HPO ₄ ²⁻	1	0.231 g
5	MgCl ₂	Mg ²⁺	1.5	0.311 g
6	HCl (1M)	Cl ⁻	103	39 mL
7	CaCl ₂	Ca ²⁺	2.5	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	SO ₄ ²⁻	0.5	0.072 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	-	-	6.118 g

El pH de la solución se ajustó a 7.4 con HCL (1M) y se almacenó a 10° C, hasta por 1 mes.

3.2.16. Caracterización electroquímica del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A).

En los sistemas de transducción electroquímica la detección del analito ocurre cuando se consume o se libera una especie electro-activa durante una reacción catalítica de óxido-reducción, y posteriormente dichas especies son

capturadas por el transductor (electrodo) y convertidas en una señal eléctrica; en un fenómeno denominado “transducción de electrones”. En el caso del bioelectrodo desarrollado en este trabajo la detección del analito (serotonina) se llevó a cabo mediante la caracterización de la señal proveniente de la oxidación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producido por la desaminación de la serotonina, a nivel del electrodo serigrafiado de carbono, mediante las técnicas de voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial.

La voltametría cíclica se ha convertido en una de las técnicas electroanalíticas más empleadas en diversas áreas de la química. Su uso se ve limitado en aplicaciones cuantitativas, sin embargo, es muy útil para el estudio de procesos de óxido-reducción, para la evaluación de la formación de intermediarios en una reacción, y para determinar la estabilidad de los productos. Ésta técnica se basa en la variación del potencial aplicado a un electrodo de trabajo, en dirección hacia delante y en dirección inversa (a una velocidad de barrido determinada), mientras se registra la corriente generada. Por ejemplo, un barrido inicial puede tener dirección negativa, y en un punto determinado cambiar su dirección de manera inversa, y ahora dirigirse en sentido positivo. Estas variaciones del potencial pueden realizarse de manera que se complete un ciclo o una serie de ciclos. Los parámetros relevantes en la voltamperometría cíclica son los potenciales máximos (E) y las corrientes máximas (I) de los picos anódicos y catódicos generados (Bertrand, 1998).

Con el objetivo de demostrar la capacidad electrocatalítica del bioelectrodo, conformado por el electrodo serigrafiado de carbono modificado con la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (ESC/MWCNT/MAO-A), se realizaron mediciones de voltamperometría cíclica a temperatura ambiente ($25^\circ C$) por medio de un potenciostato (Modelo VSP, Bio-Logic, Francia), empleando un conector modelo DSC (Dropsens, España) para adaptar el bioelectrodo al potenciostato.

Como primera aproximación, los registros se llevaron a cabo en presencia de una solución estándar de serotonina (400 ng/mL) en amortiguador de fosfatos (pH 6.5,

0.1 M) en una solución de serotonina (400 ng/mL) en fluido corporal simulado (pH 7.4); utilizando un intervalo de potencial eléctrico de 0.1 V a -0.6 V vs Ag/AgCl y una velocidad de barrido de 20 mV/s. Las señales generadas por el bioelectrodo fueron analizadas por medio del programa EC-Lab.

Posteriormente se evaluó la capacidad del electrodo para la detección de serotonina por medio de pruebas de voltamperometría de pulso diferencial. A diferencia de la voltamperometría cíclica, en la voltamperometría de pulso diferencial el barrido de potencial se hace mediante una serie de pulsos de amplitud pequeña (10 a 100 mV), los cuales se superponen formando lo que se denomina un “tren de pulsos”. En esta técnica la corriente es medida en dos puntos para cada pulso, justo antes de la aplicación del pulso y al final de este. La diferencia entre ambas mediciones da un valor de corriente el cual es graficado contra un valor de potencial base. El valor máximo de corriente de la señal generada corresponde directamente a la concentración de la especie electroactiva (analito) en la muestra (Bertrand, 1998).

Las pruebas se llevaron a cabo en el sistema electroquímico previamente descrito, estableciendo un intervalo de potencial de -0.2 V a 0.6 V vs Ag/AgCl, una velocidad de barrido de 20 mVs⁻¹, una amplitud de pulso de 100 mV, un periodo de pulso de 500 ms y un tiempo de estabilización de 60 s. Se registraron las respuestas amperométricas del bioelectrodo en presencia de 6 diluciones seriadas de serotonina en amortiguador de fosfatos (pH 6.5, 0.1 M), a concentraciones de 200, 400, 600, 800, 1000, 2500 y 5000 ng/mL. Posteriormente se hicieron registros de las respuestas del bioelectrodo en presencia de soluciones de serotonina a las mismas concentraciones pero en fluido corporal simulado (pH 7.4)

Los valores de las señales amperométricas que se obtuvieron fueron empleadas para la construcción de una curva de calibración en la que se graficó la corriente versus la concentración de serotonina de cada solución. Esta curva de calibración permito conocer el intervalo lineal de concentración que puede detectar el bioelectrodo, así como el límite de detección, o la cantidad más pequeña del analito que puede ser detectada pero no cuantificada de manera exacta.

El límite de detección se define como:

$$3 \times \sigma/m$$

Donde σ es la desviación estándar de tres registros correspondientes a la concentración más baja evaluada y m la pendiente de la ecuación lineal de la curva de calibración.

Por otra parte el límite de cuantificación, es decir, la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificada con adecuada exactitud se define como:

$$10 \times \sigma/m$$

3.2.17. Estudios operacionales del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A).

Con el objetivo de evaluar el rendimiento operacional del bioelectrodo construido se llevaron a cabo estudios de estabilidad de ensayo y de interferencias en el ensayo.

El propósito del estudio de estabilidad de ensayo es examinar el rendimiento del bioelectrodo durante la realización de diversos ensayos. En este estudio se analizaron las respuestas amperométricas del bioelectrodo generadas por soluciones de serotonina en FCS a distintas concentraciones, realizando un paso intermedio de lavado entre cada registro. Las pruebas fueron realizadas en el sistema electroquímico previamente descrito; en el que el bioelectrodo se sumergió en tres soluciones de serotonina en FCS (pH 7.4) a concentraciones de 400 ng/mL, 600 ng/mL y 800 ng/ mL. Las respuestas amperométricas generadas por cada solución de serotonina fueron registradas durante tres ciclos, realizando un lavado del bioelectrodo con FCS (pH 7.4) entre cada registro (ciclo).

El estudio de interferencias en el ensayo es esencial si se pretenden realizar análisis con muestras biológicas reales. Para esto se evaluó la influencia de otras aminas biogénicas degradables por la MAO-A como dopamina y noradrenalina en la respuesta amperométrica del bioelectrodo. La influencia de estos compuestos fue evaluada al analizar las respuestas amperométricas de dos

soluciones estándar de serotonina en FCS (concentraciones de 50 ng/mL y 100 ng/mL), así como las respuestas amperométricas de estas soluciones con la misma concentración de dopamina y noradrenalina respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Estudio de cinética de acoplamiento de la enzima MAO-A en nanotubos de carbono multipared.

El 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) es un agente intercalador ampliamente usado para la conjugación enzimática, debido a que permite la formación de enlaces de tipo amida estables entre las enzimas y nanotubos de carbono funcionalizados con grupos carboxilo (Gao y Kyratzis, 2008). Para evaluar el rendimiento de la inmovilización de la enzima MAO-A en nanotubos de carbono multipared por medio del método que de EDC se llevó a cabo un ensayo de cinética de acoplamiento, que consistió en la cuantificación de la proteína total presente en el sobrenadante de la suspensión durante el procedimiento de inmovilización. Este ensayo permite evaluar parámetros relevantes en el procedimiento de inmovilización como: tiempo de acoplamiento y porcentaje de rendimiento, es decir, la cantidad de enzima acoplada en el soporte. La inmovilización de la enzima se realizó empleando 4 mg de MWCNT. Como se puede apreciar en la figura 6, el acoplamiento de la enzima a los MWCNT se completó durante 6 minutos de incubación, lográndose acoplar 19.98 μg de MAO-A por mg de soporte, significando un 81 % de rendimiento de inmovilización. Por otra parte los ensayos de actividad mostraron que la enzima inmovilizada retuvo un 94.3 % de su actividad catalítica (3,79 U/mg) en comparación con la actividad de la enzima soluble (4,08 U/mg). En un trabajo similar reportado por Costa (2015), donde se realizó la inmovilización de la enzima lacasa en MWCNT por medio de su conjugación con EDC, reporta un 99.7 % de rendimiento de inmovilización en condiciones óptimas de concentración de EDC y NHS. Los resultados obtenidos en este trabajo para la inmovilización de la MAO-A en MWCNT indican que la enzima se acopló al soporte en un buen porcentaje, el cual

podría mejorarse al optimizar parámetros como la concentración de EDC y NHS empleadas durante la conjugación de la MAO-A.

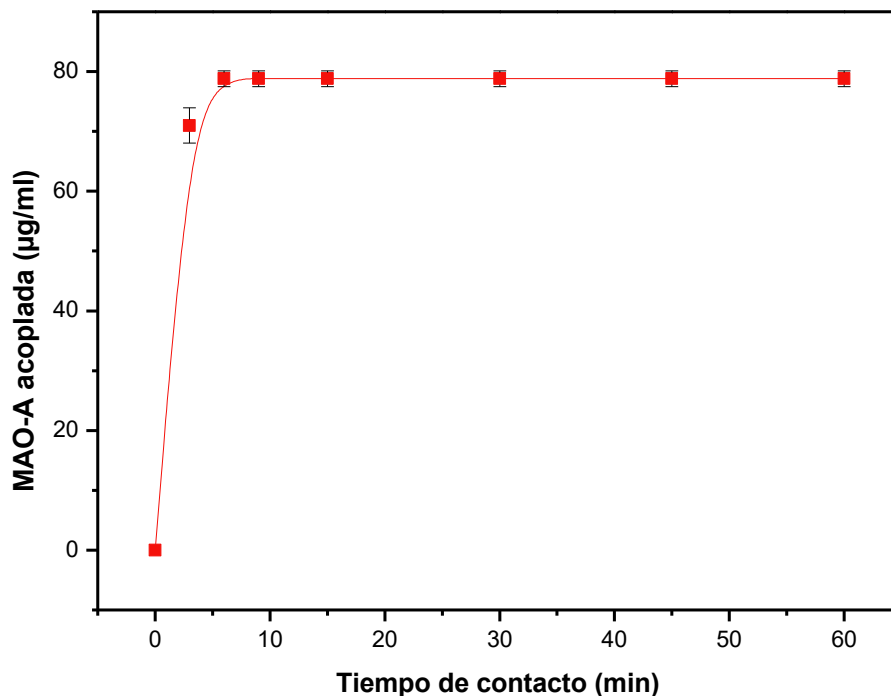


Figura 6. Representación gráfica de la cinética de acoplamiento de la enzima MAO-A en los MWCNT, mediante unión covalente mediada por EDC.

4.2. Análisis de morfología de superficie de MWCNT/MAO-A mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

En la figura 7 se muestran micrografías por medio de microscopía electrónica de transmisión de los nanotubos de carbono multipared funcionalizados (a) y posterior al procedimiento de inmovilización de la enzima MAO-A (b). En la figura 7 (a) se puede apreciar el cambio en la morfología de los nanotubos de carbono, como consecuencia del procedimiento de funcionalización observando su estructura tubular, los cuales adoptaron un arreglo en forma de entramado. Este cambio en la estructura de los MWCNTS es debido a que durante el proceso de funcionalización son sometidos a fuerzas mecánicas (baño ultrasónico), así como a un tratamiento ácido, lo que promueve su ruptura y

acortamiento. Por otra parte, la figura 7 (b) muestra el cambio en la superficie de los nanotubos de carbono debido a la inmovilización de la enzima MAO-A. La micrografía con un aumento de x500 000 (figura 7b') muestra la presencia de una capa fina en la superficie de la estructura de los nanotubos de carbono, que posiblemente indique el acoplamiento de la ENZIMA MAO-A a lo largo de las paredes que conforman su estructura tubular (flechas figura 7 b').

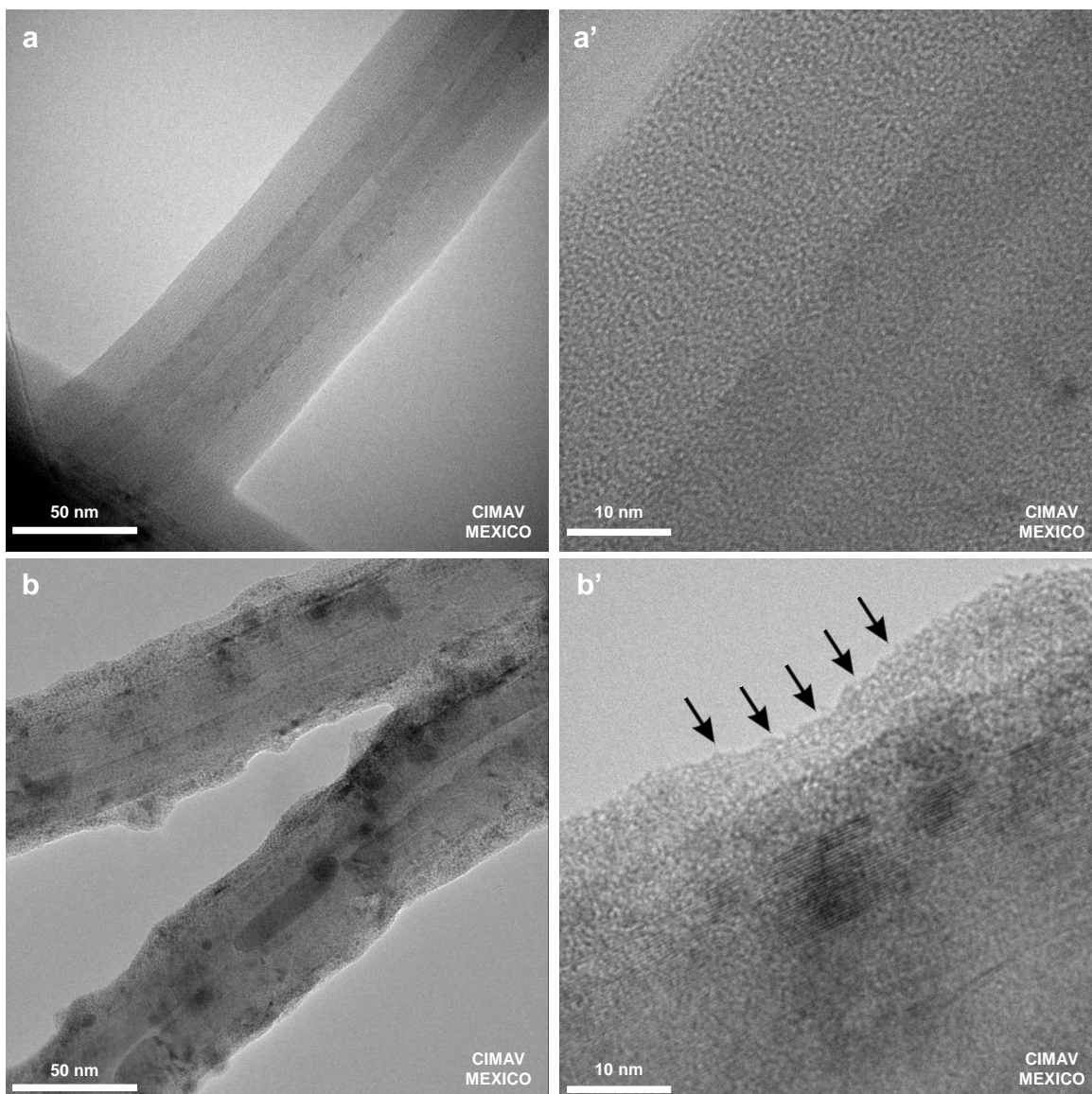


Figura 7. Micrografías por microscopía electrónica de transmisión. (a) nanotubos de carbono multipared funcionalizados, (b) nanotubos de carbono posterior a la inmovilización de la enzima MAO-A. (') Aumento de x500 000.

4.3. Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima MAO-A libre e inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A).

El estudio de los parámetros cinéticos de la enzima MAO-A permite determinar una posible modificación en la dinámica catalítica de una enzima, como consecuencia del procedimiento de inmovilización, a través de la evaluación de la aparente constante de especificidad de Michaelis-Menten (K_M) y velocidad máxima de reacción (V_{max}). Para esto, se obtuvieron los valores de velocidad inicial (V_o) referentes a la oxidación de distintas concentraciones de bencilamina (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mM) usando la enzima MAO-A libre e inmovilizada en MWCNT. La figura 8 (a) muestra los valores de velocidad inicial de reacción obtenidos para la enzima MAO-A libre e inmovilizada en MWCNT, apreciándose que tanto la enzima libre como la inmovilizada muestran un comportamiento que sigue el modelo cinético de Michaelis-Menten.

En la figura 8 (b) se muestra el ajuste de los datos mediante el modelo de Lineweaver-Burk. De acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burke, se obtuvieron valores de K_M de 76.71 mM para la enzima MAO-A libre y 39.44 mM para la MAO-A inmovilizada en MWCNT. Por otra parte, los valores de V_{max} fueron de 1.35 mM/s y 1.97 mM/s para la enzima libre e inmovilizada en MWCNT respectivamente. Estos datos muestran la presencia de cambios en el perfil cinético de la enzima inmovilizada en MWCNT, específicamente, existe una disminución del 51.4 % en el valor de la constante de Michaelis-Menten, lo que indica un mejoramiento en la afinidad de la MAO-A inmovilizada a su sustrato (bencilamina), así como en su oxidación. Ésta modificación en la constante de especificidad de la enzima inmovilizada en MWCNT puede atribuirse a que la inmovilización no generó cambios en la conformación, ni en la estructura del centro activo de la enzima. Estas observaciones contrastan con lo publicado por Verma y colaboradores, quienes reportan un aumento de 4 veces en el valor de K_m de la enzima lipasa inmovilizada covalentemente por conjugación con glutaraldehído (Verma y col., 2013). Por otra parte, en el trabajo de Markosova y

colaboradores se encontró que la enzima MAO-N-D5 presentó un aumento de 12.5 % en su K_M a causa de su inmovilización en gel de poli (vinil) alcohol.

En conjunto, los datos obtenidos del estudio de cinética de la enzima inmovilizada en MWCNT indican que la inmovilización covalente por medio del agente intercalador EDC promueve una mejora en la afinidad de la enzima hacia su sustrato (bencilamina) así como en la velocidad de catálisis de la enzima, propiedades que resultan ser de gran relevancia para la aplicación en el desarrollo de bioelectrodos y biosensores (Putzbach & Ronkainen, 2013).

