



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

Desarrollo de electrodo basado en glucosa
oxidasa inmovilizada en hidróxidos doble
laminares de NiAl para multisensor de
neurotransmisores

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Ingeniero en Nanotecnología

Presenta

María Guadalupe Araiza Ramírez

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Querétaro, Qro. Abril 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Desarrollo de electrodo basado en glucosa oxidada
inmovilizada en hidróxidos dobles laminares de NiAl
para multisensor de neurotransmisores

por

María Guadalupe Araiza Ramírez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGLIN-255138



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Ingeniería en Nanotecnología

DESARROLLO DE ELECTRODO BASADO EN GLUCOSA OXIDASA
INMOVILIZADA EN HIDRÓXIDOS DOBLE LAMINARES DE NiAl PARA
MULTISENSOR DE NEUROTRANSMISORES

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

María Guadalupe Araiza Ramírez

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

SINODALES

Dra. Janet Ledesma García

Presidente

Firma

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Secretario

Firma

Dra. Alejandra Álvarez López

Vocal

Firma

Dr. José Alberto Rodríguez Morales

Suplente

Firma

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro
México
Abril 2023

RESUMEN

En este trabajo se desarrolla una inmovilización enzimática de la enzima glucosa oxidasa sobre hidróxidos doble laminares de níquel y aluminio para la creación de electrodos para el sensado de los neurotransmisores dopamina, serotonina y epinefrina que se encuentran en la sangre humana. Este electrodo también podrá llevar a cabo la oxidación de la glucosa presente en la misma sangre y podría realizar la conversión de energía, pudiendo ser aplicable como electrodos auto-alimentables en dispositivos Lab-on-a-Chip.

Los electrodos auto-alimentables basados en celdas de combustible tienen un futuro muy prometedor en los dispositivos Lab on a Chip porque no necesitan una fuente de alimentación externa para el suministro de energía del mismo dispositivo, sus procesos de fabricación son relativamente simples y de bajo costo, y pueden ser desarrollados para diferentes aplicaciones como la determinación de biomoléculas o para la aplicación en el diagnóstico de diversas enfermedades. La serotonina está ligada a una gran variedad de síndromes psiquiátricos como la esquizofrenia, epilepsia, parkinson, síndrome de Down y autismo. La dopamina es de gran importancia en el estudio farmacológico y médico debido a la relación que tienen con diversas enfermedades cardíacas, estrés, trastornos neurológicos y tumores cancerosos. Sus niveles anormales se asocian con la esquizofrenia, las enfermedades de Alzheimer, las enfermedades de Parkinson, la fisiopatología de la depresión, entre otros. La deficiencia de la epinefrina puede causar ansiedad, depresión y trastornos del sueño, pero el exceso puede causar alta presión sanguínea, sudoración excesiva y migrañas. Entre los combustibles utilizados en Lab on a Chip, la glucosa ha sido reportada como excelente combustible siendo el combustible orgánico de mayor interés debido a que está presente en la mayoría de los seres vivos, como en la sangre. El desarrollo de este proyecto tendrá un gran impacto energético y en el área de la salud debido a las aplicaciones que puede tener el electrodo desarrollado.

Primeramente, se llevó a cabo la síntesis de los NiAl-LDHs y la elaboración de una tinta catalítica para elaborar los electrodos y realizar la inmovilización enzimática y se determinó que se inmoviliza un 49.36% de enzima en 90 minutos, después se determinaron los parámetros operacionales de la enzima inmovilizada sobre los NiAl-LDHs y se determinó que a una temperatura de 37 °C y un pH de 7.4 mantiene una actividad enzimática óptima del 85-87%.

También se realizó una evaluación de la celda microfluídica y se obtuvo una densidad de potencia de 0.678 mWcm⁻² para una concentración de glucosa de 5mM.

Por último, se realizó una evaluación electroquímica para determinar los potenciales de oxidación de cada uno de los neurotransmisores y de la glucosa como interferente, se obtuvieron potenciales de oxidación de 0.249 V, 0.112 V y 0.102 V para la serotonina, dopamina y epinefrina respectivamente y de -0.44 V para la glucosa.

A mis padres, que siempre me han guiado y apoyado para ser lo que soy hoy en día.

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento al Laboratorio Nacional de Micro y Nano fluídica por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones.

A mi asesora, la Dra. Janet Ledesma por guiarme y darme las bases para poder realizar mi trabajo, así como también ser parte fundamental de lo que hoy he logrado.

A la Dra. Alejandra Álvarez por darme de su tiempo y apoyarme en el laboratorio, así como sus consejos y aportes a mi trabajo.

De igual manera a la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ingeniería y a todos mis profesores por su paciencia, dedicación y por compartir los conocimientos que hoy llevo conmigo.

A mis padres Emma y Jorge por su apoyo incondicional y porque siempre estuvieron aún en los momentos más difíciles y en que ya no podía más. Hoy que concluyo mis estudios les dedico este gran logro, el cual no hubiera logrado sin su apoyo.

A mi novio Alonso, a quien agradezco por estar a mi lado en todo momento, y darme su apoyo cuando más lo he necesitado, el que me motiva a cumplir mis metas y todo lo que me proponga.

A mis compañeros y amigos, con los cuales compartí extensas horas de estudio y desvelo, pero también muchas horas de risas. Ustedes que fueron un pilar fundamental en mi formación, gracias por enseñarme tantas cosas.

INDICE

RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTOS.....	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ESTADO DEL ARTE	5
Tecnología Lab-on-a-chip	5
Celdas de combustible	5
Celda microfluídica.....	6
Biocelda de combustible	8
Glucosa oxidasa	13
Electrodos autoalimentables.....	16
Hidróxidos doble laminares.....	17
Serotonina	19
Dopamina.....	21
Epinefrina.....	23
Interferentes	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
III. Metodología	29
Síntesis de NiAl-LDHs	29
Elaboración de la tinta catalítica	29
Elaboración de solución tampón (Buffer de fosfatos)	29
Inmovilización enzimática.....	30
Actividad enzimática	31
Evaluación de pH óptimo	31
Evaluación de temperatura óptima	32
Evaluación a diferentes concentraciones de sustrato	32
Evaluación en celda	32
Evaluación electroquímica	33
Evaluación de interferentes	34
IV. RESULTADOS	35
V. CONCLUSIONES	52

VI. PERSPECTIVAS Y TRABAJO FUTURO	54
VII. ANEXOS	55
BIBLIOGRAFÍA.....	62

I. INTRODUCCIÓN

Un multi-sensor es un dispositivo capaz de medir diferentes sustancias o moléculas de interés al mismo tiempo. Este tipo de sensores han adquirido gran importancia en aplicaciones biomédicas en la determinación de niveles de glucosa, colesterol, urea o lactato debido a la relación que se ha descubierto que tienen estas sustancias con el desarrollo de diversas enfermedades.

Un ejemplo de estas moléculas de interés son los neurotransmisores, éstos son sustancias químicas endógenas liberadas por el sistema neuronal central y periférico, los cuales son utilizados por las neuronas para comunicarse entre sí a través de la transmisión sináptica y se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos del cerebro y los fluidos corporales de los mamíferos (Tohgi et al., 1993).

El sensado de neurotransmisores ha ganado relevancia mundial debido al estilo de vida actual; la sociedad contemporánea vive en un clima de tensión y aceleración. Los acontecimientos político-económicos, congestiones de tránsito, presiones laborales, los altos niveles de inseguridad, dietas deficientes, sustancias químicas tóxicas, infecciones y factores genéticos son sólo algunos de los causantes, estos pueden causar alteraciones en la concentración de diversos neurotransmisores en el sistema nervioso central, estas alteraciones se han relacionado con multitud de enfermedades psiquiátricas (esquizofrenia, depresión, demencia, etc.), enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington, autismo, epilepsia, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, etc.), y otras enfermedades (glaucoma, arritmias, escasez de hormona tiroidea, daño cardíaco congestivo, síndrome de muerte infantil, desánimo y angustia, etc.) (Banerjee et al., 2020)

Entre los neurotransmisores más importantes están la dopamina, serotonina y epinefrina. La dopamina tiene múltiples funciones en el cerebro tales como la modulación del comportamiento y cognición, movimiento voluntario, motivación, castigo y recompensa, inhibición de la producción de prolactina, estado de ánimo, atención, memoria de trabajo y aprendizaje

(Calabresi et al., 2007). Los niveles anormales de dopamina están relacionados con muchos trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos, incluida la enfermedad de Parkinson, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome de Tourette (Kurian et al., 2011) y algunos desórdenes alimenticios (Worley, 2017).

En el sistema nervioso central la serotonina es conocida por controlar el estado de ánimo, comportamiento, aprendizaje, sueño y ansiedad. En la periferia, la serotonina es capaz de mediar la contracción y relajación vascular, proliferación de células y apoptosis (Ruddell et al., 2008). Los niveles anormales de serotonina están ligados a una gran variedad de síndromes psiquiátricos como la esquizofrenia, depresión, epilepsia, Parkinson (Chase & Murphy, 1973), síndrome de Down y autismo (Whitaker-Azmitia, 2001).

Algunos estudios de captación de serotonina en plaquetas de sangre humana han demostrado una reducción en la captación de serotonina en pacientes con depresión (Quan-Bui et al., 1984). Otro estudio ha demostrado que los niños con hiperactividad presentan valores más bajos de serotonina en la sangre que niños sin hiperactividad de la misma edad (Coleman, 1971).

La epinefrina tiene efectos en el cuerpo como el aumento de los niveles de azúcar en la sangre, aumento de la frecuencia cardíaca, aumento de la contractilidad del corazón y relajación del músculo liso en las vías respiratorias para mejorar la respiración. Estos efectos están diseñados para proporcionar al cuerpo energía cuando se está muy estresado o asustado. La deficiencia de epinefrina puede causar ansiedad, depresión y trastornos del sueño, pero el exceso puede causar alta presión sanguínea, sudoración excesiva y migrañas. (Tsele et al., 2017)

En la actualidad el diagnóstico de muchas de las enfermedades psiquiátricas es efectuado únicamente con base en los síntomas del paciente, es decir, en la mayoría de las ocasiones no se realizan análisis sanguíneos. Los síntomas son solo parte del cuadro general debido a su inespecificidad, en otras palabras, un síntoma aislado puede indicar diversos cuadros. Por esta

razón, se realizan análisis de sangre para determinar el perfil de los neurotransmisores que pueden estar involucrados en diversos padecimientos, sin embargo, estos suelen ser tardados, costosos y generar molestias al paciente para la obtención de la muestra. Con base en lo anterior, el desarrollo de un dispositivo que tenga un tiempo de análisis corto, sea preciso, confiable y utilice la mínima cantidad de muestra es necesario para obtener mejores y más oportunos diagnósticos.

Para la detección de neurotransmisores se han desarrollado diferentes materiales y métodos, como lo es la detección por colorimetría basado en nanopartículas de oro (Kong et al., 2011) o la cromatografía líquida de ultra alta resolución (Bergh et al., 2016). Actualmente se busca diseñar o rediseñar sensores con materiales que sean cada vez más sensibles, específicos, fáciles de trabajar, no tóxicos y de bajo costo. (Ou et al., 2019)

Los hidróxidos doble laminares (LDHs) consisten en láminas de hidróxido de metal separadas unas de otras por aniones y moléculas de agua (Qi et al., 2006). Recientemente, los LDHs de níquel-aluminio (NiAl-LDHs) se han considerado como un prometedor material de electrodo en campos de la electroquímica debido a su alta capacitancia electroquímica específica y a su bajo costo, lo cual los hace útiles en el sensado de sustancias químicas.

Debido a características como su estructura laminar, alta densidad de carga en las láminas, biocompatibilidad, buena capacidad de intercambio aniónico y comportamiento de adsorción favorable, los NiAl-LDHs es un material muy atractivo para su uso como matriz en la inmovilización de algunas enzimas como la glucosa oxidasa (GOx).(Shan et al., 2006)

Esta enzima tiene aplicaciones en la industria de alimentos, fermentación y textil, pero se utiliza principalmente en biosensores debido a su alta especificidad para catalizar la oxidación de la D-glucosa en muestras sanguíneas. Gracias a la tecnología de la inmovilización enzimática, la GOx

se puede implementar en los llamados electrodos auto-alimentables, los cuales pueden captar los electrones de la reacción de oxidación de la D-glucosa presente en la muestra y utilizarlos para que, en conjunto con el material sobre el que se realiza la inmovilización (NiAl-LDHs) oxiden moléculas de interés y así, realizar el sensado o análisis de la muestra en cuestión.

Actualmente la tecnología Lab-on-a-chip se encuentra en desarrollo sobre todo para sistemas microfluídicos de detección. Los dispositivos auto-alimentables están siendo cada vez más investigados debido a que presentan varias ventajas, la más importante es que se elimina la necesidad de usar un potenciostato, incluyendo los circuitos y la fuente de alimentación, ya que la energía necesaria se obtendrá al oxidar la muestra. De igual manera, con este tipo de dispositivos se puede obtener una mayor sensibilidad y se puede hacer una simplificación por un diseño de 2 electrodos en lugar de uno de 3 electrodos.

El uso de materiales nanoestructurados en el diseño de electrodos de este tipo puede llevar al desarrollo de dispositivos con tiempos de análisis más cortos, más precisos y confiables, y así obtener mejores y más oportunos diagnósticos.

II. ESTADO DEL ARTE

Tecnología Lab-on-a-chip

La tecnología Lab-on-a-chip se centra en el desarrollo de dispositivos a escala micro o nanométrica con la integración de funciones que se llevarían a cabo a nivel de laboratorio, pero a una escala miniaturizada, lo cual incluye la fabricación y uso de sistemas micro-electromecánicos con empleo de microfluídos. De esta manera se mejora el rendimiento de los dispositivos, ofreciendo una plataforma portátil, extendida y continuamente renovada para diversas aplicaciones basadas en la idea de miniaturización (Y. Zhang et al., 2016). Los tiempos de reacción rápidos, el pequeño volumen de muestra requerido, la alta disponibilidad del dispositivo y la ausencia de contaminación cruzada hacen que estos dispositivos sean adecuados para usos clínicos (Osinga et al., 2015)(Lee, 2013). Algunas de las aplicaciones de la tecnología Lab-on-a-chip en el campo biomédico son inmunoensayos para detección de bacterias, chips de detección de PCR en tiempo real, chip de ADN, chip genético, chip de análisis celular, citómetro de flujo (para VIH) entre otras. Esta tecnología es básicamente la integración de la fluídica, electrónica, óptica y biosensores (Gupta et al., 2016a).

El tamaño de este chip puede variar desde milímetros hasta unos pocos centímetros cuadrados además que estos dispositivos pueden manejar volúmenes de fluido extremadamente pequeños de menos de pico litros (Gupta et al., 2016b).

Las celdas de combustible son una tecnología prometedora para los sistemas Lab-on-a-chip.

Celdas de combustible

Una celda de combustible es un dispositivo electroquímico (Figura 1) que convierte la energía química proveniente de un combustible en electricidad y calor. En una celda típica, el combustible se alimenta de forma continua al compartimiento del ánodo (electrodo negativo) y un oxidante, es decir, el oxígeno del aire, es alimentado continuamente al

compartimiento del cátodo (electrodo positivo) (Sharaf & Orhan, 2014). La oxidación electroquímica del combustible en el ánodo genera electrones que fluyen hacia el cátodo a través de un circuito externo, estos electrones causan la reducción electroquímica del oxidante en el cátodo. (Ibrahim Dincer, 2020)

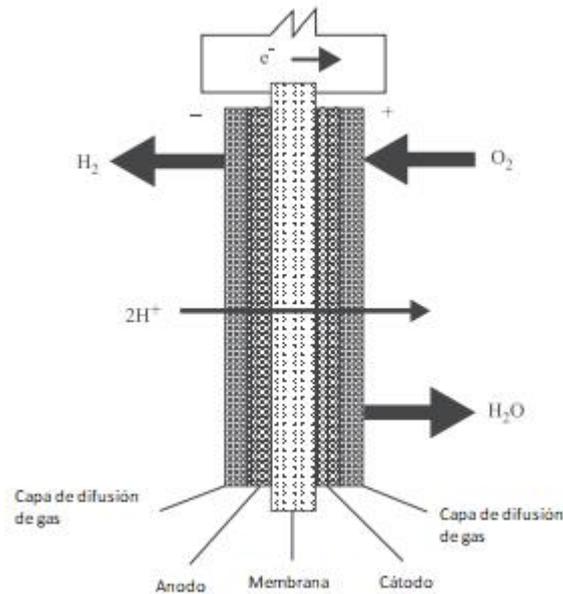


Figura 1. Celda de combustible típica. (Yu et al., 2016)

El combustible es típicamente una solución acuosa de glucosa, metanol, ácido fórmico o hidrógeno disuelto y la solución oxidante puede contener oxígeno disuelto, peróxido de hidrógeno o permanganato.

Celda microfluídica

Una celda de combustible microfluídica se define como una celda de combustible con suministro y eliminación de fluidos, sitios de reacción y estructuras de electrodos confinadas a un canal microfluídico, esto es, sistemas que aprovechan los canales de escala micrométrica para manipular y procesar volúmenes bajos de muestra (1×10^{-9} a 1×10^{-18} L) (Whitesides, 2006). Por este motivo, estos sistemas, requieren cantidades menores de reactivos costosos (Jayamohan et al., 2017).

Las celdas de combustible miniaturizadas ofrecen varias ventajas sobre las celdas de combustible convencionales, como portabilidad, transferencia de masa más rápida y, por lo tanto, un inicio rápido para una generación rápida de energía y una mayor densidad de energía (Safdar et al., 2016).

Este tipo de celda de combustible funciona sin una barrera física ya que se agrega un electrolito a las corrientes de combustible y oxidante para facilitar el transporte de iones a través de las corrientes que fluyen conjuntamente, eliminando así la necesidad de una membrana de separación (Safdar et al., 2016) entre el ánodo y el cátodo, y puede usar catalizadores tanto metálicos como biológicos (Kjeang et al., 2009). La figura 2 muestra un esquema básico de una celda de combustible miniaturizadas (microfluídicas).

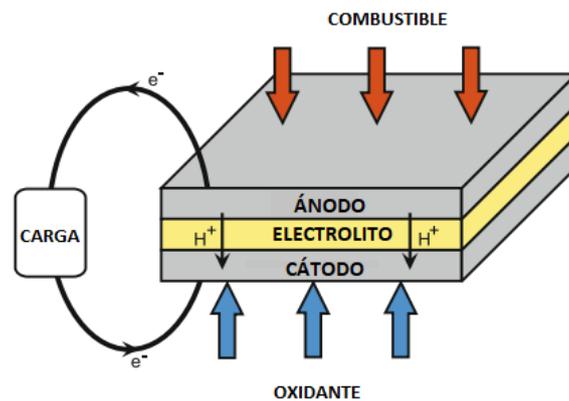


Figura 2. Diseño básico de una celda de combustible, con sus componentes básicos: ánodo y cátodo separados por un electrolito y conectados a una carga externa. (Kjeang et al., 2008)

Muchos diseños de celdas de combustible microfluídicas están optimizados para su uso con catalizadores biológicos. Convencionalmente, los biocatalizadores se colocan en una celda electroquímica de dos compartimentos que contiene la solución buffer con el combustible y el oxidante concentrado en los compartimentos anódico y catódico,

respectivamente (Shukla et al., 2005).