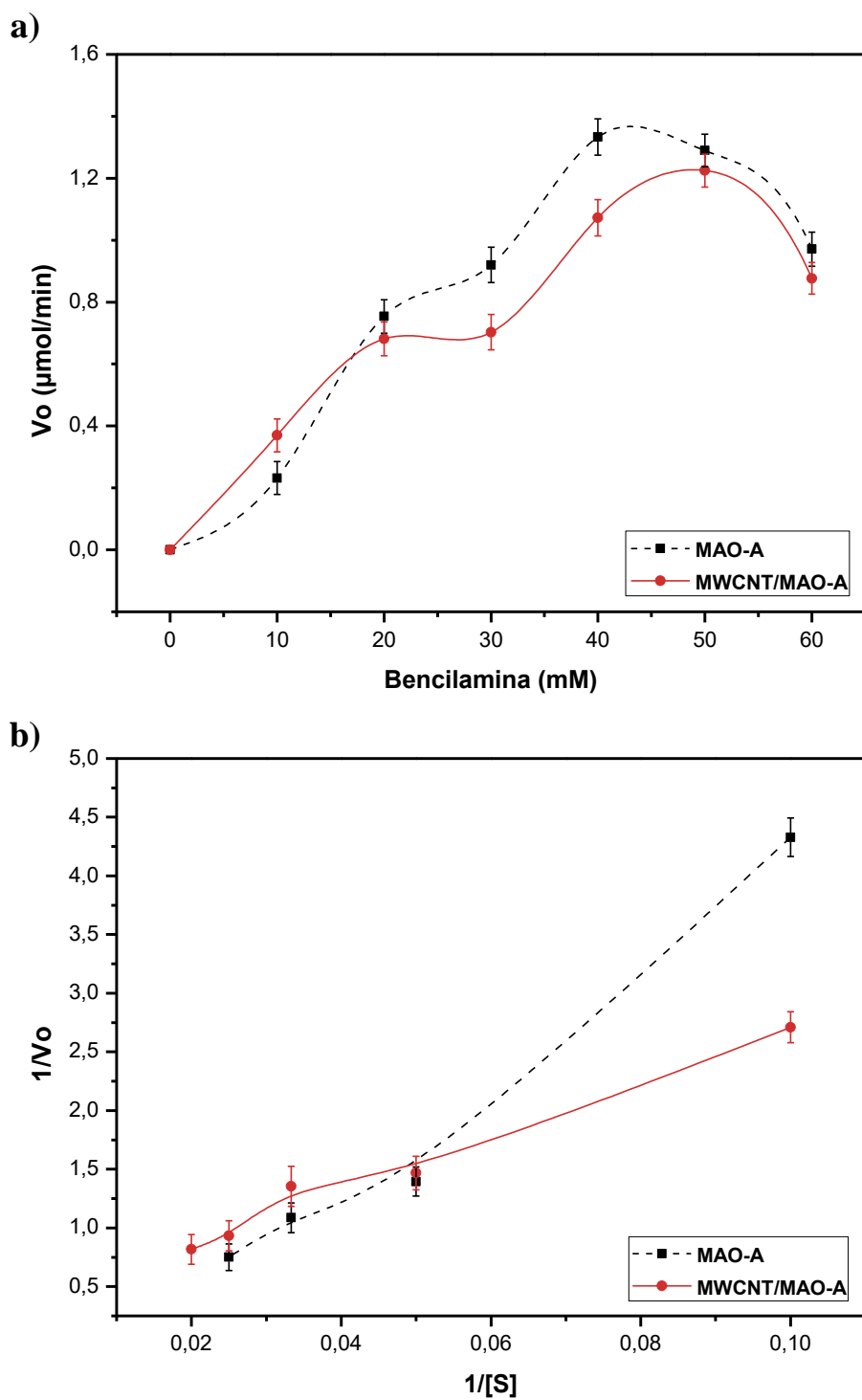


Figura 8. Representación de las velocidades iniciales de reacción de la enzima MAO-A libre e inmovilizada, para la desaminación de bencilamina (10-100 mM) (a). Ajuste con el modelo de Lineweaver-Burk de los datos de velocidad inicial de reacción (b). Los datos se expresan como el promedio de tres mediciones.

4.4. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT.

El valor de pH óptimo para la actividad de una enzima es uno de los principales parámetros bioquímicos que se ven alterados por el procedimiento de inmovilización, debido a que la fuerza iónica en el ambiente de la enzima puede influir en la formación de los enlaces intermoleculares, así como los enlaces formados entre la enzima y el soporte. Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad catalítica de la MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A), así como en su forma libre (soluble), se realizaron ensayos de actividad empleando un intervalo de pH de 4 - 8.5 a 25 °C (figura 9). Para llevar a cabo una comparación entre ambas enzimas, los resultados se representan en forma de actividad relativa (%), tomando como 100 % el valor máximo de actividad observado en los ensayos. En el caso de la enzima MAO-A libre a pH ácidos (4 y 4.5) se observó un bajo porcentaje de actividad catalítica, la cual incrementó a partir del pH 5, presentando su máxima actividad a pH 6.5; mientras que a valores de pH mayores que 7 se apreció una disminución significativa de la actividad. Por su parte, la enzima MAO-A inmovilizada en los MWCNT mostró un buen porcentaje de actividad a pH 4 y un valor de pH óptimo de 6.5 para la desaminación oxidativa de bencilamina, siendo el mismo valor de pH óptimo para la MAO-A en su forma libre. Por otra parte, se pudo apreciar que MAO-A inmovilizada mantuvo un porcentaje de actividad significativo a pH alcalinos: 7, 7.5, 8 y 8.5 (94.5 %, 93.3 %, 91.2 % y 90.4 % de MWCNT/MAO-A versus 80.2 %, 55.7 %, 51.6 % y 24.6 % de MAO-A libre).

Trabajos de inmovilización de otras enzimas en MWCNT reportan comportamientos similares en el perfil de pH; por ejemplo, el estudio publicado por Verma y colaboradores (2013) donde se inmovilizó covalentemente la enzima lipasa en MWCNT empleando glutaraldehído reporta que la lipasa inmovilizada no presentó un cambio en su pH óptimo, comparada con la enzima en forma libre (pH de 9), además se observó que la enzima inmovilizada en MWCNT mantuvo un mayor porcentaje de actividad a pH ácidos (Verma et al., 2013). Por otra parte el

trabajo publicado por Markov y colaboradores (2016) donde se inmovilizó una monoamino oxidasa de *Aspergillus niger* (MAO-N-D5) en gel de poli (vinil) alcohol describió que la MAO-N-D5 inmovilizada presentó un mayor porcentaje de actividad a pH alcalinos (pH de 8 y 8.5) (Markošová et al., 2016). En conjunto, los resultados obtenidos del estudio del efecto del pH en la actividad catalítica de la MAO-A inmovilizada en MWCNT indican que el acoplamiento a los MWCNT mejora la estabilidad de la enzima a distintos valores de pH, específicamente a pH alcalinos, este comportamiento puede deberse a que el confinamiento covalente de la enzima a la estructura de los nanotubos de carbono previene la ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos en la enzima, promoviendo el mantenimiento de su conformación (Saifuddin, Raziah, & Junizah, 2013)

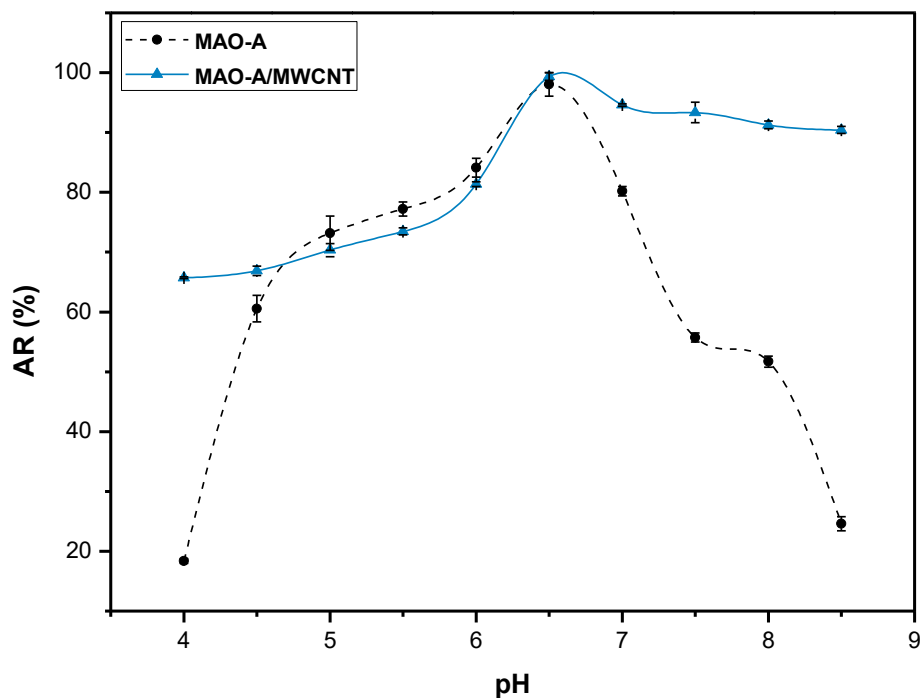


Figura 9. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la MAO-A libre e inmovilizada en MWCNT. Los valores son representados como actividad relativa (AR, %) versus el pH de reacción, a 25 °C.

4.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT.

Las enzimas, como la MAO-A, son moléculas que se ven afectadas por la temperatura, la cual puede modificar su conformación y alterar el establecimiento del complejo enzima-sustrato, influyendo en su actividad catalítica. Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la enzima MAO-A inmovilizada y en su forma libre, se llevaron a cabo ensayos de actividad a distintas temperaturas (15 - 60° C). En la figura 10 se puede apreciar que la MAO-A en forma libre presentó una temperatura óptima de 30 °C, asimismo, la enzima retuvo un buen porcentaje de actividad a 35 y 40 °C (92.8 % y 90 % respectivamente). En el caso de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT se observó un incremento de la temperatura óptima (35 °C), apreciándose que la enzima inmovilizada mostró una actividad significativa a temperaturas de 40, 45 y 50 °C (96.5 %, 95.2 % y 81.6 %). Cabe señalar que estos valores fueron significativamente mayores a los mostrados por la enzima libre (46.6 %, 41.6 % y 36.1 % respectivamente). Este efecto de estabilidad corresponde a lo observado por el grupo de Ji (2010) quienes observaron que la enzima lipasa inmovilizada covalentemente en MWCNT con EDC retuvo un buen porcentaje de actividad en un intervalo de temperatura de 40 – 55 °C (76 – 82 % de actividad) (Ji, Tan, Xu, & Feng, 2010). Asimismo el reporte de Markošová y colaboradores indicó que la enzima MAO-N-D5 presentó un incremento en su actividad a temperaturas altas en comparación con la enzima soluble (Markošová et al., 2016). El efecto de estabilidad a temperaturas altas observado en la MAO-A inmovilizada en MWCNT puede ser atribuido a las propiedades intrínsecas de los nanotubos de carbono, ya que son materiales con una alta eficiencia para la transferencia de calor, una propiedad que permite que la enzima acoplada conserve su conformación a altas temperaturas (Saifuddin et al., 2013).

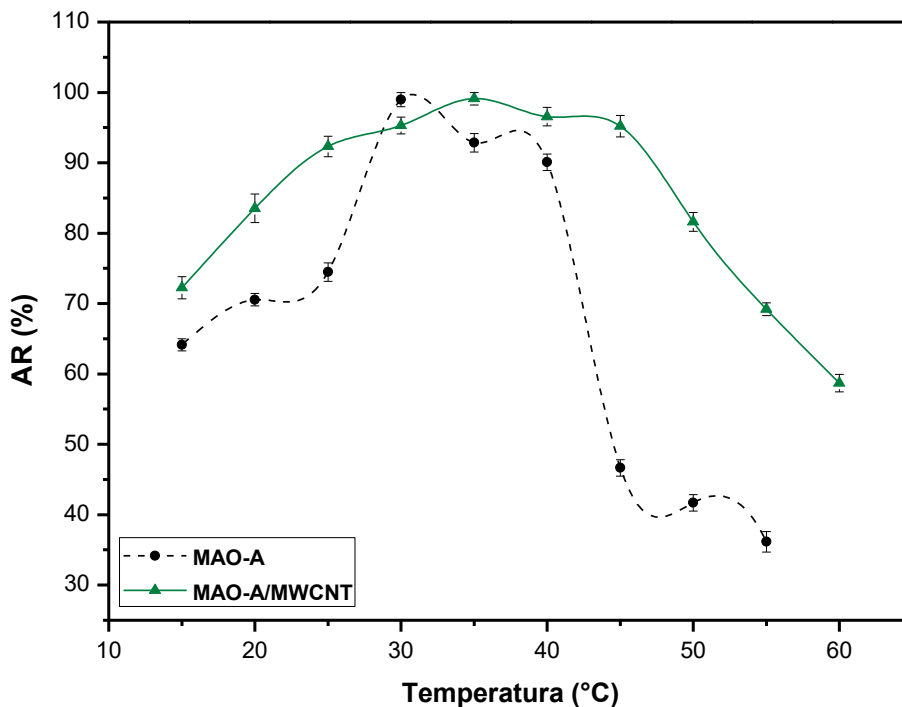


Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la MAO-A libre e inmovilizada en MWCNT. Los valores son representados como actividad relativa (AR, %) versus la temperatura de reacción, a pH de 6.5.

4.6. Evaluación de la estabilidad térmica de la enzima MAO-A libre e inmovilizada (MWCNT/MAO-A).

Con el objetivo de evaluar la existencia de cambios en la estabilidad térmica de la enzima MAO-A promovidos por la inmovilización en MWCNT, se llevaron a cabo ensayos de actividad en los que se mantuvo una suspensión de enzima inmovilizada (MWCNT/MAO-A), y una solución de la enzima en incubación a un intervalo de temperaturas de 30 a 50 °C. Los resultados experimentales son expresados como actividad relativa (%). Como se puede apreciar en la figura 11, a la temperatura de 30 °C la MAO-A inmovilizada presentó valores de actividad relativa similares a la enzima libre a lo largo del periodo de tiempo examinado, apreciándose un ligero aumento de actividad durante 120, 180, y 240 minutos (85.8 %, 81.4 % y 70.4 % de MWCNT/MAO-A versus 82.8 %, 78.1% y 66,9 % de MAO-A libre). Para la temperatura de 35 °C, la MAO-A inmovilizada conservó una

mayor actividad relativa en comparación con la enzima libre durante los periodos de 60 y 90 minutos de incubación (83.4 % y 79.7 % de MWCNT/MAO-A versus 75.6 % y 71.1 % de MAO-A libre), a partir de este periodo se observó una disminución su actividad relativa en una magnitud similar a la observada en la enzima soluble. De igual manera, en el caso de la temperatura de 40°C la MAO-A inmovilizada retuvo una mayor porcentaje de actividad relativa durante 60 y 90 minutos de incubación comparado con la enzima libre (66.5 % y 62.5 % de MWCNT/MAO-A versus 55.3 % y 55.7 % de MAO-A libre), la cual disminuyó posterior a este periodo.

Diversos reportes indican que la inmovilización enzimática en nanotubos de carbono multipared por medio de conjugación con EDC incrementa la estabilidad térmica de la enzima lipasa conjugada significativamente a temperaturas de 60 y 70 °C (Ji et al., 2010; Verma et al., 2013). En el caso de la enzima MAO-N-D5 inmovilizada se reportó que esta retiene un porcentaje de actividad mayor que la enzima soluble a en un intervalo de temperatura de 35 – 55 °C (Markošová et al., 2016). Cabe señalar que este comportamiento ha sido reportado de mayor manera en trabajos donde la estrategia de inmovilización en MWCNT es de tipo covalente, en el caso de otros tipos de inmovilización, como la adsorción, se han observado pérdidas en la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada, debido al desprendimiento de la enzima del soporte (Tavares et al., 2015).

Una de las explicaciones para éste efecto residen en la naturaleza de la conjugación covalente; la enzima al estar anclada en distintos puntos a la estructura de los nanotubos de carbono, genera rigidez en su estructura así como su confinamiento, impidiendo su plegamiento y por lo tanto promoviendo su estabilización a temperaturas altas (Wang, 2006)

Por último, a la temperatura de 50 °C se apreció una disminución significativa en la actividad relativa de la enzima MAO-A inmovilizada y soluble, posterior a 10 minutos de incubación, conservando solo el 21 % y 28 % de su actividad. A altas temperaturas se aprecia una disminución significativa de la

actividad, debido a la inactivación de la enzima tanto en su forma libre como inmovilizada, un efecto atribuido a la vibración de los átomos de la enzima, provocado por la temperatura, lo que resulta en la ruptura de enlaces y en la alteración de su estructura tridimensional (Tavares et al., 2015).

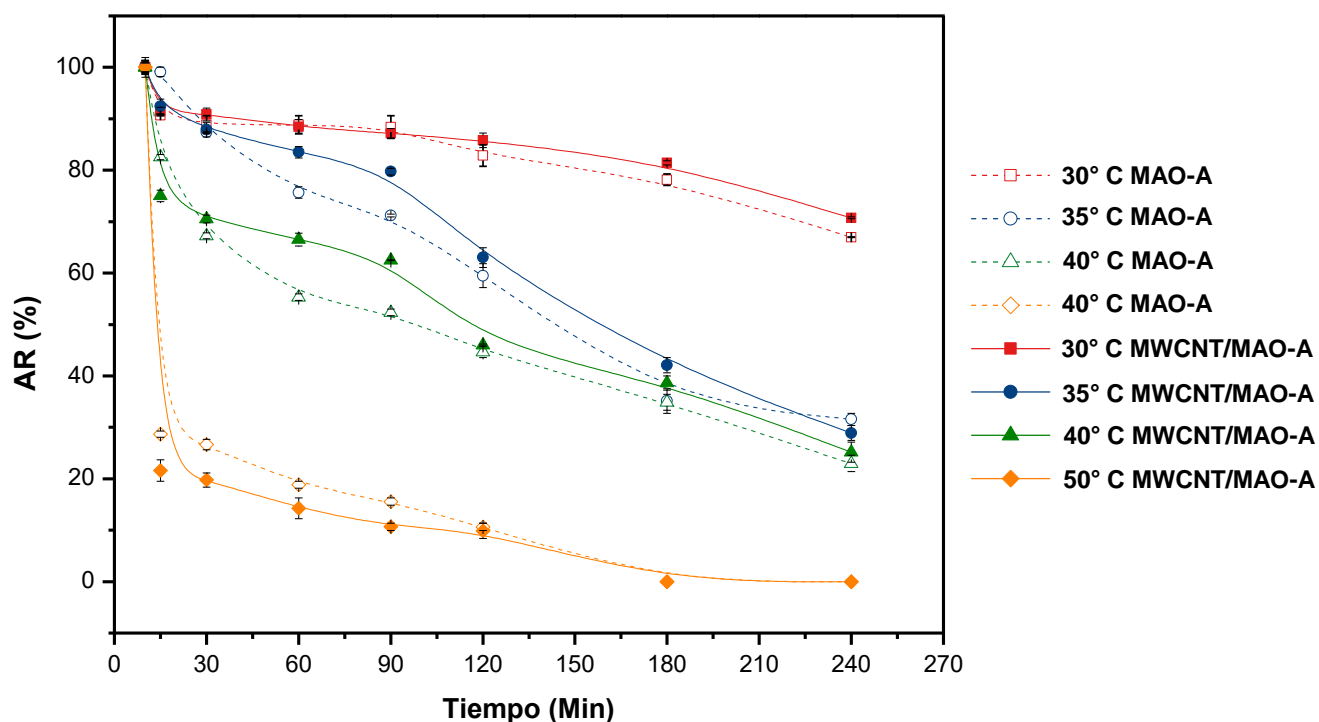


Figura 11. Estudio de estabilidad térmica de la enzima MAO-A libre (MAO-A) e inmovilizada (MWCNT/MAO-A) a temperaturas de 30 - 50 °C. Los valores son representados como actividad relativa (AR, %) versus la temperatura de reacción, a pH de 6.5. Las barras indican el error estándar de la media de tres determinaciones.

4.7. Evaluación de la estabilidad operacional y de almacenamiento de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A).

Una de las ventajas que ofrece el procedimiento de inmovilización de una enzima es la capacidad que presenta para ser reutilizada, denominada estabilidad operacional. Esta característica permite que una enzima pueda ser recuperada del medio de reacción mediante métodos de separación físicos, como la

centrifugación o filtración, permitiendo que pueda volver a emplearse por varios ciclos de reacción, reduciendo los costos de operación (Sassolas et al., 2012). El ensayo de estabilidad operacional de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT permite obtener información relevante sobre la resistencia y efectividad que posee el conjugado enzima-soporte durante ciclos consecutivos de biocatálisis. En este caso el biocatalizador MWCNT/MAO-A fue empacado en una columna cromatográfica en la cual se llevó a cabo 15 ciclos de desaminación oxidativa, empleando solución amortiguadora de fosfatos y bencilamina.

En la figura 12 se presentan de forma gráfica los valores de actividad relativa obtenidos durante los 15 ciclos del ensayo. Se puede apreciar que la enzima inmovilizada mantuvo un porcentaje de actividad mayor al 80 % hasta el ciclo 3 de reacción, posteriormente, durante los ciclos 4, 5 y 6 la enzima inmovilizada conservó de manera constante el 72 % de la actividad inicial. Durante el ciclo 7 se observó una disminución de la actividad relativa de la enzima, la cual alcanzó un 54.4 %; dicha disminución se apreció durante los ciclos consecuentes hasta llegar a 13.1 % durante el ciclo 11. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Verma y colaboradores, quienes encontraron que la enzima lipasa inmovilizada covalentemente en nanotubos de carbono conservó 80 % de su actividad hasta el ciclo 4. Sin embargo, a diferencia del presente trabajo, la lipasa inmovilizada retuvo 60 % de su actividad hasta el ciclo 10 (Verma et al., 2013)

Es de importancia señalar que la disminución de la actividad observada durante el ensayo no se atribuyó al desprendimiento de la enzima de su soporte, ya que no se detectó la presencia de proteína en la mezcla de reacción ni en las soluciones de lavado. En este caso, la disminución de la actividad enzimática pudo deberse a una pérdida de la capacidad catalítica de la propia enzima. Los datos obtenidos de este estudio indican que la enzima MAO-A inmovilizada de forma covalente en nanotubos de carbono multipared presenta una buena capacidad de reuso.

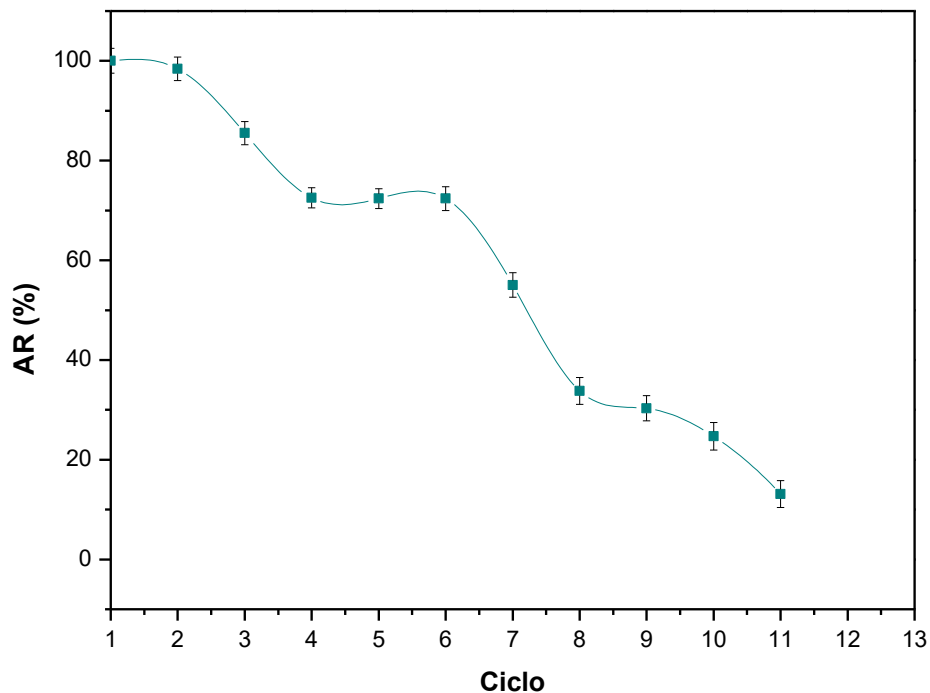


Figura 12. Ensayo de estabilidad operacional de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT. La actividad de desaminación oxidativa fue determinada mediante el método reportado por Dunn y col., 2008, empleando bencilamina como sustrato a 25° C. Las barras indican el error estándar de la media de tres determinaciones.

Por último, se evaluó la estabilidad en almacenamiento de la enzima MAO-A libre e inmovilizada mediante su mantenimiento a 4° C y determinación de su actividad catalítica. Como se puede apreciar en la figura 13, la MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared mantuvo un buen porcentaje de actividad (64.8 % a 63 %) en un periodo de 6 a 13 días de almacenamiento. Dicho mantenimiento de la actividad catalítica fue mayor que el mostrado por la enzima en forma soluble, el cual disminuyó 37.7 % a 33.2 % durante el mismo período. Como se ha mencionado anteriormente, el comportamiento de la enzima inmovilizada en nanotubos de carbono puede explicarse de acuerdo a la naturaleza del acoplamiento de la enzima al soporte, ya que la unión es de tipo covalente, la formación de los enlaces entre la enzima y el sustrato pueden promover el mantenimiento de la estructura a temperaturas bajas, afectando en

menor grado su actividad catalítica. En caso contrario, la enzima al estar en forma soluble es más susceptible a los cambios de temperatura en su microambiente, además de que en la solución están presentes compuestos como lo son: glicerol, sacarosa, EDTA, los cuales pueden interferir con la actividad catalítica de la enzima a largo plazo.

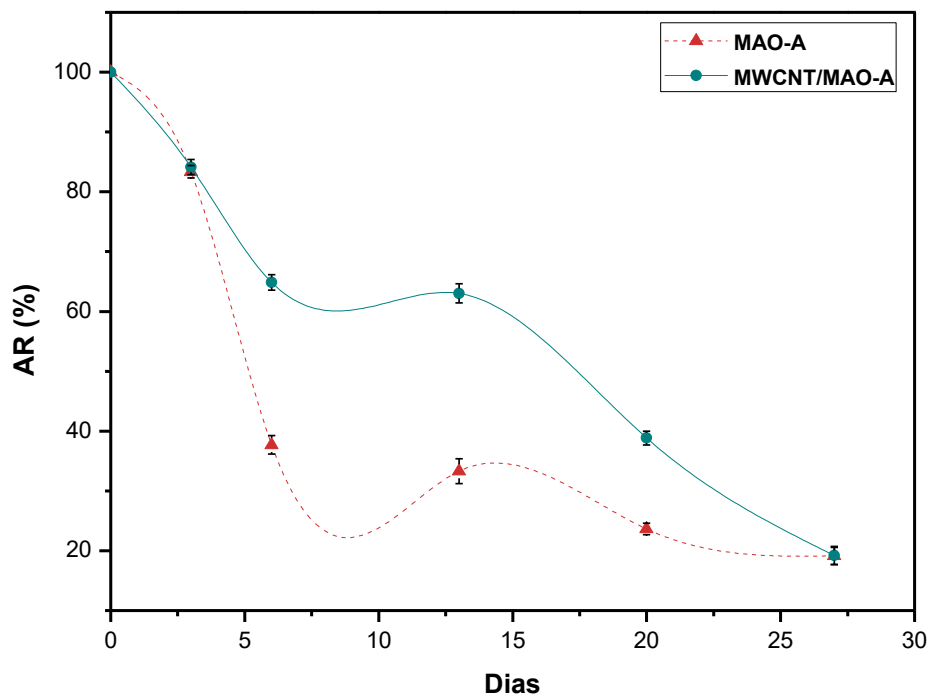


Figura 13. Estabilidad en almacenamiento de la enzima MAO-A libre e inmovilizada en nanotubos de carbono multipared a 4° C.

4.8. Caracterización electrocinética de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared mediante potencial Z.

Las interacciones electrostáticas entre la enzima MAO-A acoplada a los nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A) y el sustrato serotonina se evaluaron por medio de la determinación del potencial zeta a distintas concentraciones del sustrato en solución amortiguadora de fosfatos. En la figura 14 (a) se muestran los datos de potencial z obtenidos. Se puede observar que el valor del potencial z del bioconjugado MWCNT/MAO-A disminuyó en presencia de concentraciones bajas de serotonina, presentando valores de -13.5 mV y -14.8 mV en concentraciones de 50 ng/mL y 100 ng/mL respectivamente. A concentraciones mayores de serotonina se observó un incremento en el valor del potencial zeta, el cual se acercó a cero ($\zeta = 0.19$ mV) en presencia de 200 ng/mL de serotonina, y presentando posteriormente un valor de 11.32 mV en exposición a 400 ng/mL de serotonina. Dicho incremento en el potencial zeta se le atribuye al aumento de los grupos amino de la serotonina presentes en la solución.

Por otra parte, se evaluó el valor de potencial zeta en función del pH, en presencia de serotonina (400 ng/mL). En la figura 12 (b) se puede apreciar el incremento del potencial zeta a un valor de pH de 6.5 ($\zeta = 12.48$ mV), el cual disminuyó en presencia de soluciones de serotonina con valores de pH más alcalinos: pH 7 $\zeta = 9.72$ mV, pH 7.5 $\zeta = 3.25$, pH 8 $\zeta = -4.12$. Asimismo se pudo apreciar que el punto isoeléctrico, pH al cual el valor de ζ se acercó a 0, fue de 7.5; indicando que la MAO-A inmovilizada presenta una mayor interacción con la serotonina a ese valor de pH.

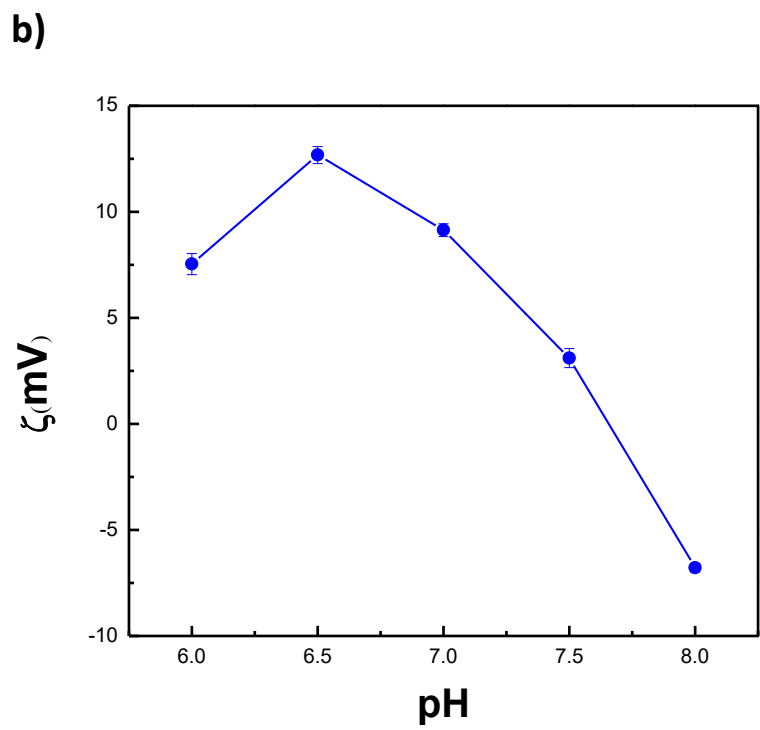
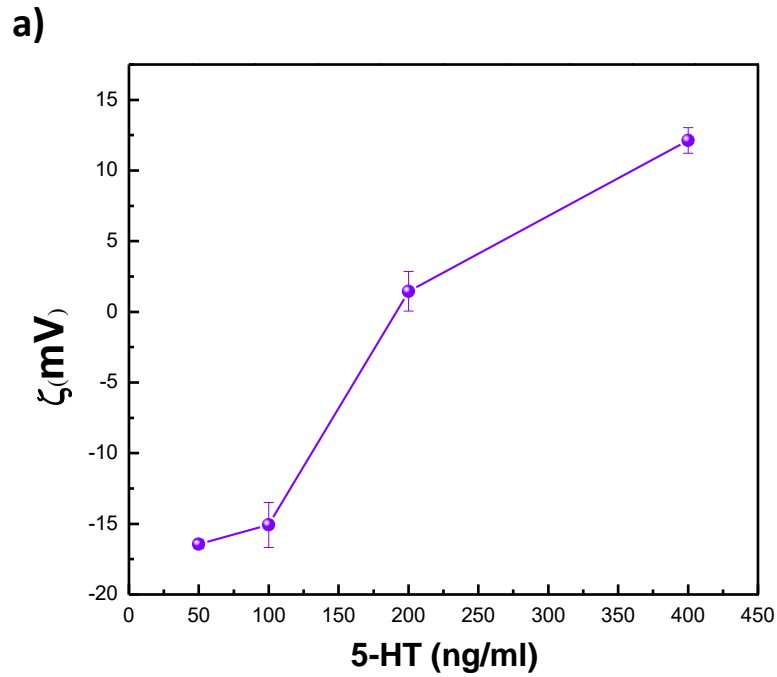


Figura 14. Potencial Zeta de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared. (a) En presencia de 50, 100, 200 y 400 ng/mL de serotonina en amortiguador de fosfatos (pH 6.5), (b) en presencia de soluciones de 400 ng/mL de serotonina a pH 6, 6.5, 7, 7.5 y 8.

4.10. Caracterización electroquímica del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A).

Evaluación de la oxidación de serotonina por el biocatalizador (MWCNT/MAO-A) y el bioelectrodo ESC/MWCNT/MAO-A por voltamperometría cíclica.

Con el objetivo de demostrar las propiedades electrocatalíticas del bioelectrodo ESC/MWCNT/MAO-A, se realizaron registros mediante voltamperometría cíclica de distintos arreglos de electrodos: A) Electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanotubos de carbono funcionalizados, B) Electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanotubos de carbono funcionalizados y activados con EDC, y C) electrodo serigrafiado de carbono modificado con el biocatalizador MWCNT/MAO-A, en presencia de una solución de serotonina (400 ng/mL) en fluido corporal simulado (pH 7.4).

Como se puede apreciar en la figura 15, los voltamperogramas correspondientes a las respuestas de los electrodos serigrafiados modificados con nanotubos de carbono funcionalizados y nanotubos de carbono activados con EDC, no muestran señales de un proceso de óxido-reducción en presencia de la solución de serotonina. En cambio, en el voltamperograma perteneciente al electrodo modificado con el biocatalizador MWCNT/MAO-A se puede observar la aparición de una respuesta de óxido-reducción, identificándose un pico anódico localizado en un potencial de 0.26 V vs Ag/AgCl y un pico catódico en 0.21 V vs Ag/AgCl.

El comportamiento electrocatalítico exhibido por el electrodo modificado en este trabajo es similar a lo reportado por Xu y colaboradores (2015), quienes al emplear nanocomposito conformado por nanotubos de carbono multipared y quitosano lograron identificar respuestas correspondientes a la oxidación de serotonina en un valor de potencial de 0.27 V vs Ag/AgCl, a nivel de un arreglo de microelectrodos de oro (Au) (Xu et al., 2015).

Estas respuestas electroquímicas son atribuidas al proceso de óxido-reducción de la serotonina a nivel del electrodo modificado. Existe una cantidad significativa de literatura que describe el mecanismo de oxidación electroquímico

de la serotonina, ya que ésta es una especie electro-activa; en dicho proceso dos electrones ($2e^-$) y dos protones ($2H^+$) son generados, formándose la molécula serotonina quinona imina, de forma reversible (Michael & Borland, 2007; Patel, Unwin, & Macpherson, 2013; Wrona, Lemordant, Lin, Blank, & Dryhurst, 1986) (fig. 16). Con base en esto se puede inferir que en la superficie del electrodo modificado ocurre la oxidación de la serotonina, donde los nanotubos de carbono multipared (MWCNT) que forman parte del biocatalizador, actúan como mediadores para la transferencia de los electrones generados, dando como resultado las corrientes de oxidación y reducción observadas.

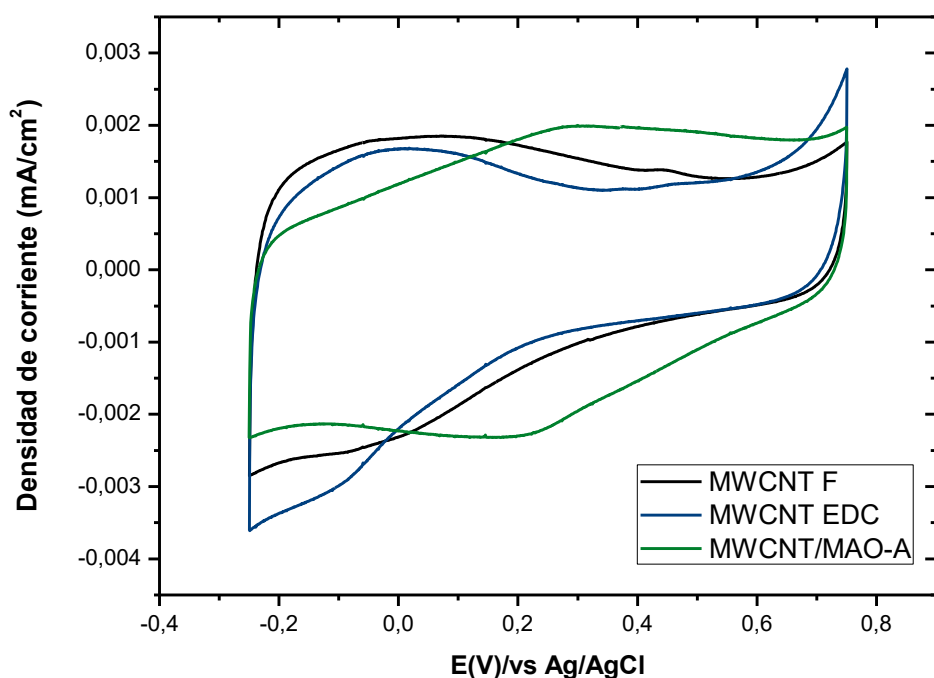


Figura 15. Registros de voltamperometría cíclica de las distintas configuraciones del electrodo en presencia de una solución de serotonina (400 ng/mL) en fluido corporal simulado (pH 7.4) a 25° C.