Biocelda de combustible

Las bioceldas de combustible son dispositivos electroquímicos en los que se hace uso de enzimas redox para obtener energía eléctrica proveniente de la energía química almacenada en biomoléculas (combustible) (Gonzalez-Solino & Di Lorenzo, 2018). En la Figura 3 se muestra un esquema de una biocelda de combustible, en el lado del ánodo un combustible sufre una oxidación catalizada por enzimas, esta reacción libera electrones que llegan al lado del cátodo a través de un circuito externo. En el cátodo se reduce un oxidante, por lo tanto, la corriente eléctrica fluye de acuerdo con una diferencia de potencial. (Barelli et al., 2021)

Debido a su alta especificidad, alta actividad catalítica y el bajo número de desechos producidos en el proceso; las enzimas han llamado mucho la atención para ser utilizadas en diversas industrias como la farmacéutica y la alimentaria. Aunque son numerosas las ventajas del uso de enzimas, se presentan algunos inconvenientes, debido a su solubilidad en agua, es difícil separarlas de los productos y no pueden reutilizarse, tampoco son muy resistentes a cambios en el medio, por esto se han buscado diferentes métodos para mejorar su estabilidad sin perder su especificidad ni reducir su actividad. Esto puede lograrse inmovilizando a la enzima, esto es, confinar físicamente a la enzima en un soporte físico reteniendo su actividad, esto la hace insoluble y facilita la separación de la enzima de los productos y puede ser reutilizada, permitiendo reducir los costos. La forma inmovilizada de las enzimas imita su forma natural en las células vivas, donde la mayoría de ellas están unidas al citoesqueleto celular, la membrana y las estructuras de los organelos (Homaei et al., 2013).

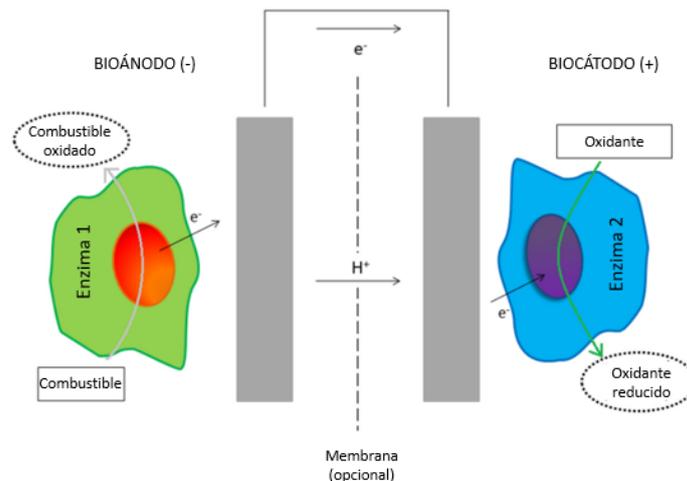


Figura 3. Representación esquemática de una biocelda de combustible enzimática. (Barelli et al., 2021)

El proceso de inmovilización puede provocar una pérdida de la actividad enzimática, esta pérdida depende muchas veces del método de inmovilización.

Tomando en cuenta el soporte o matriz y el tipo de enlaces que están involucrados, hay 5 métodos de inmovilización de enzimas:

1) Adsorción

En este método la enzima es adsorbida en el soporte usado que puede ser un soporte mineral, orgánico o resinas de intercambio aniónico. Con este método no se logra una unión permanente ya que sólo hay enlaces débiles estabilizando la enzima con el soporte, este tipo de enlaces pueden ser interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

La inmovilización por adsorción física es uno de los métodos más simples y puede realizarse bajo condiciones estáticas, de agitación o por deposición y además no se presenta una gran pérdida de actividad enzimática. Por otra parte, también presenta algunos inconvenientes, por ejemplo, la enzima inmovilizada tiene poca estabilidad, la cantidad de la enzima adsorbida es más susceptible a cambios en los parámetros de temperatura, fuerza iónica y pH; y la enzima se puede quitar fácilmente del portador (soporte) debido a las fuerzas débiles entre ellos (D. H. Zhang et al.,

2013) (Walker & Trevan, 2003a).

2) Unión covalente

En este método se forman enlaces covalentes entre los grupos funcionales no esenciales de la enzima y los del soporte. Los grupos funcionales que pueden formar enlaces covalentes son los grupos amino, imino, hidroxil, carboxil, tiol, metitiol, guanidil, imidazol y anillo fenólico.

Los soportes que se pueden utilizar en este método son carbohidratos, proteínas y soportes inorgánicos. Generalmente, este método puede unir la enzima con el soporte firmemente y evitar el desprendimiento y la fuga de la enzima. Sin embargo, a menudo causa la baja recuperación de la actividad enzimática, que es el resultado de la destrucción de la conformación activa de la enzima durante la reacción de inmovilización, la unión multipunto a los soportes, el impedimento estérico de la enzima o la fuerte unión del enlace covalente.

Normalmente, es más caro y complejo inmovilizar covalentemente una enzima debido a los mayores costes del soporte además de que el soporte a menudo debe activarse antes de la inmovilización. Sin embargo, tiene mayor estabilidad y normalmente un desprendimiento mínimo de enzima (Novick & Rozzell, 2005) (Walker & Trevan, 2003b).

3) Atrapamiento

En este método las enzimas son físicamente atrapadas dentro de una matriz porosa de algún polímero soluble en agua. Esto se hace a menudo mezclando la enzima con un monómero y un reticulante, y polimerizando el monómero alrededor de la enzima (Novick & Rozzell, 2005). En teoría, la enzima atrapada no está unida al polímero; su libre difusión es simplemente restringida. Este método preserva la movilidad de la enzima y permite incrementar su actividad y enantioselectividad aunque su mayor desventaja es la tendencia de las enzimas a filtrarse a través de la matriz (D. H. Zhang et al., 2013) (Walker & Trevan, 2003c)

4) Cross linking (Entrecruzamiento)

En este método no se necesita de un soporte ya que las enzimas son directamente unidas con enlaces covalentes entre sí, formando una compleja estructura 3D que se puede lograr por métodos químicos o físicos. Los métodos químicos de reticulación normalmente implican la formación de enlaces covalentes entre las enzimas por medio de un reactivo multifuncional, como glutaraldehído, ácido dicarboxílico o tolueno y se usan agentes floculantes, como poliaminas, polietilenimina, poliestireno sulfonatos, y varios fosfatos para los métodos físicos.

Su principal desventaja es que la enzima puede perder actividad parcialmente o quedar totalmente inactivada en caso de que el reactivo de reticulación reaccione a través del sitio activo. (M.M., 2011).

5) Encapsulación

Este tipo de inmovilización se realiza encerrando a las enzimas dentro de una membrana. A menudo se utilizan membranas de ultrafiltración o fibras huecas hechas de polietersulfona, nitrato o acetato de celulosa, o nailon. El tamaño de los poros debe elegirse correctamente para permitir que el sustrato y el producto entren y salgan de la membrana mientras aún retienen la enzima. Dado que la enzima existe en su forma soluble, la actividad suele ser alta (Novick & Rozzell, 2005).

La principal desventaja de este método es que puede haber una ruptura de la membrana si los productos de una reacción se acumulan rápidamente (M.M., 2011).

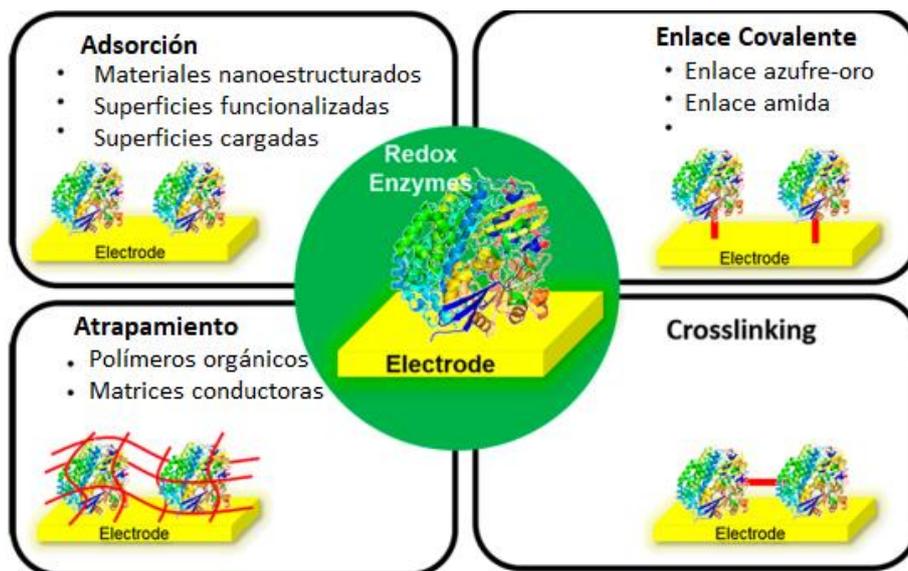


Figura 4. Métodos de inmovilización enzimática sobre electrodos (Xiao et al., 2019).

En la figura 4 se muestra un esquema representativo de los algunos de los métodos de inmovilización enzimática que se pueden realizar sobre electrodos, así como algunos materiales sobre los cuales se realiza dicha inmovilización comúnmente.

Las características fisicoquímicas del soporte a utilizar son muy importantes para determinar el rendimiento del sistema enzimático inmovilizado. Las propiedades de soporte ideales incluyen resistencia física a la compresión, hidrofilia, inercia frente a las enzimas, biocompatibilidad, resistencia al ataque microbiano y disponibilidad a bajo costo (Brena et al., 2013). Sin embargo, no existe una regla general para escoger el soporte o el método de inmovilización ya que cada uno presenta ciertas ventajas y desventajas.

El método de adsorción es simple, barato y efectivo, pero frecuentemente reversible. El método de enlace covalente y cross linking son efectivos y durables pero son caros y pueden afectar el funcionamiento de la enzima, el método de atrapamiento y encapsulamiento tiene imitaciones de transferencia masa y fuga de enzimas (Ali Khan & Alzohairy, 2010).

Glucosa oxidasa

Existen enzimas que son utilizadas en diversas industrias y procesos, como lo es la enzima glucosa oxidasa (GOx), esta enzima tiene aplicaciones en la industria de alimentos, fermentación y textil, pero se utiliza principalmente en biosensores, debido a su alta especificidad para catalizar la oxidación de la D-glucosa, pero no de la L- glucosa.

La glucosa oxidasa o glucosa-1-oxidasa (GOX) (β -D-glucosa: oxígeno-1-oxidoreductasa) es un homodímero formado por dos subunidades idénticas de 80 kDa y dos flavin adenina dinucleótido (FAD) unidos no covalentemente (Zoldák et al., 2004). Su actividad máxima está entre 20 y 50 °C con un pH óptimo de 5.5 pero con un rango de entre 4-7. Se inactiva rápidamente a temperaturas mayores a 60 °C (Wong et al., 2008) y tiene un punto isoeléctrico de 4.2 (Pazur & Kleppe, 1964). Las principales fuentes de donde se obtiene la GOx son los hongos de las familias *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Saccharomyces* (Bulmuş et al., 1997).

La GOx cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a D-gluconolactona y peróxido de hidrógeno, la D-gluconolactona se descompone espontánea y catalíticamente a ácido glucónico como se observa en la figura 5.

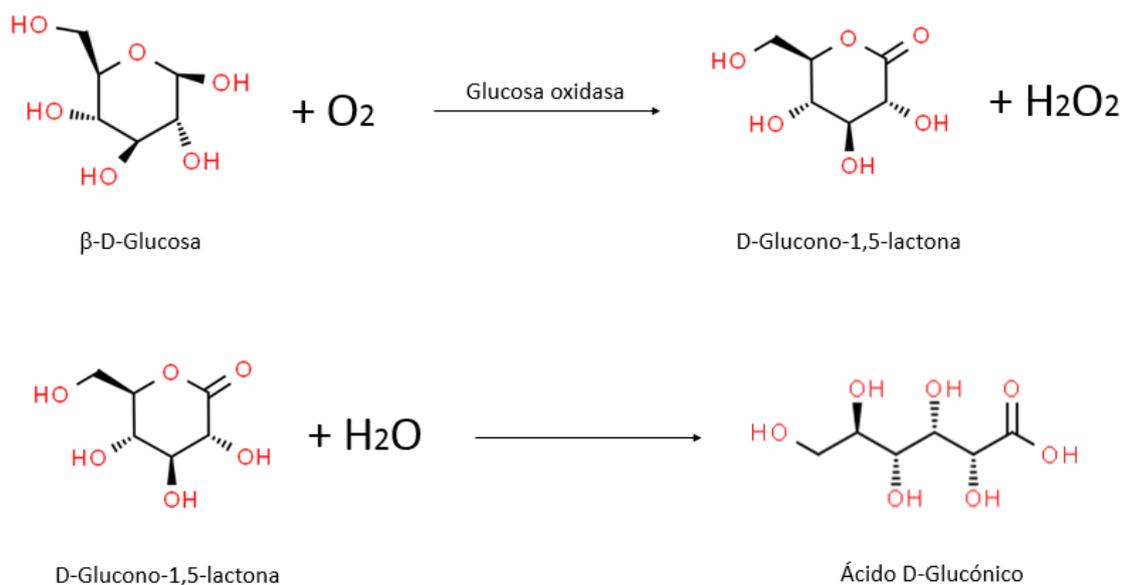


Figura 5. Mecanismo de reacción de la enzima GOX.

La conversión de β -D-glucosa en ácido glucónico implica la transferencia de dos protones y dos electrones desde el sustrato hacia FAD (Haouz et al., 1998).

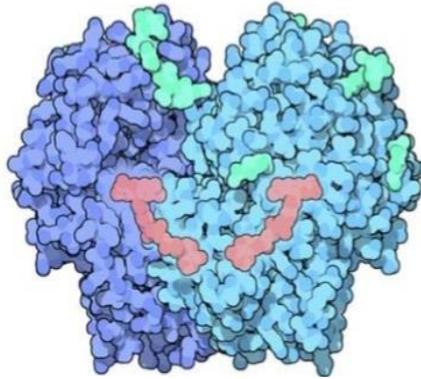


Figura 6. Glucosa oxidasa con sus dos subunidades (azul) y la coenzima FAD (rosa). (Goodsell, 2006).

Se conoce que la enzima nativa (ver Figura 6) contiene dos moléculas de dinucleótido flavina-adenina (FAD) (KEILIN & HARTREE, 1952) que son responsables de las propiedades de oxidación-reducción de la enzima. Se cree que ambos están firmemente enlazados, pero no unidos covalentemente, a la porción polipeptídica de la enzima y es posible eliminarlos sin desnaturalizar irreversiblemente la enzima.

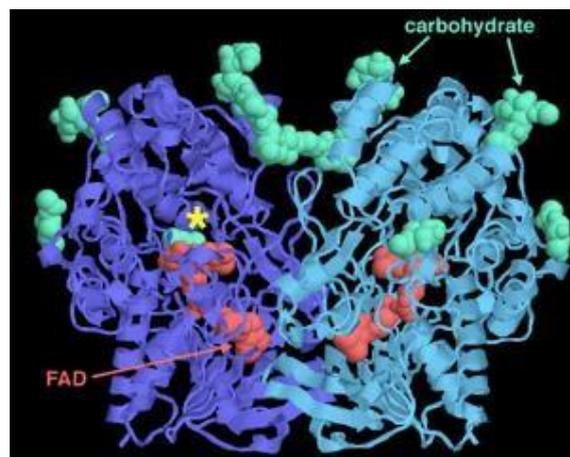


Figura 7. Estructura de la glucosa oxidasa (Goodsell, 2006).

La reacción de oxidación es realizada por los cofactores FAD unidos profundamente dentro de la enzima, mostrados en rosa. El sitio activo donde se une la glucosa está justo por encima del FAD, en un bolsillo profundo que se muestra con una estrella. Se observa que la enzima, como muchas proteínas que actúan fuera de las células, está cubierta por cadenas de carbohidratos, que se muestran en verde en la figura 7.

Para mantener la actividad catalítica, mejorar su rendimiento, estabilidad y productividad, la enzima GOx ha sido inmovilizada con diferentes métodos y en diferentes soportes. Muchos materiales pueden ser usados como soporte en la inmovilización de la GOx, como la polianilina (Parente et al., 1992), la cual permite mayor área de inmovilización, esta trabaja como aceptor de electrones durante la reacción debido a sus propiedades redox. Las matrices de polímero como el poli (ácido o-amino benzoico) le da a la GOx un ambiente más natural al no estar atrapadas en el polímero, sino unidas covalentemente a la superficie del polímero (Rauf et al., 2006), lo que le otorga una mayor estabilidad y mejora su actividad catalítica (Wang & Caruso, 2005).

Con muchos de estos métodos de inmovilización de la GOx se pretende desarrollar electrodos de glucosa, en los que se mide la formación y la cantidad de los productos de la reacción. El primer producto es la D-gluconolactona que rápidamente se hidroliza a ácido glucónico. También, gracias a la tecnología de la inmovilización la enzima glucosa oxidasa, se puede aplicar en los llamados electrodos auto-alimentables, los cuales pueden realizar la oxidación de la D-glucosa presente en la muestra para captar los electrones de dicha reacción y utilizarlos para que en conjunto con el material sobre el que se realiza la inmovilización (LDHs) oxiden moléculas de interés como los neurotransmisores y de esa forma realizar el sensado o análisis de la muestra en cuestión.

Electrodos autoalimentables

En 2001, Willner y Katz acuñaron el término "biosensor autoalimentable" para una celda de biocombustible que generaba una energía eléctrica proporcional a la concentración del analito (Grattieri & Minter, 2018).

Los electrodos autoalimentables son llamados así debido a que están libres de cualquier tipo de fuente de alimentación externa y de conexión eléctrica (X. Zhang et al., 2016) ya que mediante la oxidación del analito generan energía eléctrica que es usada para alimentar al dispositivo.

En este tipo de dispositivos se pueden usar diferentes fuentes para obtener energía:

- **Vibración:** Cuando un dispositivo está sujeto a vibraciones, se puede usar una masa inercial para crear movimiento entre las partes de un generador y convertirse en energía eléctrica usando inducción electromagnética, un material piezoeléctrico o un material electrostrictivo.
- **Energía solar:** Pueden ser celdas solares de película delgada o fibra óptica en el que la luz se convierte en energía eléctrica mediante una fotocelda, y se utilizan convertidores de voltaje para producir un voltaje útil.
- **Termoeléctrica y nuclear:** Las diferencias de temperatura se pueden aprovechar para generar energía. Se podrían extraer 2.4-4.8 W de la diferencia de temperatura de la piel de un ser humano, otro ejemplo es un marcapasos que utiliza una fuente de plutonio radiactivo para generar calor.
- **Potencia de radio y acoplamiento magnético:** Tienen la ventaja de combinar energía y comunicaciones. La limitación es la necesidad de llevar periódicamente el lector / unidad de potencia dentro del rango de transmisión del dispositivo.

Todas estas fuentes de energía y otras pueden usarse para desarrollar dispositivos autoalimentables (Glynne-Jones & White, 2001).

Las celdas de combustible enzimáticas pueden funcionar como sensores amperométricos autoalimentables para algunas biomoléculas objetivo. El sistema es fácil de miniaturizar y tiene un diseño muy simple, consiste en un ánodo y un cátodo, el cátodo actúa como transductor y la enzima redox en el ánodo como bioreceptor. No son necesarios transductores externos y los cambios en la corriente se relacionan con cambios en la concentración de la molécula de interés (Gonzalez-Solino & Di Lorenzo, 2018).

Para que el electrodo funcione como sensor adecuadamente debe tener una matriz adecuada en la que estarán las enzimas, debe permitir una inmovilización estable, buena integración de las enzimas a la matriz y retener eficientemente la funcionalidad de estas.

Hidróxidos doble laminares

Los hidróxidos doble laminares (LDHs) consisten en láminas de hidróxido de metal cargadas positivamente separadas unas de otras por aniones y moléculas de agua (ver figura 8) (Qi et al., 2006). La fórmula de estos hidróxidos doble laminares es $[M^{2+}_{1-x} M^{3+}_x(OH)_2]^{x+} A^{z-}_{x/z} \cdot mH_2O$, en donde M^{2+} es un catión metálico divalente ($Mg^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, etc$), M^{3+} es un catión metálico trivalente ($Al^{3+}, Fe^{3+}, Cr^{3+}, etc$), A^{z-} es un anión intercambiable para compensar la carga positiva de los hidróxidos doble laminares y puede ser casi cualquier anión orgánico o inorgánico ($OH^-, SO_4^{4-}, NO_3^-, etc$), y $x = M^{3+} / (M^{2+} + M^{3+})$ y puede tener valores entre 0.1 y 0.5. (Li et al., 2017; Qi et al., 2006; M. Shen et al., 2016; Valente et al., 2009; L. Zhang et al., 2016).

En particular, los LDHs que contienen un metal de transición como Co(II), Ni(II) o Mn(III), capaces de sufrir una reacción redox reversible en el rango de potencial útil, se han propuesto como materiales de recubrimiento de electrodos debido a sus propiedades de transporte de carga y de catalizador redox, especialmente en solución alcalina (Mignani et al., 2006).

El níquel ha demostrado tener una interacción muy grande con los grupos aminoacídicos de la glucosa oxidasa, esto debido a la presencia de los centros de níquel en la estructura tipo brucita de los LDHs (Guadagnini et al., 2010), es por eso que junto con el aluminio, se han hecho hidróxidos doble laminares que promueven una mejor adsorción de la enzima a la superficie (Wang & Caruso, 2005).

Recientemente, los NiAl-LDHs se han considerado como un prometedor material de electrodo en campos de la electroquímica debido a su alta capacitancia específica teórica y su bajo costo. Dentro de la estructura de los NiAl-LDHs, el papel del $Al(OH)_3$ es el de soportar la estructura de las capas, mientras que el $Ni(OH)_2$ contribuye a la capacitancia electroquímica específica (Li et al., 2017). Además de la capacitancia eléctrica de doble capa adquirida por sus abundantes capas, en particular, varios procesos faradaicos de sitios activos electroquímicos podrían ocurrir en la superficie o cerca del rango de la superficie para el almacenamiento de carga, lo que lleva a un alto almacenamiento de energía y al mismo tiempo mantiene un rendimiento potente comparable al de los materiales de electrodos supercapacitivos (L. Zhang et al., 2016).

Por lo tanto, su estructura laminar y su alta densidad de carga en las láminas las hace muy atractivas como matriz para la inmovilización de algunas enzimas dependiendo de su punto isoeléctrico. En un pH de 6.5 la glucosa oxidasa tiene una carga negativa y los LDHs carga positiva, lo cual puede ser favorable para la adsorción de la enzima a la superficie de las láminas.

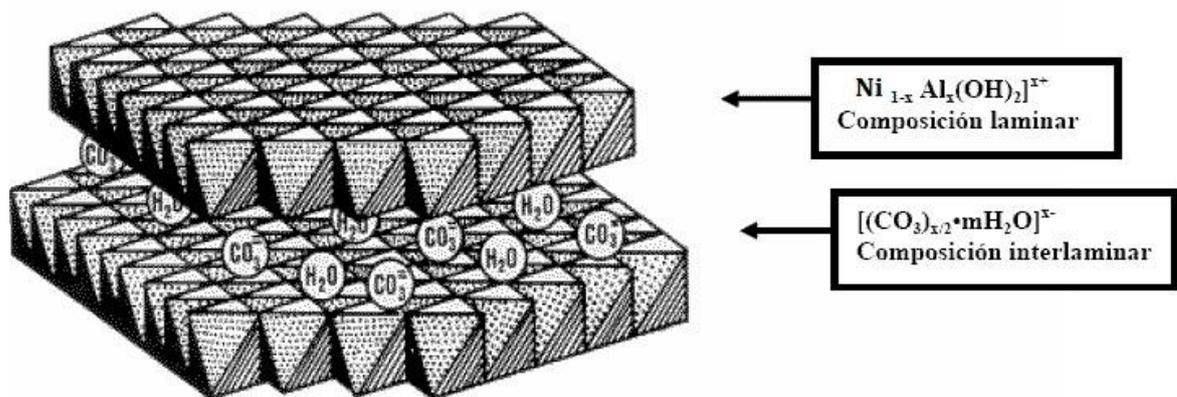


Figura 8. Estructura de los Hidróxidos dobles laminares de Ni-Al.

Los NiAl-LDHs son excelentes soportes para inmovilizar enzimas por varias razones, su alto contenido en agua proporciona un entorno biocompatible para las enzimas, presenta alta movilidad del analito y el producto, no son tóxicas y tienen alta estabilidad química e hidrolítica (González-Sáiz & Pizarro, 2001). Estos biosensores muestran buenos resultados en términos de sensibilidad, tiempo de respuesta y estabilidad a largo plazo y para aplicación en dispositivos Lab-on-a-Chip, el níquel puede ser de gran interés en aplicaciones biomédicas ya que puede ser capaz de medir varios neurotransmisores.

Los neurotransmisores son sustancias químicas liberadas por la neurona para ejercer un efecto potencial en algunos receptores. Estos se comunican a través de la sinapsis y buscan ejercer algún efecto en la célula postsináptica (Kapalka, 2010). Entre los neurotransmisores más importantes está la serotonina, la dopamina y la epinefrina.

Serotonina

Durante aproximadamente un siglo, se sabía que existía una sustancia vasoconstrictora en el suero de los mamíferos, más tarde esta sustancia fue aislada en el laboratorio de Irvine H. Page en 1948 y fue llamada "serotonina" (Folk & Long, 1988).

La serotonina, una amina indólica como la melatonina, funciona como un neurotransmisor para las células que residen en el tallo cerebral, aunque también se encuentra en la periferia como en el intestino y en los vasos sanguíneos (Holloway & Peirce, 1998).

En el sistema nervioso central la serotonina es conocida por controlar el estado de ánimo, comportamiento, aprendizaje, sueño y ansiedad. En la periferia, la serotonina es capaz de mediar la contracción y relajación vascular, proliferación de células y apoptosis (Ruddell et al., 2008). El primer paso en la síntesis de serotonina implica la captación del aminoácido esencial triptófano, en una reacción catalizada por la enzima triptófano hidroxilasa, el resultado es el 5-hidroxitriptofano que enseguida es descarboxilado por la enzima aromática L-amino ácido descarboxilasa para formar serotonina (5-HT).

Aunque la serotonina se conoce por ser un neurotransmisor en el cerebro, cerca del 95% de la serotonina es en realidad sintetizada, almacenada y liberada por células enterocromafines en la mucosa intestinal, estas células generan serotonina a partir del aminoácido L-triptófano por medio de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) (Wu et al., 2019).

Las plaquetas son responsables de recoger la serotonina del intestino y los pulmones y proporcionan el principal depósito periférico de serotonina, las plaquetas liberan serotonina en los sitios de lesión donde contribuye al reclutamiento plaquetario y a la trombo propagación (Mercado & Kilic, 2010). Es por esto que se ha identificado que las plaquetas son la mayor fuente de serotonina (Lesurtel et al., 2006).

La serotonina está ligada a una gran variedad de síndromes psiquiátricos como la esquizofrenia, epilepsia, parkinson (Chase & Murphy, 1973), síndrome de Down y autismo (Whitaker-Azmitia, 2001). Un estudio de captación de serotonina en plaquetas de sangre humana ha demostrado una reducción en la captación de serotonina en pacientes con depresión (Quan-Bui et al., 1984)(Quan-Bui et al., 1984). Otro estudio ha demostrado que los

niños con hiperactividad presentan valores más bajos de serotonina en la sangre que niños sin hiperactividad de la misma edad (Coleman, 1971)

Otras enfermedades y trastornos que se asocian a un nivel bajo de serotonina son ansiedad, migrañas, hemostasia no regulada, coagulación sanguínea, síndrome de muerte súbita del lactante y síndrome carcinoide (Sharma et al., 2018).

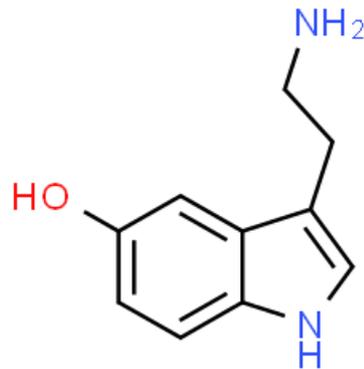


Figura 9. Estructura química de la Serotonina. Chemspider

En la figura 9 se muestra la estructura química de la serotonina la cual puede ser encontrada en las plaquetas de la sangre y tiene un rango normal de 50 a 200 ng/mL (0.28 a 1.14 $\mu\text{mol/L}$) (Chernecky & Berger, 2013).

Dopamina

Hasta mediados del siglo XX, se creía que la dopamina era puramente un sustrato intermedio en la vía de síntesis de epinefrina/norepinefrina, no fue hasta que, en 1958, Carlsson hizo un descubrimiento histórico, identificando la presencia de dopamina en el cuerpo estriado de una rata, la cual se agotó con la administración de reserpina. La rata mostró reversión en los síntomas en la administración de levedopa. Este trabajo pionero implicó, por primera vez, el papel de la dopamina en la neurotransmisión (Zhao et al., 2008).

La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido tirosina, que es

absorbido en el cerebro a través de un mecanismo de transporte activo. La tirosina se produce en el hígado a partir de la fenilalanina por medio de la acción de la fenilalanina hidroxilasa. La tirosina se transporta a neuronas que contienen dopamina, donde una serie de reacciones la convierten en dopamina (Musacchio, 1975).

Hay cuatro vías de dopamina en el cerebro: nigro-estriatal, asociado con movimiento; mesolímbico, asociado con placer; mesocortical, asociado con cognición, comportamiento emocional y memoria; y tuberoinfundibular, asociado con la regulación de la prolactina y la excitación sexual (Ayano, 2016).

La dopamina tiene múltiples funciones en el cerebro como en la modulación del comportamiento y cognición, movimiento voluntario, motivación, castigo y recompensa, inhibición de la producción de prolactina, dormir, soñar, estado de ánimo, atención, memoria de trabajo y aprendizaje (Calabresi et al., 2007).

La homeostasis anormal de la dopamina está implicada en muchos trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos, incluida la enfermedad de Parkinson, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome de Tourette (Kurian et al., 2011) y algunos desórdenes alimenticios (Worley, 2017). Los niveles de dopamina en la sangre juegan un rol importante en los trastornos de salud mental, por ejemplo, los niveles altos de dopamina están asociados con esquizofrenia y bajos niveles de dopamina están asociados con el trastorno por déficit de atención/hiperactividad. (Ayano, 2016).

Casi toda la dopamina es almacenada en plaquetas ya que se ha investigado que sólo el 1% circula libremente en el plasma (DA PRADA & PICOTTI, 1979). Se han realizado varios estudios en los que relacionan los niveles de dopamina en la sangre con algunas enfermedades como la migraña, la concentración de dopamina en las plaquetas es mayor en los pacientes con migraña comparados con pacientes saludables (D'Andrea et al., 2006). De igual manera, los pacientes con paraganglioma de cuello y

cabeza presentan niveles de dopamina en las plaquetas significativamente más altos que pacientes sanos (Osinga et al., 2015), en cambio, los pacientes con esquizofrenia presentan niveles de dopamina en las plaquetas similares a los pacientes sanos (Dean et al., 1992)

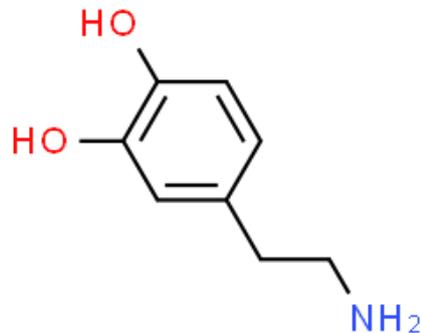


Figura 10. Estructura química de la dopamina. Chempider

En la figura 10 se muestra la estructura química de la dopamina, la cual puede ser encontrada en la sangre y tiene un rango normal de 0 a 30 pg/mL (195.8 pmol/L) (Chernecky & Berger, 2013).

Epinefrina

La epinefrina, también conocida como adrenalina, se aisló por primera vez de la glándula suprarrenal a fines de la década de 1890 por el científico japonés Jokichi Takamine (Hackney, 2017).

La epinefrina se sintetiza a partir del aminoácido tirosina, que se convierte en dihidroxifenilalanina (DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa. El DOPA, a su vez, se descarboxila por el aminoácido l-aromático descarboxilasa para formar dopamina, la dopamina se hidroxila para dar norepinefrina por la dopamina beta hidroxilasa. En la médula suprarrenal y en algunas regiones del cerebro, la norepinefrina se convierte en epinefrina por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa. La epinefrina se metaboliza por las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y catecol-O metiltransferasa (COMT), así como por alcohol y aldehído deshidrogenasas (Eisenhofer et al., 2004).

La epinefrina, un neurotransmisor dentro del sistema nervioso central, también actúa como una hormona periférica. Es una monoamina y catecolamina y se produce en el paso final de conversión de tirosina (Kapalka, 2010). En el hígado y los músculos, esta hormona causa la glucogenólisis (producción de glucosa a partir del glucógeno) (Roy Choudhury et al., 2011).

La epinefrina se libera en respuesta al estrés y aumenta la frecuencia cardíaca, fortalece la fuerza de la contracción y el gasto cardíaco, aumenta la presión arterial y abre los bronquiolos en los pulmones, y eleva los niveles sanguíneos de glucosa y lípidos, entre otros efectos. La secreción de epinefrina es parte de la respuesta humana de "lucha o huida", la respuesta de estrés agudo al miedo, la amenaza percibida o el pánico (Vardanyan & Hruby, 2006). Además, la epinefrina es una de las principales hormonas involucradas en la estimulación del sistema nervioso simpático (Kapalka, 2010).

Un nivel de adrenalina excesivo generalmente se observa en personas altamente emocionales y agresivas. Por otro lado, hay algunos trastornos de las glándulas suprarrenales que reducen el nivel de epinefrina por debajo de lo normal, incluida la enfermedad de Addison y otras formas de hipoadrenalismo (Vardanyan & Hruby, 2006).

La deficiencia de epinefrina también puede causar ansiedad, depresión y trastornos del sueño, pero el exceso puede causar alta presión sanguínea, sudoración excesiva y migrañas.

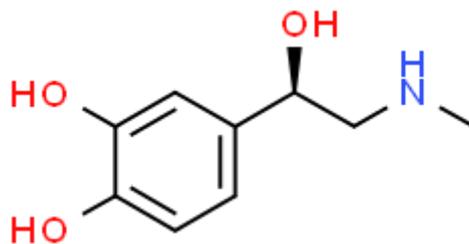


Figura 11. Estructura química de la epinefrina. Chemspider

En la figura 11 se muestra la estructura química de la epinefrina, la cual puede ser encontrada en sangre y tiene un rango normal de 0 a 140 pg/ml (764,3 pmol/L) (Chernecky & Berger, 2013).

Existen diferentes métodos para determinar la cantidad de neurotransmisores presentes en una muestra, pero muchas veces estos métodos convencionales son complicados, consumen mucho tiempo y, a menudo, requieren un pretratamiento de la muestra, lo que los hace inadecuados para la detección rápida. Sin embargo, debido a las propiedades electroactivas de estos neurotransmisores, se pueden determinar por métodos electroquímicos. Esto se basa en la electro-oxidación de los neurotransmisores en la superficie del electrodo (ver figura 12), las corrientes generadas proporcionan una medida cuantitativa de las fluctuaciones químicas dinámicas que se pueden correlacionar con la farmacología, el comportamiento y la patología de algunas enfermedades psiquiátricas. (Bucher & Wightman, 2015)

Los sensores electroquímicos ofrecen ventajas de alta sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad (Sharma et al., 2018).

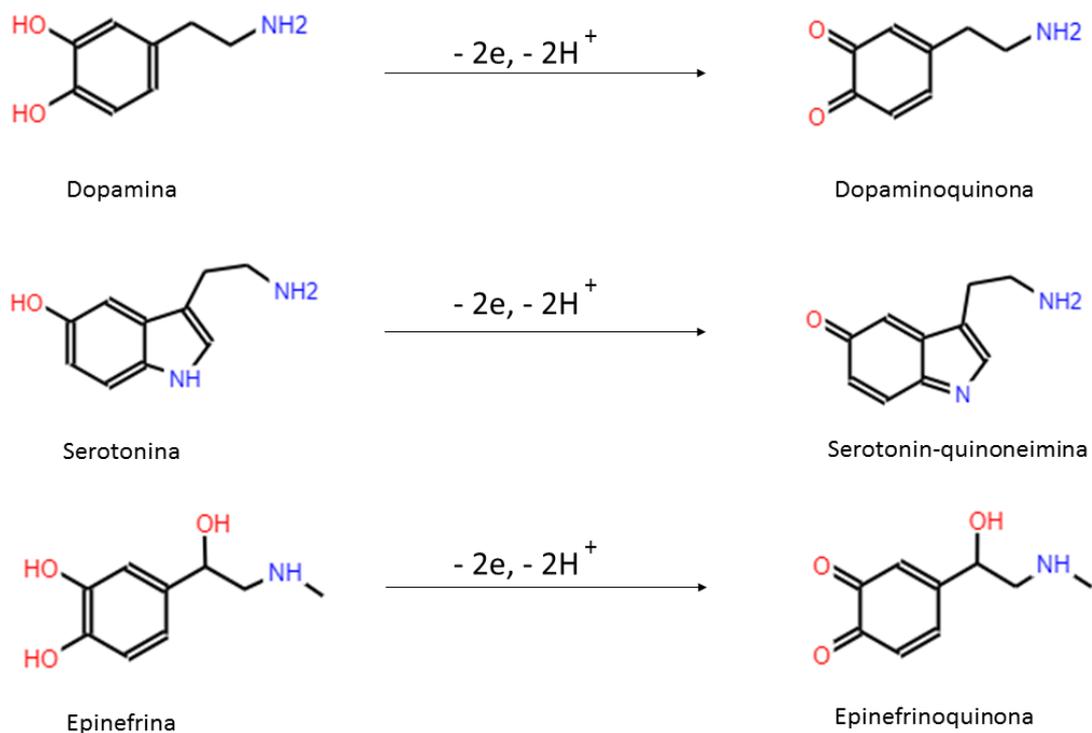


Figura 12. Oxidación electroquímica de la dopamina, serotonina y epinefrina.

Interferentes

Un requisito común para la creación de este tipo de electrodos o sondas electroquímicas diseñadas para operar en entornos biológicos reales es proporcionar selectividad frente a especies electroquímicamente activas que coexisten con neurotransmisores en las muestras biológicas. Estos incluyen ácido ascórbico, ácido úrico y acetaminofeno, entre otros (Özel et al., 2015). Una fuerte interferencia electroquímica de especies oxidables, como el ácido ascórbico, pueden generar problemas en este tipo de biosensores (Yuan et al., 2005) ya que el ácido ascórbico tiene un potencial de oxidación similar al de algunos neurotransmisores como la dopamina (Jeong & Jeon, 2008) y la serotonina.

Para aumentar la selectividad del sensor contra las interferencias, las superficies de los electrodos se pueden modificar con Nafion (Mirzaei & Sawan,

2014) ya que es un polímero cargado negativamente y se puede utilizar para excluir interferencias cargadas negativamente como las del ácido ascórbico (Jeong & Jeon, 2008).

HIPÓTESIS

El uso de hidróxidos dobles laminares de níquel y aluminio pueden funcionar como soporte para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa para el desarrollo de un electrodo empleado como multisensor de neurotransmisores autoalimentable para aplicación en dispositivos Lab-on-a-Chip.

OBJETIVOS

General

- Desarrollar un electrodo utilizando la enzima glucosa oxidasa inmovilizada sobre NiAl hidróxidos dobles laminares para la detección de neurotransmisores para futuras aplicaciones en dispositivos Lab-on-a-chip.