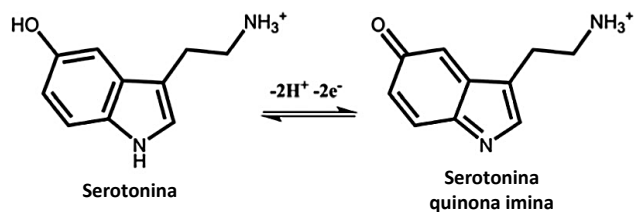


Figura 16. Proceso de óxido-reducción electroquímico de la serotonina

Evaluación de la oxidación de serotonina por el biocatalizador (MWCNT/MAO-A) y el bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) mediante voltamperometría de pulso diferencial.

Como primera aproximación, se examinó el proceso de oxidación de la serotonina, a nivel de un electrodo de carbón vítreo modificado con el biocatalizador (MWCNT/MAO-A). Se evaluaron las respuestas del biocatalizador hacia diferentes diluciones de serotonina (200, 400, 600, 800, 1000, 2500, y 5000 ng/mL) en solución amortiguadora de fosfatos (10 mM, pH 6.5), mediante voltamperometría de pulso diferencial (DPV). La figura 17 (a) muestra las señales de oxidación generadas por el biocatalizador, apreciándose un incremento de la corriente debida a la oxidación de la serotonina, identificándose la generación de picos anódicos entre los potenciales 0.1 V y 0.3 V vs Ag/AgCl.

El incremento en la corriente anódica respondió al incremento de la concentración de serotonina presente en las distintas soluciones. Esto se pudo confirmar al observar el aumento en la magnitud de los picos en presencia de soluciones con una mayor concentración de serotonina. Con el objetivo de construir una curva de calibración, los registros se realizaron por triplicado. En la figura 17 (b) se muestra la curva de calibración obtenida de los registros de oxidación del electrodo de carbón vítreo modificado con el biocatalizador (MWCNT/MAO-A) en presencia de las distintas soluciones de serotonina en amortiguador de fosfatos. Como se puede apreciar en la figura, se logró una respuesta lineal entre la señal máxima de corriente anódica y la concentración de serotonina en un intervalo de 200 ng/mL a 1000 ng/mL ($S/N = 3$), con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99271.

Posteriormente, para examinar el efecto de la solución de fluido corporal simulado sobre el comportamiento electroquímico del biocatalizador (MWCNT/MAO-A), se llevaron a cabo registros de voltamperometría de pulso diferencial bajo los mismos parámetros, en presencia de distintas soluciones de serotonina preparadas en fluido corporal simulado (pH 7.4). La figura 18 (a) muestra las señales del electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT/MAO-

A, para las soluciones de serotonina en fluido corporal simulado, apreciándose la aparición de distintos picos anódicos localizados en valores de potencial de 0.21 V y 0.3 V vs Ag/AgCl.

Siguiendo un comportamiento similar a los registros obtenidos en el ensayo previo, la magnitud de la corriente anódica aumentó en función del aumento en la concentración de serotonina en las soluciones. La construcción de la curva de calibración permitió determinar que la variación en la magnitud máxima de la corriente anódica versus la concentración de serotonina presenta una respuesta lineal en un intervalo de 400 a 1000 ng/mL ($S/N = 3$), con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.94

Cabe señalar que los picos anódicos generados en presencia de soluciones de serotonina en fluido corporal simulado mostraron una disminución en su magnitud, y en su relación lineal ($R^2=0.94$), a comparación de la relación lineal mostrada por el electrodo modificado en presencia de soluciones de serotonina preparadas con amortiguador de fosfatos.

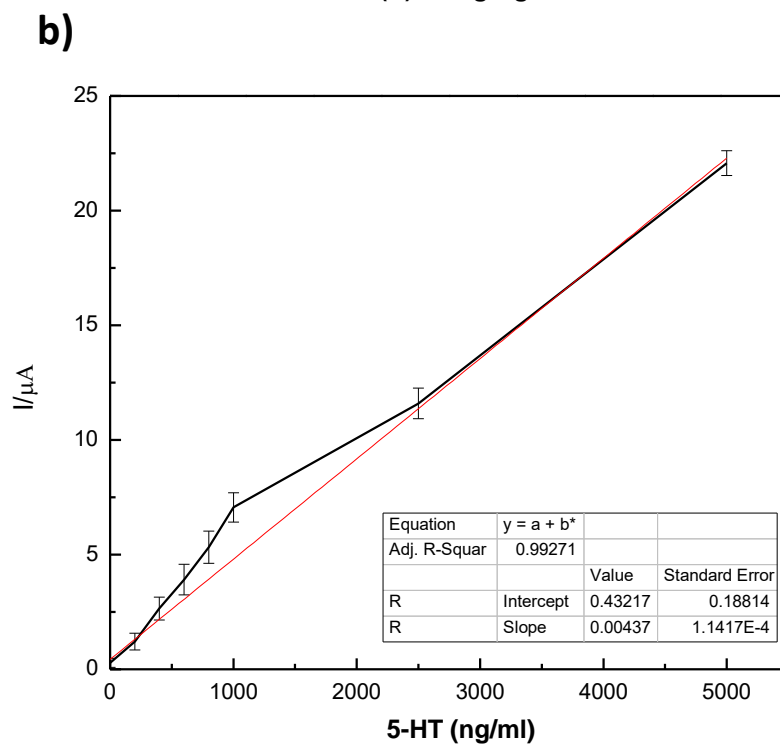
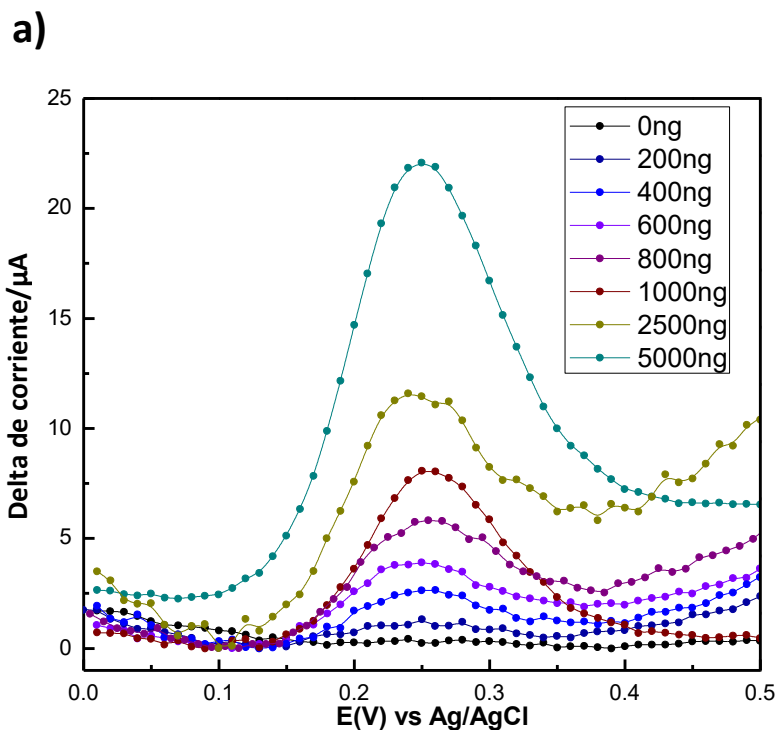


Figura 17. Respuestas amperométricas generadas por el electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT/MAO-A para de distintas concentraciones de serotonina en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.5, 10 mM) (a). Curva de calibración la magnitud de la corriente anódica vs concentración de serotonina (b).

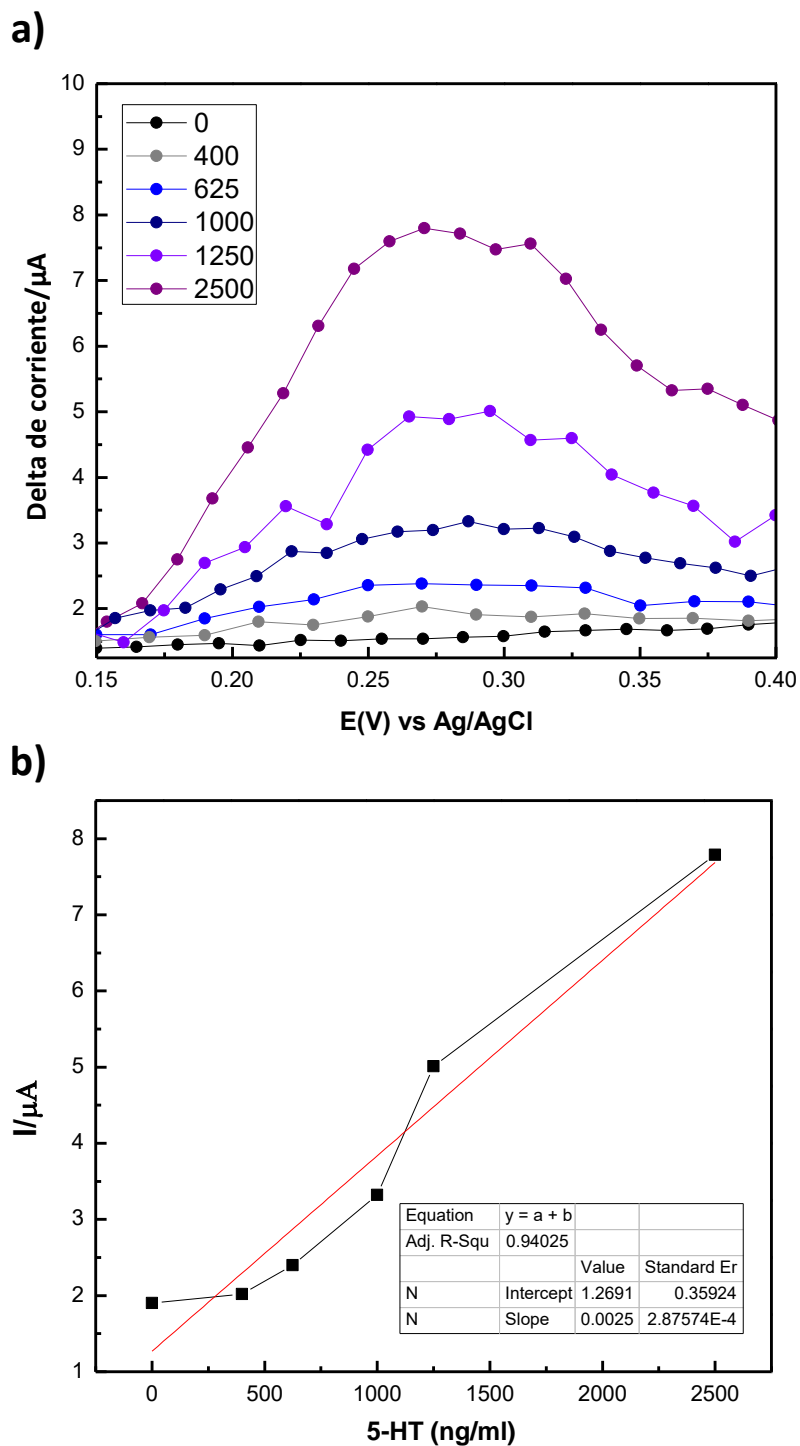


Figura 18. Respuestas amperométricas generadas por el electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT/MAO-A para de distintas concentraciones de serotonina en fluido corporal simulado (pH 7.4) (a). Curva de calibración de la magnitud de la corriente anódica vs concentración de serotonina (b).

Una vez evaluada la capacidad electrocatalítica del biocatalizador MWCNT/MAO-A en soluciones de serotonina preparadas con amortiguador de fosfatos y fluido corporal simulado, se examinó el comportamiento del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) hacia distintas soluciones de serotonina (800, 1000, 1500, 2500, 3750 y 5000 ng/mL) en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.5 10 mM). Los registros mediante voltamperometría de pulso diferencial se muestran en la figura 19 (a), de igual manera se registraron corrientes anódicas correspondientes a la oxidación de la serotonina en potenciales de 0.21 V y 0.3 V vs Ag/AgCl, confirmando los registros encontrados durante las evaluaciones con el electrodo de carbón vítreo modificado. Asimismo, se observó una dependencia de la corriente anódica hacia las diferentes concentraciones de serotonina. De acuerdo a la curva de calibración obtenida, la variación de la corriente anódica versus la concentración de serotonina mostró una respuesta lineal en un intervalo de concentración de 800 a 1500 ng/mL ($s/n=3$), con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.897 (figura 19 b). Además se apreció una disminución en la magnitud de los picos anódicos generados, un efecto que puede deberse al cambio en las propiedades fisicoquímicas del material (carbono) que forma parte del electrodo serigrafado, en comparación con el electrodo de carbón vítreo.

Por último, se realizaron evaluaciones de las corrientes anódicas generadas por el bioelectrodo en presencia de soluciones de serotonina en solución de fluido corporal simulado (pH 7.4), a concentraciones de 600, 1000, 1250, 2500, 3750 y 5000 ng/mL (figura 20 a). En concordancia a lo observado en las evaluaciones previas, se observó una dependencia de los picos anódicos hacia concentraciones crecientes de serotonina. La curva de calibración correspondiente a estas mediciones indicó que la variación de la corriente anódica generada por el bioelectrodo versus la concentración de serotonina tuvo una respuesta lineal en un intervalo de concentración de 600 a 1250 ng/mL ($S/N = 3$), con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.929 (figura 20 b). En este caso, se pudo apreciar una mejor definición en los picos anódicos en comparación a las respuestas generadas en amortiguador de fosfatos, así como una mejor correlación entre las respuestas y la

concentración de serotonina en las soluciones, indicada por el aumento en el coeficiente de correlación (R^2).

La ecuación lineal de la curva de calibración fue estimada como: $y=7.75957 \times 10^{-4} (x)+ 0.92994$. Con base en la desviación estándar de la respuesta (σ) y en la pendiente (m) de la ecuación lineal, se determinó el límite de detección (L.D) y el límite de cuantificación (L.C.) para el bioelectrodo, obteniéndose valores de 187.01 ng/mL (S/N = 3) y 618.59 ng/mL (S/N = 3) respectivamente.

En conjunto, los datos obtenidos en las distintas evaluaciones indican que el biocatalizador (MWCNT/MAO-A) posee una buena capacidad electro-catalítica hacia la oxidación de serotonina, principalmente cuando es empleado en conjunto con un electrodo serigrafado de carbono y en presencia de fluido corporal simulado. Estos resultados indican que el bioelectrodo generado puede ser aplicado para la detección de serotonina a través de su oxidación electroquímica.

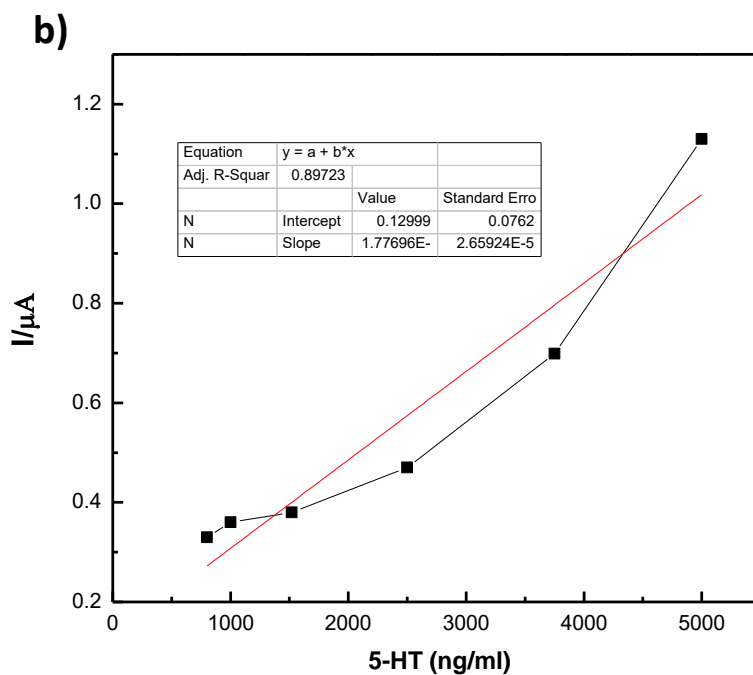
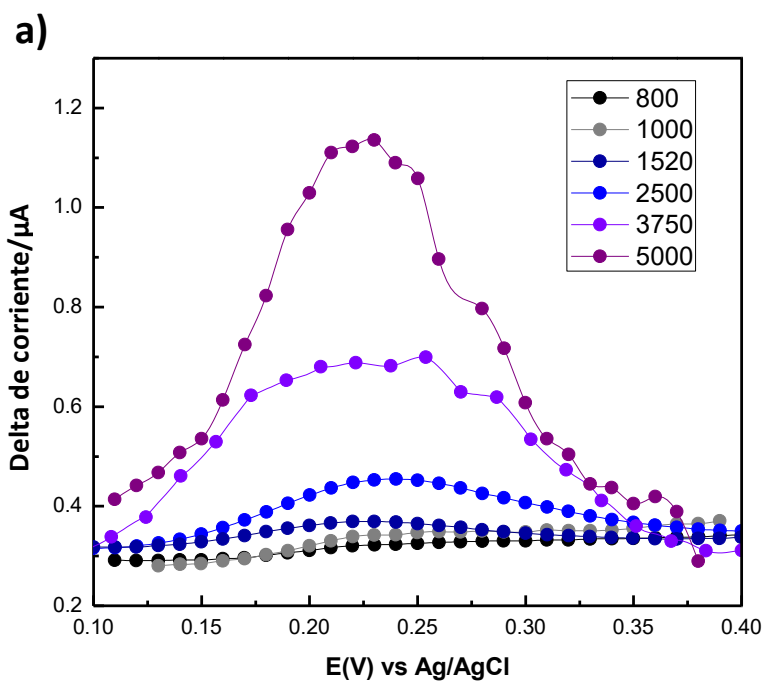


Figura 19. Respuestas amperométricas generadas por el electrodo serigrafado de carbono modificado con MWCNT/MAO-A para de distintas concentraciones de serotonina en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.5, 10 mM) (a). Curva de calibración de la corriente anódica vs concentración de serotonina (b).