Específicos

- Inmovilizar GOx sobre NiAl-LDHs en superficies de carbón para la fabricación de bio-electrodos enzimáticos mediante la técnica de adsorción y utilizando el método de Lowry para determinar la cantidad de enzima inmovilizada sobre el electrodo.
- Determinar los parámetros operacionales de la enzima inmovilizada sobre los hidróxidos dobles laminares, midiendo la actividad enzimática con ayuda de la técnica de UV-Vis, a diferentes temperaturas, pH y concentración de sustrato.
- Caracterizar el bioelectrodo desarrollado en celdas de combustibles microfluídicas utilizando glucosa contenida en soluciones amortiguadoras y glucosa contenida fluidos fisiológicos reales.
- Evaluar los electrodos desarrollados como sensores de neurotransmisores (dopamina, serotonina y epinefrina) así como el estudio de la glucosa como interferente, obteniendo los límites de cuantificación detección y la sensibilidad, mediante técnicas electroquímicas como la Voltamperometría cíclica y Voltamperometría de pulso diferencial.

III. Metodología

Síntesis de NiAl-LDHs

Se siguió el método reportado por (Abdolmohammad-Zadeh et al., 2011). Se calentaron 30 mL de agua desionizada para eliminar el exceso de CO₂, de modo que no se formaran carbonatos; luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron los reactivos 0.581g de $N_2NiO_6 \cdot 6H_2O$ y 0.375g de $AlN_3O_9 \cdot 9H_2O$ bajo agitación a temperatura ambiente manteniendo el pH a 9.6 agregando 0.05 M de $NaOH$.

Se continuó la reacción por 30 minutos bajo una atmósfera de nitrógeno, después se realizó un tratamiento hidrotérmico a una temperatura de 90°C por 24h. Se separó el producto obtenido por centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos y se lavó 3 veces con agua desionizada. Finalmente, fue secado en mufla a 60°C durante 6 horas para eliminar residuos de agua en el material.

Elaboración de la tinta catalítica

Para la elaboración de la tinta catalítica se mezcló 1 mg de enzima glucosa oxidasa (GOx), 1 mg de hidróxidos doble laminares de níquel y aluminio (NiAl-LDHs), 5 mg de bromuro de tetrabutil amonio, 3 mg de carbón vulcan y 300 µL de buffer de fosfatos pH 7.5.

Elaboración de solución tampón (Buffer de fosfatos)

Para realizar la solución tampón se realizó una solución 0.1 M de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) añadiendo 6.80 g en 500 mL de agua destilada y una solución 0.1 M de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) añadiendo 11.41 g en 500 mL de agua destilada, después se mezcla la mitad de ambos y se ajusta el pH a 7.5, añadiendo más solución de fosfato de potasio monobásico si el pH de la mezcla es superior al deseado o añadiendo más solución de fosfato de potasio dibásico si el pH de la mezcla es inferior al deseado.

Inmovilización enzimática

Se realizó una determinación de proteínas por el método de Lowry (ver Anexo 1) para determinar el tiempo óptimo en que la mayor cantidad de la enzima se inmoviliza sobre la superficie del electrodo.

Se prepararon los siguientes reactivos:

Reactivo A: Na_2CO_3 al 2% en una solución de $NaOH$ al 0.1 M,

Reactivo B_1 : $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ al 1%,

Reactivo B_2 : Tartrato al 2%,

Reactivo C: mezclando los reactivos: A, B_1 y B_2 en relación volumen 50:0.5:0.5,

Reactivo de Folin: en agua destilada en proporción 1:1.

Para hacer los electrodos se cortaron 3 cuadrados de papel Toray de 0.5 x 0.5 cm y se dejaron sumergidos en la tinta catalítica sin enzima 10 minutos, después se sacaron y se dejaron secar.

Se prepararon 3 tubos eppendorf de enzima GOx con buffer de fosfatos con pH de 7.5 para obtener una concentración de 1mg/mL en cada tubo.

Se prepararon 10 grupos de 3 tubos falcon, se cubrieron con aluminio y se rotularon por grupo como 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 minutos y dentro de cada grupo se rotularon como 1, 2 y 3, además de 1 tubo en el que se preparó el blanco, el cual contenía 2.5 mL de reactivo C, 0.25 mL de Folin y 0.5 mL de agua destilada.

Al grupo de tubos del tiempo 0 se le añadió a cada uno 2.5 mL de reactivo C, 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de enzima GOx, se agitó y se dejó reposar durante 15 minutos, después se le añadió 0.25 mL de Folin se agitó nuevamente, se dejó reposar 30 minutos y se registró la absorbancia obtenida en el Uv-vis a 560 nm.

Se añadió un electrodo a cada tubo eppendorf que contenía enzima GOx y se anotó la hora en que se hizo.

A los demás tubos se les añadió 2.5 mL de reactivo C y 450 μ L de agua, cuando pasaron 10 minutos desde que se añadieron los electrodos a la solución con enzima, se tomaron 50 μ L de enzima del tubo con el electrodo y se añadieron a los tubos de 10 minutos se agitó y se dejó reposar durante 15 minutos, después se le

añadió 0.25 mL de Folin se agitó nuevamente, se dejó reposar 30 minutos y se leyó en el Uv-vis a 560 nm, de esta misma forma se procedido con los demás tubos tomando 50 μ L de enzima de cada tubo eppendorf cada 10 minutos hasta llegar a 90 minutos.

Actividad enzimática

La actividad de GOX se evaluó siguiendo el método de (Zoghbi et al., 2008), midiendo la producción de peróxido de hidrógeno a partir de glucosa colocada como sustrato. Se utilizó la modalidad de acoplamiento con peroxidasa, usando la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) como cosustrato. La mezcla de reacción contenía 30 μ L de TMB 0.4 g/L oxigenado por 10 min; 1.4 μ L de una solución de peroxidasa de 4.3 mg/mL en buffer de fosfato 0.05 M pH 6.9; 5 μ L de de β -D-glucosa 4 mM y un electrodo de papel Toray de 0.2x0.2 cm impregnado de tinta catalítica. Esta mezcla se incubó por 10 minutos a 25 °C y la reacción se detuvo agregando 50 μ L de HCl 0.1 N. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 450 nm (máximo de absorbancia del producto de oxidación del TMB).

Evaluación de pH óptimo

Se midió la actividad enzimática a diferentes valores de pH para determinar el valor en que se obtiene el mayor porcentaje de actividad de la glucosa oxidasa inmovilizada sobre los electrodos, los valores de pH fueron 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9.

Las pruebas se realizaron por triplicado, añadiendo a los tubos la mezcla de reacción que consiste en 30 μ L de TMB, 1.4 μ L de la solución de peroxidasa, 968.6 μ L de β -D-glucosa y un electrodo de papel Toray impregnado de tinta catalítica en buffer fosfato a los diferentes valores de pH seleccionados.

Evaluación de temperatura óptima

Se midió la actividad enzimática a diferentes valores de temperatura para determinar la temperatura en que se obtiene el mayor porcentaje de actividad de la glucosa oxidasa, los valores de temperatura fueron 25, 30, 35, 40, 45 y 50 °C.

Las pruebas se realizaron por triplicado, añadiendo a los tubos la mezcla de reacción que consiste en 30 μL de TMB, 1.4 μL de la solución de peroxidasa, 968.6 μL de $\beta\text{-D-glucosa}$ y un electrodo de papel Toray impregnado de tinta catalítica en buffer fosfato a los diferentes valores de temperatura seleccionados.

Evaluación a diferentes concentraciones de sustrato

Se midió la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato para determinar el valor en que se obtiene el mayor porcentaje de actividad de la glucosa oxidasa, las concentraciones fueron 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 M.

Las pruebas se realizaron por triplicado, añadiendo a los tubos la mezcla de reacción que consiste en 30 μL de TMB, 1.4 μL de la solución de peroxidasa, 968.6 μL de $\beta\text{-D-glucosa}$ y un electrodo de papel Toray impregnado de tinta catalítica en buffer fosfato a las diferentes concentraciones de sustrato seleccionadas.

Evaluación en celda

La celda de combustible microfluídica utiliza electrodos porosos y tiene un diseño en forma de "V" que genera una distribución homogénea de los fluidos. El soporte de la placa superior de polimetilmetacrilato (PMMA) tiene dos entradas para los reactivos y una salida para liberar los productos de reacción en la placa base de PMMA, una película de elastómero se utiliza como junta y estructura de canal de la celda. Las tomas de aire están dispuestas en ambas placas para mejorar la concentración de oxígeno. La evaluación de la celda microfluídica se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones de glucosa en solución buffer de fosfato 0.1 M pH 7.5 a 10 mV/s como combustible y KOH 0.3 M saturado con O_2 en el cátodo, a un caudal de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ para ambas corrientes.

Evaluación electroquímica

Se evaluó la sensibilidad y especificidad del electrodo de NiAl-LDHs en una solución sintética de buffer de fosfatos a un pH de 7.5, similar al de la sangre, con el neurotransmisor a evaluar.

La caracterización electroquímica se realizó utilizando un Potenciostato/Galvanostato BioLogic VSP y una celda electroquímica de tres electrodos. Los electrodos modificados de NiAl-LDHs se utilizaron como electrodos de trabajo; el electrodo de Ag/AgCl como referencia y una varilla de grafito como contraelectrodo.

Se realizaron dos técnicas electroquímicas: Voltamperometría de pulso diferencial y voltamperometría cíclica (DPV y CV por sus siglas en inglés) (Ver anexos 2 y 3). La voltamperometría cíclica se realizó a 20 mV/s, en un rango de voltaje de -1 a 1 y 5 ciclos para determinar las concentraciones de los neurotransmisores por medio de una respuesta corriente-potencial y así conocer los valores de potencial donde ocurrió la oxidación y reducción de estos.

Se preparó una solución madre de 10 mM de dopamina con buffer de fosfatos de 7.5 de pH y con ella se realizaron 4 diluciones para obtener concentraciones de 5 mM, 1mM, 1×10^{-4} M y 1×10^{-5} M, con cada concentración se realizó la técnica de DPV para determinar a qué potencial se oxida la dopamina y la respuesta de corriente que se obtiene. Con la solución de concentración de 1 mM se realizó la técnica de CV para observar los picos de oxidación y reducción. Este mismo procedimiento se realizó con la serotonina y la epinefrina.

Después se realizaron las mismas 2 técnicas en 4 soluciones que contenían serotonina y dopamina, serotonina y epinefrina, dopamina y epinefrina, y por último serotonina, dopamina y epinefrina juntas, todas en una concentración de 1 mM y a partes iguales.

Evaluación de interferentes

Se evaluó la sensibilidad y especificidad del electrodo de NiAl-LDHs para trabajar en un entorno más similar al de la sangre humana, se evaluó el electrodo con una solución buffer de pH 7.5 y con glucosa que se encuentran en la sangre y podría actuar como interferente al oxidarse a un potencial similar al de los neurotransmisores usados. La glucosa es una parte fundamental en este trabajo, ya que esta al ser oxidada va proveer de energía eléctrica al sensor por lo que es de vital importancia que su potencial de oxidación no interfiera con los neurotransmisores.

IV. RESULTADOS

Inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática se realizó por adsorción sobre un electrodo de papel Toray de 0.2x0.2cm, para determinar la cantidad de enzima que fue adsorbida en el electrodo, se utilizó el método de Lowry para determinación de proteínas.

Conforme pasaba el tiempo más cantidad de enzima se adsorbía al electrodo, por lo que en cada medición la cantidad de enzima libre en el buffer disminuía, lo cual significa que los valores inversos a esas mediciones son la cantidad de enzima que se adsorbía al electrodo, la cantidad de enzima adsorbida se expresó en porcentaje como se observa en la figura 13.

A los 90 minutos la cantidad de enzima que fue inmovilizada fue de 49.36%, el cual es un valor bastante aceptable en un tiempo relativamente corto.

Entre los 80 y 90 minutos solo se observó un incremento de 1.3% por lo que se determinó que no era viable dar más tiempo de inmovilización ya que esta no incrementaría significativamente.

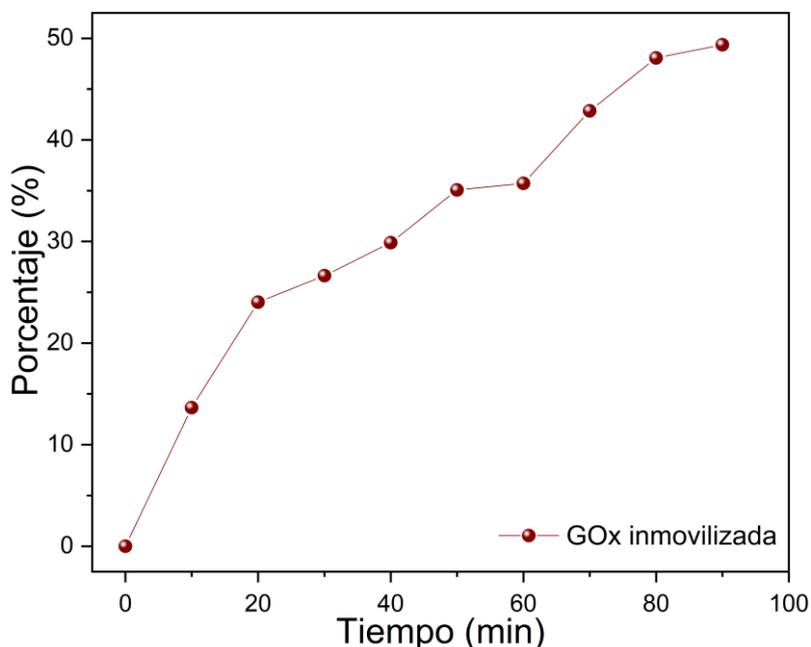


Figura 13. Porcentaje de enzima Glucosa Oxidasa inmovilizada sobre el electrodo durante 90 minutos.

TEMPERATURA

Se evaluó la actividad enzimática en un rango de temperatura de 25 a 50 °C, obteniendo el máximo de actividad alrededor de los 30°C.

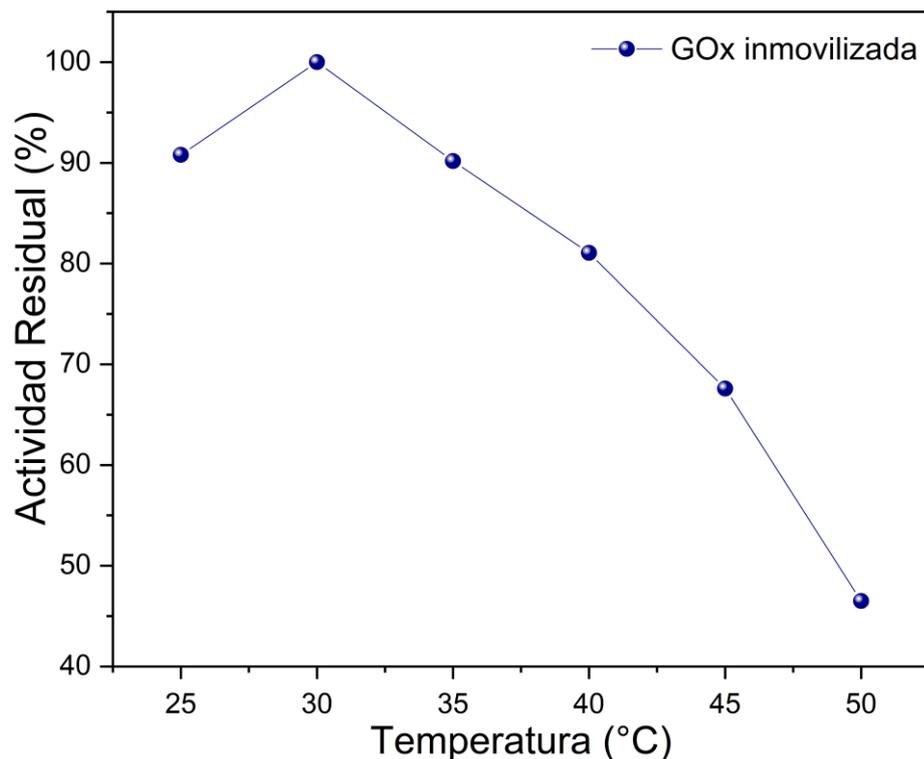


Figura 14. Actividad enzimática de la Glucosa Oxidasa a diferentes temperaturas.

Ya que el biosensor trabajaría con muestras biológicas, como lo es a sangre, esta estaría a una temperatura aproximada de 37°C, a esta temperatura la enzima tiene una actividad alrededor de 85%.

En la figura 14 se observa que a medida que aumenta la temperatura, también lo hace la tasa de actividad enzimática, por lo que a una temperatura de aproximadamente 30°C se alcanza una actividad enzimática óptima, después de esta temperatura, al existir un aumento continuo de la temperatura da como

resultado una fuerte disminución de la actividad enzimática a medida que la enzima y su sitio activo cambia de forma ya que a altas temperaturas se desnaturaliza.

pH

Se evaluó la actividad enzimática en un rango de pH de 5.5 a 9, obteniendo el máximo de actividad alrededor de un valor de 6.5.

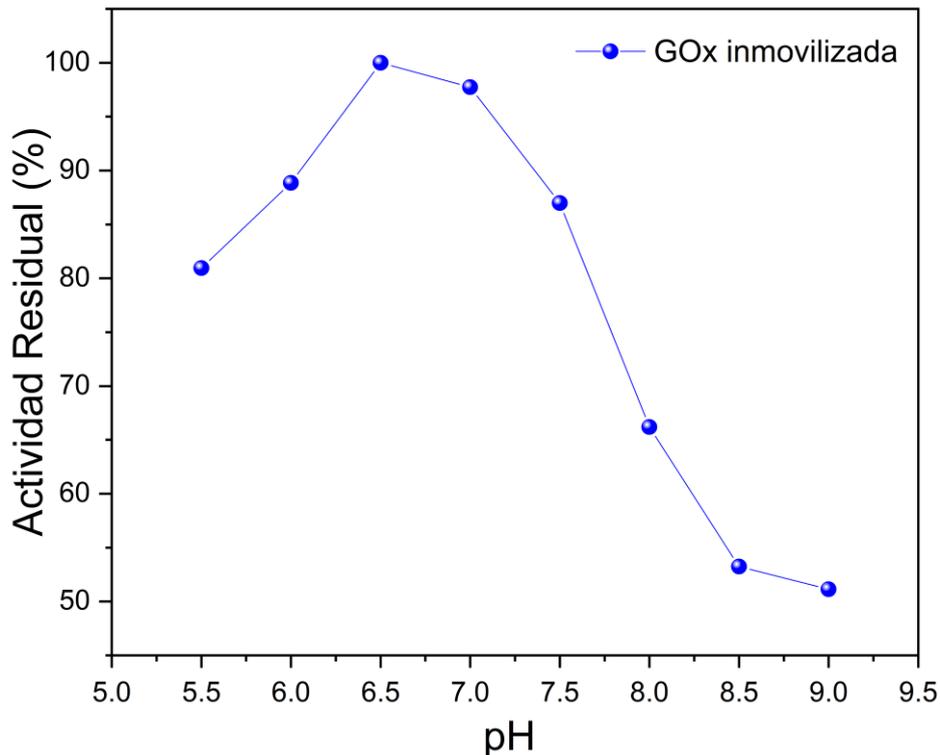


Figura 15. Actividad enzimática de la Glucosa Oxidasa a diferentes valores de pH.

La sangre tiene un rango de pH normal de 7.35-7.45, a este valor de pH la enzima tiene una actividad alrededor de 87%.

En la figura 15 se observa que a medida que aumenta el pH, también lo hace la tasa de actividad enzimática, por lo que a un pH de aproximadamente 6.5 se alcanza una actividad enzimática óptima, después de este pH, al existir un aumento continuo del pH da como resultado una fuerte disminución de la actividad enzimática a medida que el sitio activo de la enzima cambia de forma, provocando su desnaturalización.

CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

Se evaluó la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato, en un rango de 1 a 10 mM de glucosa, obteniendo el máximo de actividad alrededor de un valor de 10.

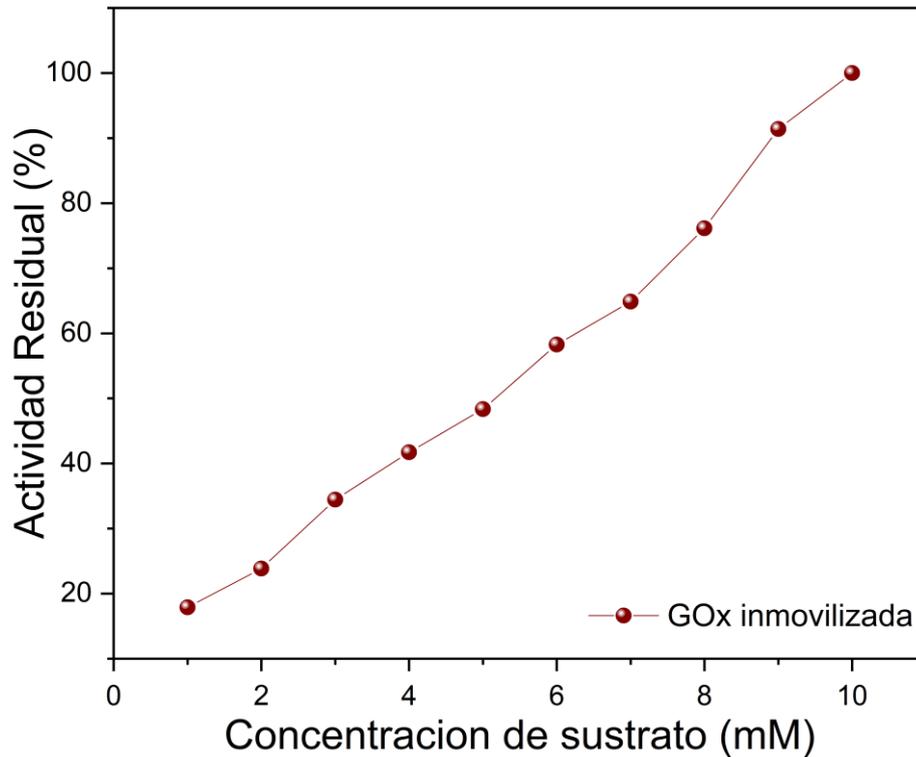


Figura 16. Actividad enzimática de la Glucosa Oxidasa a diferentes concentraciones de sustrato (glucosa).

La sangre tiene una concentración normal de glucosa de alrededor 5 mM, a esta concentración de glucosa la enzima tiene una actividad alrededor de 48 %.

En la figura 16 se observa que a medida que aumenta la concentración de sustrato, también lo hace la tasa de actividad enzimática. Un aumento continuo en la concentración de sustrato da como resultado la misma actividad ya que no hay suficientes moléculas de enzima disponibles para descomponer el exceso de moléculas de sustrato.

Evaluación en celda

Para la evaluación del bioánodo en la celda de combustible, se utilizó el diseño de la figura 17.

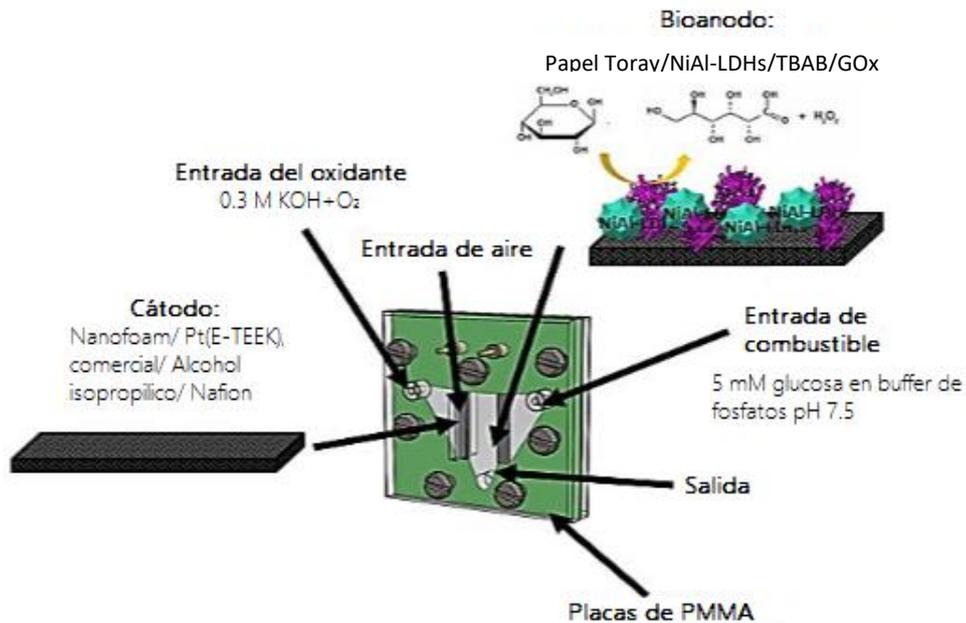


Figura 17. Representación del electrodo diseñado y del dispositivo microfluídico.

La evaluación se realizó con glucosa como combustible a 5, 10 y 20 mM en un buffer de fosfatos a un pH de 7.5 y 0.1 M.

El valor máximo de densidad de potencia para cada concentración de glucosa fue de 0.678 mWcm⁻² para una concentración de glucosa de 5mM, 1.011 mWcm⁻² para una concentración de glucosa de 10 mM y de 1.355 mWcm⁻² para una concentración de glucosa de 20 mM como se observa en la figura 18.

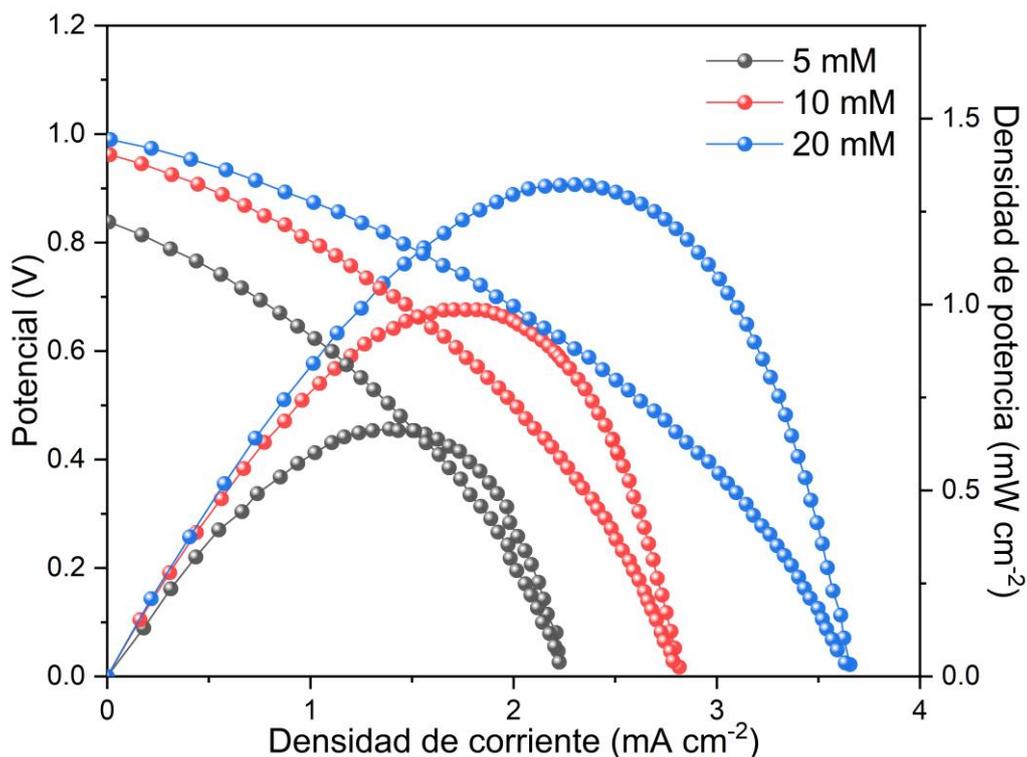


Figura 18. Curvas de polarización y de densidad de potencia obtenida de la celda de combustible microfluídica.

En la mayoría de los seres humanos los niveles de glucosa en sangre varían entre los 4.4 a 6.1 mmol/L. Los niveles de glucosa en la sangre suben hasta casi 7.8 mmol/L o un poco después de una comida completa. En los seres humanos el nivel normal de glucosa en la sangre ronda los 5 mmol/L.

Los niveles normales de glucosa en sangre deben ser considerados, ya que de esto depende la máxima densidad de potencia que podría alcanzarse en la celda de combustible, por lo que la máxima densidad de potencia que se esperaría de esta celda de combustible sería de 0.678 mWcm⁻² a una concentración normal de glucosa de 5 mM.

Evaluación electroquímica

BLANCOS

El primer paso para realizar la evaluación electroquímica fue realizar una voltamperometría cíclica sin analito (neurotransmisores) solamente con el electrodo de carbón vitreo, electrodo de carbón vitreo + NiAl-LDHs y electrodo de carbón vitreo + GOx inmovilizada sobre NiAl-LDHs, para así determinar que ninguno de los componentes del electrodo interferiría con las mediciones.

En la figura 19 se puede observar que en ninguno de los voltamperogramas se observa algún pico de corriente por lo que se determina que el electrodo puede utilizarse sin causar ninguna interferencia.

Después se continuó con cada uno de los neurotransmisores.

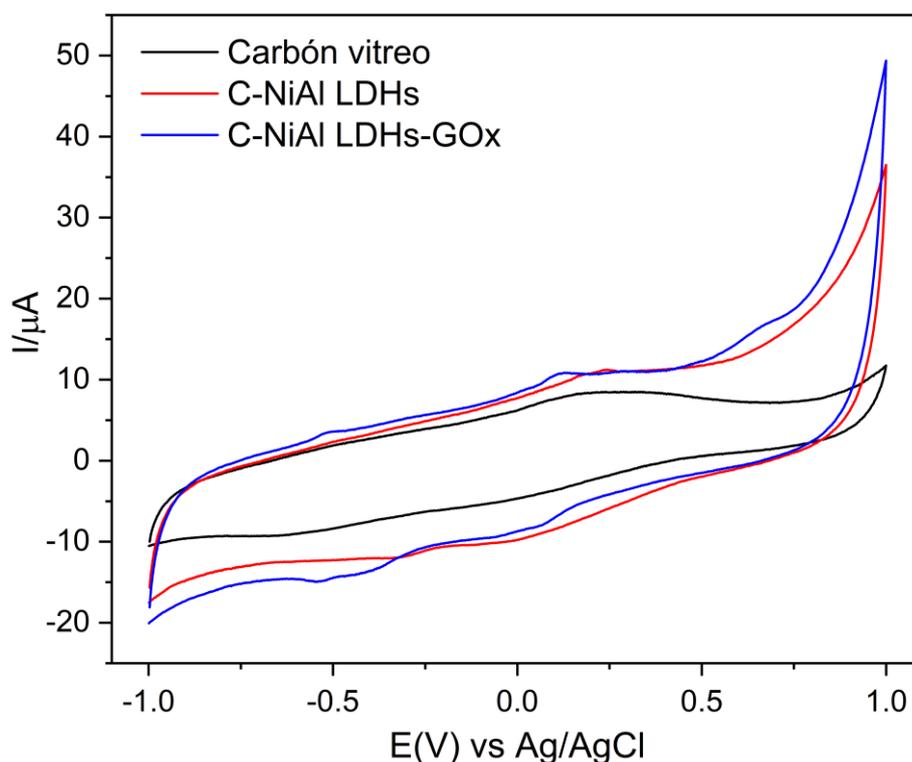
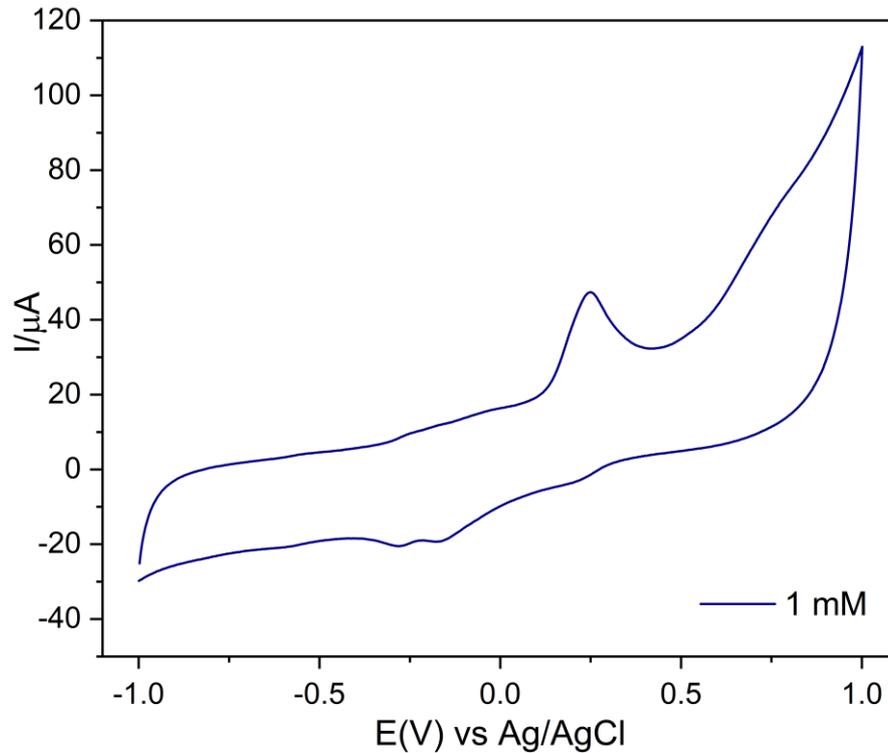


Figura 19. Voltamperometría cíclica utilizando el electrodo de carbón vitreo solo (negro), el electrodo de carbón vitreo con la tinta catalítica sin enzima (rojo) y el electrodo de carbón vitreo con la tinta catalítica y enzima (azul)

SEROTONINA

En la figura 20 se puede observar el CV de la serotonina, en la cual se obtuvo un pico de oxidación en un potencial de 0.249 V con una corriente de 47.348 μA .



μA .

Figura 20. Voltamperometría cíclica de la serotonina a una concentración de 1mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

En la figura 21 se puede observar el DPV de la serotonina, en la cual se obtuvieron picos de oxidación a diferentes concentraciones, la concentración más baja que se pudo sensor fue de 0.01 mM.

La concentración promedio de serotonina en sangre es de 0.28 a 1.14 $\mu\text{mol/L}$ por lo que el electrodo podría ser capaz de medirlo.

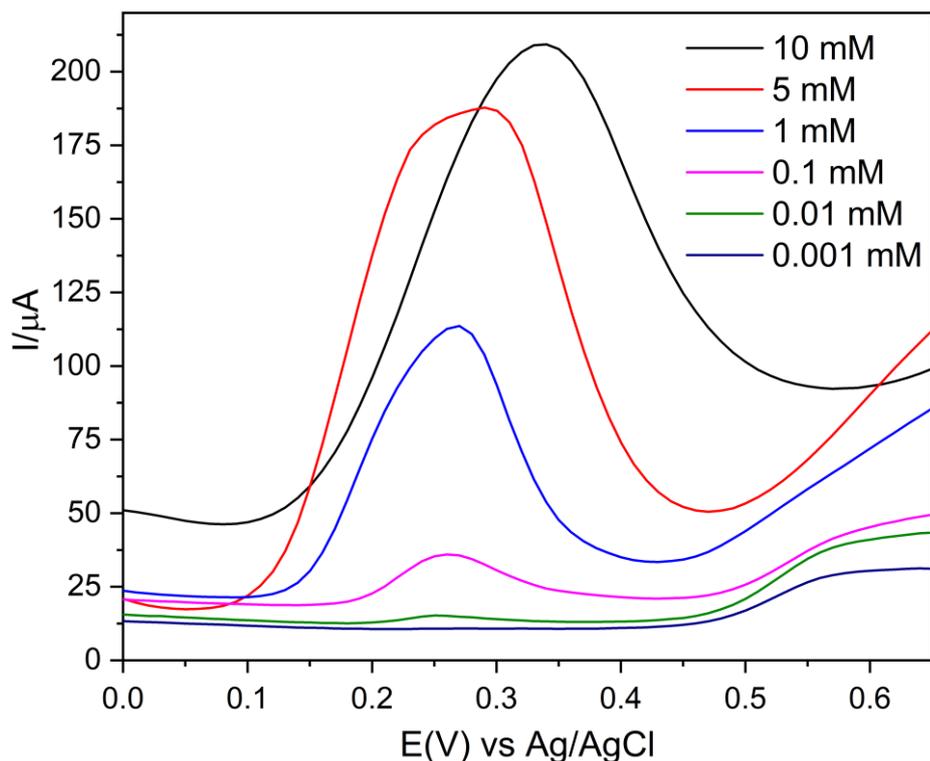


Figura 21. Voltamperometría de pulso diferencial de la serotonina a diferentes concentraciones en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

Se realizó también una curva de calibración (figura 22) con los valores de corriente y potencial obtenidos en la figura 21 para así obtener la ecuación de la recta y poder determinar la concentración de serotonina en cualquier muestra.

La concentración de serotonina en la figura 21 fue de 0.001 mM a 10 mM, se observa que la corriente en los picos de oxidación aumentó con la concentración de serotonina, por lo que se puede decir que, la corriente de oxidación es proporcional a la concentración de serotonina.

Haciendo la regresión lineal se obtuvo la ecuación $i(\mu\text{A}) = 32.637 \times [\text{cSer}] \text{ (mM)} + 32.186$ con un coeficiente de correlación de 0.94 y un límite de detección de 0.001 mM.

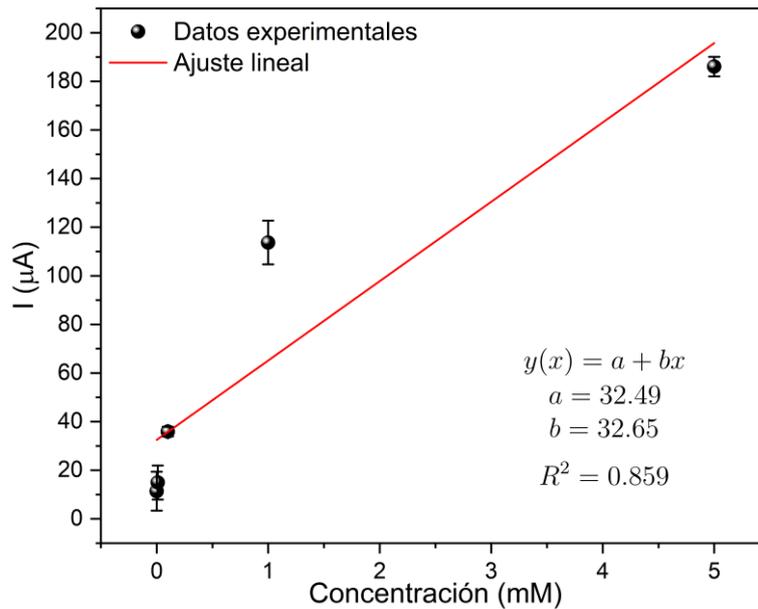


Figura 22. Curva de calibración y ecuación de la recta de la serotonina a diferentes concentraciones.

DOPAMINA

En la figura 23 se puede observar el CV de la dopamina, en la cual se obtuvo un pico de oxidación en un potencial de 0.112 V con una corriente de 45.87 µA.