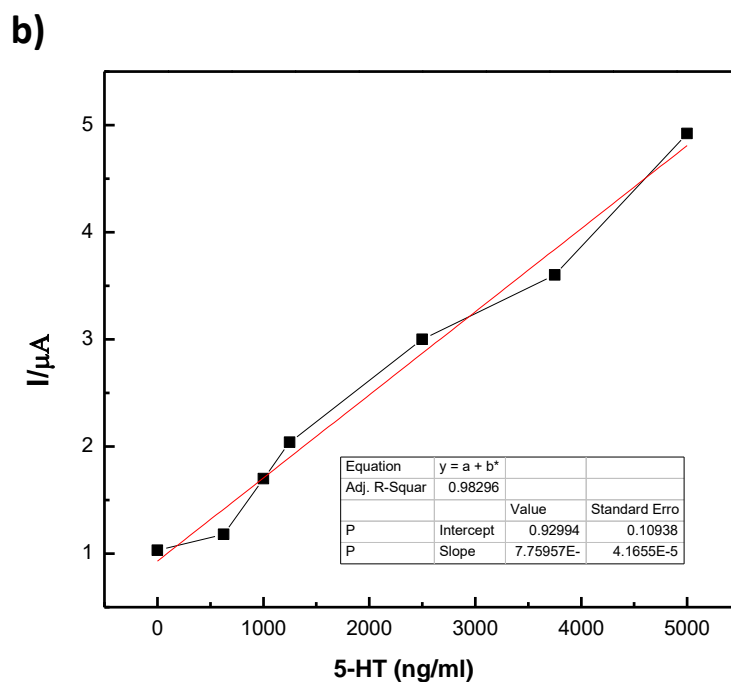
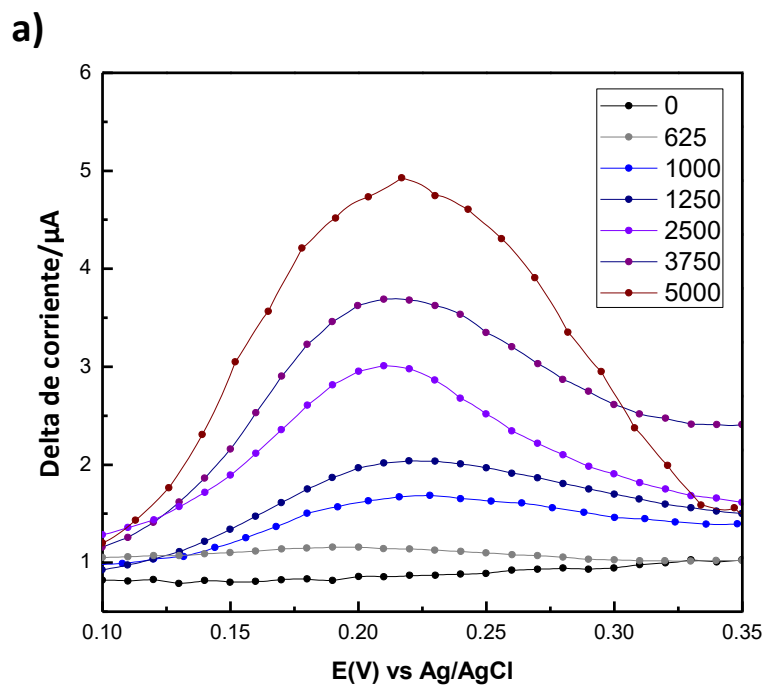


Figura 20. Respuestas amperométricas generadas por el electrodo serigrafado de carbono modificado con MWCNT/MAO-A para distintas concentraciones de serotonina en fluido corporal simulado (pH 7.4). Curva de calibración de la corriente anódica vs concentración de serotonina (a).

Evaluación de la reducción de peróxido de hidrógeno por el biocatalizador (MWCNT/MAO-A) mediante voltamperometría cíclica.

En el sistema propuesto en el presente trabajo la detección de serotonina ocurre de manera indirecta, a través de la detección del peróxido de hidrógeno generado durante la desaminación oxidativa de la serotonina por la enzima MAO-A. Este proceso puede dividirse en dos etapas: en la primera, la enzima monoamino oxidasa-A cataliza la desaminación de la molécula de serotonina, lo que implica la reducción enzimática del cofactor flavin adenin dinucleótido (FAD), y su posterior oxidación por el oxígeno molecular en el medio, generándose peróxido de hidrógeno. Posteriormente, en la segunda etapa, el peróxido de hidrógeno es detectado a partir de su reducción electroquímica a nivel del electrodo modificado (fig. 21).

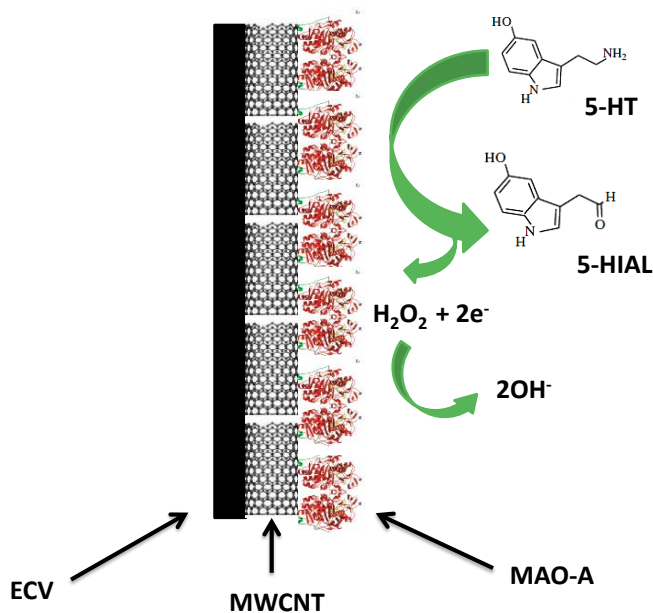


Figura 21. Esquema que representa la conformación y mecanismo de reacción del biocatalizador MWCNT/MAO-A. ECV: Electrodo de carbono vítreo, MWCNT: Nanotubos de carbono multipared, MAO-A: Monoamino oxidasa A, 5-HT: 5-hidroxi triptamina, 5-HIAAL: 5-hidroxi indolacetaldehído.

Con el objetivo de demostrar la capacidad electro-catalítica del biocatalizador MWCNT/MAO-A para la reducción del peróxido de hidrógeno se realizaron ensayos de voltamperometría cíclica en los que se registraron las

respuestas de tres arreglos distintos de electrodos como resultado de la modificación de un electrodo de carbón vítreo con: a) nanotubos de carbono multipared no funcionalizados (MWCNT NF), b) nanotubos de carbono multipared funcionalizados (MWCNT F), y nanotubos de carbono multipared con la enzima MAO-A acoplada (biocatalizador, MWCNT/MAO-A); en presencia de una solución de peróxido de hidrógeno 10 mM en amortiguador de fosfatos (10 mM, pH 6.5).

La figura 22 muestra los voltamperogramas cíclicos correspondientes a las respuestas generadas por el electrodo de carbón vítreo modificado con los distintos materiales. En el caso del electrodo modificado con MWCNT sin funcionalizar no se apreciaron respuestas en presencia de peróxido de hidrógeno, indicando que este material no posee una buena actividad electro-catalítica. En cambio, en el electrodo modificado con MWCNT funcionalizados se apreció un incremento de la corriente catódica en un valor de potencial de -0.45 V vs Ag/AgCl. Asimismo el electrodo modificado con el biocatalizador MWCNT/MAO-A presentó un incremento en la corriente catódica, en este caso en un valor de potencial de -0.5 V vs Ag/AgCl. El incremento de las corrientes catódicas apreciado corresponde al proceso de reducción electroquímica del peróxido de hidrógeno, En el que dos electrones ($2e^-$) se consumen, generándose dos aniones oxidrilo ($2OH^-$) (figura 23) (Rismetov, Ivandini, Saepudin, & Einaga, 2014).

Estos resultados indican que tanto los MWCNT funcionalizados como el biocatalizador MWCNT/MAO-A poseen una buena capacidad electro-catalítica hacia la reducción de peróxido de hidrógeno. Resultados similares han sido obtenidos con electrodos de carbón vítreo modificados con nanotubos de carbono mutipared, por ejemplo, en el trabajo de Nasirizadeh y colaboradores (2015) se reportó que un carbón vítreo modificado con MWCNT y el colorante azul reactivo 19 es capaz de detectar peróxido de hidrógeno a través de su reducción electroquímica, ya que se pudieron apreciar incrementos en las corrientes catódicas en valores de potencial de -0.21 V vs ESC (electrodo saturado de calomel) (Nasirizadeh, Shekari, Nazari, & Tabatabaee, 2016).

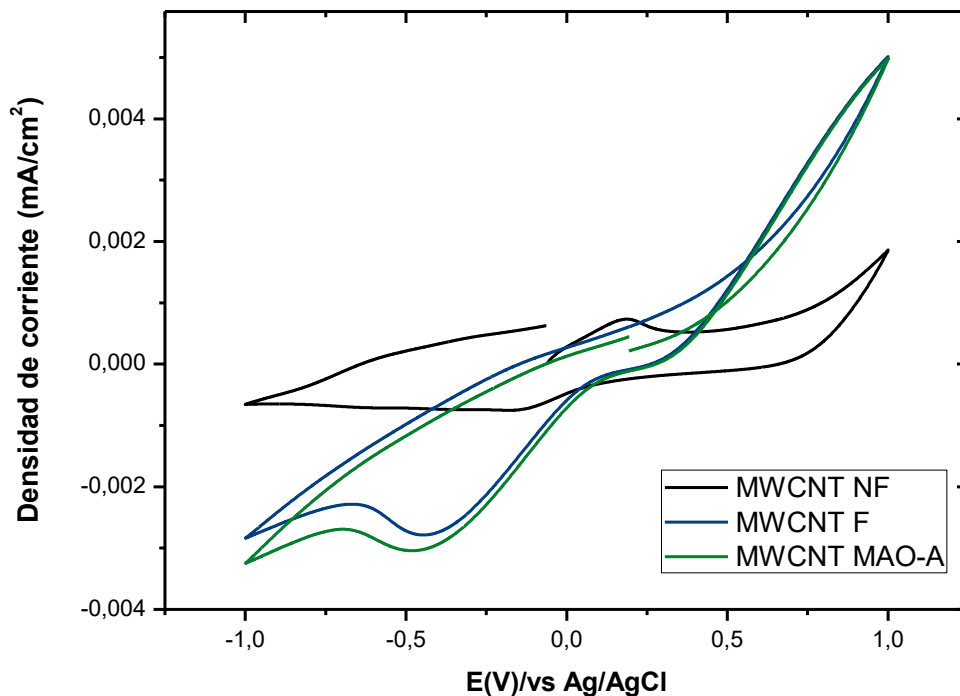


Figura 22. Registros de voltamperometría cíclica de un electrodo de carbón vítreo modificado con distintos materiales en presencia de una solución de peróxido de hidrógeno 10 mM en amortiguador de fosfatos (10 mM, pH 6.5) a 25° C.

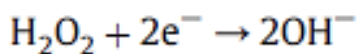


Figura 23. Proceso de reducción electroquímica del peróxido de hidrógeno.

Una vez demostrada la capacidad electro-catalítica del biocatalizador MWCNT para la reducción de peróxido de hidrógeno, se realizaron registros de voltamperometría cíclica con el objetivo de evaluar la producción enzimática de peróxido de hidrógeno a través de su reducción electroquímica. De igual manera, se realizaron registraron las respuestas de un electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT no funcionalizados, MWCNT funcionalizados y MWCNT/MAO-A, pero, en este caso, en presencia de una solución de 5000 ng/mL de serotonina en amortiguador de fosfatos (pH 6.5, 10 mM).

Las respuestas obtenidas de los distintos arreglos de electrodos se muestran en la figura 24, se puede apreciar que el electrodo modificado con MWCNT no funcionalizados careció de cambios en las corrientes catódicas

(reducción) en presencia de la solución de serotonina. De igual manera no se identificaron cambios en las corrientes de reducción en el electrodo modificado con MWCNT funcionalizados. A diferencia de esto, el electrodo modificado con el biocatalizador MWCNT/MAO-A mostró un leve incremento de la corriente catódica en un valor de potencial de $-0.68\text{ V vs Ag/AgCl}$. Este incremento de la corriente catódica corresponde al proceso de reducción de peróxido de hidrógeno generado de forma enzimática durante la desaminación de la serotonina en la solución, el cual difunde hacia la superficie del electrodo de carbón vítreo modificado con los nanotubos de carbono donde ocurre su reducción electroquímica. Cabe señalar que el incremento de la corriente catódica observado no fue muy alto, esto puede deberse a que la cantidad de peróxido de hidrógeno producido enzimáticamente es baja, aun empleando una solución de serotonina a una concentración de 5000 ng/mL .

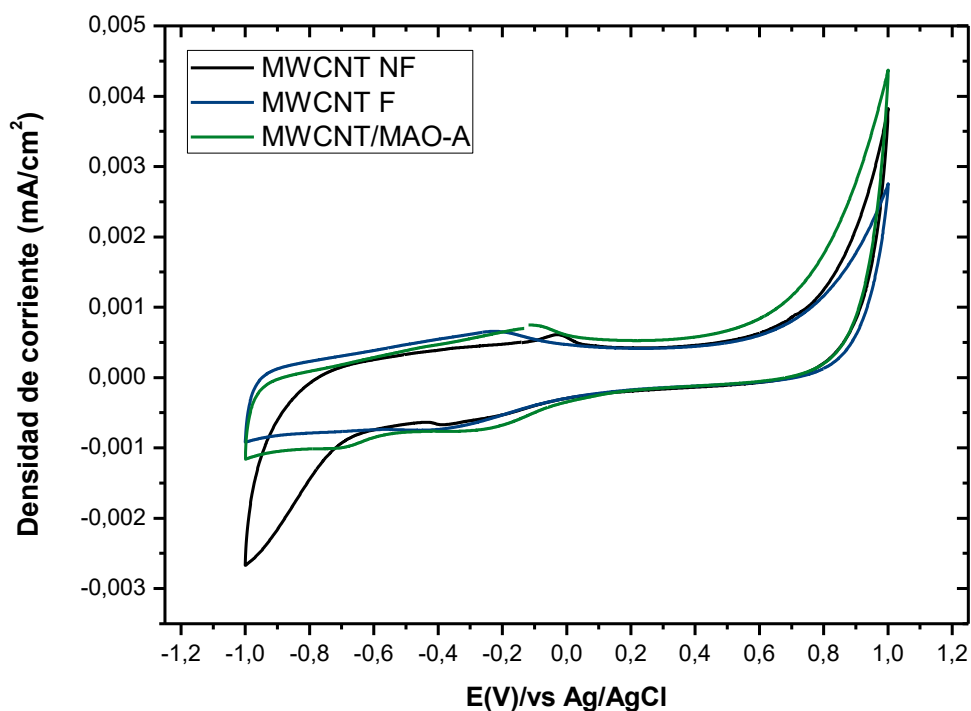


Figura 24. Registros de voltamperometría cíclica de un electrodo de carbón vítreo modificado con distintos materiales en presencia de una solución de serotonina 5000 ng/mL en amortiguador de fosfatos (10 mM, pH 6.5) a 25 °C.

Evaluación de la actividad del biocatalizador MWCNT/MAO-A mediante microscopia electroquímica de barrido (SECM).

Existen dos etapas cruciales durante el desarrollo de bioelectrodos/biosensores, la primera comprende la elección de un elemento de reconocimiento biológico (por ejemplo una enzima) el cual interactúa con el analito, y la segunda que corresponde al proceso de inmovilización de dicho elemento de reconocimiento en la superficie de un transductor. Cuando se emplean enzimas de óxido-reducción como elementos de reconocimiento biológicos, la interacción catalítica con sus respectivos sustratos crea cambios de óxido-reducción locales en una zona de difusión localizada de manera próxima a la superficie donde se encuentra inmovilizada (Maciejewska, Schäfer, & Schuhmann, 2006).

La microscopía electroquímica de barrido (en inglés scanning electrochemical microscopy, SECM), es una técnica que permite evaluar cambios

en los estados de óxido-reducción. En esta técnica son empleados ultramicroelectrodos con un diámetro de micrómetros (μm) o menos, como sondas electroquímicas (denominadas puntas) para identificar cambios en las corrientes Faradaicas generadas en la interfaz formada con la superficie que contiene el biocatalizador. El registro de los cambios en dichas corrientes es realizado en función de la posición de la punta con respecto a la superficie de la muestra en los ejes x , y (Lu et al., 2007).

Los estudios de SECM pueden llevarse a cabo empleando distintos modos de operación, siendo el modo de generación en sustrato/colección en punta (en inglés *substrate generation/ tip collection*, *SG/TC*) el más empleado para visualizar la actividad de una enzima inmovilizada. En este modo de operación el ultramicroelectrodo funciona como electrodo de trabajo y la muestra (enzima inmovilizada) es colocada en un segundo electrodo de trabajo, denominado *sustrato*. Durante el experimento, cuando la enzima interactúa con el analito de forma catalítica se genera una especie (molécula) la cual es colectada por la punta (ultramicroelectrodo). Posteriormente, a nivel de la punta, dicha especie puede sufrir un proceso de oxidación o reducción. Este modo se basa en la generación de una especie electro-activa, la cual difunde a través de la interfaz formada por el sustrato que contiene el biocatalizador y la punta, donde ocurre su oxidación o reducción promoviendo cambios en las corrientes Faradaicas producidas (Lu et al., 2007).

Con base en lo anterior se empleó la técnica de SECM en modo de operación SG/TC para evaluar la actividad de la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT, en soluciones de serotonina a distintas concentraciones. El sistema establecido en el presente trabajo consistió en el uso de un ultramicroelectrodo de platino como electrodo de trabajo y un electrodo de grafito donde se depositó el biocatalizador MWCNT/MAO-A. En presencia de serotonina la enzima MAO-A inmovilizada cataliza su desaminación, un proceso en el que el cofactor enzimático flavin adenin dinucleotido (FAD) es reducido y posteriormente oxidado por el oxígeno molecular en el medio, generándose peróxido de hidrógeno, el cual

difunde a través de la solución hacia la punta (ultramicroelectrodo) donde ocurre su reducción electroquímica (figura 25).