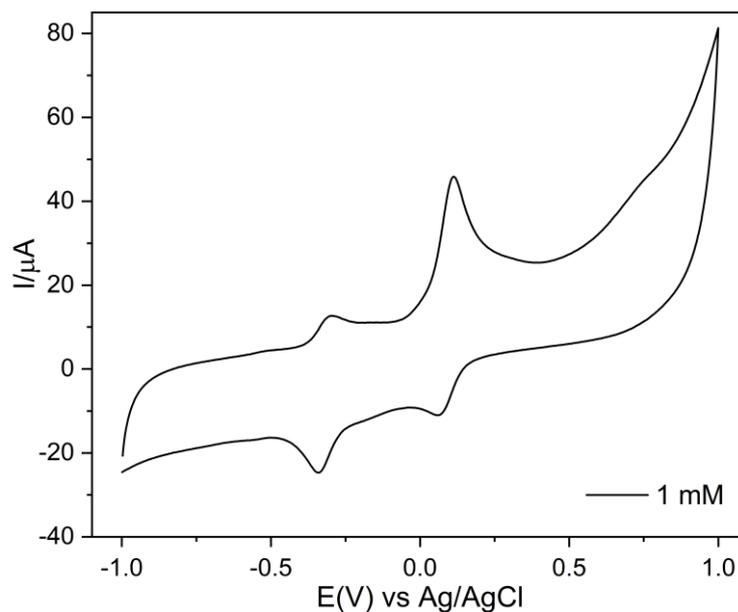


Figura 23. Voltamperometría cíclica de la dopamina a una concentración de

1mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

En la figura 24 se puede observar el DPV de la dopamina, en la cual se obtuvieron picos de oxidación a diferentes concentraciones, la concentración más baja que se pudo sentir fue de 0.1 mM.

La concentración promedio de dopamina en sangre es de 0 a 195.8 pmol/L por lo que el electrodo no sería capaz de medirlo.

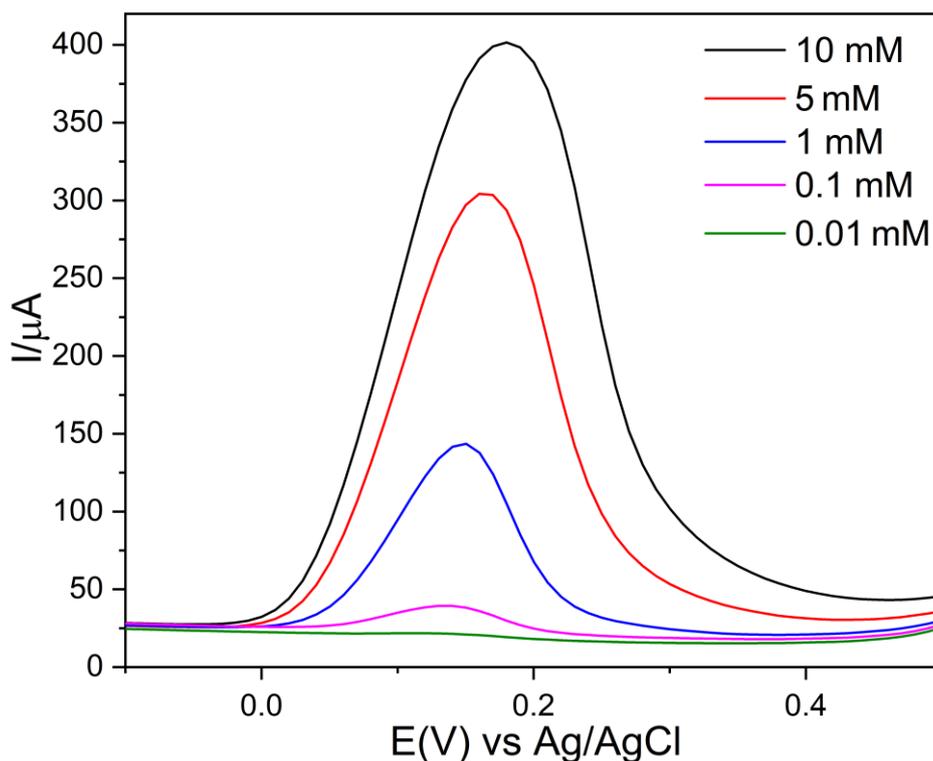


Figura 24. Voltamperometría de pulso diferencial de la dopamina a diferentes concentraciones en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

Se realizó también una curva de calibración (figura 25) con los valores de corriente y potencial obtenidos en la figura 24 para así obtener la ecuación de la recta y poder determinar la concentración de dopamina en cualquier muestra.

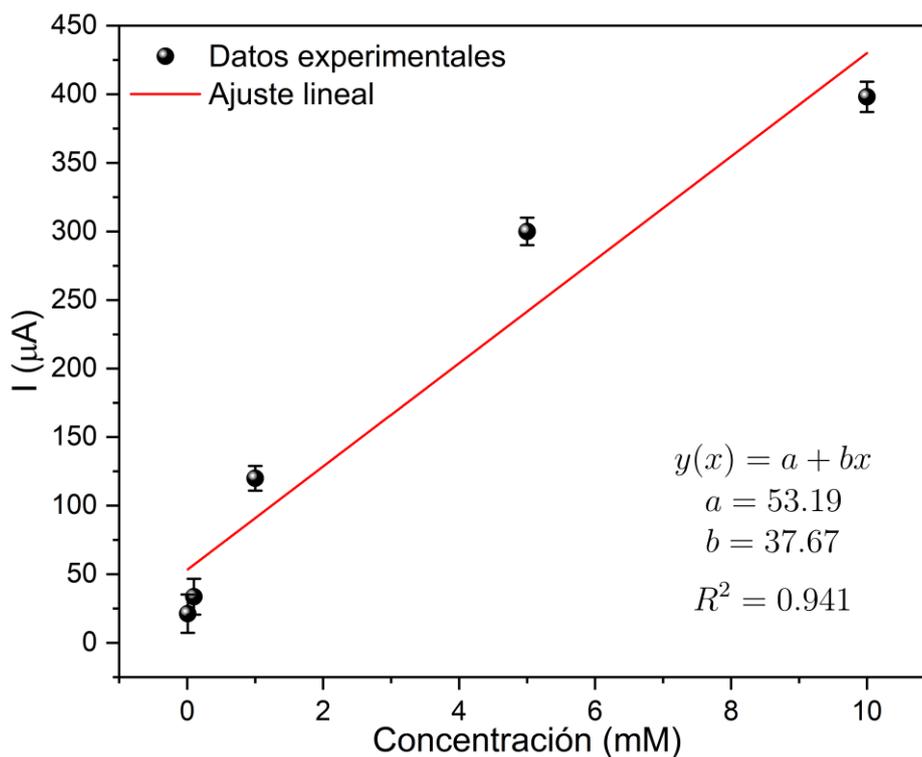


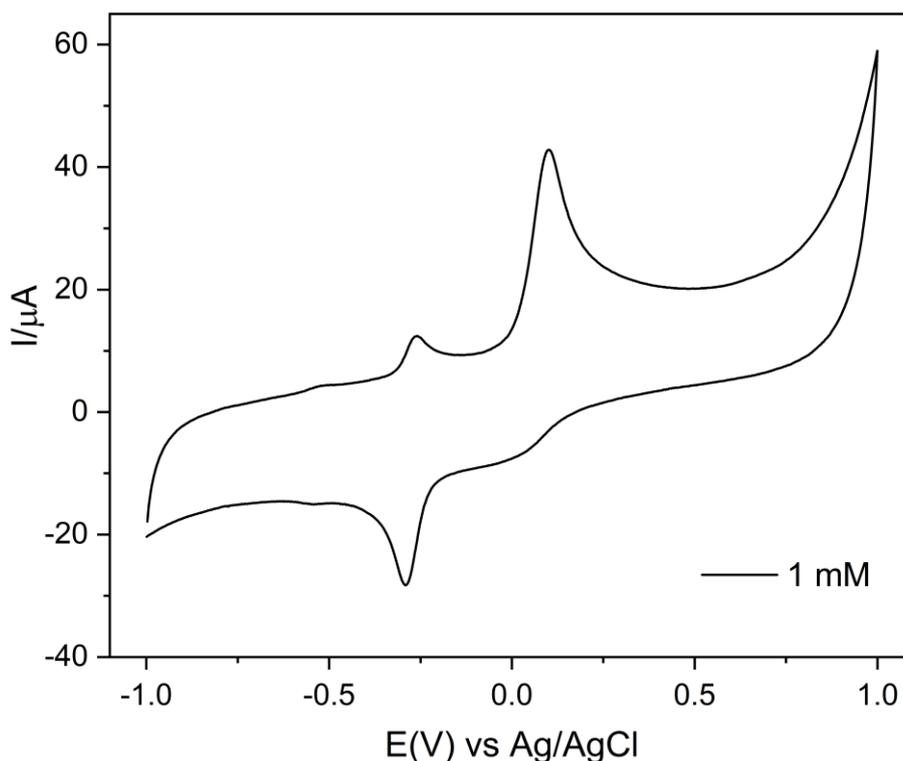
Figura 25. Curva de calibración y ecuación de la recta de la dopamina a diferentes concentraciones

La concentración de dopamina en la figura 24 fue de 0.01 mM a 10 mM, se observa que la corriente en los picos de oxidación aumentó con la concentración de dopamina, por lo que se puede decir que, la corriente de oxidación es proporcional a la concentración de dopamina.

Haciendo la regresión lineal se obtuvo la ecuación $i(\mu\text{A}) = 38.04 \times [\text{cDA}] (\text{mM}) + 51.347$ con un coeficiente de correlación de 0.94 y un límite de detección de 0.01 mM.

EPINEFRINA

En la figura 26 se puede observar el CV de la epinefrina, en la cual se obtuvo un pico de oxidación en un potencial de 0.102 V con una corriente de 42.819



μA .

Figura 26. Voltamperometría cíclica de la epinefrina a una concentración de 1mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

En la figura 27 se puede observar el DPV de la epinefrina, en la cual se obtuvieron picos de oxidación a diferentes concentraciones, la concentración más baja que se pudo sensor fue de 0.1 mM.

La concentración promedio de epinefrina en sangre es de 0 a 764,3 pmol/L por lo que el electrodo no sería capaz de medirlo.

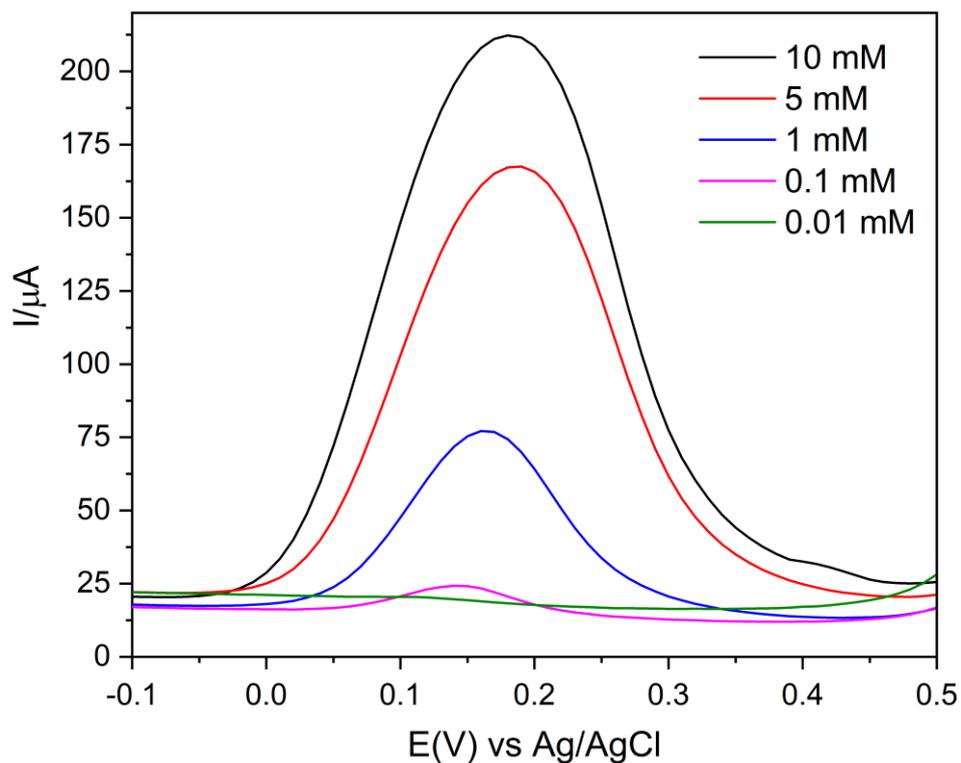


Figura 27. Voltamperometría de pulso diferencial de la epinefrina a diferentes concentraciones en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

Se realizó también una curva de calibración (figura 28) con los valores de corriente y potencial obtenidos en la figura 27 para así obtener la ecuación de la recta y poder determinar la concentración de epinefrina en cualquier muestra.

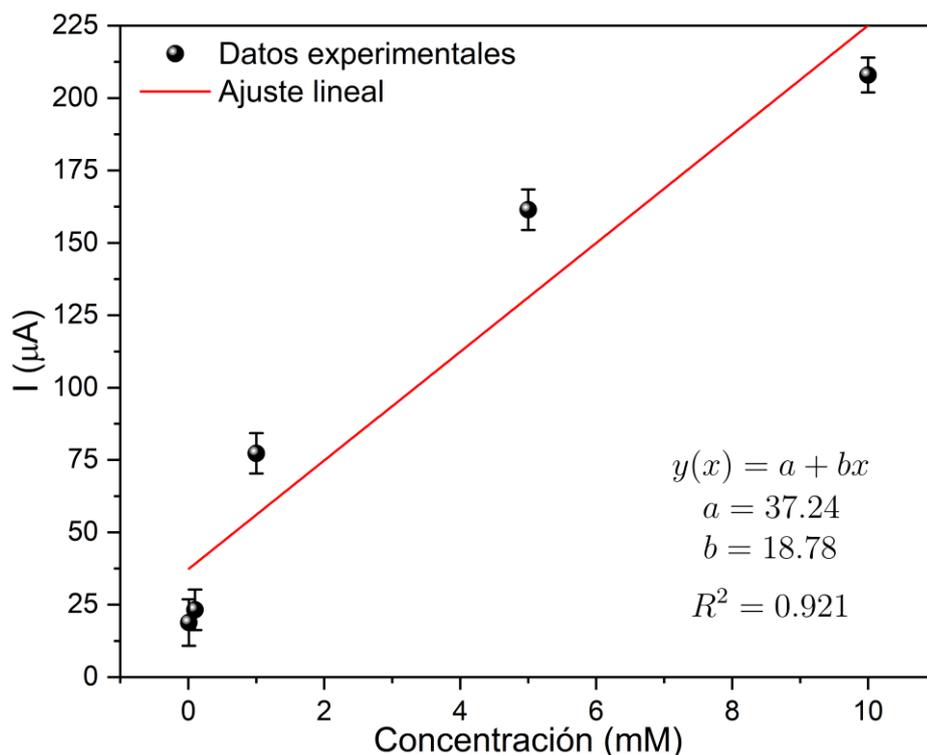


Figura 28. Curva de calibración y ecuación de la recta de la dopamina a diferentes concentraciones

La concentración de epinefrina en la figura 27 fue de 0.01 mM a 10 mM, se observa que la corriente en los picos de oxidación aumentó con la concentración de epinefrina, por lo que se puede decir que, la corriente de oxidación es proporcional a la concentración de epinefrina.

Haciendo la regresión lineal se obtuvo la ecuación $i(\mu A) = 18.768 \times [cEp] (mM) + 37.229$ con un coeficiente de correlación de 0.9218 y un límite de detección de 0.01 mM.

DOPAMINA-EPINEFRINA-SEROTONINA

El potencial al que se alcanza la oxidación en la epinefrina y la dopamina están muy cercanos (Dopamina 0.112 y epinefrina 0.102 V) por lo que podría ser difícil separar ambas señales, por lo que se realizó un CV y un DPV con los 3 neurotransmisores en la misma proporción para observar y determinar si estos neurotransmisores pueden ser sensados simultáneamente.

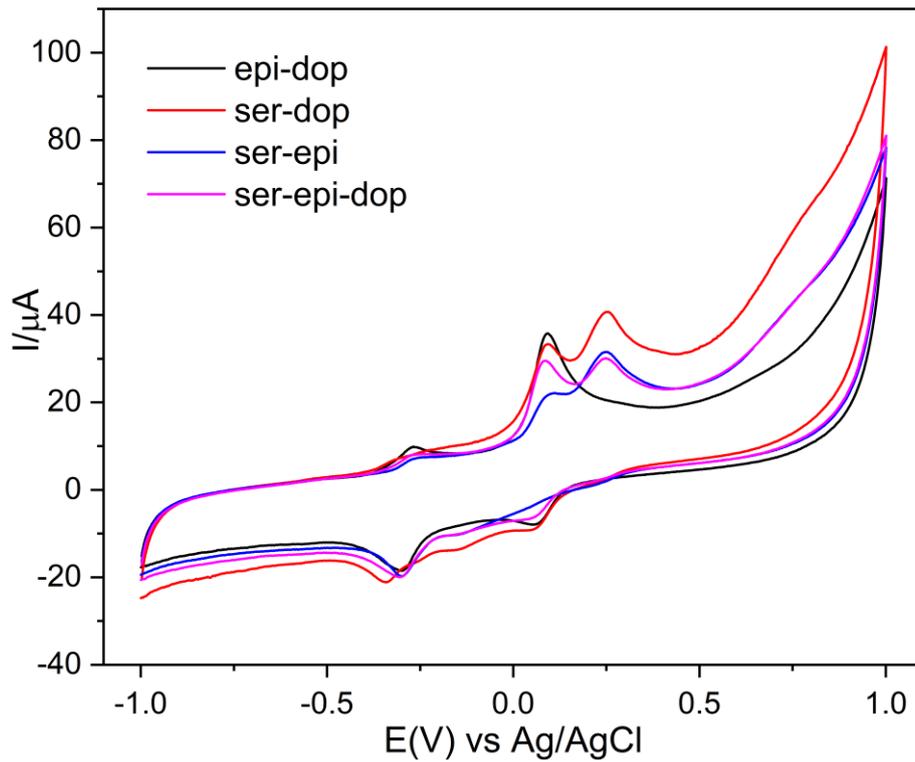


Figura 29. Voltamperometría cíclica de la serotonina, dopamina y epinefrina a una concentración de 1mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

Podemos observar en ambos experimentos (figura 29 y 30) que cuando se analiza a la dopamina y a la epinefrina juntas, ambas señales se superponen y se observa un único pico, con una corriente más alta, pero al incluir a la serotonina en el experimento, el pico superpuesto de la dopamina y la epinefrina disminuye su corriente.

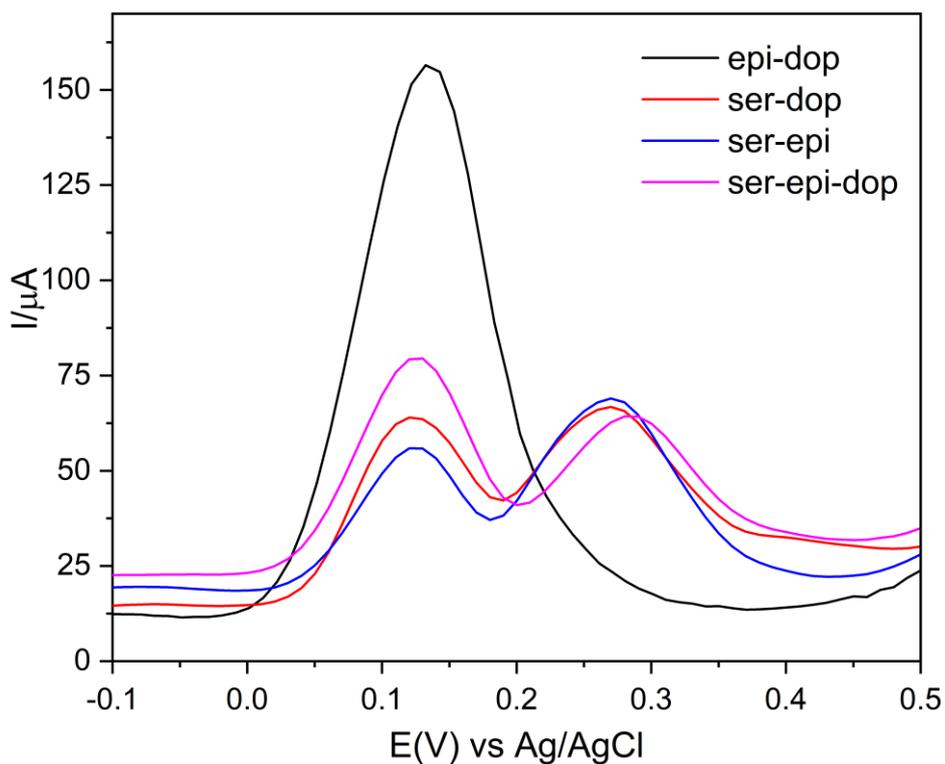


Figura 30. Voltamperometría de pulso diferencial de la serotonina, dopamina y epinefrina a diferentes concentraciones en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

Los picos de oxidación de la serotonina se mantienen en el mismo potencial y no se ven afectados por los otros neurotransmisores.