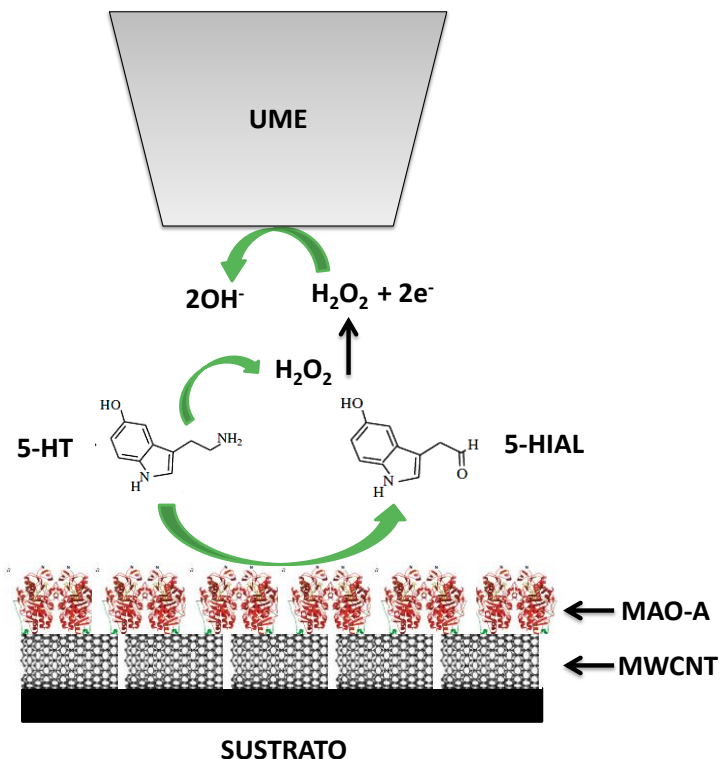


Figura 25. Esquema que representa la evaluación de la actividad del biocatalizador MWCNT/MAO-A mediante SECM. MWCNT: Nanotubos de carbono multipared, MAO-A: Monoamino oxidasa-A, UME: Ultramicroelectrodo, 5-HT: 5-Hidroxi triptamina, 5-HIAL: 5-Hidroxi indolacetaldehído.

Empleando la técnica de SECM se evaluó la actividad del biocatalizador MWCNT/MAO-A mediante la reducción electroquímica del peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente a nivel de la punta del microelectrodo, aplicando un potencial de -0.7 V (Maciejewska et al., 2006; Schäfer, Maciejewska, & Schuhmann, 2007). En la figura 26 se muestran imágenes de SECM del biocatalizador MWCNT/MAO-A en: (a) ausencia de serotonina y (b) en presencia de 200 ng/mL de serotonina en amortiguador de fosfatos (10 mM , $\text{pH } 6.5$). en la figura 26 (a) no se aprecia la generación de una señal, debido a la ausencia de serotonina en el electrolito, por otra parte, en la figura 26 (b) se observa un incremento en la corriente catódica, indicada por las áreas de color violeta, en

presencia del sustrato. Estas respuestas se atribuyen a una mayor reducción del peróxido de hidrógeno producido por la enzima MAO-A que forma parte del biocatalizador, la cual alcanzó valores de -1.5 nA a -2 nA en presencia de 500 ng/mL de serotonina.

Por medio del sistema descrito previamente y empleando el potenciostato integrado en el equipo del microscopio electroquímico de barrido (Bio-Logic, ac-SECM/SECM470) se examinaron las respuestas de reducción generadas por el biocatalizador hacia distintas soluciones de serotonina (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ng/mL) en solución amortiguadora de fosfatos (10 mM, pH 6.5), por medio de la técnica de voltamperometría de pulso diferencial.

La figura 27 (a) muestra las señales generadas por el biocatalizador en presencia de distintas concentraciones de serotonina, observándose el incremento de las corrientes catódicas como consecuencia del proceso de reducción del peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente por el biocatalizador MWCNT/MAO-A. Se apreció la generación de picos catódicos localizados en valores de potencial de -0.55 V y -0.65 V vs Ag/AgCl. Asimismo, se observó una dependencia de las respuestas de reducción hacia las distintas concentraciones de serotonina, ya que la magnitud de las corrientes catódicas incrementó en función de la concentración de serotonina.

Los registros fueron realizados por triplicado, permitiendo la obtención de la curva de calibración correspondiente a las señales registradas por el biocatalizador (figura 27 b). Se obtuvo una respuesta lineal entre la señal máxima de corriente catódica y la concentración de serotonina en un intervalo de 100 ng/mL a 400 ng/mL (S/N = 3), con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99329. De acuerdo a la ecuación lineal de la curva de calibración: $y = -0.008 (x) - 0.014$, se obtuvo un límite de detección (L.D.) de 35.6 ng/mL y un límite de cuantificación de 118.7 ng/mL.

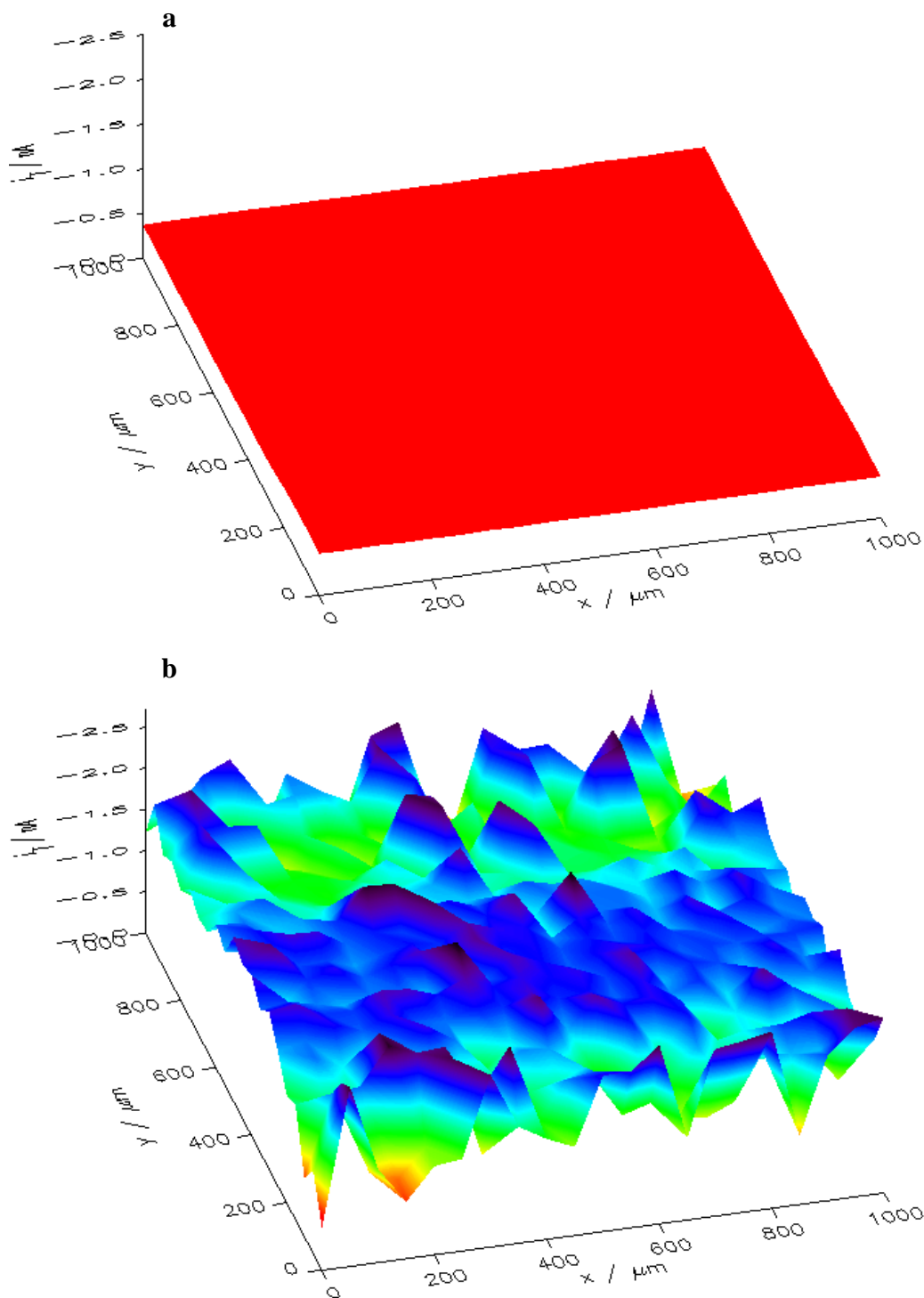


Figura 26. Imágenes de microscopía electroquímica de barrido en modo (SG/TC) de la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono multipared, (a) en amortiguador de fosfatos, (b) 200 ng/mL de serotonina en amortiguador de fosfatos (10 mM, pH 6.5).

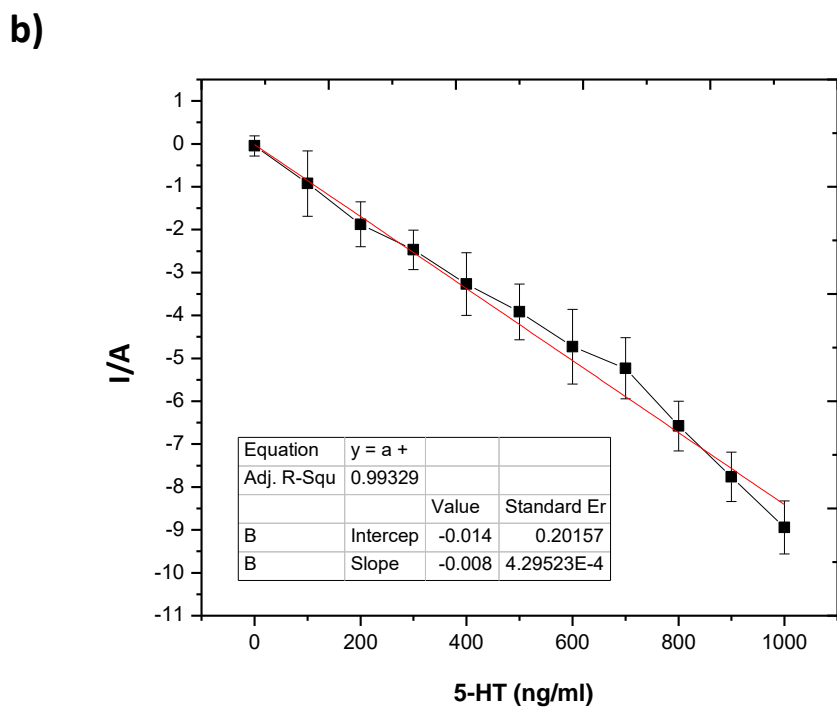
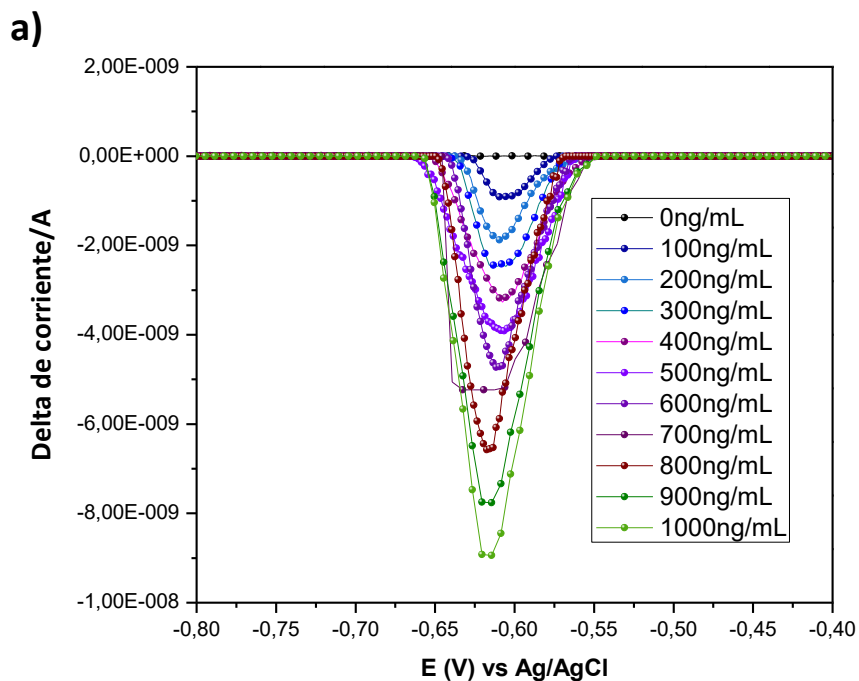


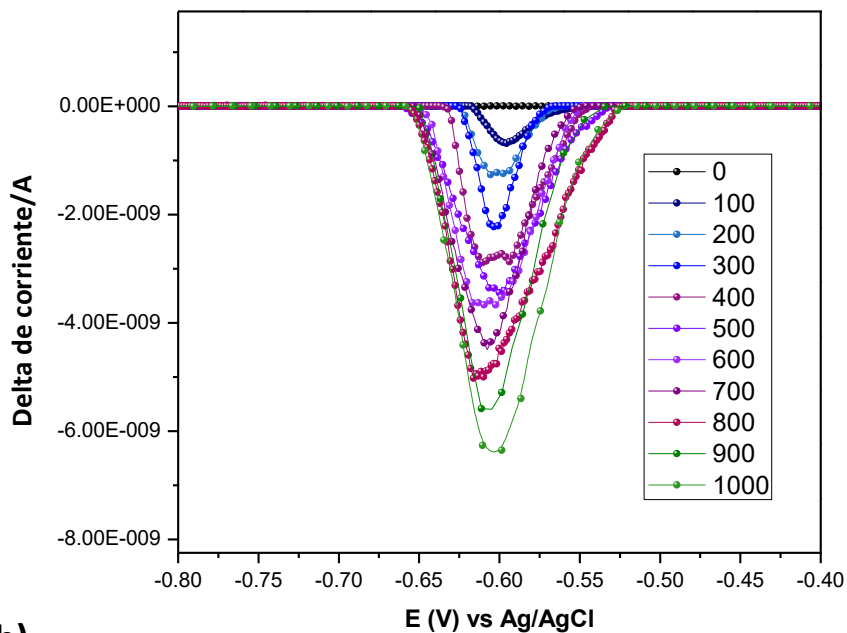
Figura 27. Respuestas de reducción generadas por el biocatalizador MWCNT/MAO-A hacia distintas concentraciones de serotonina en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.5, 10 mM) (a). Curva de calibración de la corriente catódica vs concentración de serotonina (b).

De igual manera, con el objetivo de evaluar el efecto de la solución de fluido corporal simulado sobre el rendimiento del biocatalizador para la reducción del peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente se realizaron registros de las corrientes catódicas por medio de voltamperometría de pulso diferencial, en presencia de distintas soluciones de serotonina preparadas en fluido corporal simulado (pH 7.4). Como se puede observar en la figura 28 a, se identificó la generación de corrientes catódicas en potenciales de -0.55 V y -0.65 V vs Ag/AgCl, coincidiendo con las señales observadas en los experimentos previos con soluciones preparadas con solución amortiguadora de fosfatos. Dichas corrientes, relacionadas a la reducción electroquímica del peróxido de hidrógeno, mostraron dependencia hacia la concentración de serotonina presente en la solución.

La curva de calibración correspondiente a los registros (figura 28 b) indicó que la variación de las corrientes catódicas generadas por el biocatalizador en función de la concentración de serotonina mostró una respuesta lineal en un intervalo de concentración de 300 a 500 ng/mL ($S/N = 3$), con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9897. La ecuación lineal de la curva de calibración fue estimada como: $y = -0.0064(x) - 0.0259$, determinándose un límite de detección (L.D) de 125 ng/mL y un límite de cuantificación de 608 ng/mL. Estos datos indican que el rendimiento del biocatalizador para la reducción de peróxido de hidrógeno disminuyó cuando se emplearon soluciones de serotonina preparadas con fluido corporal simulado. Este efecto puede ser atribuido a la cantidad de distintos iones que conforman esta solución, lo cuales pueden interferir en el comportamiento electro-catalítico del material.

Los resultados descritos previamente indican que biocatalizador conformado por la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono mutipared es activo, ya que posee la capacidad de generar peróxido de hidrógeno en presencia de serotonina. La generación de este subproducto puede ser evaluada electroquímicamente a través de su reducción, permitiendo una detección indirecta de la serotonina.

a)



b)

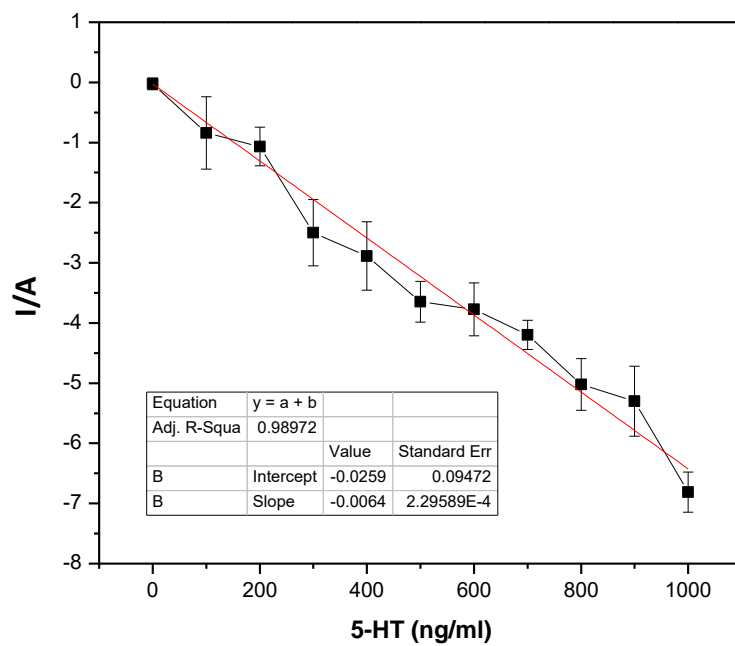


Figura 28. Respuestas de reducción generadas por el biocatalizador MWCNT/MAO-A hacia distintas concentraciones de serotonina en fluido corporal simulado (pH 7.4) (a). Curva de calibración de la corriente catódica vs concentración de serotonina (b).

4.11. Estudios operacionales del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A).

Estudio de estabilidad de ensayo.

Con el objetivo de evaluar el rendimiento del electrodo serigrafiado de carbono modificado con la enzima inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (bioelectrodo, ESC/MWCNT/MAO-A) durante diversos ciclos de detección de serotonina se llevó a cabo un estudio de estabilidad de ensayo, el cual consistió en el registro de las respuestas amperométricas generadas por el bioelectrodo mediante de voltametría de pulso diferencial (DPV), en presencia de soluciones de serotonina a concentraciones de 400 ng/mL, 600 ng/mL y 800 ng/mL en fluido corporal simulado (pH 7.4). Las respuestas generadas por cada solución de serotonina fueron registradas durante tres ciclos de reacción, realizando un paso intermedio de lavado del bioelectrodo con fluido corporal simulado.

Las respuestas electroquímicas generadas por el bioelectrodo se muestran en la figura 29. Se registraron picos de oxidación localizados en valores de -0.2 y -0.35 V vs Ag/AgCl, en presencia de las distintas concentraciones de serotonina evaluadas, los cuales corresponden al proceso de oxidación de la serotonina. De manera específica, para la solución de 400 ng/mL de serotonina se observó la generación de una señal con un valor máximo de 8.69 μA durante el primer ciclo, la cual presentó una disminución durante los dos ciclos posteriores, apreciándose valores máximos de 8.62 μA y 8.57 μA en los ciclos 2 y 3 respectivamente, con una desviación estándar (σ) de 0.06.

En el caso de la solución de 600 ng/mL se registraron señales con valores máximos de 9.57 μA durante el ciclo 1, 9.50 μA en el ciclo 2 y 9.44 μA en el ciclo 3, y una desviación estándar (σ) de 0.065. Por último, en presencia de la solución de 800 ng/mL se observaron señales con valores de 14.65 μA , 14.17 μA y 13.47 μA , para los ciclos 1, 2 y 3 respectivamente, con una desviación estándar (σ) de 0.59. Este aumento en la desviación estándar puede ser atribuido a que durante los ciclos de reacción, una pequeña parte del biocatalizador comenzó a desprenderse del electrodo.

En conjunto estos datos indican que la intensidad de la señal generada disminuyó a través de los ciclos biocatalíticos, sin embargo, de acuerdo a los valores de desviación estándar obtenidos, la magnitud de dicha disminución no es significativa, indicando que aún después de tres ciclos, las respuestas electroquímicas generadas por el bioelectrodo son buenas, en el intervalo de concentración evaluado. Este comportamiento demuestra que el electrodo modificado con la enzima MAO-A inmovilizada en MWCNT presenta una estabilidad operacional consistente para la detección de serotonina.

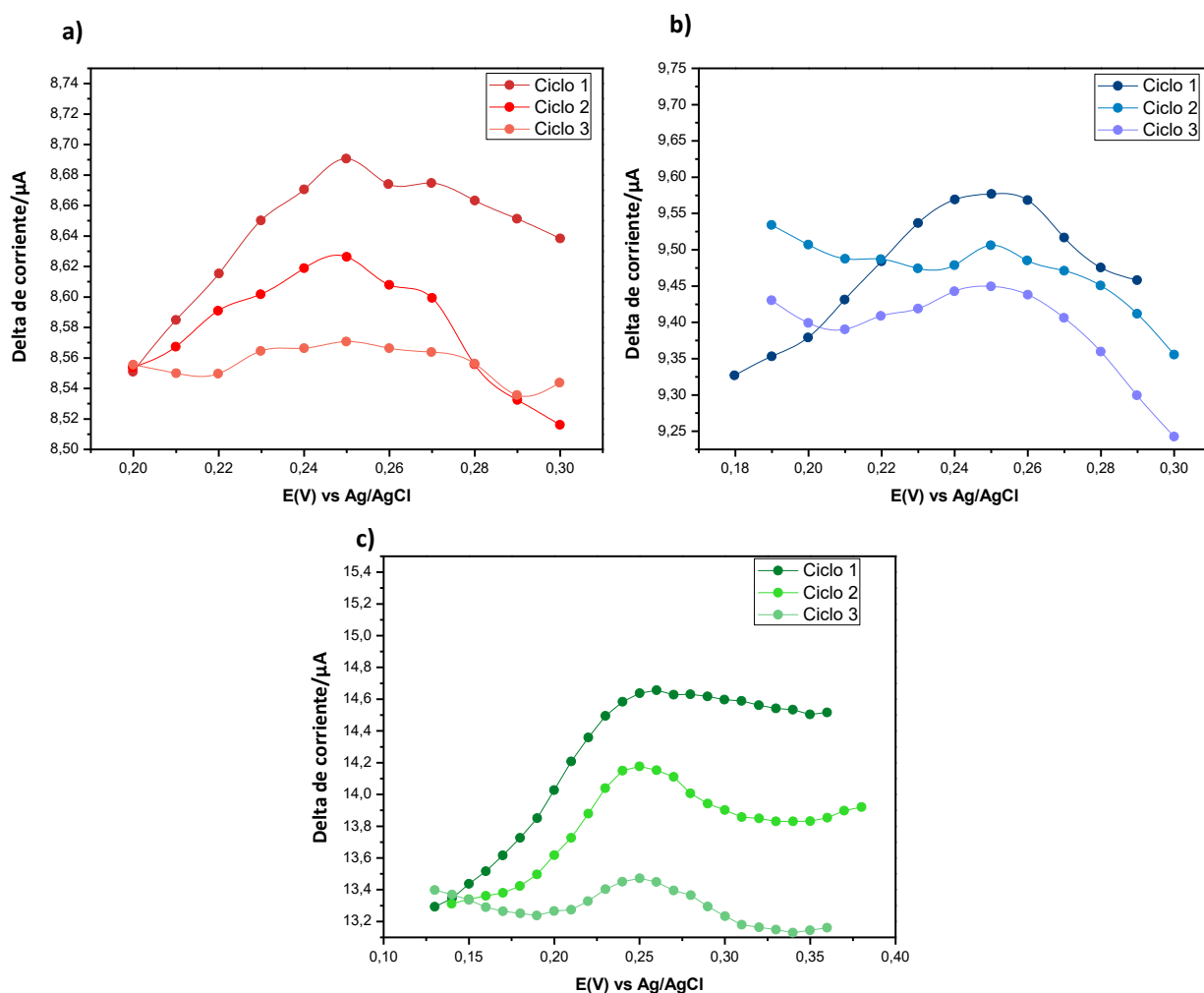


Figura 29. Respuestas amperométricas generadas por el bioelectrodo ESC/MWCNT/MAO.A en presencia de soluciones de serotonina en fluido corporal simulado (pH 7.4) durante tres ciclos de biocatálisis. (a) 400 ng/mL, (b) 600 ng/mL y (c) 800 ng/mL.

Estudio de interferentes en el ensayo.

El estudio de interferencias comprende una etapa crucial durante el desarrollo de un bioelectrodo/biosensor dirigido hacia una aplicación que requiera el uso de fluidos o matrices biológicas reales. El ácido ascórbico (vitamina C) es una molécula presente en diversos entornos biológicos, se ha demostrado que está involucrada en procesos como: absorción de hierro, síntesis de colágeno, regulación de las respuestas inmunes, osteogénesis, mantenimiento de huesos y dientes, así como en la homeostasis neuronal, como antioxidante y cofactor enzimático (Du, Cullen, & Buettner, 2012). Se ha observado que el ácido ascórbico es una molécula electroactiva, ya que puede sufrir procesos de oxidación y reducción; además de que posee la capacidad de ser un donador de electrones, permitiendo que tenga un gran potencial antioxidante (Padayatty et al., 2003). Se ha demostrado que los procesos de óxido-reducción del ácido ascórbico en electrodos sin modificar ocurren en potenciales muy similares a los de neurotransmisores como la dopamina y serotonina, lo cual resulta en una baja selectividad de las señales electroquímicas, afectando la detección conjunta de estas moléculas (Perry, Li, & Kennedy, 2009).

Debido a esto, se estudió la influencia del ácido ascórbico al evaluar las respuestas electroquímicas generadas por el bioelectrodo ESC/MWCNT/MAO-A en presencia de soluciones de distintas concentraciones de ácido ascórbico (200 a 800 ng/mL), así como al examinar la respuesta de una solución estándar de serotonina (400 ng/mL) en fluido corporal simulado, con una concentración igual de ácido ascórbico, mediante voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial.

En la figura 30 se muestra la respuesta electroquímica del bioelectrodo ESC/MWCNT/MAO-A en presencia de ácido ascórbico en fluido corporal simulado (pH 7.4). Se identificaron picos de un proceso de óxido-reducción en presencia de 400 ng/mL de ácido ascórbico, los cuales se ubicaron en 0.08 V y -0.04 V vs Ag/AgCl.

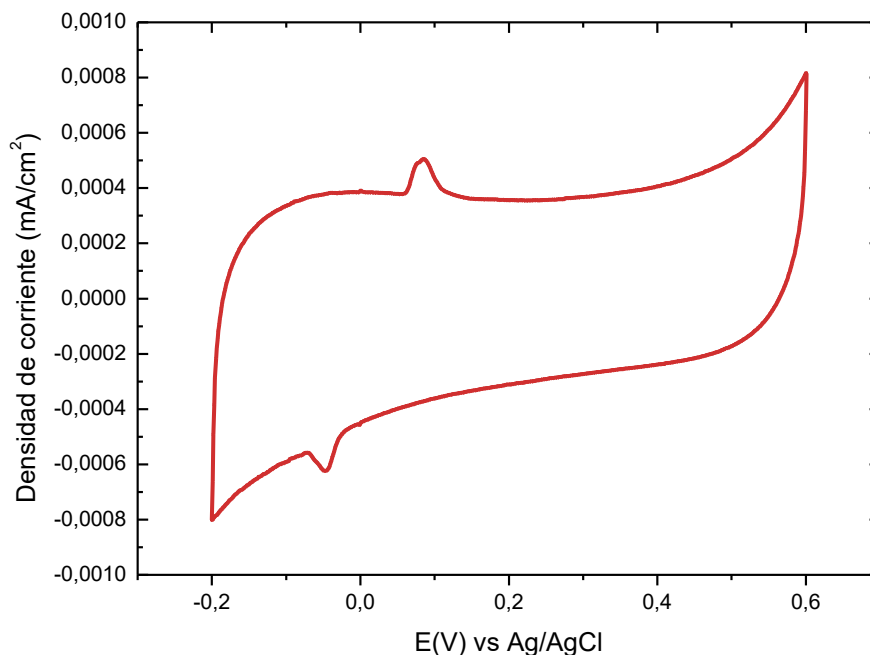


Figura 30. Registro de voltamperometría cíclica del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) en presencia de una solución de ácido ascórbico (800 ng/mL) en fluido corporal simulado (pH 7.4) a 25° C.

Estas señales electroquímicas corresponden al proceso de electrooxidación del ácido ascórbico, en el que se forma ácido dehidroascórbico acompañado por la transferencia de dos electrones y dos protones (Pisoschi, Pop, Serban, & Fafaneata, 2014). La presencia de estas señales en los valores de potencial previamente mencionados se asemeja a los valores de reportados en otros trabajos. Por ejemplo, el grupo de Rand y colaboradores (2013) reportó la presencia de picos de oxidación de ácido ascórbico en 0.13 V, los cuales fueron generados por un electrodo de carbón vítreo modificado con nanofibras de carbono (Rand y col., 2013). Por otra parte, Gupta y colaboradores reportaron que la oxidación del ácido ascórbico ocurre a un potencial de 0.1 V en un electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono multipared (Gupta, Jain, & Shoora, 2013). Los datos obtenidos en este estudio, así como la evidencia en la literatura, indican que la oxidación del ácido ascórbico puede estar ocurriendo a nivel de los nanotubos de carbono multipared que conforman el bioelectrodo.

Posteriormente se evaluaron las respuestas amperométricas generadas por el bioelectrodo en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico

(200, 400, 600 y 800 ng/mL) en fluido corporal simulado (pH 7.4). El análisis del bioelectrodo por medio de voltamperometría de pulso diferencial indicó la generación de respuestas correspondientes a la oxidación del ácido ascórbico en el bioelectrodo (figura 31 a). Dichas respuestas se observaron entre valores de potencial de 0.09 V y 0.11 V vs Ag/AgCl. Asimismo, se logró apreciar un aumento de la magnitud las respuestas amperométricas en función de la concentración de ácido ascórbico, apreciándose un aumento de la corriente en presencia de concentraciones mayores. Lo cual indica que el bioelectrodo posee la capacidad de oxidar distintas concentraciones de ácido ascórbico.

La respuesta amperométrica generada por el bioelectrodo en presencia de una solución estándar de serotonina (800 ng/mL) en conjunto con una concentración igual de ácido ascórbico en fluido corporal simulado se muestra en la figura 31 (b). La evaluación por voltamperometría de pulso diferencial indicó la generación de dos picos distintos de oxidación, el primero correspondiente a la oxidación del ácido ascórbico, localizado en 0.07 V y 0.09 V; y el segundo originado entre 0.25 V y 0.3 V, referente al proceso de óxido reducción del peróxido de hidrógeno.

No se apreció una superposición entre las respuestas generadas por los procesos de oxidación del ácido ascórbico y de serotonina, indicando que el bioelectrodo es capaz de discriminar entre ambos analitos en una misma solución, y por lo tanto, demuestra que la presencia del ácido ascórbico en la muestra no interfiere con la determinación de serotonina.

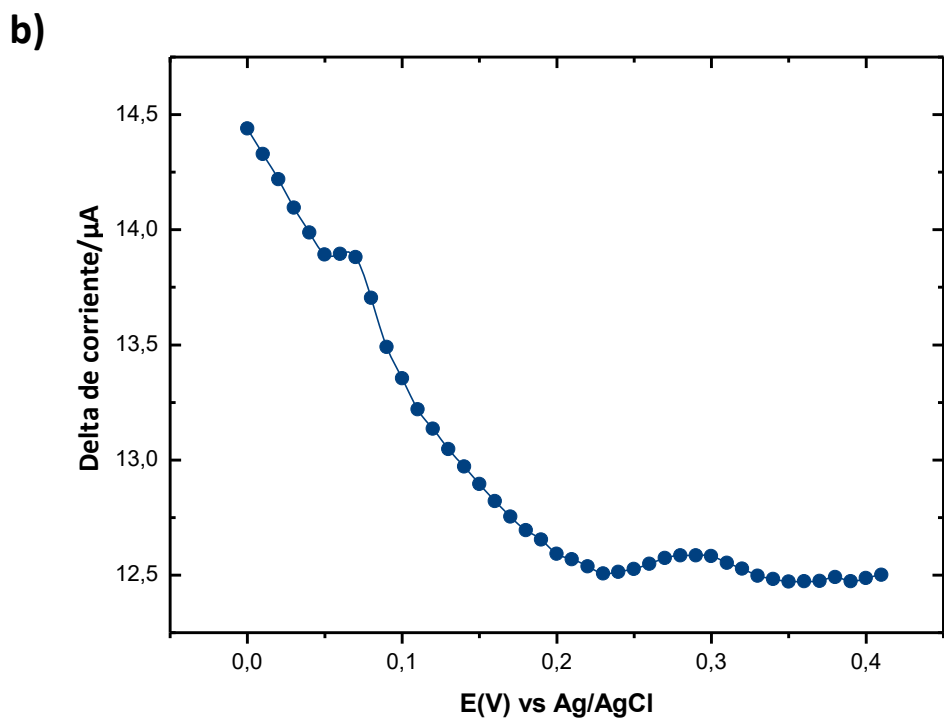
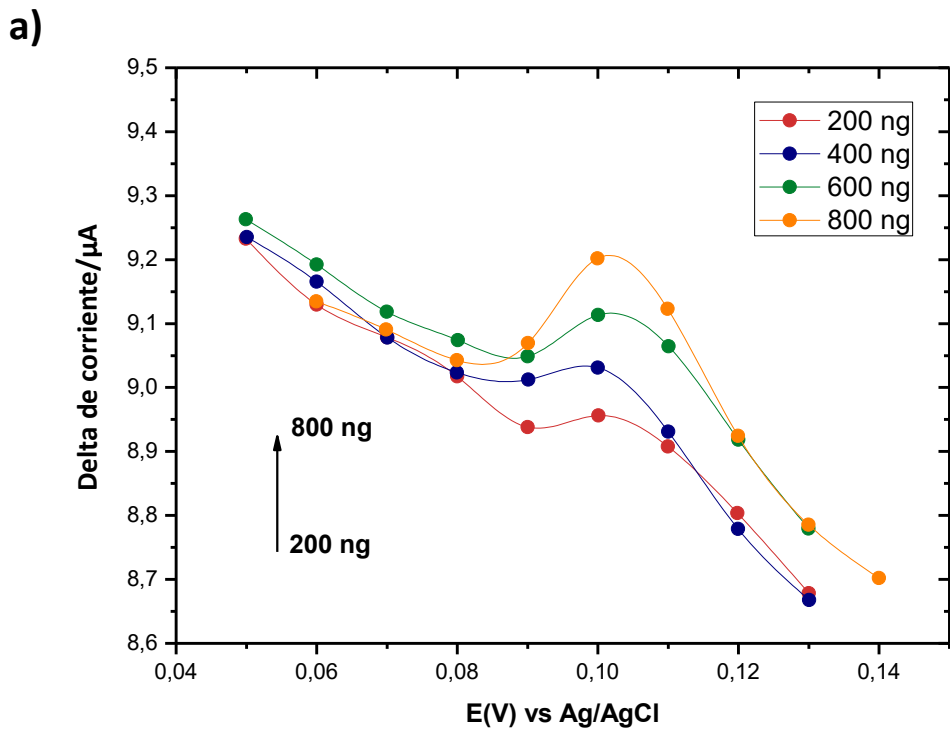


Figura 31. Registros de voltamperometría de pulso diferencial del bioelectrodo (ESC/MWCNT/MAO-A) en presencia de soluciones de ácido ascórbico en fluido corporal simulado (pH 7.4, 25 °C). (a) 200 ng/mL a 800 ng/mL), (b) respuesta del bioelectrodo en presencia de una solución estándar de serotonina (800 ng/mL) + ácido ascórbico (800 ng/mL) en fluido corporal simulado (pH 7.4, 25 °C).

Estos resultados indican que el bioelectrodo desarrollado posee la capacidad de detectar serotonina en presencia de ácido ascórbico, ya que las señales electroquímicas correspondientes a su oxidación no interfieren con la señal generada por la oxidación de la serotonina. Lo cual representa una ventaja, ya que el bioelectrodo posee el potencial de tener un buen rendimiento cuando se empleen fluidos que contengan este interferente, como es el caso de fluidos biológicos reales. Sin embargo, es necesario realizar pruebas con otro tipo de interferentes como el ácido úrico, así como otros tipos de neurotransmisores (epinefrina, dopamina) para evaluar de una manera más integral el rendimiento del bioelectrodo generado.

5. CONCLUSIONES.

Se logró generar un biocatalizador basado en la enzima Monoamino oxidasa-A (MAO-A) inmovilizada en nanotubos de carbono multipared (MWCNT). A través de ensayos de cinética de acoplamiento se determinó que el rendimiento de inmovilización de la enzima al soporte es de 81 %. Además de que se lograron identificar cambios en la morfología de superficie de los nanotubos de carbono, debido a la inmovilización de la enzima.

Mediante ensayos bioquímicos se logró caracterizar el comportamiento de la enzima inmovilizada en el soporte, encontrándose cambios en distintos parámetros bioquímicos de la enzima:

- La MAO-A inmovilizada (MWCNT/MAO-A) presentó un mejoramiento en la afinidad catalítica hacia su sustrato (bencilamina), lo cual se evidenció al mejorar sus parámetros cinéticos (K_M y V_{max}).
- La MAO-A inmovilizada (MWCNT/MAO-A) presentó un pH óptimo de actividad catalítica de 6.5 y exhibió un efecto de estabilidad a valores de pH alcalinos.
- La MAO-A inmovilizada (MWCNT/MAO-A) mostró un cambio en su temperatura óptima de actividad catalítica (35 °C), además de presentar un efecto de termoestabilidad a temperaturas altas.