GLUCOSA

La glucosa es una molécula que también se encuentra en la sangre, y al ser primordial para la obtención de energía en la celda de combustible, realizamos un DPV (figura 31) para determinar si el potencial al cual se oxidaba no interfería con el de los neurotransmisores.

Su potencial de oxidación fue de -0.44 V por lo cual no interfería con las señales de los neurotransmisores, al mismo tiempo se observó que también se podía realizar un sensado de la glucosa en sangre y a concentraciones muy bajas de hasta 1×10^{-6} M.]

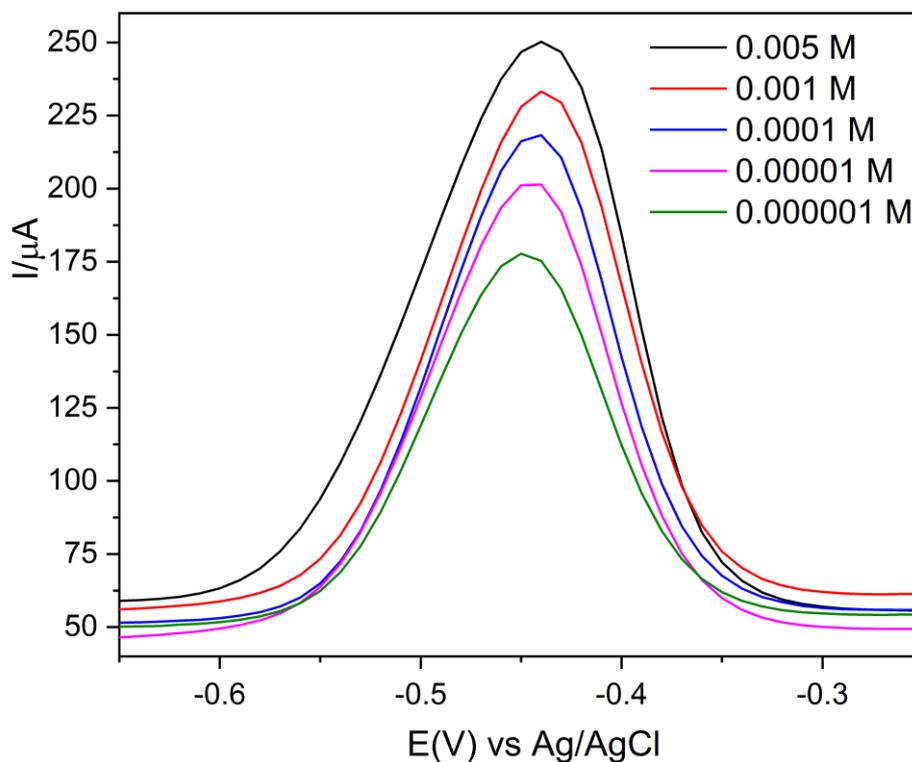


Figura 31. Voltamperometría de pulso diferencial de la glucosa a diferentes concentraciones en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.5.

V. CONCLUSIONES

Este trabajo ha demostrado que se puede fabricar un electrodo utilizando la enzima glucosa oxidasa inmovilizada sobre hidróxidos doble laminares de níquel y aluminio para la detección de neurotransmisores.

En la fabricación del electrodo se logró una inmovilización enzimática

rápida, ya que en 90 minutos se logró inmovilizar el 49.36% de la enzima sobre el electrodo, no se consideró viable dar más tiempo de inmovilización, ya que la cantidad de enzima inmovilizada no incrementaría significativamente.

Debido a que el electrodo fabricado tiene como objetivo futuro analizar muestras de sangre, todos los parámetros a los que se evaluó, fueron los parámetros que contiene la sangre, tanto temperatura como pH y concentración de sustrato (glucosa), para los cuales demostró tener una buena actividad enzimática del 85-87% a una temperatura de 37 °C y un pH de 7.4, esto nos indica que el electrodo fabricado es capaz de analizar muestras biológicas sin perder su actividad enzimática y, por lo tanto, su capacidad de generar energía, como se demostró en la evaluación de la celda microfluídica ya que a una concentración de glucosa de 5mM se obtuvo una densidad de potencia de 0.678 mWcm⁻² la cual puede ser utilizada para alimentar parte del circuito de un dispositivo Lab-on-a-chip.

Ya que se determinó que el electrodo fabricado es capaz de generar energía eléctrica mediante la oxidación de la glucosa contenida en el analito mediante la acción de la enzima glucosa oxidasa, se evaluó la capacidad que tendría este electrodo para sensar la dopamina, serotonina y epinefrina.

Mediante las técnicas voltamperométricas realizadas (DPV y CV) pudimos determinar los potenciales de oxidación de cada uno de estos neurotransmisores, el electrodo es capaz de sensar cada uno de los neurotransmisores, se obtuvieron sus picos de oxidación a los potenciales de 0.249 V, 0.112 y 0.102 para la serotonina, dopamina y epinefrina respectivamente. Los potenciales a los cuales se daba el pico de oxidación de la dopamina y la epinefrina se encuentran muy cercanos por lo que este electrodo no sería capaz de separar las señales para así determinar la concentración de cada uno de estos dos neurotransmisores, sin embargo, podría sensar la serotonina ya que su potencial de oxidación no se encuentra tan cercano al de la dopamina y la epinefrina.

Tomando en cuenta que este electrodo va a realizar el trabajo de oxidar la glucosa para generar energía para ser utilizada en el dispositivo y el del censado de los neurotransmisores en muestras biológicas se tiene que tomar en cuenta que en la sangre también existen otras sustancias, por lo que se evaluó a la glucosa como interferente, esta demostró que su potencial de oxidación es a -0.44 V por lo que no

interfiere con la señal de los neurotransmisores y puede ser censada de igual manera.

VI. PERSPECTIVAS Y TRABAJO FUTURO

Durante el desarrollo de esta tesis han surgido líneas de investigación y algunas otras que quedaron abiertas y en las que es posible seguir trabajando.

A continuación, se presentan algunos trabajos futuros que pueden desarrollarse como resultado de esta tesis y otros que, por exceder el alcance de esta tesis, no han podido ser desarrollados.

Entre los posibles trabajos futuros se destacan:

- Evaluar los electrodos desarrollados como sensores de neurotransmisores (dopamina, serotonina y epinefrina) en muestras de sangre reales obteniendo los límites de cuantificación, detección y la sensibilidad.
- Evaluar otras sustancias presentes en la sangre como interferentes para determinar si su presencia interfiere con el sensado de los neurotransmisores.
- Modificar el electrodo desarrollado para que sea capaz de separar los potenciales de oxidación de cada uno de los neurotransmisores para poder medir cada uno individualmente.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

El ensayo de Lowry es el método colorimétrico más común para determinar el contenido de proteína en la solución.

El ensayo de proteínas de Lowry se basa en la reacción de Biuret con pasos y reactivos adicionales para aumentar la sensibilidad de detección. En la reacción de biuret, el cobre interactúa con cuatro átomos de nitrógeno de péptidos para formar un complejo cuproso. Lowry añade ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico también conocido como reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo interactúa con los iones cuprosos y las cadenas laterales de tirosina, triptófano y cisteína para producir un color verde azulado (que depende en parte del contenido de tirosina y triptófano) que se puede detectar entre 650 nm y 750 nm. El rango de detección de proteínas es de 5 a 100 µg. (C.-H. Shen, 2019).

ANEXO 2

VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA (CV)

La voltamperometría cíclica (CV) suele ser el primer experimento realizado en un estudio electroquímico de un compuesto, un material biológico o la superficie de un electrodo. Su efectividad resulta de su capacidad para observar rápidamente el comportamiento redox en un amplio rango de potencial. El voltamograma resultante es análogo a un espectro convencional en el sentido de que transmite información en función de un escaneo de energía.

La voltamperometría cíclica consiste en ciclar el potencial de un electrodo, el cual es sumergido en una solución sin agitar y medir la corriente resultante. (Peter T. Kissinger, 1983)

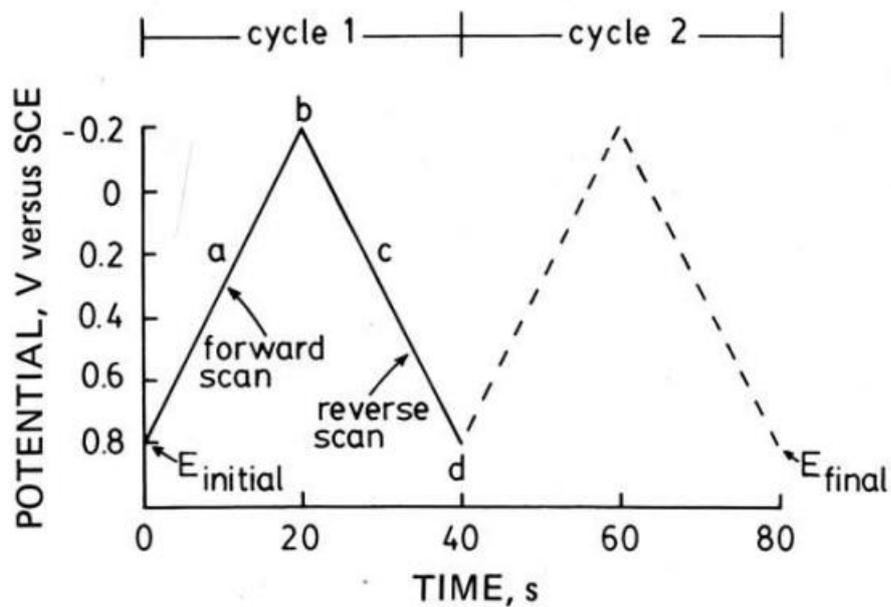


Figura 30. Señal típica de excitación de una voltamperometría cíclica. (Peter T. Kissinger, 1983)

La respuesta de corriente de un pequeño electrodo estacionario en una disolución no agitada se excita por medio de una onda triangular de voltaje como en la figura 30. Esta señal de excitación de potencial barre el potencial de electrodo

entre dos valores, algunas veces llamado “switching”.

Este ciclo de excitación generalmente se repite varias veces. Los extremos de voltaje en los cuales ocurre la inversión son llamados potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio que se escoge para un experimento dado es aquel en que ocurre la oxidación o la reducción controlada por la difusión de uno o más analitos. La dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva, dependiendo de la composición de la muestra (un barrido en dirección de potenciales más negativos se denomina barrido directo, mientras que uno en la dirección opuesta es llamado barrido inverso). Generalmente, la duración de los ciclos va de 1 s a 100 s o más.

La velocidad de barrido (v) se refleja en la pendiente de la línea de potencial inicial y del potencial de inversión.

Un sistema CV consta de una celda de electrólisis, un potencióstato, un convertidor de corriente a voltaje y un sistema de adquisición de datos (ver figura 32).

La celda de electrólisis consta de un electrodo de trabajo, un contraelectrodo, un electrodo de referencia y una solución electrolítica. El electrodo de trabajo lleva a cabo el evento electroquímico de interés. Se utiliza un potencióstato para controlar el potencial aplicado del electrodo de trabajo en función del potencial del electrodo de referencia. El potencial del electrodo de trabajo varía linealmente con el tiempo, mientras que el electrodo de referencia mantiene un potencial constante. (Elgrishi et al., 2018) El contraelectrodo conduce la electricidad desde la fuente de la señal hasta el electrodo de trabajo. El propósito de la solución electrolítica es proporcionar iones a los electrodos durante la oxidación y reducción.

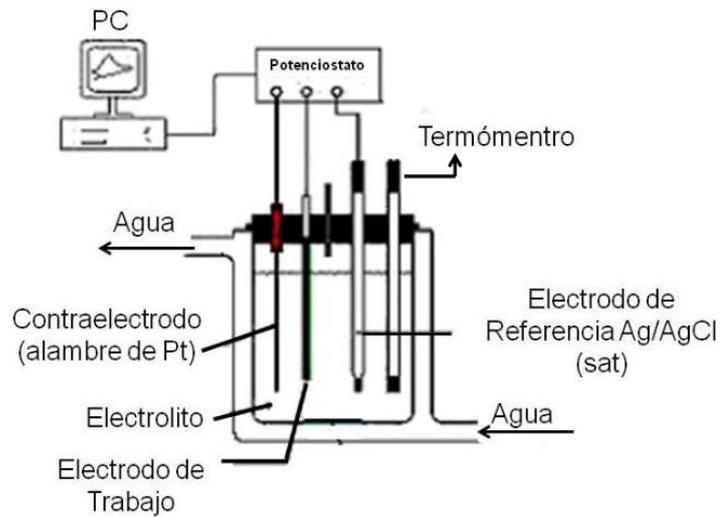


Figura 32. Sistema de voltamperometría.

Un potenciostato es un dispositivo electrónico que utiliza una fuente de alimentación de corriente continua para producir un potencial que se puede mantener y determinar con precisión, al mismo tiempo que permite introducir pequeñas corrientes en el sistema sin cambiar el voltaje. El convertidor de corriente a voltaje mide la corriente resultante y el sistema de adquisición de datos produce el voltamperograma resultante. (Skoog et al., 2001)

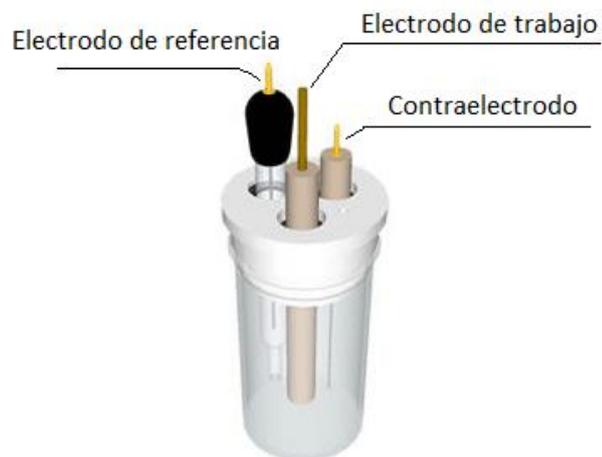


Figura 33. Configuración de 3 electrodos de una celda típica de electrólisis.

Se obtiene un voltamperograma cíclico midiendo la corriente en el electrodo de trabajo durante los barridos de potencial. La figura 34 muestra un voltamograma cíclico resultante de la reducción y oxidación de un solo electrón.

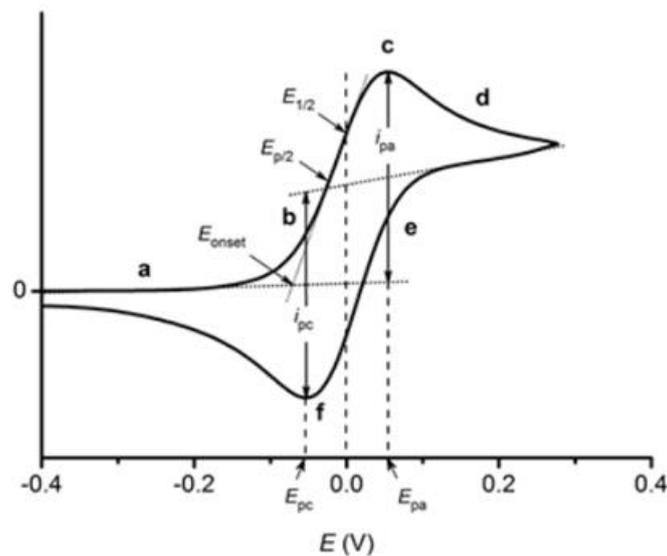


Figura 34. Señal de respuesta en voltametría cíclica.

Se observa en la figura 34 que a medida que se alcanza el inicio de la oxidación (E_{onset}), la corriente aumenta exponencialmente (b) a medida que el analito se oxida en la superficie del electrodo de trabajo. La corriente alcanza el pico máximo en el punto (c).

La inversión de escaneo a potenciales negativos (escaneo reductivo) continúa oxidando el analito hasta que el potencial aplicado alcanza el valor en el que el analito oxidado que se ha acumulado en la superficie del electrodo puede volver a reducirse (e).

El proceso de reducción refleja el de oxidación, solo que con una dirección de exploración opuesta (f). Las corrientes máximas anódica y catódica deben ser de igual magnitud, pero con signo opuesto, siempre que el proceso sea reversible (y si el pico catódico se mide en relación con la línea de base después del pico anódico). (Bard & Faulkner, 2001) (Skoog et al., 2001)

ANEXO 4

VOLTAMPEROMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (DPV)

La voltamperometría de pulso diferencial (DPV) es una técnica de pulso que está diseñada para minimizar las corrientes de carga de fondo. En DPV, se elige un valor de potencial base en el que no hay reacción faradaica y se aplica al electrodo. El potencial base aumenta entre pulsos con incrementos iguales (figura 34). La corriente se mide inmediatamente antes de la aplicación del pulso y al final del pulso, y se registra la diferencia entre ellos (Simões & Xavier, 2017). Los pulsos cortos hacen que la técnica sea muy sensible, lo que le otorga una ventaja de precisión de al menos una parte por billón durante un análisis.

Estos puntos de muestreo se seleccionan para permitir el decaimiento de la corriente no faradaica (de carga). La diferencia entre las mediciones de corriente en estos puntos para cada pulso se determina y se grafica contra el potencial base. (Kounaves, 2015)

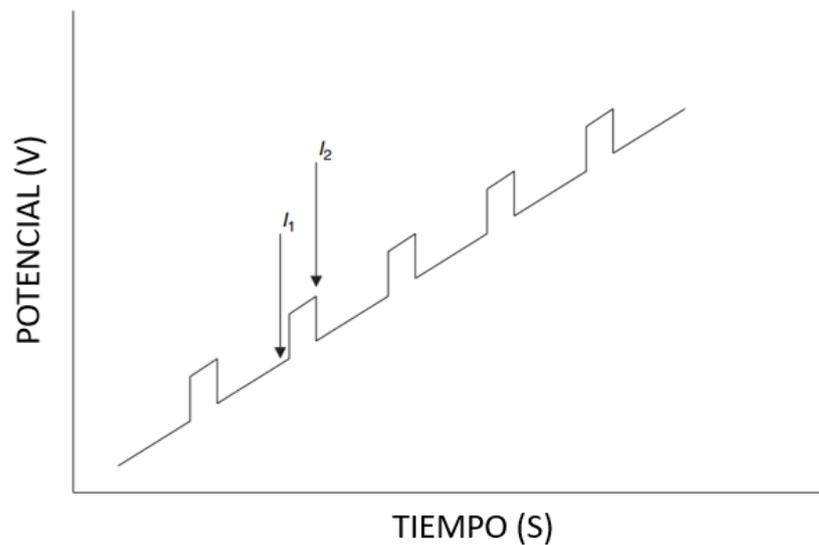
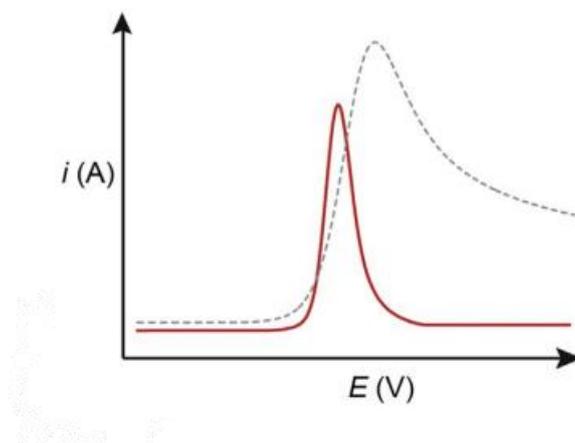


Figura 34. Perfil de variación del potencial aplicado en voltamperometría diferencial de pulsos. (Westbroek, 2005)

Esta técnica proporciona una discriminación sustancial contra la corriente de carga y proporciona una curva ideal con forma de pico (figura 35) (Drake et al.,



1978).