- La MAO-A inmovilizada (MWCNT/MAO-A) exhibió una buena estabilidad térmica a temperaturas de 35° C y 40° C.
- La MAO-A inmovilizada (MWCNT/MAO-A) mostró una buena estabilidad operacional.
- La MAO-A inmovilizada (MWCNT/MAO-A) tuvo una buena estabilidad en almacenamiento (4° C) comparada con la enzima en forma soluble.

En conjunto, estos datos demostraron que los nanotubos de carbono son un soporte adecuado para la inmovilización covalente de la enzima MAO-A.

A través de la determinación de los valores de potencial Z del biocatalizador en presencia del sustrato (serotonina) se determinó que este presenta una buena afinidad hacia su sustrato, a nivel interacciones electrostáticas.

Por medio de técnicas electroquímicas como voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial se logró demostrar la capacidad electrocatalítica del biocatalizador generado. Se identificaron señales correspondientes al proceso de oxidación electroquímico de la serotonina. Además determinó que existe una dependencia de las respuestas amperométricas generadas por el bioelectrodo hacia cambios en la concentración del analito.

Mediante microscopía electroquímica de barrido se demostró que la enzima MAO-A inmovilizada en nanotubos de carbono mutipared conserva su actividad catalítica, por medio de la reducción electroquímica del subproducto peróxido de hidrógeno. Además se determinó que el biocatalizador genera respuestas electroquímicas correspondientes a la reducción de peróxido de hidrógeno, las cuales son dependientes de la concentración de serotonina.

Se logró desarrollar un bioelectrodo por medio de la modificación de un electrodo serigrafado de carbono, con un biocatalizador basado en la inmovilización de la enzima MAO-A en nanotubos de carbono multipared (MWCNT/MAO-A). El bioelectrodo mostró un buen rendimiento electrocatalítico para la determinación de serotonina en una solución de fluido corporal simulado;

presentando un intervalo lineal de 600 a 1250 ng/mL, con un límite de detección de: 187.01 ng/mL (S/N = 3) y un límite de cuantificación de: 618.59 ng/mL (S/N = 3). Por otra parte el bioelectrodo exhibió una buena estabilidad operacional durante la determinación de serotonina, así como la capacidad de realizar determinaciones de serotonina en presencia de interferente como ácido ascórbico y epinefrina.

Este trabajo comprende un primer acercamiento hacia el desarrollo de un dispositivo autónomo para la determinación de serotonina, que integre el biocatalizador MWCNT/MAO-A. Sin embargo, para lograr el desarrollo de un dispositivo autónomo, como es el caso de un *biosensor*, es necesario diseñar y construir el sistema correspondiente al procesamiento de la señal generada por el transductor, con el objetivo de obtener una señal que pueda ser interpretada de forma sencilla por el usuario. Para el procesamiento de la señal se pueden emplear tecnologías basadas en la microelectrónica y el micromaquinado, las cuales permiten el diseño de sistemas de circuitos integrados, como es el caso de la tecnología de semiconductores complementarios de óxidos-metálicos (en inglés CMOS), con la que se pueden diseñar arreglos de millones de transistores en plataformas de tipo *lab-on-a-chip*. Por otra parte, para el potencial desarrollo de un dispositivo se ha considerado la implementación de tecnologías derivadas de la manipulación de fluidos en espacios del orden de los micrómetros (*microfluídica*), las cuales ofrecen ventajas como la reducción de los reactivos empleados para el análisis, reducción de los tiempos de análisis, miniaturización y disminución del consumo de energía. En conjunto, se pretende implementar este tipo de tecnologías para lograr el desarrollo de un dispositivo que tenga una potencial aplicación biomédica, como una herramienta que pueda ser empleada como auxiliar en el diagnóstico, dentro del área de la salud.

6. REFERENCIAS.

- Albert, P. R., Benkelfat, C., & Descarries, L. (2012). The neurobiology of depression—revisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1601), 2378–2381. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0190>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Fifth Edition* (5th ed). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M., & Thomson Jr., J. A. (2015). Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 51, 164–188. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.018>
- Apetrei I.M., & Apetrei C. (2013). Amperometric tyrosinase based biosensors for serotonin detection. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(3), 8253–8262.
- Bertrand, M. J. (1998). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry Edited by Frank A. Settle. Prentice Hall: Upper Saddle River. 1997. xxi + 995 pp. ISBN 0-13-177338-0. *Journal of the American Chemical Society*, 120(26), 6633–6633. <https://doi.org/10.1021/ja975671k>
- Biju, V. (2014). Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 43(3), 744–764. <https://doi.org/10.1039/c3cs60273g>
- Binda, C., Mattevi, A., & Edmondson, D. E. (2011). Structural properties of human monoamine oxidases A and B. *International Review of Neurobiology*, 100, 1–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386467-3.00001-7>
- Buckley, P. F., Miller, B. J., Lehrer, D. S., & Castle, D. J. (2009). Psychiatric Comorbidities and Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 35(2), 383–402. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn135>
- Celada, P., Puig, M. V., & Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 25. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00025>
- Cole, V. T., Apud, J. A., Weinberger, D. R., & Dickinson, D. (2012). Using latent class growth analysis to form trajectories of premorbid adjustment in schizophrenia. *Journal of Abnormal Psychology*, 121(2), 388–395. <https://doi.org/10.1037/a0026922>

- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Dayan, P., & Huys, Q. J. M. (2008). Serotonin, inhibition, and negative mood. *PLoS Computational Biology*, 4(2), e4. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0040004>
- Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1826(2), 443–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003>
- Dunn, R. V., Marshall, K. R., Munro, A. W., & Scrutton, N. S. (2008). The pH dependence of kinetic isotope effects in monoamine oxidase A indicates stabilization of the neutral amine in the enzyme–substrate complex. *FEBS Journal*, 275(15), 3850–3858. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06532.x>
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y.-J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., ... Fombonne, E. (2012). Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research*, 5(3), 160–179. <https://doi.org/10.1002/aur.239>
- Fakhoury, M. (2015). New insights into the neurobiological mechanisms of major depressive disorders. *General Hospital Psychiatry*, 37(2), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2015.01.005>
- Fombonne, E., Marcin, C., Bruno, R., Tinoco, C. M., & Marquez, C. D. (2012). Screening for Autism in Mexico. *Autism Research*, 5(3), 180–189. <https://doi.org/10.1002/aur.1235>
- Gabriele, S., Sacco, R., & Persico, A. M. (2014). Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology*, 24(6), 919–929. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.02.004>
- Gao, Y., & Kyratzis, I. (2008). Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide—a Critical Assessment. *Bioconjugate Chemistry*, 19(10), 1945–1950. <https://doi.org/10.1021/bc800051c>
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 8(3), 1400–1458.
- Gupta, V. K., Jain, A. K., & Shoora, S. K. (2013). Multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for the simultaneous determination of ascorbic acid and caffeine. *Electrochimica*

Acta, 93(Supplement C), 248–253.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.065>

- Holmes, A. (2008). Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(7), 1293–1314. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.006>
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1), 165–229.
- Ji, P., Tan, H., Xu, X., & Feng, W. (2010). Lipase covalently attached to multiwalled carbon nanotubes as an efficient catalyst in organic solvent. *AIChE Journal*, 56(11), 3005–3011. <https://doi.org/10.1002/aic.12180>
- Kessler, R. C., & Bromet, E. J. (2013). The epidemiology of depression across cultures. *Annual Review of Public Health*, 34, 119–138. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114409>
- Keszthelyi, D., Troost, F. J., & Masclee, A. a. M. (2009). Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterology & Motility*, 21(12), 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01370.x>
- Kim, B. C., Lee, I., Kwon, S.-J., Wee, Y., Kwon, K. Y., Jeon, C., ... Kim, J. (2017). Fabrication of enzyme-based coatings on intact multi-walled carbon nanotubes as highly effective electrodes in biofuel cells. *Scientific Reports*, 7, 40202. <https://doi.org/10.1038/srep40202>
- Kim, S. K. (2015). Recent update of autism spectrum disorders. *Korean Journal of Pediatrics*, 58(1), 8–14. <https://doi.org/10.3345/kjp.2015.58.1.8>
- Kirsch, J., Siltanen, C., Zhou, Q., Revzin, A., & Simonian, A. (2013). Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. *Chemical Society Reviews*, 42(22), 8733–8768. <https://doi.org/10.1039/C3CS60141B>
- Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>
- Li, J., & Lin, X. (2007). Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 124(2), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.01.021>
- Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T., & Murray, C. J. L. (2006). Measuring the Global Burden of Disease and Risk Factors, 1990–2001. In A. D. Lopez, C. D. Mathers, M. Ezzati, D. T. Jamison, & C. J. Murray (Eds.),

Global Burden of Disease and Risk Factors. Washington (DC): World Bank. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11817/>

- Lu, X., Wang, Q., & Liu, X. (2007). Review: Recent applications of scanning electrochemical microscopy to the study of charge transfer kinetics. *Analytica Chimica Acta*, 601(1), 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.021>
- Maciejewska, M., Schäfer, D., & Schuhmann, W. (2006). SECM imaging of spatial variability in biosensor architectures. *Electrochemistry Communications*, 8(7), 1119–1124. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.04.021>
- Marcinko, D., Pivac, N., Martinac, M., Jakovljević, M., Mihaljević-Peles, A., & Muck-Seler, D. (2007). Platelet serotonin and serum cholesterol concentrations in suicidal and non-suicidal male patients with a first episode of psychosis. *Psychiatry Research*, 150(1), 105–108. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2006.08.012>
- Markošová, K., Dolejš, I., Stloukal, R., Rios-Solis, L., Rosenberg, M., Micheletti, M., ... Rebroš, M. (2016). Immobilisation and kinetics of monoamine oxidase (MAO-N-D5) enzyme in polyvinyl alcohol gels. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 129(Supplement C), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.04.009>
- Martín-López, M., Manuel Perea, J., Morabet, L., & Francisco Navarro, J. (2008). Actualización del papel de la enzima MAO-A en la regulación de la conducta agresiva. *Psiquiatría Biológica*, 15(05), 175–181.
- Michael, A. C., & Borland, L. M. (Eds.). (2007). *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1847/>
- Mirzaei, M., & Sawan, M. (2014). Microelectronics-Based Biosensors Dedicated to the Detection of Neurotransmitters: A Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 14(10), 17981–18008. <https://doi.org/10.3390/s141017981>
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(3), 187–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00944.x>

- Mozaffari, S. A., Chang, T., & Park, S.-M. (2010). Self-assembled monolayer as a pre-concentrating receptor for selective serotonin sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.015>
- Münzer, A. M., Heimgreiter, M., Melzer, K., Weise, A., Fabel, B., Abdellah, A., ... Scarpa, G. (2013). Back-gated spray-deposited carbon nanotube thin film transistors operated in electrolytic solutions: an assessment towards future biosensing applications, *1*(31), 3797–3802. <https://doi.org/10.1039/C3TB20170H>
- Murphy, D. L., & Lesch, K.-P. (2008). Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nature Reviews. Neuroscience*, *9*(2), 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrn2284>
- Nasirizadeh, N., Shekari, Z., Nazari, A., & Tabatabaee, M. (2016). Fabrication of a novel electrochemical sensor for determination of hydrogen peroxide in different fruit juice samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, *24*(1), 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.06.006>
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin receptors. *Chemical Reviews*, *108*(5), 1614–1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>
- Özel, R. E., Hayat, A., & Andreescu, S. (2015). RECENT DEVELOPMENTS IN ELECTROCHEMICAL SENSORS FOR THE DETECTION OF NEUROTRANSMITTERS FOR APPLICATIONS IN BIOMEDICINE. *Analytical Letters*, *48*(7), 1044–1069. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.976867>
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., ... Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, *22*(1), 18–35.
- Pagan, C., Delorme, R., Callebert, J., Goubran-Botros, H., Amsellem, F., Drouot, X., ... Launay, J.-M. (2014). The serotonin-N-acetylserotonin–melatonin pathway as a biomarker for autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, *4*(11), e479. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.120>
- Patel, A. N., Unwin, P. R., & Macpherson, J. V. (2013). Investigation of film formation properties during electrochemical oxidation of serotonin (5-HT) at polycrystalline boron doped diamond. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *15*(41), 18085–18092. <https://doi.org/10.1039/C3CP53513D>
- Perry, M., Li, Q., & Kennedy, R. T. (2009). Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. *Analytica Chimica Acta*, *653*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.08.038>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Serban, A. I., & Fafaneata, C. (2014). Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*,

121(Supplement C), 443–460.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.127>

- Piven, J., Tsai, G. C., Nehme, E., Coyle, J. T., Chase, G. A., & Folstein, S. E. (1991). Platelet serotonin, a possible marker for familial autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 21(1), 51–59.
- Putzbach, W., & Ronkainen, N. J. (2013). Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(4), 4811–4840. <https://doi.org/10.3390/s130404811>
- Rand, E., Periyakaruppan, A., Tanaka, Z., Zhang, D., Marsh, M. P., Andrews, R. J., ... Koehne, J. E. (2013). A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid. *Biosensors & Bioelectronics*, 42, 434–438. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.10.080>
- Richardson-Jones, J. W., Craige, C. P., Nguyen, T. H., Kung, H. F., Gardier, A. M., Dranovsky, A., ... Leonardo, E. D. (2011). Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(16), 6008–6018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5836-10.2011>
- Rismetov, B., Ivandini, T. A., Saepudin, E., & Einaga, Y. (2014). Electrochemical detection of hydrogen peroxide at platinum-modified diamond electrodes for an application in melamine strip tests. *Diamond and Related Materials*, 48(Supplement C), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2014.07.003>
- Roiser, J. P., Levy, J., Fromm, S. J., Nugent, A. C., Talagala, S. L., Hasler, G., ... Drevets, W. C. (2009). The effects of tryptophan depletion on neural responses to emotional words in remitted depression. *Biological Psychiatry*, 66(5), 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.05.002>
- Ruhé, H. G., Mason, N. S., & Schene, A. H. (2007). Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Molecular Psychiatry*, 12(4), 331–359. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001949>
- Saifuddin, N., Raziah, A. Z., & Junizah, A. R. (2013). Carbon Nanotubes: A Review on Structure and Their Interaction with Proteins [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2013/676815>
- Saldanha, D., Kumar, N., Ryali, V., Srivastava, K., & Pawar, A. (2009). Serum serotonin abnormality in depression. *Medical Journal Armed Forces India*, 65(2), 108–112. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(09\)80120-2](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(09)80120-2)

- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- Schäfer, D., Maciejewska, M., & Schuhmann, W. (2007). SECM visualization of spatial variability of enzyme–polymer spots: 1. Discretisation and interference elimination using artificial neural networks. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9), 1887–1895. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.07.039>
- Schultz, N., Metreveli, G., Franzreb, M., Frimmel, F. H., & Syldatk, C. (2008). Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 66(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.05.004>
- Selvaraj, S., Arnone, D., Cappai, A., & Howes, O. (2014). Alterations in the serotonin system in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 45, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.06.005>
- Shahrokhian, S., & Saberi, R.-S. (2011). Electrochemical preparation of over-oxidized polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composite on glassy carbon electrode and its application in epinephrine determination. *Electrochimica Acta*, 57(Supplement C), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.04.029>
- Singh, S. P., Singh, V., Kar, N., & Chan, K. (2010). Efficacy of antidepressants in treating the negative symptoms of chronic schizophrenia: meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 197(3), 174–179. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.109.067710>
- Squires, L. N., Jakubowski, J. A., Stuart, J. N., Rubakhin, S. S., Hatcher, N. G., Kim, W.-S., ... Sweedler, J. V. (2006). Serotonin Catabolism and the Formation and Fate of 5-Hydroxyindole Thiazolidine Carboxylic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13463–13470. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602210200>
- Tavares, A. P. M., Silva, C. G., Dražić, G., Silva, A. M. T., Loureiro, J. M., & Faria, J. L. (2015). Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454(Supplement C), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.054>
- Tilmaciu, C.-M., & Morris, M. C. (2015). Carbon nanotube biosensors. *Frontiers in Chemistry*, 3. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00059>
- Veenstra-VanderWeele, J., & Blakely, R. D. (2012). Networking in autism: leveraging genetic, biomarker and model system findings in the search for

- new treatments. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(1), 196–212. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.185>
- Verma, M. L., Naebe, M., Barrow, C. J., & Puri, M. (2013). Enzyme Immobilisation on Amino-Functionalised Multi-Walled Carbon Nanotubes: Structural and Biocatalytic Characterisation. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073642>
- Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(6), 574–579. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.009>
- Weisstaub, N. V., Zhou, M., Lira, A., Lambe, E., González-Maeso, J., Hornung, J.-P., ... Gingrich, J. A. (2006). Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5786), 536–540. <https://doi.org/10.1126/science.1123432>
- Wrona, M. Z., Lemordant, D., Lin, L., Blank, C. L., & Dryhurst, G. (1986). Oxidation of 5-hydroxytryptamine and 5,7-dihydroxytryptamine. A new oxidation pathway and formation of a novel neurotoxin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 29(4), 499–505. <https://doi.org/10.1021/jm00154a013>
- Xu, H., Wang, L., Luo, J., Song, Y., Liu, J., Zhang, S., & Cai, X. (2015). Selective recognition of 5-hydroxytryptamine and dopamine on a multi-walled carbon nanotube-chitosan hybrid film-modified microelectrode array. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(1), 1008–1021. <https://doi.org/10.3390/s150101008>
- Yang, Q., Zhao, Y., Bai, J., Wu, L., Zhang, H.-M., & Qu, L. (2015). Detection of epinephrine and metanephrine at a nitrogen doped three-dimensional porous graphene modified electrode. *Analytical Methods*, 7(24), 10394–10402. <https://doi.org/10.1039/C5AY02454D>
- Zafeiriou, D. I., Ververi, A., Dafoulis, V., Kalyva, E., & Vargiami, E. (2013). Autism spectrum disorders: the quest for genetic syndromes. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 162B(4), 327–366. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32152>
- Zalsman, G., Aslanov-Farbstein, D., Rehavi, M., Roz, N., Vermeiren, R., Laor, N., ... Toren, P. (2011). Platelet vesicular monoamine transporter 2 density in the disruptive behavior disorders. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 21(4), 341–344. <https://doi.org/10.1089/cap.2010.0148>
- Zigah, D., Pellissier, M., Fabre, B., Barrière, F., & Hapiot, P. (2009). Covalent immobilization and SECM analysis in feedback mode of glucose oxidase on a modified oxidized silicon surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 628(1), 144–147. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.01.013>

Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules*, 19(9), 14139–14194. <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>