Figura 35. Respuesta típica de un voltamograma de pulso diferencial. (Islam & Channon, 2019)

Un sistema DPV se construye como en la figura 32, a part.

La técnica DPV es importante para la determinación de productos farmacéuticos, colorantes, insecticidas y pesticidas. En general, estos métodos ofrecen alta sensibilidad, bajo límite de detección, fácil operación y el uso de instrumentación simple. (Ni et al., 2001) (Ries et al., 2011)

BIBLIOGRAFÍA

- Abdolmohammad-Zadeh, H., Rezvani, Z., Sadeghi, G. H., & Zorufi, E. (2011). Layered double hydroxides: A novel nano-sorbent for solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.035>
- Ali Khan, A., & Alzohairy, M. A. (2010). Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. *Research Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/rjbsci.2010.565.575>
- Ayano, G. (2016). Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment*. <https://doi.org/10.4172/2471-271x.1000120>
- Banerjee, S., McCracken, S., Faruk Hossain, M., & Slaughter, G. (2020). Electrochemical Detection of Neurotransmitters. *Biosensors*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/bios10080101>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). Electrochemical Methods. In *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications* (Second).
- Barelli, L., Bidini, G., Pelosi, D., & Sisani, E. (2021). Enzymatic biofuel cells: A review on flow designs. *Energies*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/EN14040910>
- Bergh, M. S. S., Bogen, I. L., Lundanes, E., & Øiestad, Å. M. L. (2016). Validated methods for determination of neurotransmitters and metabolites in rodent brain tissue and extracellular fluid by reversed phase UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1028, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.011>
- Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: A literature survey. In *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2
- Bucher, E. S., & Wightman, R. M. (2015). Electrochemical Analysis of Neurotransmitters. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 8, 239–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040426>
- Bulmuş, V., Ayhan, H., & Pişkin, E. (1997). Modified PMMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization. *Chemical Engineering Journal*. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(96\)03156-7](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(96)03156-7)
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., & Di Filippo, M. (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. In *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.001>
- Chase, T. N., & Murphy, D. L. (1973). Serotonin and central nervous system function. In *Annual review of pharmacology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.13.040173.001145>
- Chernecky, C., & Berger, B. (2013). Laboratory Tests and Diagnostic Procedures 6th Edition. In *Elsevier Saunders, St. Louis*.
- Coleman, M. (1971). Serotonin concentrations in whole blood of hyperactive children. *The Journal of Pediatrics*. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(71\)80428-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(71)80428-6)
- D'Andrea, G., Granella, F., Perini, F., Farruggio, A., Leone, M., & Bussone, G. (2006). Platelet levels of dopamine are increased in migraine and cluster

- headache. *Headache*. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2006.00407.x>
- DA PRADA, M., & PICOTTI, G. B. (1979). CONTENT AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF CATECHOLAMINES AND 5-HYDROXYTRYPTAMINE IN HUMAN AND ANIMAL BLOOD PLATELETS: MONOAMINE DISTRIBUTION BETWEEN PLATELETS AND PLASMA. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1979.tb07878.x>
- Dean, B., Kulkarni, J., Copolov, D. L., Shrikanthan, P., Malone, V., & Hill, C. (1992). Dopamine uptake by platelets from subjects with schizophrenia: A correlation with the delusional state of the patient. *Psychiatry Research*. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(92\)90014-T](https://doi.org/10.1016/0165-1781(92)90014-T)
- Drake, K. F., Van Duyne, R. P., & Bond, A. M. (1978). Cyclic differential pulse voltammetry: A versatile instrumental approach using a computerized system. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 89(2), 231–246. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(78\)80187-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(78)80187-9)
- Eisenhofer, G., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (2004). Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. In *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.1>
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
- Folk, G. E., & Long, J. P. (1988). Serotonin as a neurotransmitter: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(88\)90193-4](https://doi.org/10.1016/0742-8413(88)90193-4)
- Glynne-Jones, P., & White, N. M. (2001). Self-powered systems: A review of energy sources. In *Sensor Review*. <https://doi.org/10.1108/02602280110388252>
- González-Sáiz, J. M., & Pizarro, C. (2001). Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Effect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on enzyme action and kinetics parameters. *European Polymer Journal*. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(00\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(00)00151-8)
- Gonzalez-Solino, C., & Di Lorenzo, M. (2018). Enzymatic fuel cells: Towards self-powered implantable and wearable diagnostics. In *Biosensors*. <https://doi.org/10.3390/bios8010011>
- Goodsell, D. S. (2006). Glucose Oxidase. *RCSB Protein Data Bank*. https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2006_5
- Grattieri, M., & Minteer, S. D. (2018). Self-Powered Biosensors. In *ACS Sensors*. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00818>
- Guadagnini, L., Mignani, A., Scavetta, E., & Tonelli, D. (2010). Ni(OH)₂ versus Ni/Al layered double hydroxides as matrices to immobilize glucose oxidase. *Electrochimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.10.024>
- Gupta, S., Ramesh, K., Ahmed, S., & Kakkar, V. (2016a). Lab-on-chip technology: A review on design trends and future scope in biomedical applications. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*. <https://doi.org/10.14257/ijbsbt.2016.8.5.28>
- Gupta, S., Ramesh, K., Ahmed, S., & Kakkar, V. (2016b). Lab-on-chip technology: A

- review on design trends and future scope in biomedical applications. In *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*.
<https://doi.org/10.14257/ijbsbt.2016.8.5.28>
- Hackney, A. C. (2017). Doping, performance-enhancing drugs, and hormones in sport: Mechanisms of action and methods of detection. In *Doping, Performance-Enhancing Drugs, and Hormones in Sport: Mechanisms of Action and Methods of Detection*.
- Haouz, A., Twist, C., Zentz, C., Tauc, P., & Alpert, B. (1998). Dynamic and structural properties of glucose oxidase enzyme. *European Biophysics Journal*.
<https://doi.org/10.1007/s002490050106>
- Holloway, F. A., & Peirce, J. M. (1998). Fundamental Psychopharmacology. In *Comprehensive Clinical Psychology*. [https://doi.org/10.1016/b0080-4270\(73\)00176-0](https://doi.org/10.1016/b0080-4270(73)00176-0)
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. In *Journal of Chemical Biology*.
<https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- Ibrahim Dincer, O. S. (2020). *Ammonia Fuel Cells* (pp. 13–32).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822825-8.00002-5>
- Islam, M. N., & Channon, R. B. (2019). Electrochemical sensors. In *Bioengineering Innovative Solutions for Cancer*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813886-1.00004-8>
- Jayamohan, H., Romanov, V., Li, H., Son, J., Samuel, R., Nelson, J., & Gale, B. K. (2017). Advances in Microfluidics and Lab-on-a-Chip Technologies. In *Molecular Diagnostics: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00011-0>
- Jeong, H., & Jeon, S. (2008). Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid by nafion and single-walled carbon nanotube film modified on carbon fiber microelectrode. *Sensors*. <https://doi.org/10.3390/s8116924>
- Kapalka, G. M. (2010). Substances Involved in Neurotransmission. In *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374927-7.00004-2>
- KEILIN, D., & HARTREE, E. F. (1952). Specificity of glucose oxidase (notatin). *The Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj0500331>
- Kjeang, E., Djilali, N., & Sinton, D. (2008). Microfluidic Fuel Cells. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, 1169–1177. https://doi.org/10.1007/978-0-387-48998-8_935
- Kjeang, E., Djilali, N., & Sinton, D. (2009). Microfluidic fuel cells: A review. In *Journal of Power Sources*. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2008.10.011>
- Kong, B., Zhu, A., Luo, Y., Tian, Y., Yu, Y., & Shi, G. (2011). Sensitive and selective colorimetric visualization of cerebral dopamine based on double molecular recognition. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(8), 1837–1840.
<https://doi.org/10.1002/anie.201007071>
- Kounaves, S. P. (2015). Voltammetric Techniques. In *Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* (pp. 709–725). <https://doi.org/10.1002/9781118684030.ch2>
- Kurian, M. A., Gissen, P., Smith, M., Heales, S. J. R., & Clayton, P. T. (2011). The monoamine neurotransmitter disorders: An expanding range of neurological

- syndromes. In *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70141-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70141-7)
- Lee, N. Y. (2013). Recent progress in lab-on-a-chip technology and its potential application to clinical diagnoses. *International Neurology Journal*. <https://doi.org/10.5213/inj.2013.17.1.2>
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D. J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., & Clavien, P. A. (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1123842>
- Li, L., Hui, K. S., Hui, K. N., Xia, Q., Fu, J., & Cho, Y. R. (2017). Facile synthesis of NiAl layered double hydroxide nanoplates for high-performance asymmetric supercapacitor. *Journal of Alloys and Compounds*. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.06.062>
- M.M., M. (2011). The Art of Immobilization Using Biopolymers, Biomaterials and Nanobiotechnology. In *Biotechnology of Biopolymers*. <https://doi.org/10.5772/23696>
- Mercado, C. P., & Kilic, F. (2010). Molecular mechanisms of sert in platelets: Regulation of plasma serotonin levels. In *Molecular Interventions*. <https://doi.org/10.1124/mi.10.4.6>
- Mignani, A., Scavetta, E., & Tonelli, D. (2006). Electrodeposited glucose oxidase/anionic clay for glucose biosensors design. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.06.041>
- Mirzaei, M., & Sawan, M. (2014). Microelectronics-based biosensors dedicated to the detection of neurotransmitters: A review. In *Sensors (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/s141017981>
- Musacchio, J. M. (1975). Enzymes Involved in the Biosynthesis and Degradation of Catecholamines. In *Biochemistry of Biogenic Amines*. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3171-1_1
- Ni, Y., Wang, L., & Kokot, S. (2001). Simultaneous determination of nitrobenzene and nitro-substituted phenols by differential pulse voltammetry and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 431(1), 101–113. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01319-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01319-2)
- Novick, S. J., & Rozzell, J. D. (2005). Immobilization of Enzymes by Covalent Attachment. In *Microbial Enzymes and Biotransformations*. <https://doi.org/10.1385/1-59259-846-3:247>
- Osinga, T. E., Korpershoek, E., De Krijger, R. R., Kerstens, M. N., Dullaart, R. P. F., Kema, I. P., Van Der Laan, B. F. A. M., Van Der Horst-Schrivers, A. N. A., & Links, T. P. (2015). Catecholamine-Synthesizing Enzymes Are Expressed in Parasympathetic Head and Neck Paraganglioma Tissue. *Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1159/000377703>
- Ou, Y., Buchanan, A. M., Witt, C. E., & Hashemi, P. (2019). Frontiers in electrochemical sensors for neurotransmitter detection: Towards measuring neurotransmitters as chemical diagnostics for brain disorders. *Analytical Methods*, 11(21), 2738–2755. <https://doi.org/10.1039/c9ay00055k>
- Özel, R. E., Hayat, A., & Andreescu, S. (2015). Recent Developments in Electrochemical Sensors for the Detection of Neurotransmitters for Applications

- in Biomedicine. *Analytical Letters*.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2014.976867>
- Parente, A. H., Marques, E. T. A., Azevedo, W. M., Diniz, F. B., Melo, E. H. M., & Filho, J. L. L. (1992). Glucose Biosensor Using Glucose Oxidase Immobilized in Polyaniline. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1007/BF02788878>
- Pazur, J. H., & Kleppe, K. (1964). The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1021/bi00892a018>
- Peter T. Kissinger, W. R. H. (1983). Cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.*, 60(9), 702.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ed060p702>
- Qi, C., Amphlett, J. C., & Peppley, B. A. (2006). Product composition as a function of temperature over NiAl-layered double hydroxide derived catalysts in steam reforming of methanol. *Applied Catalysis A: General*.
<https://doi.org/10.1016/j.apcata.2006.01.013>
- Quan-Bui, K. H. Le, Plaisant, O., Leboyer, M., Gay, C., Kamal, L., Devynck, M. A., & Meyer, P. (1984). Reduced platelet serotonin in depression. *Psychiatry Research*. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(84\)90056-8](https://doi.org/10.1016/0165-1781(84)90056-8)
- Rauf, S., Ihsan, A., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A., & Khalid, A. M. (2006). Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane. *Journal of Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.019>
- Ries, M. A. El, Salama, N. N., Toubar, S., Abd, M., Hamid, E., & Walash, M. I. (2011). *Differential Pulse Anodic Voltammetric Determination of Dapsone in Pharmaceutical Preparation Using Carbon Paste and Glassy Carbon Electrodes*. 6, 307–322.
- Roy Choudhury, A. K., Majumdar, P. K., & Datta, C. (2011). Factors affecting comfort: Human physiology and the role of clothing. In *Improving Comfort in Clothing*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-539-2.50001-6>
- Ruddell, R. G., Mann, D. A., & Ramm, G. A. (2008). The function of serotonin within the liver. In *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.01.006>
- Safdar, M., Jänis, J., & Sánchez, S. (2016). Microfluidic fuel cells for energy generation. In *Lab on a Chip*. <https://doi.org/10.1039/c6lc90070d>
- Shan, D., Yao, W., & Xue, H. (2006). Amperometric detection of glucose with glucose oxidase immobilized in layered double hydroxides. *Electroanalysis*, 18(15), 1485–1491. <https://doi.org/10.1002/elan.200603545>
- Sharaf, O. Z., & Orhan, M. F. (2014). An overview of fuel cell technology: Fundamentals and applications. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.012>
- Sharma, S., Singh, N., Tomar, V., & Chandra, R. (2018). A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes. In *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.013>
- Shen, C.-H. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, 187–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00008-0>
- Shen, M., Zhang, Z., & Ding, Y. (2016). Synthesizing NiAl-layered double hydroxide

- microspheres with hierarchical structure and electrochemical detection of hydroquinone and catechol. *Microchemical Journal*.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.08.011>
- Shukla, A. K., Raman, R. K., & Scott, K. (2005). Advances in mixed-reactant fuel cells. In *Fuel Cells*. <https://doi.org/10.1002/fuce.200400075>
- Simões, F. R., & Xavier, M. G. (2017). Electrochemical Sensors. *Nanoscience and Its Applications*, 155–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5>
- Skoog, D., West, D., & Holler, F. (2001). *Fundamentos de química analítica - Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler*.
<https://books.google.com.gt/books?id=CU7yWvK1kGQC&pg=PA511&dq=la+longitud+de+onda+aproximada+a+la+que+absorbe+cada+color+de+la+región+UV-Visible,&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwi4w7PC68nuAhXl1FkKHc48AFkQ6AEwAXoECAUQA#g#v=onepage&q=la+longitud+de+onda+aproximada>
- Tohgi, H., Abe, T., Takahashi, S., Takahashi, J., Nozaki, Y., Ueno, M., & Kikuchi, T. (1993). Monoamine metabolism in the cerebrospinal fluid in Parkinson's disease: relationship to clinical symptoms and subsequent therapeutic outcomes. *Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section*.
<https://doi.org/10.1007/BF02260911>
- Tsele, T. P., Adekunle, A. S., Fayemi, O. E., & Ebenso, E. E. (2017). Electrochemical detection of Epinephrine using Polyaniline nanocomposite films doped with TiO₂ and RuO₂ Nanoparticles on Multi-walled Carbon Nanotube. *Electrochimica Acta*, 243, 331–348. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.05.031>
- Valente, J. S., Sánchez-Cantú, M., Lima, E., & Figueras, F. (2009). Method for large-scale production of multimetallic layered double hydroxides: Formation mechanism discernment. *Chemistry of Materials*.
<https://doi.org/10.1021/cm902377p>
- Vardanyan, R. S., & Hruby, V. J. (2006). Adrenergic (Sympathomimetic) Drugs. In *Synthesis of Essential Drugs*. <https://doi.org/10.1016/b978-044452166-8/50011-x>
- Walker, J. M., & Trevan, M. D. (2003a). Enzyme Immobilization by Adsorption. In *New Protein Techniques*. <https://doi.org/10.1385/0-89603-126-8:481>
- Walker, J. M., & Trevan, M. D. (2003b). Enzyme Immobilization by Covalent Bonding. In *New Protein Techniques*. <https://doi.org/10.1385/0-89603-126-8:495>
- Walker, J. M., & Trevan, M. D. (2003c). Enzyme Immobilization by Entrapment. In *New Protein Techniques*. <https://doi.org/10.1385/0-89603-126-8:491>
- Wang, Y., & Caruso, F. (2005). Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. *Chemistry of Materials*.
<https://doi.org/10.1021/cm0483137>
- Westbroek, P. (2005). Electrochemical methods. *Analytical Electrochemistry in Textiles*, 37–69. <https://doi.org/10.1533/9781845690878.1.37>
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2001). Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin*. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00615-3)
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. In *Nature*.

- <https://doi.org/10.1038/nature05058>
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4>
- Worley, J. (2017). The role of pleasure neurobiology and dopamine in mental health disorders. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*. <https://doi.org/10.3928/02793695-20170818-09>
- Wu, H., Denna, T. H., Storkersen, J. N., & Gerriets, V. A. (2019). Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. In *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.015>
- Xiao, X., Xia, H. Q., Wu, R., Bai, L., Yan, L., Magner, E., Cosnier, S., Lojou, E., Zhu, Z., & Liu, A. (2019). Tackling the Challenges of Enzymatic (Bio)Fuel Cells. In *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00115>
- Yu, H., Hebling, C., & Revathi, S. (2016). Fuel Cells: Microsystems. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.01727-6>
- Yuan, C. J., Hsu, C. L., Wang, S. C., & Chang, K. S. (2005). Eliminating the interference of ascorbic acid and uric acid to the amperometric glucose biosensor by cation exchangers membrane and size exclusion membrane. *Electroanalysis*. <https://doi.org/10.1002/elan.200503359>
- Zhang, D. H., Yuwen, L. X., & Peng, L. J. (2013). Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. In *Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2013/946248>
- Zhang, L., Hui, K. N., San Hui, K., & Lee, H. (2016). High-performance hybrid supercapacitor with 3D hierarchical porous flower-like layered double hydroxide grown on nickel foam as binder-free electrode. *Journal of Power Sources*. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.04.010>
- Zhang, X., Zhang, L., Zhai, Q., Gu, W., Li, J., & Wang, E. (2016). Self-Powered Bipolar Electrochromic Electrode Arrays for Direct Displaying Applications. In *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00054>
- Zhang, Y., Ge, S., & Yu, J. (2016). Chemical and biochemical analysis on lab-on-a-chip devices fabricated using three-dimensional printing. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.008>
- Zhao, Y., DeCuyper, M., & LeDoux, M. S. (2008). Abnormal motor function and dopamine neurotransmission in DYT1 Δ GAG transgenic mice. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.027>
- Zoghbi, N., Ojeda, L., Noguera, N., Yépez, A., Camargo, H., & Triana-Alonso, F. (2008). Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos producida en medios a base de fertilizantes y azúcar industrial. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*.
- Zoldák, G., Zubrik, A., Musatov, A., Stupák, M., & Sedlák, E. (2004). Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406883200>

